

# 罗伊氏乳杆菌发酵液中 具有降胆固醇能力蛋白的分离、纯化和鉴定

陈 臣<sup>1,\*</sup>,于瑞莉<sup>2</sup>

(1.上海应用技术大学,香料香精技术与工程学院,上海 201418;

2.江南大学,食品科学与技术国家重点实验室,江苏无锡 214122)

**摘要:**罗伊氏乳杆菌 DSM122460 无细胞上清发酵液 (cell-free supernatant, CFS) 具有较高的胆固醇移除能力,经初步鉴定有效成分为蛋白质。通过超滤浓缩、硫酸铵分级沉淀、DEAE Sepharose F.F 阴离子交换层析进一步对该活性成分进行分离纯化。纯化后,其比活力达到 61.6 U/mg,纯化倍数为 32.4。经 SDS-PAGE 检测,样品达到电泳级纯,分子量约为 60 ku。通过质谱鉴定初步认定该活性蛋白为一假设蛋白,其功能尚待进一步研究。

**关键词:**罗伊氏乳杆菌,无细胞上清发酵液,移除胆固醇,纯化,假设蛋白

## Isolation, purification and identification of protein with cholesterol-reducing activity from the supernatant of *Lactobacillus reuteri*

CHEN Chen<sup>1,\*</sup>, YU Rui-li<sup>2</sup>

(1.School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China;

2.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The cell-free supernatant (CFS) of *Lactobacillus reuteri* DSM122460 exhibited the cholesterol removal ability and the effective components were predicted as proteins. The active component was purified by ultrafiltration, ammonium sulfate precipitation, and DEAE-Sepharose F.F anion exchange chromatography. The specific activity of purified component was 61.6 U/mg with a purification factor of 32.4. The purified protein was electrophoresis pure determined by SDS-PAGE, and the estimated molecular weight was about 60 ku. The active protein was identified as a hypothetical protein by mass spectrometry and its function remains to be further studied.

**Key words:** *Lactobacillus reuteri*; cell-free supernatant (CFS); cholesterol reduction; purification; hypothetical protein

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)22-0200-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.22.031

胆固醇又称胆甾醇,是动物组织细胞所不可缺少的重要物质,它不仅参与形成细胞膜,而且是合成胆汁酸、维生素 D 和甾体激素的原料,是人体内重要的营养成分<sup>[1]</sup>。胆固醇分为高密度胆固醇和低密度胆固醇两种,前者对心血管有保护作用,后者偏高,能对动脉造成损害。随着人们生活水平的逐渐提高,低密度胆固醇摄入量普遍偏高。血清中低密度胆固醇含量偏高,容易导致动脉粥样硬化、冠心病、脑中风、高血压等心脑血管疾病,严重威胁人类健康。研究表明,血清中低密度胆固醇减少 1% 就可以使冠心病的危险降低 2%~3%<sup>[2]</sup>,因此,降低血清和食物中低密度胆固醇含量是当前科学研究热点之一。

早在 1974 年, Mann 等研究者就发现大量饮用酸乳等发酵乳制品的非洲 Masai 人血清胆固醇保持在非常低的水平<sup>[3]</sup>,之后的很多研究都表明乳酸菌具有降低血清总胆固醇及低密度胆固醇的功能<sup>[4]</sup>。然而益生菌降解血清胆固醇的确切机理目前仍不明确。Gilliland 等<sup>[5]</sup>认为在厌氧的条件下,乳酸菌在含有胆盐的高胆固醇培养基中生长时,菌体细胞可以吸收介质中的胆固醇,降低介质中的胆固醇含量。Klaver<sup>[6]</sup>和 Corzo<sup>[7]</sup>研究表明乳酸菌从培养基中去除胆固醇是因为其分泌胆盐水解酶促进甘氨酸钠和牛磺酸钠水解,细菌在动物或人体内通过水解结合型胆盐转变为游离胆酸,进而与胆固醇发生共沉淀作用。随着研究的开展,目前人们越来越倾向于认为,细菌

收稿日期:2016-05-24

作者简介:陈臣(1982-),男,博士,讲师,研究方向:食品生物技术, E-mail:chenchen@sit.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金(31501451)。

降低胆固醇的作用是由于菌体吸收和胆固醇共沉淀协同作用的观点,而且不同条件下细菌会表现出以某种方式(吸收或共沉淀)为主的能力<sup>[8]</sup>。此外,研究还发现乳酸菌发酵生成的不可消化短链脂肪酸、胞外多糖、蛋白质等均参与对胆固醇的分解和去除作用<sup>[9-10]</sup>。上述研究结果充分说明乳酸菌的降胆固醇机制是复杂的,或许还有其它的作用方式存在。

罗伊氏乳杆菌普遍存在于人类和大部分动物的肠道中,是目前已报道的具有降胆固醇能力的乳酸菌之一。研究发现罗伊氏乳杆菌 DSM122460 在无细胞参与的情况下仍表现出胆固醇移除能力,其无细胞上清发酵液(Cell free supernatant, CFS)的胆固醇移除率可达到 69%。通过比较对照组和处理组的胆盐水解酶活性和移除胆固醇能力得出 CFS 中含有除胆盐水解酶以外的可移除胆固醇的有效成分,经硫酸铵沉淀等方法初步鉴定为蛋白类物质<sup>[11]</sup>。本文对此有效成分进行了分离纯化,并通过质谱进行初步鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

罗伊氏乳杆菌 DSM122460 台湾大学赠送;邻苯二甲醛 Sigma 公司;MRS 培养基 德国 Merck 公司;DEAE Sepharose F.F Ameisham Biosciences 公司;胆固醇、硫酸铵、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250 等其他试剂 国药集团化学试剂有限公司。

Avanti J30I 高速冷冻离心机 美国 Beckman Coulter 公司;CE7250 型紫外分光光度计 英国 BIO-AQUARIUS 公司;真空冷冻干燥机 美国 LABCONCO 公司;AKTK purifier 层析仪 美国 GE Healthcare 公司;Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳仪、Geldoc 2000 凝胶成像系统 美国 Bio-Rad 公司;4800 MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪 美国 Applied Biosystems 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 罗伊氏乳杆菌 DSM122460 使用前按 1% 的接种量接种到 MRS 肉汤,在 37 °C 培养 12 h,传代两次进行活化,实验菌株在实验过程中 4 °C 冰箱保存。

1.2.2 粗蛋白液的制备 罗伊氏乳杆菌 DSM122460 菌液按 1% 接种于 2 L MRS 培养基中,37 °C 培养 24 h,4 °C,12000 × g 离心 10 min 收集上清液,经 0.22 μm 微滤膜过滤后用截留分子量为 30000 ku 的膜超滤浓缩至 200 mL。

1.2.3 硫酸铵分级沉淀 取 200 mL 蛋白浓缩液在冰浴条件下缓慢加入研磨好的硫酸铵粉末,依次至 30%、40%、50%、60%、70%、80% 的饱和度,缓慢搅拌防止泡沫产生。每加完一次硫酸铵后,将上清液于 4 °C 冰箱静置 3 h,然后离心(10000 × g, 4 °C, 25 min),收集上清和沉淀,吸取少量上清液测定蛋白质含量。剩余上清液继续加入硫酸铵至下一设定饱和度,静置,离心收集上清和沉淀,如此循环操作。考马斯亮蓝法测定上清液的蛋白含量,沉淀用约两倍体积的磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH7.0)溶解后,

透析,测定胆固醇清除能力。

确定最佳饱和度后,在后续操作中,首先在冰浴条件下向上清液中加入硫酸铵至饱和度范围的下限,4 °C 冰箱静置过夜,离心(10000 × g, 4 °C, 25 min),弃去沉淀,量取上清液体积;冰浴条件下向上清液中加入硫酸铵至饱和度上限,4 °C 冰箱静置 3 h,离心(10000 × g, 4 °C, 25 min),收集沉淀,弃去上清液,将沉淀复溶至约 2 倍体积的磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH7.0)中,透析除盐。透析后的蛋白样品装入冻干瓶中,经真空冷冻干燥后得到蛋白粉,磷酸盐缓冲液溶解后进行下一步纯化操作。

1.2.4 阴离子交换层析 将 DEAE-Sepharose F.F 离子交换琼脂糖凝胶沿玻璃棒缓慢加入到型号 XK16/20 层析柱中,凝胶沉降过夜,确保胶面平整。连接 AKTA purifier 层析仪,使用 Unicorn 软件调整流速为 0.5 mL/min,最大柱压为 0.15 MPa,UV 280 nm 进行检测。先用经抽滤脱气的超纯水平衡两个柱体积至仪器基线平直,再用经抽滤脱气的缓冲液(pH7.0, 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液)平衡至仪器基线平直。上样前,样品需经过 0.45 μm 膜过滤,用注射器将样品注入每次上样量为 3 mL 待样品全部进入层析柱后,用缓冲液洗脱,流速 0.5 mL/min,UV 280 nm 检测紫外吸收峰,待穿透峰洗脱结束后,以含 0.5 mol/L NaCl 的平衡缓冲液洗脱蛋白<sup>[12]</sup>。手动收集样品,当 UV 280 nm 吸收开始明显升高时开始进行收集,每管 5 mL,待 UV 280 nm 吸收值降低至基线时停止收集。收集产物 4 °C 透析除盐后浓缩测定其胆固醇清除能力。

梯度洗脱时,起始缓冲液 A 为 pH7.0, 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液,洗脱缓冲液 B 为含 1 mol/L NaCl 的 pH7.0, 25 mmol/L 的磷酸盐缓冲液,60 min 内洗脱 8 个柱体积后,两种缓冲液按合适比例混合,可得到 NaCl 浓度在 0~0.5 mol/L 范围的离子强度梯度。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳分析 采用不连续垂直板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行蛋白的纯度和分子量的分析,5% 浓缩胶,12% 分离胶,以低分子量标准蛋白为标准。模式为恒压模式,电压为 110 V;电泳完后,用考马斯亮蓝染色液于室温染色 2 h,用脱色液脱色至蛋白条带清晰。通过凝胶成像仪灰度扫描电泳胶板,分析蛋白分布与浓度。

1.2.6 目的蛋白的二级质谱鉴定 将含有目的蛋白的 SDS-PAGE 胶块切成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块,装入离心管中,水洗一次。用脱色缓冲液浸泡 15 min。反复三次,直至将颜色脱尽,蒸馏水洗涤 1 次,将胶块浸入 30 μL 100% 乙腈中 5 min,脱水使胶块变白,然后室温抽干加 8 μL 胰蛋白酶液(0.005 mg/mL),37 °C 放置 16 h 左右。将 0.3 μL 已酶解的样品点到样品板上,室温晾干,上 MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪选用正离子反射模式进行一级质谱解析,选择强度最大的 10 个峰进行二级质谱,将一级和二级质谱数据整合并使用 GPS 3.6 (Applied Biosystems) 和 Mascot 2.1 (Matrix Science) 对质谱数据进行分析 and 蛋白鉴定。

1.2.7 胆固醇清除能力的测定 为了防止 CFS 有效

成分纯化过程中胆盐水解酶的干扰,在每一步纯化后进行移除胆固醇能力测定时不再添加牛磺胆酸钠。

取一定量的溶液或冻干粉溶于 1 mL pH4.4 的醋酸-醋酸钠的缓冲液中,以相同体积的缓冲液作对照,分别加入制备好的卵磷脂-胆固醇胶束,混合均匀,37 °C 反应 30 min,利用改良的邻苯二甲醛法<sup>[14]</sup>测定对照组和样品组胆固醇含量。以 1 h 内转化 1 μg 胆固醇所需的物质含量定义为一个活力单位<sup>[13]</sup>。

胆固醇清除能力计算公式:活力(U/mL) =  $\frac{KW}{VT}$

式中:K,蛋白液稀释倍数;W,转化胆固醇的量(μg);V,蛋白液液的体积(mL);T,反应时间(h)。

1.2.8 蛋白质浓度的测定 采用考马斯亮蓝 G250 的方法,并计算比活力。

## 2 结果与讨论

### 2.1 粗蛋白液的浓缩

在分别研究罗伊氏乳杆菌 DSM122460 的 CFS 和细胞裂解物移除胆固醇能力后,结果显示罗伊氏乳杆菌 DSM122460 的 CFS 具有相当高的胆固醇移除能力,细胞裂解物基本无移除能力,表明参与移除胆固醇的物质主要位于 CFS<sup>[11]</sup>。经蛋白浓度测定实验,CFS 中蛋白含量偏低,蛋白浓度只有 40 μg/mL 左右,不利于进一步蛋白的分离和纯化。因此,CFS 经超滤浓缩至十分之一体积的浓缩液作为粗蛋白液的来源。

### 2.2 硫酸铵浓度的确定

如图 1 所示,随着硫酸铵浓度的增加,发酵上清液中的蛋白浓度随着硫酸铵加入量的增加而逐渐减少,硫酸铵饱和度为 30% 时上清液中蛋白浓度为 31.2 μg/mL 时,硫酸铵达到 80% 时上清液中蛋白浓度减低到 10.8 μg/mL。不同饱和度沉淀得到的蛋白经过盐析脱盐后,测得其去除胆固醇的能力。研究表明硫酸铵饱和度为 30%、40%、50% 和 80% 时沉淀出的蛋白没有移除胆固醇的能力;饱和度为 60% 时,活力为 8.4 U/mL,饱和度为 70% 时,活力为 14.8 U/mL,胆固醇清除能力最高。因此选用 50%~70% 硫酸铵饱和度纯化该蛋白。

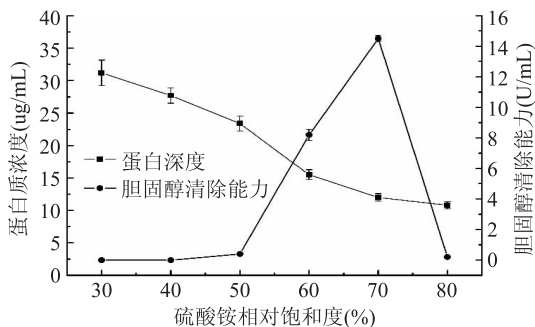


图1 硫酸铵饱和度与降胆固醇能力的关系曲线

Fig.1 The relationship between saturated ammonium sulfate solution and the cholesterol reduction ability

### 2.3 阴离子交换层析

罗伊氏乳杆菌 DSM122460 在 pH 为 4.0 的情况

下胆固醇移除率最高,随着 pH 的升高,移除率下降,推断此蛋白的等电点在 pH7.0 以下<sup>[11]</sup>。因此选用阴离子交换剂(DEAE-Sephrose F.F)进行实验<sup>[15]</sup>。

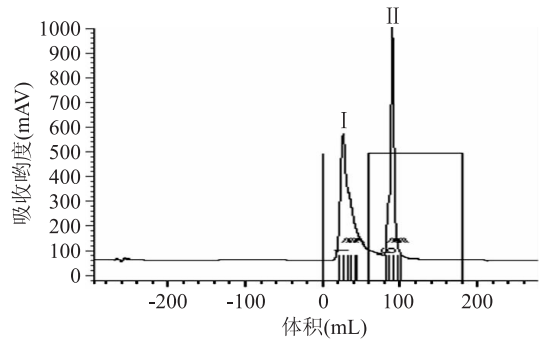


图2 pH7.0,NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时目的蛋白在 DEAE-Sephrose F.F 层析图谱

Fig.2 Chromatography of the active substance on a DEAE-Sephrose F.F column at pH7.0 and 0.5 mol/L NaCl

从图 2 可以看出,进样后得到一个蛋白峰 I,经过 0.5 mol/L NaCl-25 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗脱后得到洗脱峰 II,经活力测定,峰 II 具有降胆固醇能力。蛋白电泳结果表明(图 4),峰 II 中含有多种蛋白。可能由于离子浓度太强,几种蛋白同时洗脱下来。采用起始缓冲液 A(pH7.0,25 mmol/LPBS)与洗脱缓冲液 B(pH7.0,25 mmol/LPBS,1 mol/L NaCl)进行线性梯度洗脱,经过 60 min 缓冲液 B 从 0 达到 100%,峰 II 被洗脱开,得到 3 个洗脱峰,分离效果较好,结果如图 3 所示。经活力测定,NaCl 浓度约为 0.25 mol/L 时洗脱出的峰 II-3 具有降胆固醇能力,收集该组分,冻干备用。

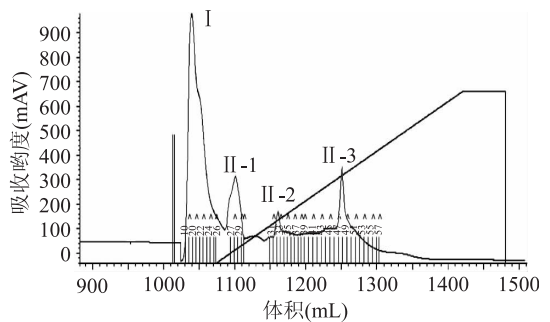


图3 pH7.0、采用线性梯度洗脱(NaCl 浓度 0~0.5 mol/L)时目的蛋白在 DEAE-Sephrose F.F 层析图谱

Fig.3 Chromatography of the active substance on a DEAE-Sephrose F.F column at pH7.0 with linear gradient elution of NaCl(0~0.5 mol/L)

由表 1 中可得,粗蛋白液成分较复杂,比活力较低;经超滤浓缩和硫酸铵沉淀后,对目的蛋白进行了富集,其比活力达到 29.4 U/mg;再通过阴离子交换层析进行分离,采用线性梯度洗脱方式,比活力达到了 61.6 U/mg,纯化倍数为 32.4。

### 2.4 SDS-PAGE 蛋白电泳分析

将纯化过程中硫酸铵分级沉淀、两次阴离子交换层析收集的样品用分离胶浓度 12% 的 SDS-PAGE 分析,选择低分子量的标准蛋白作为分子量标准(图 4)。电泳结果表明,经过上述纯化步骤后得到目的



表1 降胆固醇相关蛋白的分离纯化结果

Table 1 Purification result of the cholesterol-reduction protein

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活力 (U/mg)	纯化倍数	得率 (%)
粗蛋白液	220.0	410.2	1.9	1	100
超滤浓缩	64.1	334.7	5.2	2.7	81.6
硫酸铵分级沉淀	4.9	143.9	29.4	15.5	35.1
阴离子交换层析	0.90	55.4	61.6	32.4	13.5

蛋白的单一一条带,达到电泳纯,结合 Marker 分析,此蛋白的分子质量约为 60 ku。

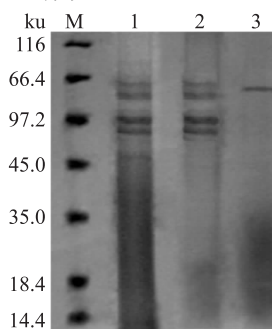


图4 分离纯化各组分的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of samples

from different steps of purification

注: M.Marker, 1.硫酸铵分级沉淀, 2.阴离子层析 (0.5 mol/L NaCl 洗脱), 3.峰 II-3, 阴离子层析 (0.1~0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱)。

### 2.5 目的蛋白的质谱鉴定

对图4泳道3中的蛋白条带挖点后进行酶切, 然后将其进行串联质谱 (MALDITOF/TOF) 分析, 并利用 Mascot 搜索引擎将数据在蛋白质数据库 (NCBIInr) 中检索。利用数据库检索对目的蛋白进行检索后得到 Mascot Score 图 (图5)。结果表明, 目的蛋白与检索结果的匹配分数达到 108 分, 远远高于其阈值分数 65 分, 说明两者匹配上的概率是显著的 ( $p < 0.05$ )。检索结果显示其分子量为 60802, 和样品 SDS-PAGE 电泳显示结果接近。肽段比对到的蛋白质为: hypothetical protein [Lactobacillus reuteri], NCBI 数据库中登录号 No.gi|489764699。氨基酸覆盖率为 12% (图6), 已用粗体标明。目前对于该蛋白的研究还较少, 通过保守结构域分析, 该蛋白含有由 63 个氨基酸组成的含有三段重复区域糖苷结合位点, 其中短的重组区域可能与胆碱的结合有关。

与降胆固醇有关的蛋白主要包括胆盐水解酶和胆固醇氧化酶。自从发现乳酸菌在肠道中可使结合胆盐分解为游离胆盐以来, 胆盐水解酶被认为在乳酸菌移除胆固醇方面起着关键作用。胆盐水解酶将结合胆盐水解为游离胆盐后, 游离胆盐需要在酸性条件下 ( $pH < 6.0$ ) 才能和胆固醇发生共沉淀作用, 从而起到移除胆固醇的能力<sup>[16]</sup>。通过前面的研究已经表明, CFS 中除了胆盐水解酶以外还含有可移除胆固醇的有效成分<sup>[11]</sup>。另一和胆固醇降解代谢相关的酶是胆固醇氧化酶, 它在氧气的参与下, 可将胆固醇转化成胆甾-4-烯-3-酮。然而, 目前还未有乳酸菌

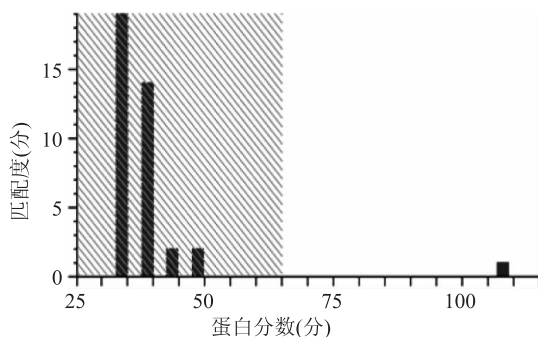


图5 目的水解后肽段的序列检索 Mascot score 图

Fig.5 Mascot score histogram of peptides from the digestion of the target protein searching in the database

```

1 MVSNGVLQLL LTFVATLGLA SVNNASAATT DTNTTIQQTQ TTDQTNNSFK EATTVKGNTE
61 RNITDSPTNK DQTTDKFKNK VTNVDQSQQQ TDGKQGAECT TDQPENKAP QTTNWTKNTN
121 NQWVYSCKDS QDVKGTQYVQ LPTIPDTNVE GDTNWFVKD GVAQSGVQQW AGSYYYFDPT
181 TYLRVDNDYR QAQWGDWYMF GNDGRIVTGL YGYNQDTYYA NPTVYLRKRN TYIQTEKDGGR
241 GVLLGADGAA LSGIQYWNNA YYYFDPATHL QANKRNYVQS QWGDWYLIGD SGQVLSGVQQ
301 WAGSYYYFDP TTYLRVDNDYR RQAQWGDWYM FGNDRIVRTG LYDYKNTYQ ANFVYLRLEK
361 NTYTKNAKDG RGVLLGDNGA ALSGVQSMNN AYYFFDPTTH LQANKRNYVQ SQWGDWYLID
421 NNGKVLSSGLQ EHYGNYYFDF PITYLKVTNK WVNQYFGAD GVRVYQRFNL DYGRLYRFDA
481 NGNMLKNRWF NDDNAKKSYY FGTGVAVYTG RHTINGVYTV FNSDGRVRET IK
    
```

图6 质谱分析中与比对蛋白匹配的肽段序列

Fig.6 Matched peptides identified

by mass spectrometry with the target protein

产胆固醇氧化酶的报道<sup>[17]</sup>。除此以外, 于平<sup>[18]</sup>等人也发现植物乳杆菌在生长过程中产生了特殊的酶系, 从而将胆固醇降解成其他物质, 导致其含量降低, 然而具体酶的种类并未说明。韩国 Kim 等在嗜酸乳杆菌 ATCC43121 的 CFS 中也发现了与降低胆固醇有关的蛋白, 其分子量为 12 ku<sup>[13]</sup>。本研究中发现的与降胆固醇有关的蛋白为一假设蛋白, 其功能尚需进一步研究。

### 3 结论

罗伊氏乳杆菌 DSM122460 的 CFS 通过超滤装置得到浓缩液, 硫酸铵分级沉淀的饱和度范围为 50%~70%, 胆固醇移除能力最高; 样品采用 DEAE Sepharose F.F 阴离子交换层析进一步分离纯化, 当 pH 为 7.0, 采用含 0.1~0.5 mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱时, 分离效果较好, 得到了电泳纯的目的蛋白, 纯化倍数为 32.4; 经 SDS-PAGE 分析, 其分子量约为 60 ku, 通过质谱鉴定初步认定该活性蛋白为一假设蛋白, 其功能尚待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 于守洋. 中国保健食品的进展 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1-213
- [2] Manson J E, Tosteson H, Ridker P M, et al. The primary prevention of myocardial infarction [J]. N Engl J Med, 1992, 326 (21): 1406-1416.
- [3] Mann G V. Studies of a surfactant and cholesteremia in Maasai [J]. Am J Clin Nutr, 1974, 27(5): 464-469.
- [4] Martinez R C, Bedani R, Saad S M. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges [J]. Br J Nutr, 2015, 114(12): 1993-2015.
- [5] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus [J]. Appl Environ

Microbiol, 1985, 49(2): 377-381.

[6] Klaver F A, Van Der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(4): 1120-1124.

[7] Corzo G, Gilliland S E. Measurement of bile salt hydrolase activity from Lactobacillus acidophilus based on disappearance of conjugated bile salts[J]. J Dairy Sci, 1999, 82(3): 466-471.

[8] Tsai C C, Lin P P, Shieh Y M, et al. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*[J]. Scientific World J, 2014, 2014: 690-752.

[9] Pereira D I, Gibson G R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002, 37(4): 259-281.

[10] Lindstrom C, Holst O, Nilsson L, et al. Effects of *Pediococcus parvulus* 2.6 and its exopolysaccharide on plasma cholesterol levels and inflammatory markers in mice[J]. AMB Express, 2012, 2(1): 66.

[11] 于瑞莉, 郭本恒, 张灏, 等. 罗氏乳杆菌无细胞上清培养液移除胆固醇能力的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012(1): 89-93.

[12] Panthi S, Choi Y S, Choi Y H, et al. Biochemical and Thermodynamic Characterization of a Novel, Low Molecular Weight Xylanase from *Bacillus Methylophilus* CSB40 Isolated from Traditional Korean Food [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2016, 179(1): 126-142.

[13] Kim Y, Jin Y W, Whang K Y. Characterization of the Cholesterol-Reducing Activity in a Cell-Free Supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 [J]. Biosci Biotech Biochem, 2008, 72(6): 1483-1490.

[14] Rudel L L, Morris M D. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde[J]. J Lipid Res, 1973, 14(3): 364-366.

[15] 田亚平. 生化分离技术[M]. 化学工业出版社, 2006: 235-292.

[16] Jones M L, Tomaro-Duchesneau C, Martoni C J, et al. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(5): 631-642.

[17] 张玲, 杨海麟, 孙燕, 等. 微生物胆固醇氧化酶的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 225-229.

[18] 于平, 孙海森, 励建荣, 等. 植物乳杆菌 LpT1 和 LpT2 体外降胆固醇机制[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 561-565.

(上接第 194 页)

Microbiol Biotechnol, 2003, 30(12): 682-690.

[9] 张卫华, 汪超, 罗军杰, 等. 响应面优化醋酸菌发酵条件研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 48-51.

[10] Matthias K, Wolfgang W, Stamml, et al. Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations [J]. Applied Microbiol Biotechnol, 1989 (30): 47-52.

[11] 朱运平, 李大为, 张雪, 等. 巴氏醋酸杆菌 B103 培养条件和培养基成分的优化研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(6): 60-65.

[12] 朱杨玲. 采用 PCR-DGGE 方法研究浙江玫瑰醋酿造过程中的微生物多样性[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2009.

[13] Apisit S, Somboon T, Suwimon K. Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand [J]. Applied Microbiol Biotechnol, 2004, 50: 47-53.

[14] 董书阁, 管斌, 熊三玉, 等. 利用响应面分析法优化醋酸菌 AD\_1 的发酵条件[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(3): 78-81.

[15] 邓涛, 单杨, 李高阳, 等. 响应面优化柑橘皮色素超声波辅助提取工艺[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(2): 56-61.

[16] 何志刚, 李维新, 林晓姿, 等. 枇杷酒醋化过程醋酸菌的生长、产酸及耗氧的关系[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(12): 22-25.

[17] 陈英才. 固定化醋酸菌酿造食醋的过氧化反应[J]. 中国调味品, 2001(9): 7-8, 12.

(上接第 199 页)

[24] Ranadheera C S, Baines S K, Adams M C. Importance of food in probiotic efficacy [J]. Food Research International, 2010, 43(1): 1-7.

[25] Mani-López E, Palou E, López-Malo A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(5): 2578-2590.

[26] 王佳. 鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌发酵大豆乳工艺研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009: 22.

[27] 吴均. 牦牛酸乳中优良乳酸菌的筛选鉴定及发酵酸乳抗氧化特性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 23.

[28] 李岩岩, 谷新晰, 杨雪聪, 等. 瑞士乳杆菌和干酪乳杆菌混种发酵绿豆乳产品稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 14-18.

[29] 杨媚. 应用萌发大豆生产益生菌发酵豆乳的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(11): 206-209.

[30] Thomas T D. Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better fermented animal products [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 1985, 2(1): 1-10.

[31] Nguyen H T H, Ong L, Lefevre C, et al. The microstructure and physicochemical properties of probiotic buffalo yoghurt during fermentation and storage: a comparison with bovine yoghurt [J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(4): 937-953.

[32] Bezerra M F, Souza D F S, Correia R T P. Acidification kinetics, physicochemical properties, and sensory attributes of yoghurts prepared from mixtures of goat and buffalo milks [J]. International Journal of Dairy Technology, 2012, 65(3): 437-443.