

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2014.05.008

文章编号:2095-6002(2014)05-0041-05

引用格式:任大勇,翁璐超,刘宏锋,等. 乳酸菌体外降解胆固醇的影响因素研究. 食品科学技术学报,2014,32(5):41-45.

REN Dayong, WENG Luchao, LIU Hongfeng, et al. Factors influencing *in vitro* cholesterol removal ability of lactic acid bacteria. Journal of Food Science and Technology, 2014,32(5):41-45.

乳酸菌体外降解胆固醇的影响因素研究

任大勇¹, 翁璐超¹, 刘宏锋², 周亭亭¹, 张振业¹, 邵丽芳¹

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118;

2. 吉林大学 动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 研究了影响乳酸菌体外降解胆固醇的4个因素:胆盐质量浓度、胆固醇质量浓度、培养基初始pH值和菌体培养时间. 结果表明,受试菌株的降解能力显著受上述因素的影响;在相同条件下,不同菌株的降解能力差异显著. 总体上,胆盐质量浓度为4~6 mg/mL,胆固醇质量浓度为190~230 mg/L,培养基初始pH值在5~7,菌体培养时间11~23 h时,乳酸菌降解胆固醇的能力最高,达到50%以上.

关键词: 乳酸菌; 胆固醇; 影响因素; 体外

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

胆固醇与心脑血管疾病、高血脂等疾病的发作有密切的关系. 临床研究表明,总胆固醇水平每升高1 mmol/L,冠心病死亡的概率就会增加35%^[1]. 近年来国内外的大量研究表明,乳酸菌对胆固醇具有较强的降解作用,适量长期饮用乳酸菌发酵的乳制品具有降低血清胆固醇含量的作用. 目前,研究人员开展了一系列乳酸菌降低胆固醇的实验,目的在于筛选优良菌株,开发功能性乳酸菌制品^[2-3]. 研究表明,很多因素都可以影响乳酸菌对胆固醇的降解能力,例如胆固醇浓度、胆盐浓度、培养基的初始的pH值、乳酸菌培养时间等^[4]. 本文对不同乳酸菌菌株在不同的培养条件下体外降解胆固醇能力的影响做了研究,旨在明确乳酸菌发挥降胆固醇作用的最佳条件,为科学使用益生菌提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳酸菌菌种

实验选取6种乳酸菌:发酵乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、粪肠球菌、德氏乳杆菌乳酸亚种、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌,均为吉林农业大学食品科学与工程学院保存.

1.1.2 实验试剂

MRS培养基,青岛海博生物公司;牛胆盐,中国惠世有限公司;胆固醇,北京鼎国有限公司;硫代乙醇酸钠、正己烷、二甲亚砜、95%乙醇、氢氧化钾、硫酸、邻苯二甲醛均为分析纯.

1.1.3 实验器材

DHP-781型恒温培养箱,湖北医疗器械厂;722E型分光光度计,上海光谱仪器公司;QL866型漩涡震荡混合器,江苏其林贝尔有限公司;SW-CJ-1FD型超净工作台,上海新苗有限公司;DK-S28型水浴锅,上海精宏有限公司.

1.2 胆固醇质量浓度测定方法

胆固醇质量浓度测定方法按文献进行^[5-6],并作适当修改. 取0.5 mL培养24 h后的乳酸菌上清液于试管中,加入体积分数95%乙醇3 mL,0.5 mol/L KOH溶液2 mL,漩涡震荡1 min后,置于60℃水浴锅中皂化10 min后取出试管迅速冷却. 冷却完全后加入5 mL正己烷,漩涡震荡1 min进行萃取,萃取完全后取上层液体于另一干燥洁净的试管中,静置10 min后加入3 mL水,漩涡震荡1 min后静置10 min,待分层后取2.5 mL上层溶液于试管中,置于80℃水浴锅中加热挥发至无液体残留,取出试管加

收稿日期:2013-09-30

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20130522175JH);吉林农业大学大学生科技创新基金(2012).

作者简介:任大勇,男,副教授,博士,主要从事食品微生物方面的研究.

4 mL 邻苯二甲醛显色剂,漩涡振荡 1 min 后静置 10 min,加入 2 mL 硫酸漩涡振荡 1 min,避光静置 10 min 后,用分光光度计在波长 550 nm 处测吸光度,根据胆固醇与吸光度标准曲线方程计算胆固醇的质量浓度。

1.3 标准曲线绘制

在干燥洁净的 5 支试管中分别加入 5 mL 含胆盐质量浓度为 1.0 mg/mL 的 MRS-THIO 培养基,分别再加入 0.05,0.10,0.15,0.2,0.25 mL 的胆固醇母液使胆固醇质量浓度为 20,40,60,80,100 mg/L,依照测定胆固醇的方法测定其吸光度,横坐标为胆固醇质量浓度,纵坐标为吸光度绘制曲线,可得到曲线回归方程,计算胆固醇的质量浓度。胆固醇的去除率按式(1)计算^[7]。

$$\text{胆固醇去除率}/\% = (1 - \rho_1/\rho_0) \times 100, \quad (1)$$

式(1)中, ρ_1 为培养后菌液中上清液中的胆固醇质量浓度; ρ_0 为初始培养基中总胆固醇的质量浓度。

1.4 胆盐质量浓度对乳酸菌降胆固醇能力的研究

分别加入 5 mL 含有 170 mg/L 胆固醇(5 mL MRS-THIO 培养基加入 425 μ L 母液)的 MRS-THIO 培养基于 6 支干燥洁净的试管,添加胆盐分别至质量浓度为 0,2,4,6,8,10 mg/mL,接种量按体积比的 3% 的量接种,接种后将含乳酸菌的培养基于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h,取 0.5 mL 培养后的乳酸菌上清液按胆固醇测定方法测定其剩余的胆固醇质量浓度。以不含乳酸菌的高胆固醇培养基作为空白对照。

1.5 胆固醇质量浓度降胆固醇能力的研究

分别加胆盐质量浓度为 1.0 mg/mL 的 MRS-THIO 培养基 5 mL 于 6 支干燥洁净的试管,再分别加入胆固醇母液 75,175,275,375,475,575 μ L 至胆固醇质量浓度为 30,70,110,150,190,230 mg/L,接种量按体积比的 3% 的量接种,接种后将含乳酸菌的培养基于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h,取 0.5 mL 培养后的乳酸菌上清液按胆固醇测定方法测定其剩余的胆固醇质量浓度。以不含乳酸菌的高胆固醇培养基作为空白对照。

1.6 培养时间对乳酸菌降胆固醇能力的研究

取 7 支干燥洁净的试管,分别加含有 170 mg/L 胆固醇的胆盐质量浓度为 1.0 mg/mL 的 MRS-THIO 培养基 5 mL,每种菌按 3% 的接种量接种,接种后将含乳酸菌的培养基于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中分别培养 3,7,11,15,19,23,36 h。取 0.5 mL 培养后的乳酸菌上清液按胆固醇测定方法测定其剩余的胆固醇质量浓度。以不含乳酸菌的高胆固醇培养基作为空白对照。

另取 36 支试管各加入 1 mL 胆盐质量浓度为 1.0 mg/L 的 MRS-THIO 培养基再分为 3 组,按 3% 接种,接种后将含乳酸菌的培养基于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中

分别培养 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 h,取 0.5 mL 培养后的乳酸菌上清液加入 5 mL 蒸馏水稀释,再用分光光度计在 600 nm 波长处测定光密度值,以不含乳酸菌的高胆固醇培养基作为空白对照,绘制生长曲线。

1.7 培养基初始 pH 值降胆固醇能力的研究

分别加含有 170 mg/L 胆固醇的胆盐质量浓度为 1.0 mg/mL 的 MRS-THIO 培养基 5 mL 于 6 支干燥洁净的试管,分别将 pH 值调节为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,按 3% 接种,接种后将含乳酸菌的培养基于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h,取 0.5 mL 培养后的乳酸菌上清液按胆固醇测定方法测定其剩余的胆固醇质量浓度,空白对照为不含乳酸菌的高胆固醇培养基。

2 结果与分析

2.1 标准曲线分析

在牛胆盐质量浓度为 1.0 mg/mL 的 MRS-THIO 培养基中添加质量浓度不同的胆固醇,按照测定胆固醇方法测定吸光度,以吸光度($A_{550\text{nm}}$)为纵坐标,横坐标为胆固醇质量浓度(mg/L),绘制标准曲线,见图 1。

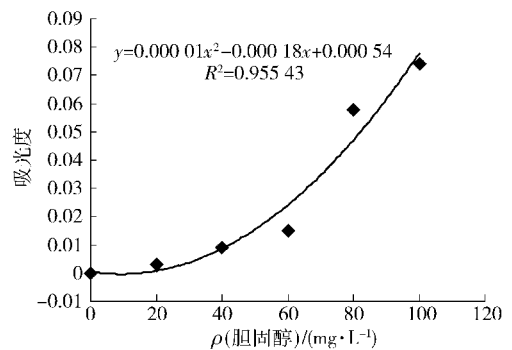


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve

2.2 胆盐质量浓度对乳酸菌降胆固醇能力的影响

胆盐质量浓度对乳酸菌降胆固醇能力的影响结果见图 2。由图 2 可知,胆盐浓度对 6 种乳酸菌均有显著性影响,粪肠球菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌随着胆盐质量浓度的增加,对胆固醇的降解能力均先下降后有所增加,在胆盐质量浓度为 4~6 mg/mL 时,对胆固醇的去除能力达到最大值,分别为 23.1%,33.8%,38.2%。当胆固醇质量浓度再增加时,这四种乳酸菌对胆固醇的降解能力反而有所下降。发酵乳杆菌和鼠李糖乳杆菌在不加胆盐时对胆固醇的去除能力最强,去除率分别为 32.6%,31.0%,当加入胆盐时,去除率均显著降低($P < 0.05$)。

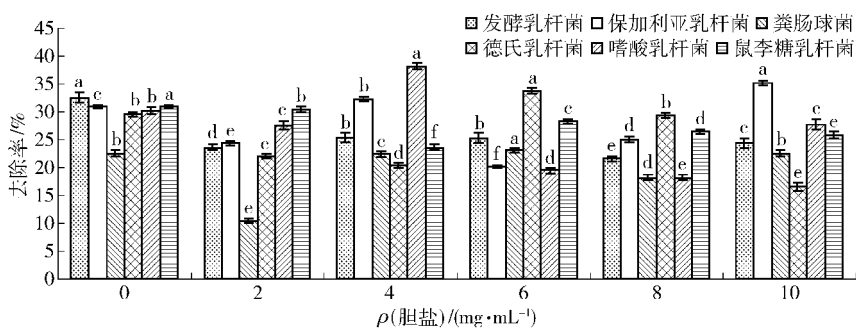


图2 胆盐质量浓度对胆固醇去除率的影响

Fig. 2 Effect of bile salt concentration on cholesterol removal rate

2.3 胆固醇质量浓度对乳酸菌降胆固醇能力的影响

胆固醇质量浓度对乳酸菌降胆固醇能力的影响结果见图3. 由图3可知,在胆固醇质量浓度不同的MRS-THIO培养基中,不同质量浓度的胆固醇对6种乳酸菌降解胆固醇的能力均有显著性影响. 随着胆固醇质量浓度的增加,6种乳酸菌降解胆固醇的能力均有所提高,当胆固醇质量浓度达到230 mg/L

时,发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌、粪场球菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌去除胆固醇的能力均达到最大值,分别为33.5%,27.6%,27.4%,25.7%,39.0%. 鼠李糖乳杆菌在胆固醇质量浓度为190 mg/L时,对胆固醇的去除率最大,为30.9%,在胆固醇质量浓度为230 mg/L时,鼠李糖乳杆菌对胆固醇的降解反而有所下降,去除率为27.7%.

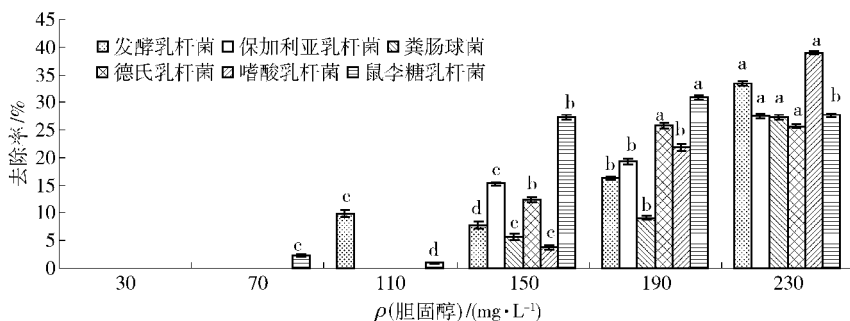


图3 胆固醇质量浓度对胆固醇去除率的影响

Fig. 3 Effect of cholesterol concentration on cholesterol removal rate

2.4 培养基初始pH值对乳酸菌降胆固醇能力的影响

培养基初始pH值对乳酸菌降胆固醇能力的影响结果见图4. 由图4可知,pH值对6种乳酸菌降解胆固醇都有显著的影响. 发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌均在酸性环境中对

胆固醇的去除能力较强. 发酵乳杆菌在pH值3.0时,对胆固醇的降解能力最强,去除率达到53.8%;其次是嗜酸乳杆菌,在pH值3.0时,对胆固醇的去除率为46.5%. 随着pH值>4.0时,这4种乳酸菌对胆固醇的降解能力均显著下降($P < 0.05$). 而粪

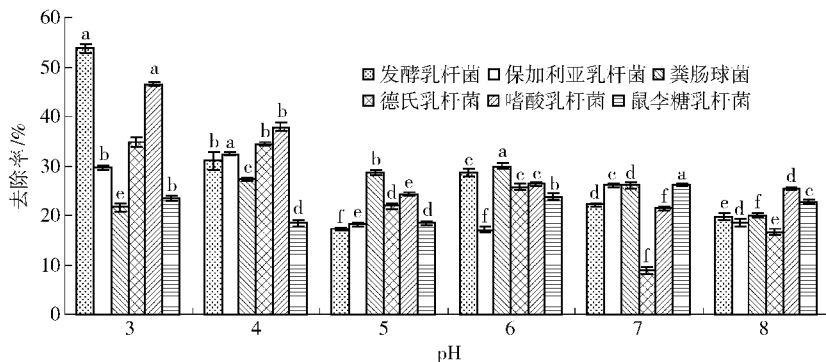


图4 培养基初始pH值对胆固醇去除率的影响

Fig. 4 Effect of medium initial pH on cholesterol removal rate

肠球菌随 pH 值的增加,对胆固醇的降解能力先增加后下降,在 pH 值 6.0 时,对胆固醇的去除率达到最大值 30.0%。鼠李糖乳杆菌在中性环境中对胆固醇的降解能力最强,在 pH 值 7.0 时,对胆固醇的去除率为 26.1%。

2.5 培养时间对乳酸菌降胆固醇能力的影响

6 种受试乳酸菌的生长曲线见图 5,乳酸菌发酵时间对其降胆固醇能力的影响结果见图 6。由图 6 可知,菌株的生长时间对胆固醇的降解能力有显著影响。发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜酸乳杆菌在

培养 3 h 时胆固醇的去除率分别为 37.0%、36.1%、29.9%,随着菌株生长时间的增加,这 3 种菌对胆固醇的去除能力均有所增加,在培养 11~15 h 时最早达到最佳去除率,此时胆固醇的去除率分别为 43.0%、43.6%、41.7%。粪肠球菌、德氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌在培养 3 h 时胆固醇的去除率分别为 31.0%、32.1%、30.2%,在培养 19 h 后对胆固醇的去除能力迅速增加,培养 23 h 后去除能力迅速增加,此时胆固醇的去除率分别达到最高值为 39.4%、43.0%、43.3%。

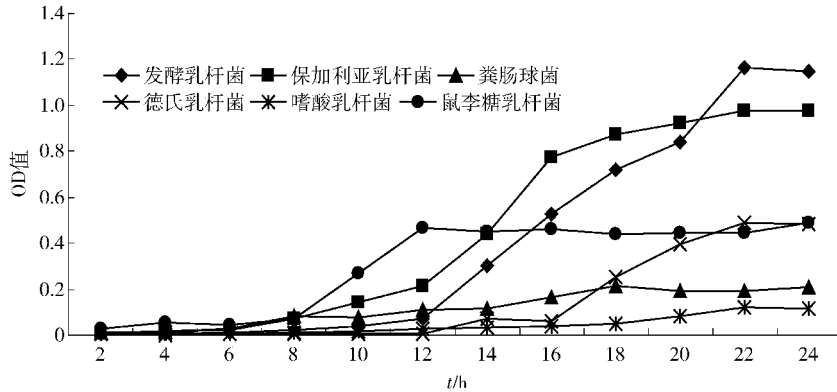


图 5 6 种乳酸菌在 MRS-THIO 培养基中的生长情况

Fig. 5 Growth curves of six kinds of lactic acid bacteria in the MRS-THIO medium

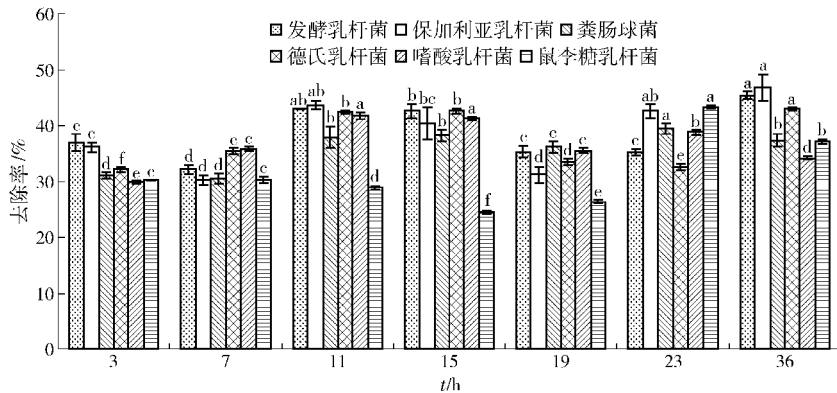


图 6 培养时间对胆固醇去除率的影响

Fig. 6 Effect of incubation time on cholesterol removal rate

3 讨论与结论

有研究表明,适量浓度的胆盐可以使菌体细胞壁通透性增加,胆固醇被吸收至细胞内部,而浓度过高的胆盐会抑制细菌生长,因而不利于菌体细胞吸收胆固醇^[8-10]。本研究使用的测试的 6 种乳酸菌中保加利亚乳杆菌、粪肠球菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌与之前的研究一致。

本研究中,在低胆固醇浓度下 6 种乳酸菌对胆固醇降解能力较差,随着胆固醇浓度的增加,乳酸菌

对胆固醇的降解能力随之提高,如在胆固醇质量浓度为 30~70 mg/L 时只有鼠李糖乳杆菌对胆固醇的去除率为 2.3%,其他 5 种菌株对胆固醇的去除率均为 0;在胆固醇质量浓度大于 110 mg/L 时,乳酸菌对胆固醇的降解能力明显提高,原因并不明确,可能是因为不同菌株对胆固醇降解的机理不同^[11]。

pH 值对乳酸菌降解胆固醇的能力有显著影响。本实验中,发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌、德氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌均在酸性环境中对胆固醇的去除能力较强。而粪肠球菌在弱酸性环境中对胆固醇的降解能力较强,鼠李糖乳杆菌在中性环境中对胆固醇的

降解能力最强。虽然目前对于乳酸菌降解胆固醇的机理尚无定论,但人们更多倾向于活体乳酸菌通过吸收和共沉淀联合作用以降低胆固醇的观点^[12-13]。Klaver等^[14]研究表明酸性环境对胆酸和胆固醇发生共沉淀现象有利,因此有利于胆固醇的降解。

此外,本研究还表明,菌株的培养时间对其降解胆固醇的能力具有显著影响,随着菌株生长时间的增加这菌株对胆固醇的去除能力随着增加。除了粪肠球菌、德氏乳杆菌、鼠李糖乳酸菌在培养23 h后对胆固醇的去除率达到最大值外,其余的3种菌株在培养11 h后对胆固醇的去除率就已达到最大值,这可能与不同菌种所需要活化的时间不同有关。

本实验结果表明,受试6种乳酸菌对胆固醇均有一定的降解能力,乳酸菌对胆固醇的降解能力因胆盐浓度、胆固醇浓度、pH值、培养时间和菌株种类的不同而表现出较大的差异。其中发酵乳杆菌在胆盐质量浓度为1.0 mg/mL、胆固醇质量浓度为170 mg/L、pH值3.0的MRS培养基对胆固醇的降解能力最强,达到53.8%;嗜酸乳杆菌次之,达到46.5%。

参考文献:

- [1] 刘长建,姜波,安晓雯,等. 菠菜中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(6): 937-940.
- [2] Grunewald K K. Sera cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus* [J]. J Food Sci,1982,47(2):2078-2079.
- [3] Lin S Y, Ayres J W, Willia W J R, et al. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *In vitro* and *in vivo* results [J]. J

- Dairy Sci,1989,72(2):2882-2889.
- [4] 肖琳琳,董明盛. 西藏干酪乳酸菌降胆固醇特性研究[J]. 食品科学,2003,24(10):142-145.
- [5] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Appl Environ Microb,1985,49(2):377-381.
- [6] 李常营,卢晓霆,于志会,等. 酸菜来源植物乳杆菌S4-5的降胆固醇作用[J]. 食品科学,2011,32(7):69-72.
- [7] 田建军,张开屏,靳焯. 高效降胆固醇乳酸菌的筛选[J]. 食品科技,2011,36(11):21-30.
- [8] Noh D O, Kim S H, Gilliland S E. Incorporation of cholesterol into the cell membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC43121 [J]. J Dairy Sci,1997,80:3107-3113.
- [9] 靳志强,王延祥,李平兰,等. 植物乳杆菌耐酸耐胆盐的体外试验及其降胆固醇作用[J]. 中国食品学报,2009(5):24-28.
- [10] 焦月华,张兰威,易华西,等. 酸耗牛乳中乳酸菌降胆固醇作用及胆盐耐受性研究[J]. 东北农业大学学报,2012,43(2):6-12.
- [11] 王一鸣,范小兵,杭晓敏,等. 体外去除胆固醇菌株的筛选及其作用机理研究[J]. 微生物学报,2006,33(6):43-47.
- [12] Tahri K, Crociani J, Ballongue J, et al. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol [J]. Lett Appl Microbiol, 1995,21(3):149-151.
- [13] Tahri K, Grill J P, Schneider F. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation [J]. Curr Microbiol, 1996, 33(3):187-193.
- [14] Klaver F A K, Van Der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt deconjugation activity [J]. Appl Environ Microb, 1993,59(4):1120-1124.

Factors Influencing *in vitro* Cholesterol Removal Ability of Lactic Acid Bacteria

REN Dayong¹, WENG Luchao¹, LIU Hongfeng², ZHOU Tingting¹, ZHANG Zhenye¹, SHAO Lifang¹
(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* cholesterol removal ability of different lactic acid bacterial strains. Single factor experiments were carried out to explore the influences of oxgall addition, cholesterol addition, medium pH, and incubation time on the cholesterol removal ability of the strains. The results showed that cholesterol removal rate was significantly affected by the above factors. Under the same conditions, considerable variation was found among lactic acid bacterial strains with regard to the ability to assimilate cholesterol from a laboratory growth medium. Generally, the highest cholesterol removal rate (more than 50%) was obtained under the condition of the oxgal concentration 4-6 mg/mL, cholesterol concentration 190-230 mg/L, medium initial pH 5-7, and incubation time 11-23 h.

Key words: lactic acid bacteria; cholesterol; influence factor; *in vitro*

(责任编辑:李 宁)