

# 植物乳杆菌 Zhang-LL 耐胃肠道逆环境及降胆固醇特性研究

隋梦,于立娟,谢远红,张红星\*

(农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室,  
食品质量与安全北京实验室,北京农学院食品科学与工程学院,北京 102206)

**摘要:**利用从发酵米粉中筛选出的一株植物乳杆菌 Zhang-LL 探讨其胃肠道耐受性及体外降胆固醇功效。本实验分别在 pH1.5~3.0、胆盐浓度 0.1%~0.5% 的条件下模拟人体胃肠道环境,采用活菌计数法检测菌株 Zhang-LL 耐胃肠道逆环境特性及邻苯二甲醛法检测降胆固醇效果。结果表明:初始菌数为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的植物乳杆菌 Zhang-LL 在 pH1.5~3.0 的环境中 3 h 后,活菌数仍可达  $10^6$  CFU/mL;在胆盐浓度为 0.10%~0.50% 环境中 8 h,活菌数可达  $10^5 \sim 10^7$  CFU/mL;体外胆固醇降低率在 20.69%~35.68% 范围。研究表明植物乳杆菌 Zhang-LL 具有较强的耐胃肠道逆环境特性及良好的降胆固醇能力,为开发研制降胆固醇功能食品及微生态制剂提供了实验基础。

**关键词:**植物乳杆菌,降胆固醇,胃肠道,耐受性

## Study on tolerance characteristics of the gastrointestinal tract and cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL

SUI Meng, YU Li-juan, XIE Yuan-hong, ZHANG Hong-xing\*

(Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residue,  
Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Faculty of Food Science and Engineering,  
Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** The tolerance characteristics of the gastrointestinal tract and cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL isolated from fermented rice noodles in Bama, Guangxi Province were investigated. Viable count was firstly used in this study to detect the tolerance characteristics under simulated gastrointestinal tract environment pH1.5~3.0. Additionally, bacterial growth was evaluated in the presence of 0.10%~0.50% bile salt. O-phthalaldehyde was used to detect its cholesterol-lowering capability. The results showed that *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL's number of viable bacteria was still up to  $10^6$  CFU/mL after 3 h under pH1.5~3.0, whose initial bacterial count was  $1 \times 10^7$  CFU/mL. And being cultured for 8 h in the MRS-broth (0.10%~0.50% bile salt), the viable count reached nearly to  $10^5 \sim 10^7$  CFU/mL. A cholesterol removal rate ranging from 20.69% to 35.68% was observed under varying conditions. It showed that *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL had a strong capability of anti gastric intestinal reverse environment and good cholesterol lowering ability, which provided the experimental basis for the development of cholesterol-lowering functional food and micro ecological preparation.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*; cholesterol-lowering; gastrointestinal tract; tolerance

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)16-0226-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.16.036

随着生活水平的提升,人们对高营养食品的追求也越来越多,然而意味着食品中的胆固醇含量偏高。大量流行病学调查、科学实验及临床干预已经证明,摄入过多胆固醇而导致的动脉粥样硬化,血脂水平升高等是各种心脑血管疾病的主要原因<sup>[1]</sup>。因此,降低血清中胆固醇的水平直接关系到人类的健

康情况。很多研究者致力于降低人体血清中胆固醇含量,防止高血脂相关疾病发生的研究<sup>[2-3]</sup>。Mann<sup>[4]</sup>很早研究发现,非洲 Maasai 人大量食用发酵的乳制品,其体内胆固醇含量普遍较低。这引起了营养学、医学、微生物学等各界人士的注意,从而掀起了乳酸菌降胆固醇作用的研究热潮。学者们开始系统地研

收稿日期: 2016-02-17

作者简介: 隋梦(1992-),女,硕士研究生,研究方向:食品加工与安全, E-mail: 15117957701@163.com。

\* 通讯作者: 张红星(1970-),男,博士,教授,研究方向:食品微生物,食品安全检测与控制, E-mail: hxzhang@163.com。

基金项目:北京市长城学者培养计划(CIT&TCD20140315)。

究能直接降解胆固醇的微生物,将其应用于低胆固醇食品的开发。

学者们在动物模型和人体实验对益生菌降低血浆胆固醇的研究取得了相应成效<sup>[5-6]</sup>。Anderson<sup>[7]</sup>等人让48名高胆固醇血症患者在每日晚餐后服用含有嗜酸乳杆菌L1的发酵酸奶。经过10周的实验,得到结果,与对照组相比,L1组的血浆胆固醇平均水平下降了约2.4% ( $p < 0.05$ )。Nguyen<sup>[8]</sup>等采用提取自婴儿粪便中的植物乳杆菌PH04对小鼠上进行降胆固醇的实验,他们对12只雄性小鼠分别给予每天 $4 \times 10^8$  CFU/mL剂量的植物乳杆菌PH04,14 d后检测血脂指标。结果显示,PH04组小鼠的血浆总胆固醇下降了7%左右,而血浆甘油三酯下降了约10%,差异均有统计学意义( $p < 0.05$ )。国内有关降胆固醇乳酸菌的研究起步较晚,近几年才开始筛选功能性菌株并研究相关功能与机制。谢宁<sup>[9]</sup>、李婷婷<sup>[10]</sup>等都在高脂血症大鼠上验证了益生菌的降胆固醇功效。

本研究采用从天然发酵米粉中筛选得到的一株植物乳杆菌Zhang-LL,利用活菌计数法检测其在不同酸性环境及胆盐浓度下的耐受情况,同时模拟胃肠道逆环境,以邻苯二甲醛法测定其体外降胆固醇能力,为该类产品开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) Zhang-LL 北京农学院食品与工程学院 F123 室保藏菌种;葡萄糖、乙醇、冰乙酸 北京化工厂;蛋白胨、牛肉膏、酵母浸粉、胆盐、胆固醇 北京奥博星生物技术有限公司;无水乙酸钠、柠檬酸三铵、磷酸氢二钾、吐温-80、氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、邻苯二甲醛、氢氧化钠 国药集团化学试剂有限公司;硫酸镁 北京精求化工有限责任公司;硫酸锰 广东汕头西陇化学厂;琼脂、蔗糖酯 北京畅华志诚科技有限公司。

BS224S 型精密电子天平 德国 Sartorius 集团;MLS-3750 型全自动高压蒸汽灭菌锅 日本 SANYO 公司;BCN-1360B 型无菌超净工作台 哈尔滨东联公司;WS-01 恒温恒湿培养箱 湖北黄石恒丰医疗器械有限公司;PHS-3B 型雷磁便携式酸度计 上海精科;QL-901 型旋涡振荡器 海门市其林贝尔公司;JY92-II DN 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;WFJ-2100 型可见光分光光度计 龙尼柯(上海)仪器有限公司;BIOFUGE STRATOS 大容量台式冷冻离心机 美国 Thermo Scientific DW-40L262;低温保存箱 海尔集团 Haier。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 将保藏在实验室-80℃冰箱中的菌株用移液枪取100 μL接种到MRS液体培养基中,37℃培养12 h,将活化一代的菌种以2%的接种量接种于100 mL灭菌的MRS培养基中,37℃培养12 h,得到扩大培养液,4℃冷藏。

1.2.2 菌落计数方法 在无菌超净工作台将待测

样品利用旋涡振荡器摇匀,振荡时间不少于30 s,对样品进行十倍梯度稀释。根据预计活菌数选择3个适当稀释梯度,吸取1 mL待测稀释菌液以倾注平板法倒入MRS培养基平板中,快速摇匀,静置10 min,于37℃倒置培养36~48 h,进行菌落计数<sup>[11]</sup>,调整活菌数约为 $1 \times 10^7$  CFU/mL。

1.2.3 耐酸实验 将活化2代的菌液以2%的接种量分别接种于已用HCl调节pH为1.5、2.0、2.5、3.0的MRS液体培养基中,以MRS液体培养基(pH6.5)作为空白对照,在37℃环境中静置培养3 h,设定在0、1、2、3 h时间点分别取样分析,用灭菌PBS缓冲液进行10倍梯度稀释,在适宜稀释度取100 μL接种于MRS平板,每个稀释度3个平行样,37℃培养36~48 h后计数。绘制植物乳杆菌Zhang-LL的生长曲线,从而检测菌株对酸的耐受能力。

1.2.4 耐胆盐实验 将活化2代的菌液以2%的接种量分别接种到含0.10%、0.30%、0.50%牛胆盐的MRS液体培养基中,以不含胆盐的MRS培养基作为空白对照,在37℃环境中静置培养8 h,每2 h取样,用灭菌PBS缓冲液10倍稀释,在适宜稀释度取100 μL接种于MRS平板,每组3个平行,37℃培养36~48 h后测定发酵液中的活菌数,绘制植物乳杆菌Zhang-LL的生长曲线,比较菌株生长与胆盐含量的关系,以判断其对胆盐的耐受性。

1.2.5 模拟胃肠道逆环境降胆固醇能力实验

1.2.5.1 标准曲线的绘制 将1 mg/mL的胆固醇标准母液<sup>[12]</sup>配制成浓度分别为20、40、60、80、100、120、140、160、180、200 μg/mL的工作液。然后取0.5 mL工作液,置于60℃水浴中蒸干溶剂,加入0.5 mL含0.3%牛胆盐MRS液体培养基,采用邻苯二甲醛法进行测定,空白为4 mL邻苯二甲醛显色剂和2 mL浓硫酸混合液,实验三次平行。以胆固醇的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,进行函数拟合得到曲线回归方程,用于计算胆固醇的质量浓度。

$$\text{胆固醇移除率}(\%) = (1 - \rho_1 / \rho_0) \times 100$$

式中: $\rho_1$ 为培养后上清液胆固醇的质量浓度; $\rho_0$ 为初始培养基胆固醇的质量浓度。

1.2.5.2 实验方法 首先制备胆固醇MRS-CHOL培养基<sup>[13-14]</sup>,准确称取0.1 g胆固醇,放入小烧杯中,继续添加0.1 g蔗糖酯、1 mL吐温-80,并搅拌均匀,再加入5 mL冰乙酸,60℃水浴加热溶解后再用超声波破碎机进行破碎处理,趁热用0.22 μm的滤膜将溶解液过滤,直接加入到配制好的已高压灭菌的MRS培养基中,一边加入一边搅拌,使其形成均匀稳定的胶体溶液,得到约含0.1 mg/mL胆固醇的MRS液体培养基。用无菌的6 mmol/L NaOH调培养基pH在6.0~7.0之间。将植物乳杆菌Zhang-LL在MRS培养基中活化2代后,按10%接种至pH为3.0的PBS缓冲液中(模拟胃环境),37℃静置培养,分别于0、30、60、90、120 min时间段取样,离心收集菌体,用生理盐水离心洗涤1次,将全部菌泥转至含有0.3%牛胆盐、0.1 mg/mL胆固醇的MRS液体培养基中。经过37℃培养8 h后,在550 nm处分别测定胆固醇质量

浓度的吸光值( $A_{550\text{nm}}$ )。每组实验做三个平行,在培养前和培养后分别取样,并以未接菌的含有0.3%牛胆盐、0.1 mg/mL胆固醇的液体MRS培养基中为空白对照。胆固醇质量浓度采用邻苯二甲醛法<sup>[15]</sup>进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐酸实验

益生菌要在肠道存活并发挥益生作用的前提是耐受胃中的酸性环境。食物在胃里消化时间,一般为1~3 h。人体空腹胃液pH为0.9~1.8,在进食过程中pH会有所上升,维持在3.0左右,但在消化过程中由于胃酸的分泌,胃液pH又下降<sup>[16]</sup>。因此本实验将植物乳杆菌接种于pH1.5、2.0、2.5、3.0的酸性培养基中培养3 h以检测对胃酸的耐受性,以正常MRS培养基(pH6.5)作对照,结果见图1。

由图1所示,植物乳杆菌Zhang-LL在pH为3.0的条件下,经过1 h的培养,活菌数基本保持不变,之后随培养时间延长活菌数逐渐上升,这表明此植物乳杆菌菌株能在偏酸性环境中生长良好;在pH2.5条件下,经过3 h的培养活菌数基本保持不变;在pH2.0和pH1.5环境下,随着培养时间的延长活菌数逐渐下降,但经过3 h后活菌数仍可达到 $10^6$  CFU/mL。结果表明,此菌株在pH1.5~3.0作用3 h活菌数可达 $10^6$  CFU/mL,具有较高耐酸能力,能够在胃中存活并进入肠道。这与靳志强<sup>[17]</sup>的研究结果:植物乳杆菌H13可耐受pH2.5及pH3的酸性环境,作用3 h后活菌数能达到 $10^6$  CFU/mL的结果相近。

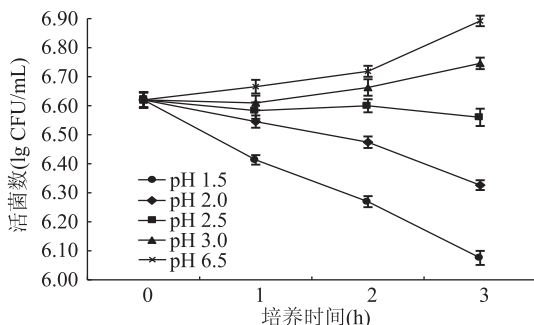


图1 植物乳杆菌Zhang-LL的耐酸性实验

Fig.1 Acid tolerance test result of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL

### 2.2 耐胆盐实验

小肠是胆固醇的吸收场所,亦是乳酸菌发挥降胆固醇功能的主要部位。在人体肠液中正常胆汁酸盐质量浓度为0.30%~0.50%,食物在肠道中通过时间一般为6~8 h<sup>[14]</sup>。所以本实验测定植物乳杆菌Zhang-LL在0.10%、0.30%、0.50% (m/v)的胆盐培养基中生长检测其对胆盐的耐受性,以未添加胆盐的MRS培养基作为对照,结果见图2。

由图2可知,在胆盐浓度为0.10%的MRS培养基中,受到胆盐的影响初始阶段植物乳杆菌Zhang-LL活菌数有所降低,经过4~6 h后开始逐渐上升,当培养时间达到8 h时,活菌数明显上升,可达到 $10^7$  CFU/mL。菌株在胆盐浓度为0.30%条件下,开始

活菌数明显下降,之后基本保持不变,培养至6 h后又逐渐上升,这可能是由于菌株适应了胆盐环境的结果;菌株在胆盐浓度为0.50%条件下,活菌数明显下降,但能保持在 $10^6$  CFU/mL附近,具有较强的胆盐耐受能力。结果表明,菌株在胆盐浓度为0.10%~0.50%环境中生存8 h活菌数可达 $10^5$ ~ $10^7$  CFU/mL,可见植物乳杆菌Zhang-LL对胆盐具有良好的耐受性,能够在肠道中存活并发挥益生作用。

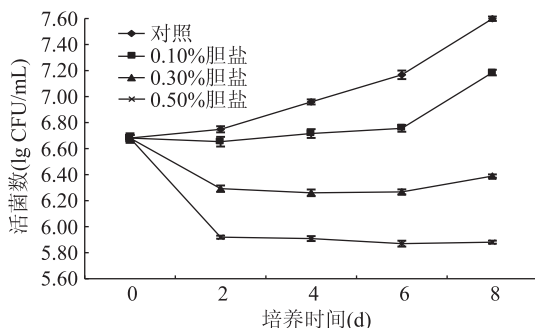


图2 植物乳杆菌Zhang-LL的耐胆盐实验结果

Fig.2 Bile salt tolerance test result of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL

### 2.3 降胆固醇能力实验

2.3.1 胆固醇测定标准曲线 以胆固醇浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,550 nm下的吸光度值为纵坐标,所得的拟合直线方程为: $y = 0.0022x + 0.0009$ ,  $R^2 = 0.9970$ 。

2.3.2 模拟胃肠道逆环境降胆固醇能力实验 模拟胃肠环境实验结果表明,植物乳杆菌Zhang-LL对模拟胃酸环境(pH1.5~3.0)和胆汁盐环境(0.1%~0.5%)均表现出较强的耐受性。因此,本实验模拟胃肠道逆环境进行降胆固醇能力实验。

由表1实验结果可知,在胃酸环境(pH3.0)中菌体的培养时间对于乳酸菌体外降胆固醇能力有显著性影响( $p < 0.05$ )。菌株Zhang-LL对胆固醇的降低率范围在20.69%~35.68%之间,当菌液不经过胃酸时,在1.57  $\mu\text{g/mL}$ 胆固醇含量0.3%胆盐的培养基中经过8 h培养,胆固醇的降低率最高为35.68%。在pH3.0 PBS缓冲液中培养时间越长,其在胆固醇培养液中胆固醇的降低率越小,随着菌体在胃酸培养时间的增长,菌株Zhang-LL在培养基中的降胆固醇能力逐渐下降。当培养时间达到120 min时,胆固醇的降低率为20.69%。出现这种情况的原因可能是菌株活菌数随着培养时间的增长逐渐下降,但仍有大部分菌株存活,故还存在降胆固醇能力。由以上结果可知,植物乳杆菌Zhang-LL具有体外降胆固醇能力,为进一步研究植物乳杆菌Zhang-LL的降胆固醇作用机理以及开发具有降胆固醇特性的产品提供理论依据。

乳酸菌降胆固醇的作用机理主要包括同化吸收作用<sup>[15]</sup>,共沉淀作用<sup>[18]</sup>、细胞膜吸附胆固醇作用<sup>[19]</sup>等。本实验中发现植物乳杆菌Zhang-LL作用机理目前还不明确,还需要进一步实验说明是以何种途径降低胆固醇。并且对其体内的降胆固醇作用机理还需要进一步探索与研究。而且降解胆固醇的程度

表1 植物乳杆菌 Zhang-LL 胆固醇含量的移除率

Table 1 Cholesterol-reducing ability of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL

pH3.0 培养 的时间 (min)	0.3%胆盐 培养的 时间(h)	胆固醇含量(μg/mL)		移除率 (%)
		培养前	培养后	
0	8	1.57 ± 0.01	1.01 ± 0.01	35.68 <sup>a</sup>
30	8	1.57 ± 0.01	1.13 ± 0.04	27.96 <sup>b</sup>
60	8	1.57 ± 0.01	1.16 ± 0.02	26.34 <sup>b</sup>
90	8	1.57 ± 0.01	1.19 ± 0.02	24.24 <sup>bc</sup>
120	8	1.57 ± 0.01	1.25 ± 0.03	20.69 <sup>c</sup>

注:表中为 Bonferroni t-test 测验结果,在同一列数据中,相同字母则表示差异不显著,不同字母则表示差异显著( $p < 0.05$ )。

还和菌株培养时间有关系,Zhao 等<sup>[20]</sup>人的研究结果表明了在培养时间为 12 h 时对乳酸菌有最大的移除量,李常营<sup>[21]</sup>等人又研究了酸菜来源的植物乳杆菌 S4-5 在指数期结束(培养时间为 14 h)之际,胆固醇的移除率最大,为 66.7%。所以,实验菌株 Zhang-LL 可以在高胆固醇培养液中进行进一步长时间培养,以计算出其最高降胆固醇移除率。

### 3 结论

菌株的初始接种量为  $1 \times 10^7$  CFU/mL,经耐酸、耐胆盐实验,活菌数仍在  $10^5$  CFU/mL 以上,表明有足够数量的植物乳杆菌 Zhang-LL 通过胃肠道而保持活性,证明了此菌株对酸及胆盐具有较高的耐受性,能够在胃中存活并进入肠道。同时模拟胃肠道逆环境,以邻苯二甲醛法测定其体外降胆固醇能力,其体外胆固醇降低率在 20.69%~35.68% 范围之间;当菌液不经过胃酸时,8 h 培养后胆固醇的移除率最高为 35.68%。当菌液经过胃酸 120 min 时,胆固醇的降低率最低为 20.69%。本实验室保藏的菌株 Zhang-LL 在体外表现为一株具有良好降胆固醇能力的菌株,为进一步研究其体内降胆固醇作用及移除胆固醇的作用机理提供参考。

### 参考文献

[1] Steomberg D, Parthasarthy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity[J]. The New England Journal of Medicine, 1989, 320(14):915-924.

[2] 隋在云,盛国良,李英霞,等.复方降脂软胶囊对高脂血症大鼠血液流变学的影响[J].河南中医,2009,29(4):353-354.

[3] Perdigon G. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. [J]. Immunology, 1988; 63(1): 17-23.

[4] Mann GV. Study of surfactant and cholesteremia in the Maasai [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1974, 27(5): 464-469.

[5] Jones M, Martoni C, Parent M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in

hypercholesterolaemic adults [J]. Br J Nutr, 2012, 107(10): 1505-1513.

[6] Rajesh Kumar, Sunita Grover, Virender Kumar Batish. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats [J]. British Journal of Nutrition, 2011, 105(4): 561-573.

[7] Anderson JW, Gilliland SE. Effect of Fermented Milk Containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans [J]. Journal of the American College of Nutrition, 1999, 18(1): 43-50.

[8] Nguyen TD, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 358-361.

[9] 谢宁. 两株乳酸杆菌对高脂饮食大鼠胆固醇影响及相关机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[10] 李婷婷. 降胆固醇益生乳酸菌的筛选及其在大鼠体内的应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

[11] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 143-147, 263.

[12] Rudel L L, Morris M D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde [J]. Journal of Lipid Research, 1973, 14: 364-366.

[13] Psomas E I, Fletouris D J, Litopoulou-Tzanetaki E, et al. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(86): 3416-3422.

[14] 赖文, 刘书亮, 张倩颖, 等. 降胆固醇乳酸菌鉴定及其在体外模拟胃肠环境中抗性研究[J]. 中国酿造, 2011(3): 90-93.

[15] Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1985, 49(2): 377-381.

[16] DIA Pereira, GR Gibson. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4689-4693.

[17] 靳志强, 王延祥, 李平兰, 等. 植物乳杆菌耐酸耐胆盐的体外实验及其降胆固醇作用[J]. 中国食品学报, 2009(9): 24-28.

[18] Shimada K, Bricknell KS, Finegold SM. Deconjugation of bile acid by intestinal bacteria: a review of literature and additional studies [J]. The Journal of Infectious Diseases, 1969, 119(3): 273-281.

[19] Razin S, Tully JG. Cholesterol Requirement of Mycoolasmas [J]. Journal of Bacteriology, 1970, 102(2): 306-310.

[20] ZHAO Ruixiang, SUN Junliang, MO Haizhen, et al. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2007, 23(2): 195-200.

[21] 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(7): 69-72.