



一株降胆固醇作用乳酸菌 KF5 的分离与鉴定

张 玢, 许 女, 习傲登, 王艳萍

(天津市食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘 要: 利用邻苯二甲醛法, 从源于西藏 Kefir 粒的 56 株乳酸菌和实验室保存的 9 株乳酸菌中, 筛选得到了一株降胆固醇效果明显的乳酸菌 KF5。经生理生化实验及分子遗传学鉴定, 该菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。为了能够进一步研究 KF5 的降胆固醇功能, 对其进行了生物学特性的考察。结果表明, KF5 具有较好的耐酸性以及一定的胆盐耐受力。

关键词: 植物乳杆菌; 胆固醇; 筛选; 鉴定; 生物学特性

中图分类号: Q93-3 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)02-0017-04

Screening and Identification of Cholesterol-Reducing KF5 Strain

ZHANG Bin, XU Nü, XI Ao-deng, WANG Yan-ping

(Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The cholesterol-reducing ability was tested on 56 strains of lactic acid bacteria isolated from Tibet kefir grain and 9 strains of lactic acid bacteria stored in our lab by the o-phthalaldehyde method. KF5 strain was screened for its better cholesterol-reducing ability and bionomics. KF5 strain was identified as *Lactobacillus plantarum* based on morphologic observe, biochemical identification and sequence analysis of 16S rDNA. The further study on the bionomics of KF5 strain was carried out. The results show that KF5 strain has good acid tolerance and bile salt tolerance.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; cholesterol; screening; identification; bionomics

动脉粥样硬化、冠心病等心脑血管疾病已严重威胁着人类的健康, 血清中高胆固醇含量被认为是诱发此类疾病的重要危险因素。因此, 降低血清胆固醇水平直接关系到人类的健康, 也是当前科研工作的热点之一。20 世纪 70 年代, 科学家先后通过对饮用发酵乳制品的非洲 Massi 人血清胆固醇和新生儿的研究以及对常饮酸乳的美国人的调查^[1]等发现, 乳酸菌具有降低人体血清胆固醇的作用。目前, 国外在大量的体内和体外研究实验^[2-3]中都证实了乳酸菌这一益生功能, 欧美和日本市场上也已经有了降低血清胆固醇的益生乳酸菌制品^[4], 但是国内在这方面的研究还处于起步阶段, 相关产品更是甚少。因此, 寻求具有降低胆固醇功能并且安全高效的乳酸菌菌种具有十分重要的意义。本文从分离自西藏 Kefir 粒的 56 株乳

酸菌和保存于实验室的 9 株乳酸菌中筛选得到一株降胆固醇效果明显的乳酸菌 KF5, 并对其进行了鉴定和生物学特性讨论, 为进一步研究 KF5 的降胆固醇机理和开发降胆固醇制品提供理论依据和基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

本实验所用 65 株乳酸菌中, 56 株分离自西藏 Kefir 粒, 9 株为本实验室保存。

1.2 培养基

脱脂乳培养基 (g/L): 脱脂奶粉 120, pH 自然。115 °C 灭菌 20 min。

MRS 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 牛肉浸膏 10, 酵母

收稿日期: 2008-08-31; 修回日期: 2008-11-11

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD04A06)

作者简介: 张 玢 (1983—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 王艳萍, 教授, ypwang@tust.edu.cn.

浸膏 5, 葡萄糖 20, K_2HPO_4 2, 乙酸钠 5, 柠檬酸铵 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05, 吐温 80 1, pH 6.2~6.6. 121 °C 灭菌 20 min. MRS 固体培养基加入 2% 琼脂.

MRS-CHOL 培养基: 称取胆固醇 0.5 g, 以无水乙醇定容至 50 mL, 即可获得 1.0 g/100 mL 的胆固醇溶液. 在 MRS 液体培养基中添加 1% 上述溶液, 使胆固醇终浓度为 10 mg/100 mL. 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 降胆固醇乳酸菌的筛选

采用邻苯二甲醛法^[5]测定胆固醇含量. 将 65 株乳酸菌各自于 MRS 液体培养基中活化两代, 按 4% 接种量接种于 100 mL 的 MRS-CHOL 培养基中, 37 °C 厌氧培养 24 h, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液待测. 选取胆固醇降解率高的乳酸菌作为进一步研究的菌株.

胆固醇降解率 = (对照胆固醇含量 - 发酵上清液胆固醇含量) / 对照胆固醇含量 × 100%.

将筛选得到的高效降胆固醇菌株按 4% 接种量接种于 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养 24 h 后测定 pH 并活菌计数; 再分别从脱脂乳培养基划线接种于含 0.3% 牛胆盐的 MRS 固体培养基上, 37 °C 厌氧培养 48 h, 观察生长情况. 选取产酸特性、生长特性以及胆盐耐受性较好的菌株进行后续研究.

1.4 菌种的鉴定

1.4.1 菌株形态学观察

将 KF5 划线接种于 MRS 固体培养基上, 37 °C 厌氧培养 48 h, 记录菌落特征. 同时在显微镜下观察记录菌体的形态特征.

1.4.2 菌株生理生化实验

对 KF5 进行菌属鉴定和糖发酵实验^[6], 以实验室保存保加利亚乳杆菌和嗜酸乳杆菌为标准菌株.

1.4.3 16S rDNA 的分子生物学鉴定

(1) 细菌总 DNA 的提取: 参照 Forsman P 等人^[7]的方法. (2) 16S rDNA 扩增: 以基因组 DNA 为模板, 利用细菌通用引物 (P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'; P2: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') 进行 PCR 扩增. 扩增程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性, 30 s, 55 °C 退火, 30 s, 72 °C 延伸, 1.5 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析. (3) 序列分析: 测序由北京奥科公司完成, 测序结果与 GenBank 中的标准株序列进行同源性比较.

1.5 菌株的生物学特性

1.5.1 生长特性

将 KF5 按 4% 接种量接种于 MRS 液体培养基

中, 37 °C 厌氧培养, 每 2 h 测定一次发酵液 A_{650} 和 pH.

1.5.2 耐酸性实验

将 KF5 按 4% 接种量分别接种于 200 mL pH 为 2.0 和 3.0 的 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养, 1、2、3 h 分别取样, 活菌计数. 以 pH 6.2~6.6 的 MRS 液体培养基作为对照.

1.5.3 耐胆盐实验

将 KF5 按 4% 接种量分别接种于 200 mL 含有 0.3% 和 0.5% 牛胆盐的 MRS 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养, 0、4、12 h 分别取样, 活菌计数. 以不含牛胆盐的 MRS 液体培养基作为对照.

2 结果与讨论

2.1 降胆固醇乳酸菌的筛选

采用本实验室保存的 9 株乳酸菌和从 Kefir 粒中分离得到的 56 株乳酸菌进行体外降胆固醇实验. 65 株乳酸菌对 MRS-CHOL 培养基中胆固醇的降解率见表 1.

表 1 不同菌株的降胆固醇能力

Tab.1 Cholesterol-reducing ability of different strains

胆固醇降解率/%	< 0	0 ~ 10	10 ~ 20	20 ~ 30	> 30
测定菌株数	9	35	15	4	2

由表 1 可知, 65 株乳酸菌中大部分都具有降胆固醇作用, 但降胆固醇能力差异较大, 有 6 株菌株的胆固醇降解率大于 20%. 其中, 从 Kefir 粒中分离得到的 KF5 和 KF6 降胆固醇效果最好, 胆固醇降解率分别达到了 $(34.56 \pm 1.85)\%$ 和 $(35.62 \pm 1.31)\%$.

比较 KF5 和 KF6 的基本特性发现 (表 2), KF5 在产酸特性、生长特性以及胆盐耐受性方面均优于 KF6, 因此选择 KF5 作为进一步研究的菌株.

表 2 菌株 KF5 和 KF6 的特性

Tab.2 Characteristics of KF5 and KF6

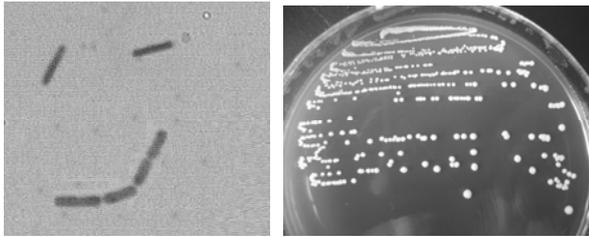
菌株	pH	活菌数/ mL^{-1}	胆盐耐受性
KF5	4.33	2.09×10^9	++
KF6	4.51	7.57×10^8	+

注: “++”表示生长良好; “+”表示生长.

2.2 KF5 的鉴定

2.2.1 个体形态及菌落特征

该菌为革兰氏阳性细菌, 短小杆状, 单独存在或呈短链状排列. 在 MRS 平板上表现为圆形、低凸起、边缘整齐、表面光滑、乳白色的光滑型菌落 (图 1).



(a) 个体形态 (b) 菌落形态

图 1 KF5 的个体形态和菌落形态图

Fig.1 Cellular and colonial morphology of KF5

2.2.2 生理生化实验结果

过氧化氢阴性, 发酵葡萄糖产酸, 无运动性, 不产 H₂S, pH 4.5 能生长, 确定为乳杆菌属 (*Lactobacillus*). 依据糖发酵实验结果 (表 3), 初步鉴定 KF5 为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*).

表 3 KF5 的糖发酵实验结果

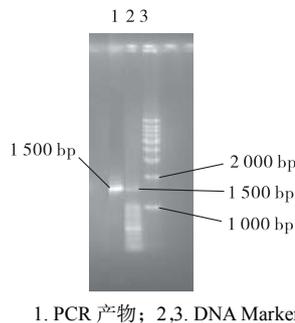
Tab.3 Biochemical identification of KF5

糖类	结果	糖类	结果
葡萄糖	+	棉籽糖	+
半乳糖	+	鼠李糖	-
果糖	+	阿拉伯糖	-
麦芽糖	+	山梨醇	+
纤维二糖	+	蔗糖	+
甘露醇	+	海藻糖	+
甘露糖	+	木糖	-
乳糖	+	核糖	+
蜜二糖	+	七叶苷	+

注: “+”表示菌株为阳性反应; “-”表示菌株为阴性反应.

2.2.3 16S rDNA 的遗传学鉴定

以 KF5 总 DNA 为模板, 利用细菌通用引物进行 PCR 扩增, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 得到约 1 500 bp 的扩增产物, 见图 2.



1. PCR 产物; 2,3. DNA Marker

图 2 KF5 的 16S rDNA 的 PCR 产物电泳图

Fig.2 16S rDNA of KF5 amplified by PCR

PCR 产物的纯化和核酸序列的测定由北京奥科公司完成, 测序结果与 GenBank 中的标准株序列进行对比. 由表 4 可见, 通过 16S rDNA 序列同源性比较, 菌株 KF5 与 GeneBank 中 11 株植物乳杆菌的 16S rDNA 序列相似性达到 100%. 因此进一步确认

KF5 为植物乳杆菌.

表 4 菌株 KF5 的 16S rDNA 序列同 GeneBank 中细菌菌株同源性分析结果

Tab.4 Analysis results of homology of 16S rDNA sequence of isolate KF5 compared with different strains available in GenBank

菌种名	菌株名	登记号	相似性/%
植物乳杆菌	EW-p	EU096230.1	100
植物乳杆菌	NRIC 1834	AB362755.1	100
植物乳杆菌	NRIC 1767	AB362747.1	100
植物乳杆菌	NRIC 1724	AB362733.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0387	AB362656.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0386	AB362655.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0385	AB362654.1	100
植物乳杆菌	NRIC 0384	AB362653.1	100
植物乳杆菌	L3	DQ239696.1	100
植物乳杆菌	WCFS1	AL935258.1	100
植物乳杆菌	WCFS1	AL935253.1	100

2.3 KF5 的生物学特性

2.3.1 生长特性

KF5 的生长曲线和产酸曲线如图 3 所示. 由图 3 可知, KF5 前 2 h 生长缓慢, 2 h 后进入对数生长期, 16 h 后生长处于稳定期. 其产酸速度开始较快, 8 h 后 pH 就降至 5 以下, 16 h 后进入稳定期, 产酸平稳, pH 基本维持在 4.15 左右.

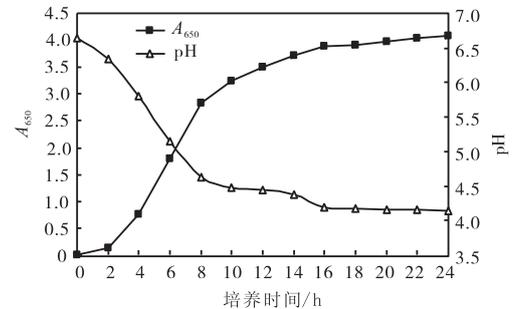


图 3 KF5 生长曲线及 pH 的变化

Fig.3 Grown and pH change curves of strain KF5

2.3.2 耐酸性实验

模拟胃酸环境, 观察 3 h 内 KF5 在 pH 分别为 2 和 3 的液体 MRS 培养基中的活菌数变化, 测定其耐酸性, 结果见表 5. KF5 在 pH 3.0 的条件下, 3 h 内活菌数基本没有变化, 3 h 后活菌数维持在 10⁸ mL⁻¹, 说明 pH 3.0 对 KF5 菌株的存活无太大抑制作用. 相对而言, pH 2.0 的条件对 KF5 影响较大, 2 h 后活菌数下降到 10⁵ mL⁻¹, 3 h 后大部分死亡, 活菌数降至 10⁴ mL⁻¹ 以下. 由于通常胃酸的 pH 在 3.0 左右, 流体食物在胃内停留时间为 1~2 h^[8], 所以 KF5 具有较强的耐酸能力, 能够顺利通过胃酸环境到达肠道.

表5 菌株 KF5的酸耐受性能
Tab.5 Acid tolerance of KF5

时间/h	活菌数/mL ⁻¹	
	pH 2.0	pH 3.0
0	1.77 × 10 ⁸	1.81 × 10 ⁸
1	8.50 × 10 ⁶	1.52 × 10 ⁸
2	1.20 × 10 ⁵	1.39 × 10 ⁸
3	—	1.01 × 10 ⁸

注：“—”表示活菌数少于 1.00 × 10⁴ mL⁻¹。

2.3.3 耐胆盐实验

人体小肠中通常的胆盐浓度为 0.3%~0.5%^[8]。模拟小肠胆盐环境,测得 KF5 在 MRS-牛胆盐培养基中活菌数的变化情况见表 6。

表6 菌株 KF5的胆盐耐受性能
Tab.6 Bile salt tolerance of KF5

胆盐浓度/%	活菌数/mL ⁻¹	
	2 h	4 h
0	1.82 × 10 ⁸	7.50 × 10 ⁸
0.3	6.20 × 10 ⁷	1.54 × 10 ⁷
0.5	5.60 × 10 ⁵	8.00 × 10 ⁴

菌株 KF5 于含 0.3%牛胆盐 MRS 液体培养基中培养 2 h 和 4 h 的活菌数与原培养液中活菌数差异并不十分显著。培养 2 h 后,活菌数超过 10⁷ mL⁻¹ 以上; 4 h 后,活菌数略有下降,但仍保持在 10⁷ mL⁻¹。相对而言,0.5%牛胆盐对 KF5 的抑制作用稍强,在培养 2 h 和 4 h 后,活菌数基本维持在 10⁵ mL⁻¹ 和 10⁴ mL⁻¹。在小肠正常胆盐浓度条件下,人体消化过程大致为 4 h。因此可以看出,菌株 KF5 具有比较强的耐胆盐能力,能够顺利通过小肠到达大肠。

3 结 语

(1)开菲尔粒(Kefir Grains,KG)是传统制品开菲尔(Kefir)的发酵剂,不仅具有较高的营养作用,而且对人体胃肠道疾病、高血压、心脏病、过敏症等均有一定疗效^[9]。近年研究已从 Kefir 中分离鉴定出具有不同程度降胆固醇作用的乳酸乳球菌乳酸亚种、干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌^[4]等菌属。本实验筛选出的 KF5 分离自西藏 Kefir 粒,结果表明,KF5 具有较好的降胆固醇效果,体外胆固醇降解率达 34.56%,可作为进一步开发降胆固醇乳制品的功能性菌种。

(2)植物乳杆菌为人体的原籍菌,存在于肠道及口腔黏膜中。健康人消化道共生的优势菌中 52%为植物乳杆菌^[10]。经鉴定,KF5 为植物乳杆菌,因此开

发其乳制品可促进肠道内优势菌群的定植,维持菌群平衡,具有重要的实际应用价值。

(3)由于益生菌必须进入人体的胃肠道才能发挥其功能,因此要求益生菌能耐受有机体的防御机制,其中包括胃液中的低 pH 和小肠中的高胆盐等^[11]。生物学特性结果显示,KF5 在 pH 2.0、pH 3.0 和胆盐浓度为 0.3%、0.5%的 MRS 培养基中分别培养 2 h 和 4 h 后,活菌数基本上仍可达到 10⁴ mL⁻¹ 以上,表明具有较好的耐酸和耐胆盐能力。

参考文献:

- [1] Mann G V. A factor in yogurt which lowers cholesterolemia in man[J]. *Artherosclerosis*, 1977, 26: 335-340.
- [2] Małgorzata Ziarno. The influence of cholesterol and biomass concentration on the uptake of cholesterol by *Lactobacillus* from MRS broth[J]. *Acta scientiarum polonorum*, 2007, 6(2): 29-40.
- [3] Liong M T, Shah N P. Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89: 1390-1399.
- [4] 杨颖, 华伟, 张灏. 益生乳酸菌降胆固醇功能的研究进展[J]. *江苏食品与发酵*, 2004(3): 19-22.
- [5] 王玉文, 刘慧, 李平兰. 产胆盐水解酶乳酸菌的分离、鉴定及降胆固醇机理的初步研究[J]. *食品科学*, 2006, 27: 215-218.
- [6] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 1版. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 4-37.
- [7] Forsman P, Alatosava T. Repeated sequences and the sites of genome rearrangements in bacteriophages of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*[J]. *Archives of Virology*, 1994, 137: 43-54.
- [8] Conway P M, Gorbachsl, Goldin B R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell[J]. *Journal of Dairy Science*, 1987, 70: 1-12.
- [9] 张慧敏, 李远志. 开菲尔的营养成分、保健功能及其产品研究进展[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(4): 118-119.
- [10] Ahrne S, Noback S, Jeppsson B, et al. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 85: 88-94.
- [11] 辛羚, 郭本恒, 吴正钧. 3株乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究[J]. *中国乳品工业*, 2005, 33: 15-17.