

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(11): 1438 - 1444; 4 November 2009  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 泡菜、传统腊肠中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定

汪晓辉, 于平, 励建荣\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310035)

**摘要:**【目的】筛选具有降胆固醇功能的乳酸菌菌株,为乳酸菌体外、体内的降胆固醇生理特性和机理研究奠定基础。【方法】以碳酸钙-MRS 选择性培养基(Calcium Carbonate-Man Rogosa and Sharp Medium)从中国传统食品泡菜、腊肠中筛选乳酸菌,应用改良的胆固醇筛选培养基筛选具有较高降胆固醇能力的乳酸菌菌株,并研究其耐酸性,耐胆盐活性,生长曲线及产酸特性;结合菌落形态学、接触酶反应、革兰氏染色、碳水化合物微量鉴定管及 16SrRNA 寡核苷酸碱基序列分析鉴定菌株。【结果】筛选得到的两个菌株 LpT1 和 LpT2 胆固醇降解率分别达到 49.11% 和 50.03%,且呈现了较好的耐酸性和耐胆盐活性,其中 LpT1 在第 14 小时开始进入对数生长期,在第 22 小时进入生长稳定期,LpT2 在第 12 小时进入对数生长曲线,第 20 小时进入稳定期;它们都能在 pH2.0 的 MRS 培养基中存活至少 4 h,在含 0.2% 胆盐的 MRS 培养基中生长良好,经鉴定均为植物乳杆菌。【结论】筛选得到的植物乳杆菌具有较高的胆固醇降解率,同时表现了较强的耐酸、耐胆盐活性,具有重要的生产应用价值,为后续的体内活性、机理研究提供了原始菌株并奠定了良好的基础。

**关键词:** 降胆固醇; 乳酸菌; 16SrRNA; 鉴定

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1438-07

高血压、动脉粥样硬化、冠心病等心血管疾病已严重威胁着人类的健康,高胆固醇血症(Hypercholesterolemia)被认为是引起众多心血管疾病的重要因素之一,甚至是导致死亡的首要因素,而食物中的胆固醇与血液中的胆固醇含量呈正相关,因此降低食品或人体血清中的胆固醇含量是目前科学研究的热点之一。1963 年 Shaper 等<sup>[1]</sup>发现非洲 Samburu 和 Masai 部落的人大量饮用由乳酸菌发酵的乳制品后,其体内血清胆固醇的含量相对较低,国内外大量研究也表明服用乳酸菌(Lactic acid bacteria)或其制品,有助于降低血清胆固醇<sup>[2]</sup>。国内一些学者研究发现胆固醇代谢的紊乱直接与肠道内菌群调节能力的减弱和对胆固醇还原能力的下降有关<sup>[3-5]</sup>。Gilliland 等<sup>[6]</sup>证实了菌体对胆固醇具有

吸收作用, Frank<sup>[7]</sup> 和 Walker<sup>[8]</sup> 等同时指出共沉淀去除胆固醇,胆固醇的溶解度取决于胆盐的溶解度,胆盐转化成游离胆酸后,容易吸附到膳食成分和菌体上,由于溶解度下降致使胆固醇共沉淀析出。Dietschy<sup>[9]</sup>发现在体内,胆固醇是胆酸合成的前体,由于胆酸的减少,胆固醇便转化为胆酸来补足因排出体外而损失的胆酸,因此加速了胆固醇的代谢,引起胆固醇浓度的降低。本文旨在筛选出具有高效降解胆固醇功能的乳酸菌,综合运用菌落形态学、生理生化实验和分子生物学技术对其进行鉴定,为后续研究胆固醇体外、体内降解机制提供重要的基础材料,并为开发新型的乳酸菌制剂或低胆固醇食品提供理论基础。

**基金项目:**“十一五”国家科技支撑计划重点项目“功能性食品的研制和开发”之“食品功能因子高效分离与制备关键技术的研究”(批准号:2006BAD27B03)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-88056656; E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn

**作者简介:**汪晓辉(1984-),男,浙江临海人,硕士研究生,研究方向微生物学。E-mail: wxh\_tony@163.com

**收稿日期:**2009-04-13; **修回日期:**2009-06-19

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要材料:** 泡菜: 海宁光明蔬菜有限公司; 传统腊肠: 浙江杭州万隆肉制品有限公司;

**1.1.2 培养基:** 液体、固体 MRS 培养基: Merck Chemicals Ltd.; 碳酸钙-MRS 固体培养基: MRS 中加入 3% 的碳酸钙, 混匀。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 胆固醇, 牛胆盐, 乳酸标准样品: Sigma-Aldrich Co., Ltd., China; 溶菌酶、蛋白酶 K、16S rRNA 的 PCR 扩增引物<sup>[10]</sup> 购自上海生工生物工程技术有限公司; 其他试剂: 均为分析纯, 购自华东医药股份有限公司。HBPX220 PCR 自动系列分析仪: Hybaid Co., Ltd.; 水平电泳装置, 凝胶成像系统: BIO-RAD; A1100 高效液相色谱仪: Agilent Technologies; 全能台式高速冷冻离心机: Biofuge Stratos; UV-2550 UV-Visible Spectrophotometer: Shimadzu Corporation; YQX-II 型厌氧培养箱: 上海博泰实验设备有限公司。氮气吹干仪: Organomation Associates, Inc.

### 1.2 乳酸菌初筛

用无菌水清洗泡菜、腊肠表面并收集清洗液, 平板浇注法接种在碳酸钙-MRS 琼脂平板上, 37℃ 厌氧培养 48 h, 选取有溶钙圈的菌落, 然后在 MRS 琼脂平板上多次划线纯化, 直至整个平板上的菌落形态一致, 挑取单菌落到 MRS 液体培养基增菌培养 24 h, 转入 4℃ 冰箱储存备用。

### 1.3 邻苯二甲醛法测定胆固醇含量<sup>[11]</sup>

取 1 mL 样品, 加入 3 mL 95% 乙醇和 2 mL 50% 氢氧化钾, 旋涡振荡混匀。于 60℃ 下恒温水浴 10 min, 冷却后加入 5 mL 正己烷, 旋涡振荡萃取 1-2 min, 加入 2 mL 蒸馏水, 振荡均匀, 静置分层。取 2 mL 上层正己烷, 60℃ 水浴氮气吹干, 加入 4 mL 0.5 mg/mL 邻苯二甲醛溶液和 2 mL 浓硫酸, 显色反应 20 min, 于 553 nm 处测定吸光度值。

### 1.4 降胆固醇培养基的制备

根据 Razin 等<sup>[12]</sup> 提供的方法制备胆固醇胶束, 作为高胆固醇培养液中的胆固醇源添加到 MRS 培养基中, 用于以下的实验, 当天使用。

### 1.5 降胆固醇乳酸菌的体外筛选

将乳酸菌接种于 MRS 液体培养基, 37℃ 静置培养 12 h 转接 3 次活化后, 按 2% (v/v) 接种量接种于 5 mL 降胆固醇筛选培养基中, 摇匀后立即取样 1 mL, 27 × g 离心 5 min, 取上清液用邻苯二甲醛比色

法测定胆固醇含量。接种后的发酵液 37℃ 静置培养 48 h 后用同样方法测定上清中胆固醇含量, 做多组平行求平均值。

胆固醇的降解率:

$$V = \frac{B - A}{B} \times 100\%$$

式中: A 为各实验菌株发酵后的培养液 553 nm 处的吸光度值。

B 为空白对照 553 nm 处的吸光度值。

### 1.6 发酵液中乳酸的定性定量研究

采用 Agilent A1100 高效液相色谱 (HPLC) 仪, 色谱柱 Agilent ZORBAX 80A Extend-C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm, 柱温 40℃, 流动相为 pH2.3 的 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液, 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 210 nm。依据乳酸标准品、发酵液、未接种的发酵液保留时间定性, 外标法定量。

### 1.7 菌株耐酸性研究

调整活化的菌株活菌数约为  $2.0 \times 10^7$  cfu/mL, 接种于 pH 值为 1.5、2.0、3.0 的 MRS 培养基中, 在培养后第 0、2、4、6、8 小时梯度稀释平板法测定乳酸菌活菌数, 做 5 个平行求平均值。以时间为横坐标, 单位菌落总数对数值为纵坐标绘制耐酸性曲线。

### 1.8 菌株耐胆盐性质研究

调整活化的菌株活菌数约为  $2.47 \times 10^7$  cfu/mL 接种于分别含有 0.1%、0.2%、0.3% 牛胆盐的 MRS 培养基中, 于培养后第 0、2、4、6、8、10、12 小时梯度稀释平板法测定乳酸活菌数, 做 5 个平行求平均值。以时间为横坐标, 单位菌落总数对数值为纵坐标绘制耐胆盐活性曲线。

### 1.9 菌株生长曲线、产酸特性测定

调整活化好的菌株初始细菌浓度约为  $10 \times 10^4$  cfu/mL 按 2% 的接种量接种于 5 mL MRS 液体培养基中, 37℃ 培养, 每隔 2 h 比浊法 600 nm 处测定细菌细胞生长量和 pH 值, 直到稳定期为止。以培养时间为横坐标, 对应的吸光度值、pH 值为纵坐标绘制生长曲线和产酸特性图。

### 1.10 菌株形态学观察、生理生化试验

记录平板上的菌落形态, 革兰氏染色、过氧化氢酶试验、吲哚试验、以及碳水化合物微量生化鉴定管反应, 参照《常用细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup> 中相应的指标比对鉴定。

### 1.11 16S rRNA 分子生物学鉴定

细菌基因组 DNA 的抽提, 参照 Marmur<sup>[14]</sup> 文种的方法提取。以抽提的 LpT1、LpT2 细菌 DNA 组作为

PCR 扩增的模板,用于 16S rRNA PCR 扩增的引物为一对通用引物,正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3'; 反向引物: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC GCA-3'。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)为: 10  $\times$  Taq Buffer 5  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L,浓度为 10  $\mu$ mol/L 的引物各 1  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L dNTP 1  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L,超纯水 40.5  $\mu$ L,混匀 5 min。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 44 s,52 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 10 mL 1% 琼脂糖电泳分析,并委托上海生工生物工程有限公司测序,所用测序仪器为 ABI PRISM 3730,测序试剂为 Big Dye terminator v3.1。测序得到的序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 上的 BLAST 程序在 GenBank 基因库中进行比对,选取相似性较高的几株菌株的 16S rRNA 序列,用 DNAMAN 软件进行同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 乳酸菌初筛结果

选取有溶钙圈、圆形、乳白色、湿润,革兰氏染色

阳性的单菌落 98 株划平板纯化,纯化后的菌株经 MRS 液体培养基中增培 12 h,取 0.8 mL 菌液到 0.2 mL 的甘油冻存管中 -70 $^{\circ}$ C 保存。

### 2.2 体外降解胆固醇乳酸菌筛选结果

98 株乳酸菌大部分呈现一定的降胆固醇能力,但各菌株间差异比较大。由于乳酸菌在培养基中的生长体系比较复杂,筛选的实验数据至少经过 10 次以上的重复试验求平均值,得到活性比较稳定的菌株。对照组浓度为 0.0747 mg/mL,降解后接种 12、28 株菌株的上清液胆固醇浓度分别为 0.0380 mg/mL 和 0.0373 mg/mL,降解率达到 49.11% 和 50.03%,所以选取这两株菌株进行后续的实验并分别命名为 LpT1, LpT2。

### 2.3 菌株乳酸发酵特性

接种 LpT1 和 LpT2 的发酵液中乳酸明显增加,通过和乳酸的标准液对照,LpT1 和 LpT2 的乳酸产量分别达到 52g/L 和 56g/L(图 1)。

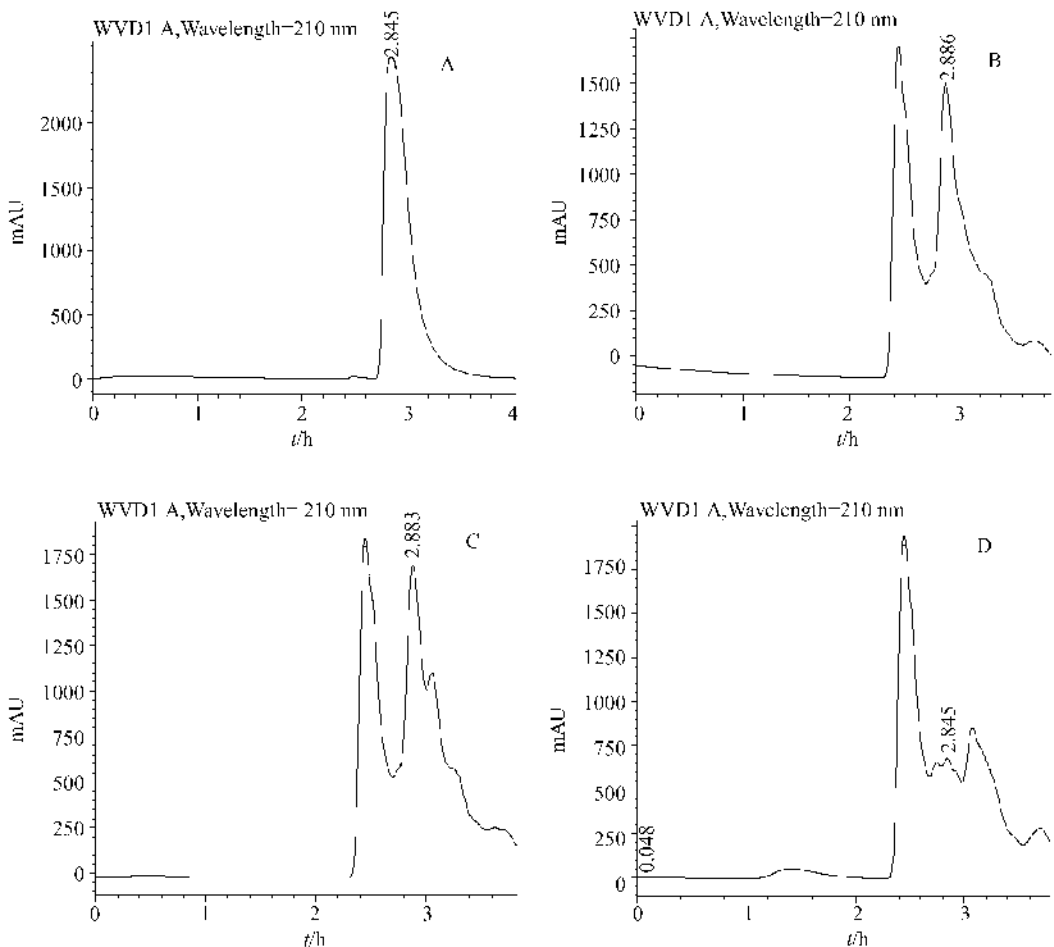


图 1 乳酸标准样品(A)、LpT1 上清液(B)、LpT2 上清液(C)和未接种培养基上清液(D)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard lactic acid(A), LpT1 supernatant(B), LpT2 supernatant(C) and uninoculated culture medium supernatant(D).

## 2.4 菌株的耐酸性

LpT1 和 LpT2 都呈现了较强的耐酸性, 在 pH3.0 条件下存活率都比较高, 比较图 2-A 和图 2-B, 发现 LpT2 比 LpT1 具有更强的耐酸性。但当 pH 下降到 2.0 时, 两株菌的存活率明显降低了, LpT1 经过 4 h 培养后, 活菌数已经下降达 3 个数量级, 培养 8 h 活菌数几乎下降到两位数。通常, 人体进食后胃部 pH 在 3.0~5.0 之间, 小肠在 4.0~5.5 之间, 大肠内大于 5.0, 耐酸性试验表明 LpT1 和 LpT2 对酸性环境的适应性都比较好, 若其进入人体的肠道后, 还能存活一定的时间, 不会影响降胆固醇活性。

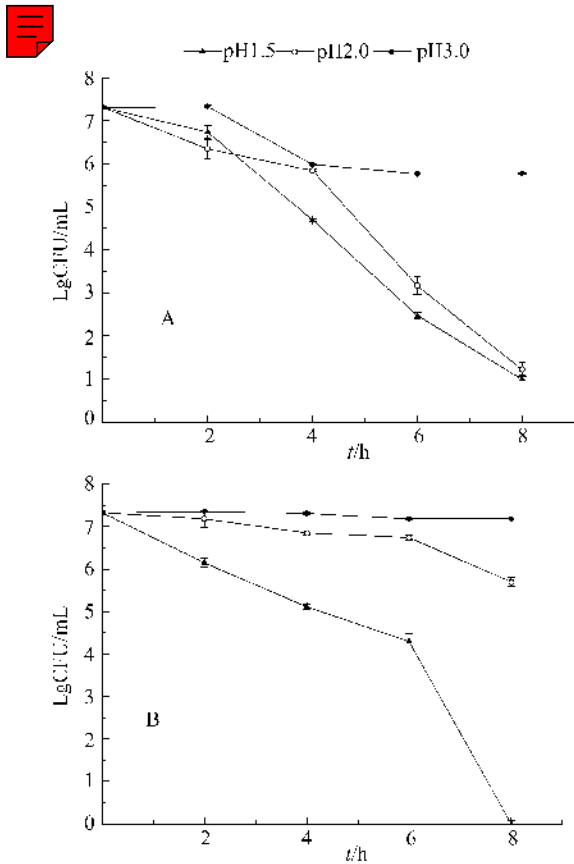


Fig.2 Survival of LpT1 (A) and LpT2 (B) under different pH values and time.

## 2.5 菌株的耐胆盐活性

从图 3-A、图 3-B 中可以看出, LpT1、LpT2 菌株都能在 0.1% 的胆盐下生长并存活至少 8 h, 且 LpT1 菌株明显比 LpT2 菌株具有更好的耐胆盐活性。LpT1 在 0.2% 的胆盐浓度下也能生长, 而在 0.3% 的胆盐浓度下, 两个菌株的生长均明显的被抑制。当益生菌随着食物进入口腔, 经过胃和小肠, 最终

到达小肠末端, 人体小肠中胆盐含量在 0.03% ~ 0.3% 范围内波动, 因此要求益生乳酸菌不仅能耐受一定的酸度还能有一定的胆汁耐受力。从试验结果可知, 所筛选的两株菌株均能适应 0.2% 的胆汁酸环境, 有着广泛的应用前景。

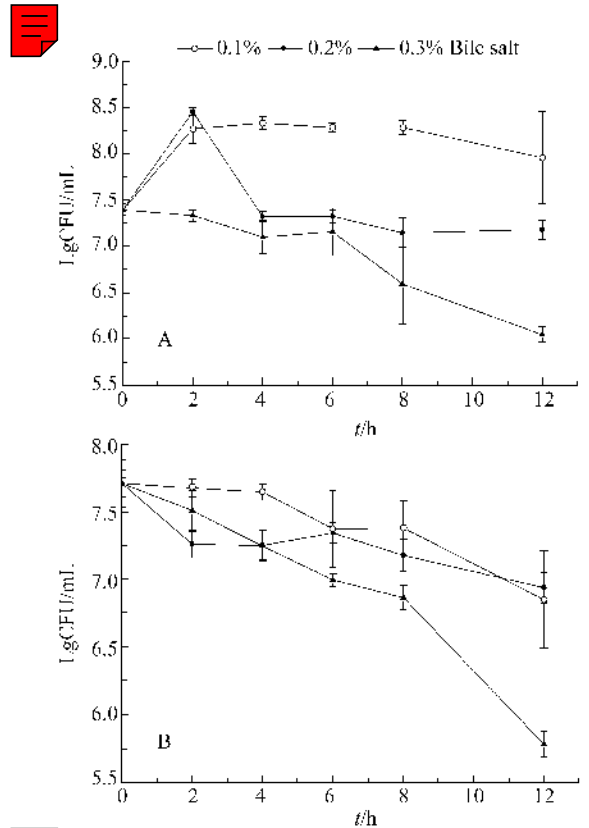


Fig.3 Survival of LpT1 (A) and LpT2 (B) under different bile salt concentration and time.

## 2.6 降胆固醇乳酸菌株的生长曲线产酸特性

图 4-A、图 4-B 分别为 LpT1 和 LpT2 菌株的生长曲线和对应时间培养液中的 pH 值, LpT1 在第 14 小时开始进入对数生长期, 在第 22 小时进入生长稳定期。LpT2 在第 12 小时进入对数生长曲线, 第 20 小时进入稳定期。两株菌的产酸速率和菌体的生长密度成正相关趋势, 在进入稳定期后, 溶液中的 pH 值也渐趋向于平缓, LpT1 菌株产酸性能稍微弱于 LpT2, 前者最低 pH 值 4.2 左右, 后者在 4.0 左右。

## 2.7 生理生化试验结果

各种碳水化合物的发酵结果如下:

将表 1 上的结果和《常用细菌系统鉴定手册》中植物乳杆菌的碳水化合物反应特征对照, 24 个指标

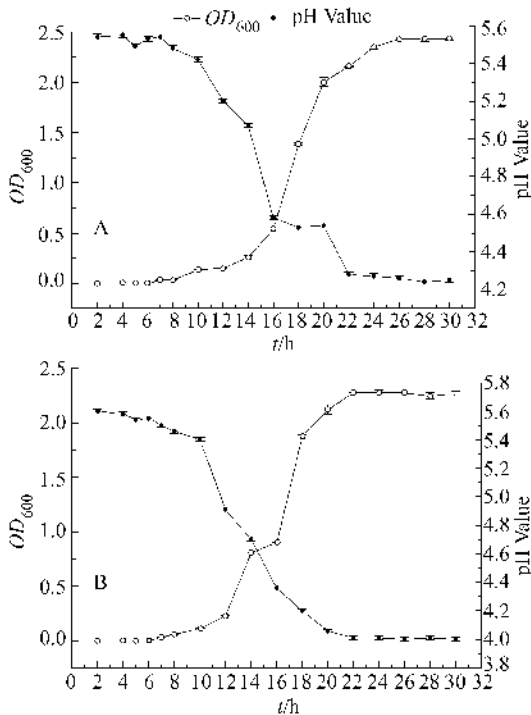


图4 LpT1(A)和 LpT2(B)的生长曲线与产酸特性

Fig.4 Growth curves and ability of producing acid of LpT1(A), LpT2 (B).

中, LpT1 只有乳糖、山梨醇和木糖不符, LpT2 只有乳糖、麦芽糖、核糖和山梨醇不符, 并且这种不符可能和具体的评价标准有关, 因此初步认为两个菌株均为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

## 2.8 菌株的 16S rRNA 鉴定结果

以通用引物进行 PCR 扩增, 获得了两条特异的、大小约为 1.5 kb 的扩增条带。获得的特异片段经 PCR Product Purification kit 纯化后进行测序, 分别获得了 1481bp 和 1469bp 的片段, 提交到 GenBank 获得基因登陆号(GenBank accession number)分别为 GQ166662 和 GQ166663, 并通过 Blast 程序与 GenBank 核酸序列库中的序列进行比对, 发现 LpT1 和 LpT2 和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)或戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)的相似性都超过 98%。选取相似性较高的几株植物乳杆菌的 16SrRNA 序列, 经 DNAMAN 软件的“Multiple Sequence Alignment”模块做同源性比较, 结果表明 LpT1 和 LpT2 与菌株 *Lactobacillus plantarum* MA2 (FJ785723), *Lactobacillus plantarum* EW-p(EU096230)和 *Lactobacillus plantarum* IMAU40010(FJ749729)的同源性都大于 99%, 结合生理生化的鉴定结果, 将 LpT1 和 LpT2 鉴定为植物乳杆菌。

表 1 LpT1 和 LpT2 生理生化鉴定比对结果

Table 1 Test result of LpT1 and LpT2 utilize carbohydrate

Carbohydrate	LpT1	LpT2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Amygdalin	+	+	+
Arabinose	-	-	d
Cellobiose	+	+	+
Esculin	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+ w	+	+
Glucose	+	-	+
Gluconate	+	+	+
Lactose	-	-	+
Maltose	+	-	+
Mannite	+	+	+
Mannitose	+	+	+
Melezitose	-	-	d
Melibiose	+	+	+
Raffinose	+	+ w	+
Rhamnose	-	-	-
D-ribose	+	-	+
Sorbierite	-	-	+
Saccharose	+	+	+
Xylose	-	+ w	d
Arginine hydrolase	-	-	-
Catalase reaction	-	-	-
Gelatin liquefaction reaction	-	-	-
Gram stain	+	+	+

\* +, Positive; -, Negative; d, 11% - 89% Positive; w, Week.

## 3 讨论

(1)目前, 国内外报道的降胆固醇乳酸菌种类主要集中在乳杆菌属, 如嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)<sup>[15]</sup>, 保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)<sup>[16]</sup>, 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)<sup>[17]</sup>, 鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosu*)<sup>[18]</sup>, 罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)<sup>[19]</sup>等。此外还有一些微生物包括链霉菌属(*Streptomyces*), 诺卡氏菌属(*Nocardia*), 节杆菌属(*Arthorbacter*), 棒状杆菌属(*Corynebacterium*), 分支杆菌属(*Mycobacterium*), 沙雷氏菌属(*Serratia*), 假单胞菌属(*Pseudomonas*), 芽孢杆菌属(*Bacillus*)等。这些

菌株产生的高活性胆固醇氧化酶(EC 1.1.3.6)能降解胆固醇及其同系物<sup>[20]</sup>。相关的降胆固醇机理研究也比较多,主要集中在吸收(包埋)理论和共沉淀理论。本文筛选的菌株就是为后续的降胆固醇机理提供可靠的菌株。

(2)由于胆固醇是脂溶性的化合物,几乎不溶于水中,因此文章中的胆固醇在培养基中的分布不一定严格均匀,但多次筛选的结果表明,LpT1和LpT2的降胆固醇能力都较其他菌株明显。同时,筛选也是在体外培养基中进行的,还需要应用到体内动物模型中去验证,以进一步论证所筛选菌株的降胆固醇性能。

(3)文中所筛选的菌株均来自可食用的食品基质泡菜,具有很高的安全性,同时表现了较强的耐酸、耐胆盐活性,具有潜在的生产应用价值。

## 参考文献

- [1] Shaper AG, Jones KW, Jones M, et al. Serum lipids in three nomadic tribes of Northern Kenya. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1963, 13: 135 - 146.
- [2] Grill JP, Cayuela C, Antoine JM, et al. Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31: 154 - 156.
- [3] 齐智, 元香南, 尹杰, 等. 高胆固醇食物不同摄入量对血脂的影响. 营养学报(*Acta Nutrimenta Sinica*), 2006, 28(5): 442 - 443.
- [4] 袁杰利, 康白. 肠球菌及有关微生态调节剂. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 1998, 10(1): 59 - 61.
- [5] 傅晓丽, 康白, 苏哲坦, 等. 肠球菌生态制剂对人血清胆固醇水平作用的初步探讨. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 1992, 4(3): 10 - 18.
- [6] Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(2): 377 - 381.
- [7] Frank AM Klaver, Roelof van der Meer. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt - deconjugation activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(4): 1120 - 1124.
- [8] Walker DK, Gilliland SE. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(4): 956 - 961.
- [9] John M Dietschy. Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *Journal of Lipid Research*, 1968, 9: 297 - 309.
- [10] 朱军莉, 韩剑众, 励建荣. 纤维素分解菌 BSX5 的分离、鉴定及产酶条件. 食品与生物技术学报(*Journal of Food Science and Biotechnology*), 2006, 25(3): 15 - 19.
- [11] Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 1973, 14: 364 - 366.
- [12] Razin S, Kutner S, Efrati H, et al. Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1980, 598(3): 628 - 640.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 267 - 295.
- [14] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3: 208 - 218.
- [15] Liang MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88: 55 - 66.
- [16] Kumar R, Dahiya JS, Singh D, et al. Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose - controlled bioreactor. *Bioresource Technology*, 2001, 78: 209 - 211.
- [17] 居华, 刘书亮, 敖灵, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及生长特性. 中国乳品工业(*China Dairy Industry*), 2007, 35(8): 7 - 10.
- [18] Maria EC, Vibeke de Vanay, Tore Midtvedt, et al. Probiotics in gnotobiotic mice conversion of cholesterol to coprostanol in vitro and in vivo and bile acid deconjugation in vitro. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, 12(4): 219 - 224.
- [19] Taranto MP, Sesma F, Pesce de Ruiz Holgado, et al. Bile salt hydrolase plays a key role on cholesterol removal by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Letters*, 1997, 19: 845 - 847.
- [20] 肖琳琳. 乳酸菌降胆固醇作用及机理研究. 南京农业大学硕士学位论文. 2003.

# Isolation and identification of cholesterol-reducing lactic acid bacteria from indigenously fermented pickles and dried-sausage

Xiaohui Wang, Ping Yu, Jianrong Li\*

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain cholesterol-reducing lactic acid bacteria (LAB), we isolated and identified strains of LAB from indigenously fermented pickles and dried-sausage. [Methods] We screened original LAB strains based on the Calcium Carbonate-MRS medium (Calcium Carbonate-Man Rogosa and Sharp Medium) from pickles and sausage. The cholesterol-reducing strains were confirmed by screening with in vitro cholesterol levels. These strains were identified by methods of morphologic observation, catalase reaction, carbohydrate reaction and 16SrRNA sequencing. [Results] We obtained two strains of LAB (LpT1 and LpT2), which presented a comparatively high ability of cholesterol reducing. The two strains also showed high acid resistance and bile salt tolerance. The time of LpT1 entering the logarithm phase of growth and stationary phase of growth was 14 hours and 22 hours after cultivated, while that of LpT2 was 12 hours and 20 hours after cultivated. These two strains survived for at least 4 hours in the MRS broth with pH 2.0 and grew well in the MRS broth containing 0.2% bile salt, and we identified these two strains to be *Lactobacillus plantarum* by 16SrRNA sequencing. [Conclusion] The two LAB strains could reduce cholesterol in vitro and resist acid and bile salt.

**Keywords:** cholesterol reducing; lactic acid bacteria; 16S rRNA; identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the key program for the development of functional food in the national science & technology pillar program during the 11<sup>th</sup> five-year plan project (2006BAD27B03)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-88056656; E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn

Received: 13 April 2009/Revised: 19 June 2009

## 《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发《收稿回执》,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样:为了保护知识产权,务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板);为了核实文中的图、表等内容,还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费:100元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理,务必通过邮局汇款,切忌夹在纸样材料中随信邮寄!【为了便于查找,请在汇款单上注明“稿件编号”。】