

## 具有降血压功能的益生菌的筛选

杨焱炯<sup>1</sup> 张和春<sup>2</sup> 周朝晖<sup>2</sup> 罗九甫<sup>1</sup> 杭晓敏<sup>2\*</sup>

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)<sup>1</sup>

(上海交大昂立股份有限公司生物医药研究所 上海 200030)<sup>2</sup>

**摘要:** 体外 ACE 抑制活性实验表明, 实验室保存的 40 株乳酸菌菌株中有 27 株具抑制 ACE 的活性, 其中尤以 *L. salivarius* La5、*L. salivarius* Lma1、*L. plantarum* LP529、*L. plantarum* LS12、*L. plantarum* LS31、*L. helveticus* ZL51 最为明显。按照益生菌标准对上述 6 株菌的耐酸、耐胆盐、抗药性、抑菌等性能进行评价, 结果表明, *L. plantarum* LP529、*L. plantarum* LS12、*L. plantarum* LS31、*L. helveticus* ZL51 可作为益生菌用于降血压产品。

**关键词:** 益生菌, ACE, 降血压

**中图分类号:** Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0028-03

### Screening of Antihypertensive Probiotic

YANG Yan-Jiong<sup>1</sup> ZHANG He-Chun<sup>2</sup> ZHOU Chao-Hui<sup>2</sup>

LUO Jiu-Fu<sup>1</sup> HANG Xiao-Min<sup>2\*</sup>

(School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)<sup>1</sup>

(Shanghai Jiao Da Orally Co., Ltd, Shanghai 200030)<sup>2</sup>

**Abstract:** Experiment in vitro of inhibition to ACE (Angiotensin converting enzyme) indicates that 27 of 40 *Lactobacillus* stored in lab can inhibit the activity of ACE. Of those, *L. salivarius* La5, *L. salivarius* Lma1, *L. plantarum* LP529, *L. plantarum* LS12, *L. plantarum* LS31, *L. helveticus* ZL51 show better effect. Those *Lactobacillus* were studied with standard of probiotics, including resistance to acid, bile salt, antibiotic and inhibition to bacterium. The result shows that *L. plantarum* LP529, *L. plantarum* LS12, *L. plantarum* LS31, *L. helveticus* ZL51 can be considered as probiotics and applied to antihypertensive product.

**Key words:** Probiotics, ACE, Antihypertensive

益生菌 (Probiotics) 是指来源于宿主并对宿主健康有一定促进作用的微生物活体。欧共体“益生菌类食品的营养功能示范项目”建立了益生菌的科学筛选标准<sup>[1]</sup>。

ACE (血管紧张素转化酶) 在血压调节方面起着重要的作用, 抑制 ACE 抑制物已发展成一大类治疗高血压的药物<sup>[2-5]</sup>。国外很多研究表明, 益生菌具有降血压的作用。

本文拟从来源于健康人体菌株中筛选出具有抑制 ACE 活性的菌株, 并按照益生菌的标准进行评价, 筛选到具商品开发价值的益生菌, 应用于降血压产品。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株:** 40 株乳酸菌菌株: 上海交大昂立股份有限公司生物医药研究所从健康婴儿和青年肠道分离鉴定并保存。

\* 通讯作者 Tel: 86-21-54450638, Fax: 86-21-54450807, E-mail: xmhang@mail.orlly.com.cn

收稿日期: 2005-11-28, 修回日期: 2006-01-12

**1.1.2 试剂:** ACE 诊断试剂盒 (苏州艾杰生物科技有限公司), 牛胆盐 (国药化学试剂有限公司), 药敏试验培养基: Mueller ~ Hinton 琼脂 (MHA), 药敏纸片和比浊管 (上海伊华医学科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 培养方法:** 取一环新鲜斜面上的菌落至 MRS 液体培养基中, 37°C 培养 24 h, 得到种子液。以 10% 接种量将种子液接至 10% 的脱脂乳中 ( $0.7 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min), 37°C 培养 24 h。所得发酵液 4,500 r/min 离心 10 min, 取上清液并将其 pH 调至 8.0, 14,000 r/min 离心 10 min, 取上清, 备用。

**1.2.2 抑制 ACE 活性实验原理和计算公式:** FAPGG (N - (3 [2 - Furyl] Acryloyl) - Phe - Gly - Gly) 在 ACE 作用下酶解为 FAP 和 GG, 从而在波长 340 nm 处吸光度发生下降变化。通过测定 FAPGG 在 340 nm 处吸光度下降速度可计算出 ACE 的活性。

$$\text{计算: ACE (U/L)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times Tv \times 1000}{\epsilon \times Sv \times L}$$

$\epsilon$ : 毫摩尔消光系数为 0.5,  $Tv$ : 总反应体积为 0.54 mL,  $Sv$ : 样品体积为 0.04 mL,  $L$ : 比色杯光径为 1.0 cm。

**1.2.3 抑制 ACE 活性体外实验:** 抑制酶活测定在 20  $\mu$ L 标准血清 (含有 ACE) 中, 加入 20  $\mu$ L 上清提取液。取 20  $\mu$ L 标准血清加 20  $\mu$ L 生理盐水做对照。37°C 加热 5 min, 加 500  $\mu$ L 诊断试剂, 340 nm 测光吸收值。37°C 加热 10 min, 在 340 nm 处测光吸收值, 计算  $\Delta A/\text{min}$  和 ACE 活性, 筛选具抑制 ACE 活性菌株。

**1.2.4 耐酸性能实验:** 在 4.5 mL 的 pH 2.0、3.0、4.0 的磷酸缓冲液以及生理盐水中加入 0.5 mL 菌株培养液, 37°C 放置 2 h 后, 做计数培养。

**1.2.5 耐胆盐性能实验:** 在 4.5 mL 的分别含有 0、0.05%、0.1% 牛胆盐的生理盐水中加入 0.5 mL 菌株培养液, 37°C 放置 2 h 后, 做计数培养。

**1.2.6 药敏实验:** 参考 2000 年美国 NCCLS 药敏试验法规。

**1.2.7 抑菌性能评价:** 牛津杯法、琼脂点测试法。

## 2 结果

### 2.1 40 株乳酸菌体外抑制 ACE 活性分析结果

对实验室保存的 40 株乳酸菌体外抑制 ACE 酶活性实验, 40 株实验菌株中有 27 株表现出对 ACE 的抑制作用, 其中 La5、Lma1、LP529、LS12、LS31、ZL51 这 6 株的抑制作用尤其明显。对 ACE 活性抑制都达到了 40% 以上。

同时发现, 菌株在对 ACE 的抑制并没有种间的特异性, 完全是菌株间个体的差异例如, Lma1、LB9、La5、LN41 都是唾液乳杆菌, 但 Lma1、La5 均有出色的抑制活性, 而 LB9、LN41 对 ACE 完全没有抑制作用。

### 2.2 耐酸性能实验

对上述 6 株乳酸菌耐酸实验结果显示, La5 和 Lma1 对酸十分敏感, 在 pH 2.0 处理 2 h 后, 活菌数从  $10^7/\text{mL}$  下降到低于  $10^4/\text{mL}$ , 下降了 3 个数量级, 而 *L. plantarum* LS12、LS31、ZL51 则表现出较好的耐酸性能, pH 4.0、3.0 处理 2 h 基本没有影响, 即使在 pH 2.0 处理 2 h 后, 菌数也仅下降 1 个数量级。

### 2.3 耐胆盐性能实验

上述 6 株乳酸菌耐胆盐实验结果显示, La5 和 Lma1 对胆盐十分敏感, 0.05% 胆盐

处理 2 h 后, 活菌数从  $10^7/\text{mL}$  下降到低于  $10^4/\text{mL}$ , 下降了超过 3 个数量级, 在用 0.05% 胆盐处理 2 h 后, 活菌基本都死亡了。而 LP529、LS12、LS31、ZL51 表现出对胆盐较好的耐受性, 0.05% 胆盐处理 2 h 后菌数没有明显下降, 即使 0.1% 胆盐处理 2 h 后, 菌数也仅下降了 1 个数量级。

#### 2.4 药敏实验

美国 NCCLS 药敏试验法规中的 35 种常见抗生素的药敏实验表明, 这 35 种抗生素对 LP529、LS12、LS31、ZL51 产生抑制作用, 而 21 种抗生素对 La5、Lma1 具有抑制作用, 另外丙氟哌酸对 La5 也具有抑制作用。

#### 2.5 抑菌性能实验

上述 6 株乳酸菌对实验所用指示菌的抑菌结果见表 1。从表 1 中可看出, 唾液乳杆菌 La5 和 Lma1、植物乳杆菌 LP529、LS12、LS31 对实验指示菌均有较好的抑菌活性; 瑞士乳杆菌 ZL51 对实验指示菌的抑菌效果并不明显。

表 1 6 株菌抑菌实验结果

编号	抑菌圈直径 (mm)					
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
La5	18	9	8	14	14	18
Lma1	19	9	11	10	14	16
LP529	15	13	20	12	12	12
LS12	18	13	22	20	13	12
LS31	15	15	21	15	13	15
ZL51	10	-	-	-	-	-

### 3 讨论

噻嗪类利尿剂、 $\beta$ -受体阻滞剂、钙离子拮抗剂等降血压药物会引发大量的副作用, 而 ACE 抑制物因副作用少, 已经发展成为一大类治疗高血压的药物。1992~1995 年, 全世界治疗高血压的药物中, ACE 抑制物药物占整个降血压药物的比重由 25% 上升至 33%<sup>[5]</sup>, 并且这个数字还在不断增加。用乳酸菌制成具有降血压作用的功能食品, 具有广泛的应用前景。

研究发现, 很多乳酸菌在体外实验中都有抑制 ACE 的作用, 综合对 ACE 的抑制活性、菌株耐酸耐胆盐、耐药和抑菌能力, 挑选出 *L. helveticus* ZL51 和 *L. plantarum* LP529、*L. plantarum* LS12、*L. plantarum* LS31 作为备选菌株, 可作为益生菌应用于降血压产品中。

#### 参考文献

- [1] Quillien C. Probiotics. France; Institut National de la Recherche Agronomique, 2001.
- [2] Pahor M, Psaty B M. Diabetes Care, 2000, 23 (7): 888~892.
- [3] 何海伦, 陈秀兰, 张玉忠, 等. 中国生物工程杂志. 2004, 24 (9): 7~11.
- [4] Cheryl R. Nelson Dee A. Knapp Hypertension, 2000, 36: 600.
- [5] Siegel D, Lopez J. JAMA. 1997, 278 (21): 1745~1748.