

## 类植物乳杆菌的耐酸、耐胆盐及降胆固醇特性

刘长建, 刘秋\*, 姜波

(大连民族学院生命科学学院, 大连 116600)

**摘要** 【目的】研究了类植物乳杆菌 II 32 的酸、胆盐耐受性和胆固醇去除能力, 并通过菌株生长和胆固醇去除的关系探讨可能的机理。【方法】菌株 II 32 生长在高胆固醇 MRS 培养基中, 胆固醇的检测通过气相色谱法。检测菌株在不同生长阶段对胆固醇的去除情况。【结果】菌株 II 32 具有酸耐受性、胆盐耐受性和一定的胆固醇清除能力。菌株在 pH2.0 培养 2 h 后仍能达到  $10^4$  cfu/mL; 加胆盐(0.3% ~ 0.4%)对菌株生长量达到 OD 值 0.6 的时间延迟在 0.5 h 以内, 热杀死的和休眠的细胞能去除很少的胆固醇, 分别是 5.64、5.90 mg/g 细胞干重, 而生长的细胞去除的胆固醇达到 16.98 mg/g 细胞干重。另外, 研究表明胆固醇去除与菌体的生长有一定的相关性。【结论】菌株 II 32 去除胆固醇可能的机理是菌体对胆固醇的吸附及菌体在生长过程中对胆固醇的吸收利用, 为此该菌株具有添加到食品中来降低血液胆固醇的潜能。

**关键词**: 类植物乳杆菌; 酸耐受性; 胆盐耐受性; 胆固醇清除

**中图分类号**: Q935      **文献标识码**: A      **文章编号**: 0001-6209(2009)09-1176-04

自 20 世纪 30 年代有研究认为“血管壁增厚即动脉粥样硬化症是不正常胆固醇代谢的结果”, 已有越来越多的研究表明胆固醇与冠心病、高血脂等心血管疾病间有关联<sup>[1]</sup>。一般来说, 血胆固醇浓度每上升 1%, 冠心病死亡率则上升 2%。因而, 保持血液中胆固醇浓度在正常范围内对于预防动脉粥样硬化和心脑血管疾病是至关重要的。

近年来大量体内外试验结果表明, 乳酸菌具有较强的降胆固醇作用, 适量饮用乳酸菌及乳酸菌发酵食品可有效降低由消化道进入血液的胆固醇含量, 从而减少心血管疾病的发病几率<sup>[2]</sup>。国内外对嗜酸乳杆菌等乳酸菌降胆固醇潜能和作用机理进行了广泛的研究, 可能的降胆固醇机理包括: 游离胆酸盐与胆固醇的共沉淀作用; 细菌的酶对胆酸盐的去结合作用; 细菌对胆固醇的吸收等, 但至今尚无定论<sup>[3]</sup>。类植物乳杆菌是人体消化道中重要的益生乳

酸菌, 我国对其降胆固醇菌株的相关报道主要集中在菌株的筛选<sup>[4]</sup>, 作用机理的研究亟待加强。本研究就其在模拟胃肠环境的存活情况, 并通过菌体生长与去除胆固醇能力的关系对胆固醇体外去除机理作了初步研究。希望能提供一些研究乳酸菌降胆固醇行为的方法和数据资料, 以及更好地发挥其降低由消化道进入血液胆固醇的作用, 为产品的开发提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要仪器和试剂

气相色谱仪(GC-2010, 日本岛津公司), 冷冻干燥机(Freezezone 4.5, 美国 Labconco 公司), 分光光度计(UV-2450, 日本岛津公司), 高速冷冻离心机(CF15RX, 日本日立公司)等。胆固醇、正己烷、氢氧化钾等均为国药集团化学试剂公司分析纯产品。

基金项目: 国家自然科学基金(30671398); NSFC-KOSEF 国际合作项目(30711140389)

\* 通信作者。Tel: +86-411-87656045; E-mail: liuqi@dlun.edu.cn

作者简介: 刘长建(1975-), 男, 辽宁普兰店人, 工程师, 工学硕士, 主要从事应用微生物研究。E-mail: l3cj@dlun.edu.cn

收稿日期: 2009-03-06; 修回日期: 2009-04-27

**1.1.1 培养基与菌种**: ① MRS 培养基<sup>[5]</sup>。② 高胆固醇 MRS, 即胆固醇胶束液体培养基 (0.12 mg/mL, 以 1000 mL 计): 0.12 g 胆固醇、0.24 g 牛胆盐、0.12 g 蔗糖酯、1.2 mL 吐温 80 搅拌均匀, 再加 5 mL 冰乙酸加热溶解。超声 15 min 后, 0.45  $\mu\text{m}$  膜过滤并快速加入到 MRS 液体培养基中, 边加入边搅拌, 使其形成均匀稳定的胶体溶液<sup>[6]</sup>。③ 菌株的活化: *Lactobacillus paraplantarum* II 32 由本实验室分离鉴定<sup>[5]</sup>, 按 1% 接种量接种于 MRS 液体培养基 (10 mL) 37 $^{\circ}\text{C}$  静置培养过夜, 连续两次, 备用。

## 1.2 胆固醇的测定

采用气相色谱方法, 氢火焰离子化检测器 (FID) 测定, 色谱条件为: Rtx-1 毛细管色谱柱 (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ), 汽化室温度为 280 $^{\circ}\text{C}$ , 柱箱起始温度为 200 $^{\circ}\text{C}$ , 程序升温 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  至 260 $^{\circ}\text{C}$ , 检测器温度为 300 $^{\circ}\text{C}$ , 以氮气为载气, 总流速为 20.1 mL/min, 柱流速为 0.20 mL/min, 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 分流比为 10:1。胆固醇标准溶液 (0.2 mg/mL) 分别稀释到 10~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 8 个浓度, 每个浓度进样 5 次, 取其平均值。以色谱峰面积为 Y, 标准样品溶液浓度为 X, 建立胆固醇工作曲线的外标方程为:

$Y = 418473X - 908.09$ ,  $r = 0.9981$ , 结果表明, 在给定的浓度范围内, 线性关系良好。

## 1.3 发酵液中胆固醇的提取

菌液 5 mL 离心, 取 1 mL 上清加入 5 mL KOH (0.55 mol/L 甲醇溶液) 提取胆固醇, 具体方法见 Psomas<sup>[6]</sup> 的报道。然后进行色谱分析。

## 1.4 耐酸试验

将活化菌液按 10% 接种量分别接种于低 pH 值 (pH2) 的 MRS 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$  静置培养, 分别在 0 h、0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 时取装有发酵液的试管。为防止细胞呈链状可超声 5 s 后, 采用无菌水以 10 倍递减稀释至适宜梯度, 平板计数。平行 3 次<sup>[7]</sup>。

## 1.5 胆汁耐受试验

将活化菌液按 1% 接种量分别接入含 0.3%、0.4% 牛胆盐 (m/v) 的 MRS 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$  静置培养, 分别在 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 时 620 nm 测试发酵液的 OD 值。平行 3 次<sup>[8]</sup>。

## 1.6 死的、休眠的和活的细胞对胆固醇的清除试验

将活化菌液作以下三种处理 (1) 121 $^{\circ}\text{C}$  15 min 热杀死, 收集菌体 (6000 r/min, 10 min 4 $^{\circ}\text{C}$ ), 等体积无菌水洗两次, 接种于等体积的高胆固醇 MRS 培养基。(2) 直接收集菌体, 等体积无菌水洗两次, 悬浮于等体积的高胆固醇磷酸盐缓冲液 (胆固醇 0.12 mg/mL, 磷酸 0.05 mol/L, pH6.4)。(3) 直接按

5% 接种量接种于高胆固醇 MRS 培养基。各处理分别平行 3 次, 37 $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h 后, 取发酵液 5 mL 离心, 沉淀用等体积无菌水洗两次, 真空冷冻干燥后称细胞干重<sup>[9]</sup>。上清液测胆固醇含量, 按以下公式计算:

$$\text{胆固醇清除量} = (C_0 - C_{24})(W_{24} - W_0)$$

式中的  $C_0$ 、 $C_{24}$  分别代表起始和 24 h 时培养基中胆固醇的浓度,  $W_0$ 、 $W_{24}$  分别代表起始和 24 h 时细胞干重。

## 1.7 菌体生长过程中胆固醇含量的变化

将活化菌液按 2% 接种量分别接种 MRS 和高胆固醇 MRS 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h。每隔 3 h 测定细胞的生长量和发酵液的胆固醇含量。

# 2 结果

## 2.1 菌株的耐酸性

如表 1 所示, 菌株在低 pH 值 (pH2) 处理 1.5 h 后, 细胞数量明显降低。但 2 h 后, 活菌数依然大于  $10^4$ , 说明该菌株对低 pH 值有一定的耐受性。

表 1 低 pH 值 (2.0) 对乳酸菌 II 32 生存的影响

Table 1 Effect of low pH (2.0) on viability of strains II 32

Test	Viable cell count/(log cfu/mL)				
	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
1	8.53	9.46	8.69	6.61	5.33
2	8.44	8.59	8.20	5.24	4.54

## 2.2 菌株的耐胆盐性

从图 1 可以看出, 乳酸菌 II 32 在含不同浓度胆盐的培养基中均能生长, 培养 6 h 后, 0.4% 胆盐比 0.3% 的对菌株的抑制作用略强, 但抑制的差别不明显。不同浓度胆盐对菌株生长量达到 OD 值 0.6 的时间延迟都在 0.5 h 以内, 说明菌株对胆盐有耐受性。

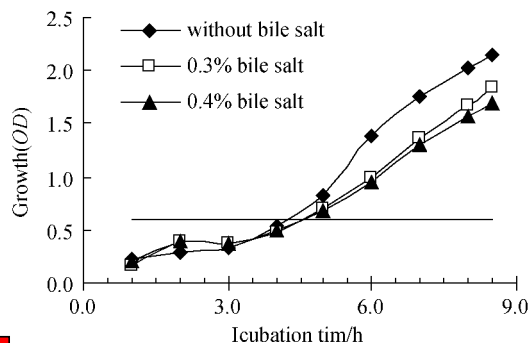
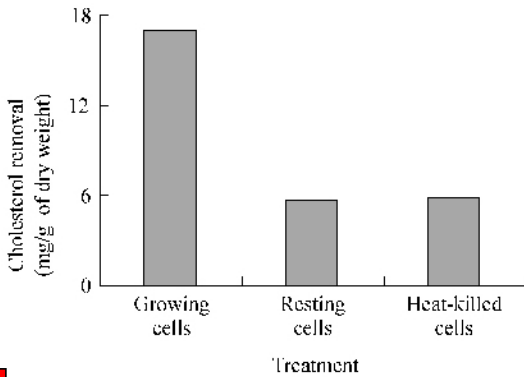


图 1 胆盐对乳酸菌 II 32 生长的影响

Fig. 1 Effect of bile salt on viability of strains II 32.

**2.3 生长、休眠和热杀死菌体对胆固醇的清除作用** 试验结果表明 (图 2), 处于生长状态的乳酸菌

II 32 具有较强的去除胆固醇能力,去除胆固醇达到了 16.98 mg/g 细胞干重。热杀死的和休眠的细胞也能去除胆固醇,但去除能力较低,分别为 5.64、5.9 mg/g 细胞干重。

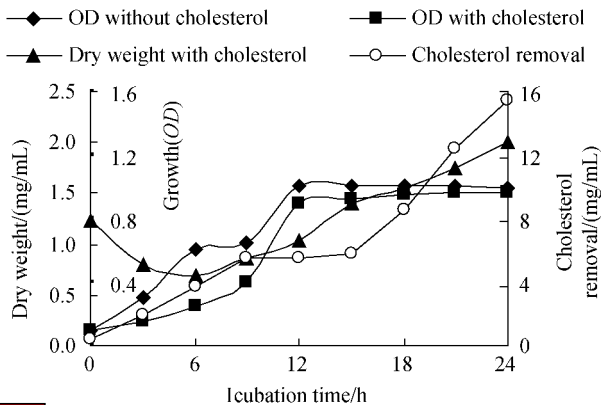


2 生长的、休眠的和死的菌株对胆固醇的去除作用

Fig. 2 Cholesterol removal by growing, resting, and heat-killed cells.

#### 2.4 菌体生长过程中胆固醇含量的变化

如图 3 所示,与培养液中不含胆固醇对照试验相比,乳酸菌 II 32 在高胆固醇培养基中生长缓慢,但差别不大。菌株在胆固醇存在时的前 9 h 生长缓慢,而在 9 h ~ 12 h 开始快速生长,12 h 后 OD 值保持恒定。培养液中胆固醇含量在前 9 h 缓慢减少,在 9 h ~ 15 h 胆固醇含量基本保持恒定,15 h 后培养液中胆固醇含量迅速减少,与菌株的生长有一定的相关性。而培养液中含胆固醇时细胞干重在 6 h 略有降低,在 6 h ~ 15 h 有相对平稳的增加,15 h 后有较快的增长。整个过程与胆固醇清除的快慢相互影响,前 15 h 胆固醇的去除较慢,之后有一个较快增加。



3 乳酸菌 II 32 的生长和胆固醇清除模式

Fig. 3 Growth profiles in medium with cholesterol, and without cholesterol and cholesterol assimilation patterns.

### 3 结论和讨论

高水平的血清胆固醇能引起冠状心脏病,因而

能降低血清胆固醇水平的乳酸菌研究得到了广泛关注<sup>[2]</sup>。而乳酸菌制品要作为微生物制剂或生物活性食品进入人体,那么菌株在人体胃肠道内存活能力的高低就直接关系到产品能否发挥其促进健康作用,也就是要求乳酸菌能够耐受胃肠道的酸和胆盐,其中包括胃液中的低 pH 值和小肠中的胆汁盐等。食物一般在胃部停留大约 1 h ~ 2 h, pH 值约在 1.5 ~ 3.0 之间。实验结果表明乳酸菌 II 32 在 pH 2.0 处理 2 h 后,活菌数仍能达到  $10^4$  cfu/mL。Ding 等研究的酸耐受菌株嗜酸乳杆菌和唾液乳杆菌经低 pH 值 (pH 2.0) 处理 2 h 后的活菌数略高于  $10^4$  cfu/mL<sup>[7]</sup>。对比可以说明乳酸菌 II 32 具有较强的耐酸能力,能够保证一定数量的活菌体顺利通过胃酸环境到达肠内。小肠是人体胆固醇合成和吸收的重要场所,同时也是乳酸菌发挥其降胆固醇作用的主要部位,正常人体小肠中胆汁盐含量在 0.03% ~ 0.3% 范围内波动。由耐胆汁盐试验可以看出,乳酸菌 II 32 具有较强的抗胆汁盐能力,菌体到达小肠部位能够存活并生长。

虽有许多研究指出乳杆菌在生长过程中能清除培养基中的胆固醇,但其机理还不明确。Gilliland 认为培养基中的胆固醇含量减少是由于乳杆菌菌体的同化胆固醇作用<sup>[10]</sup>。研究结果表明乳酸菌 II 32 的热杀死和休眠细胞能通过细胞表面的吸附而去除一定的胆固醇,这暗示了细菌即使不能生长了、死了也能去除胃肠道内的胆固醇。而生长的细胞有更高的胆固醇去除能力表明胆固醇是通过细胞的生长,也就是被细胞吸收利用而去除。

菌体生长过程中胆固醇含量变化的试验结果显示,该菌株在培养 24 h 后,消除培养液中的胆固醇为 15.45 mg/mL,低于已报道的嗜酸乳杆菌<sup>[9]</sup>的胆固醇消除量 20 mg/mL。胆固醇清除与细胞生长有一定的相关性。15 h 前菌体生长较慢,胆固醇的去除可能以细胞对胆固醇的吸附为主;而之后随着菌体生长的加快,细胞对胆固醇清除也加快了,说明可能以菌体对胆固醇的生长利用为主。这进一步证实了胆固醇清除是通过细胞的吸附和吸收作用。当然,胆固醇清除与生物量水平并不是完全一致的,因此需要进一步的研究。

总之,本研究的类植物乳杆菌 II 32,具有较强的耐酸、耐胆盐和降胆固醇等特性,一旦通过食物进入体内,可对外源性的胆固醇以及肝脏排到肠管中的胆固醇有脱除作用,从而减少肠壁对胆固醇的吸收,对于改善机体血脂有一定的意义。加之该菌株还有抑制多种腐败菌生长、增加食品货架期的特性<sup>[5]</sup>,因

此具有重要的应用价值。至于乳酸菌在体内的降胆固醇作用是否也存在其它的作用机制如共沉淀作用等共同作用或以某一种作用机制为主的形式,至今尚无明确的定论,有待于深入研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Park YH , Kim JG , Shin YW , et al. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. *Journal Microbiology and Biotechnology* 2007 ,17( 4 ) :655 - 662 .
- [ 2 ] Lin SY , Ayres JW , Winkler WJ , et al. Lactobacillus effects on cholesterol in vitro and in vivo results. *Journal of Dairy Science* ,1989 ,72( 11 ) :2885 - 2899 .
- [ 3 ] Liang MT , Shah NP. Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005 ,71( 4 ) :1745 - 1753 .
- [ 4 ] 赵佳锐 , 范晓兵 , 杭晓敏 , 等. 人体肠道益生菌体外降胆固醇活性研究. *微生物学报* ( *Acta Microbiologica Sinica* ) 2005 ,45( 6 ) :920 - 924 .

- [ 5 ] 刘长建 , 徐洪涛 , 权春善 , 等. 乳酸菌素生产菌的分离与鉴定. *食品与发酵工业* ( *Food and Fermentation Industries* ) 2005 ,31( 7 ) :26 - 30 .
- [ 6 ] Psomas EI , Fletouris DJ , Litopoulou-Tzanetaki E , et al. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese. *Journal of Dairy Science* , 2003 ,86( 11 ) :3416 - 3422 .
- [ 7 ] Ding WK , Shah NP. Acid , bile , and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Food Microbiology and Safety* 2007 ,72( 9 ) :446 - 450 .
- [ 8 ] Pereira DI , Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and Bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 2002 ,68( 9 ) :4689 - 4693 .
- [ 9 ] Liang MT , Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of Lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science* 2005 ,88( 1 ) :55 - 66 .
- [ 10 ] Gilliland SE , Nelson CR , Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* . *Applied and Environmental Microbiology* ,1985 ,49( 2 ) :377 - 381 .

## Acid and bile tolerance and cholesterol reduction ability of *Lactobacillus paraplantarum*

Changjian Liu , Qiu Liu\* , Bo Jiang

( College of Life Science , Dalian Nationalities University , Dalian 116600 , China )

**Abstract** [ **Objective** ] We studied the acid and bile tolerance of *Lactobacillus paraplantarum* II 32 , and examined the possible mechanisms of cholesterol reduction. [ **Methods** ] Strain II 32 was incubated in MRS ( de Man , Rogosa , Sharpe ) broth supplemented with cholesterol , and the cholesterol in medium was determined using gas chromatography. We examined cholesterol reducing ability under different conditions , and the relation between growth and cholesterol reduction of strain II 32. [ **Results** ] Strain II 32 showed acid resistance , bile salt tolerance and the cholesterol-reducing ability. The results indicated that strain II 32 survived at pH2 after 2 h culture and the living bacterial number could reach  $10^4$  cfu/mL. In addition , the growth of strain II 32 was delayed less than 0.5 h in MRS broth with 0.3% ~ 0.4% bile salt , when the absorbance value both increased to 0.6 unit. Cholesterol removed by dead and resting cells were 5.64 and 5.90 mg/g of dry weight compared with growing cells , which was 16.98 mg/g of dry weight. Cholesterol removal was greatly associated with growth of the bacteria. The possible mechanisms for removal of cholesterol from media were proposed : assimilation of cholesterol during growth , and binding of cholesterol to the cell surface. [ **Conclusion** ] Strain II 32 may be promising candidates for use as a dietary adjunct to lower serum cholesterol in vivo.

**Keywords** : *Lactobacillus paraplantarum* ; acid tolerance ; bile tolerance ; cholesterol removal

( 本文责编 : 王晋芳 )