

几株乳酸菌益生潜力及降胆固醇的研究*

李妍² 张兰威^{1**}

(哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院 哈尔滨 150090)

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 采用体外试验方法研究 7 株乳酸菌和双歧杆菌对人体消化道不良环境的抵抗能力、在肠道上皮的黏附定植能力及其降胆固醇潜力。结果表明:受试菌对 CCL-187 细胞粘附能力存在显著差异($P < 0.05$) , 粪肠球菌 M1 粘附能力最强;各菌对胃液和胰液都有较强耐受能力,在模拟胃液和胰液中分别培养 3h 和 4h 后仍能保证 95% 以上存活,在含胆汁培养基中受到不同程度抑制,但都能存活;受试菌在生长过程中能够使环境中胆固醇降低从 25% ~ 54% 不等,粪肠球菌 A30 和 A31 和嗜酸乳杆菌 A878 和 PB1 能使胆固醇降低 40% 以上,是良好的降胆固醇备选菌株。

关键词 益生菌 粘附性 抗酸 耐胆汁 降胆固醇

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1146-04

Study on the Probiotic Properties of Some Lactic Acid Bacteria Strains*

LI Yan², ZHANG Lan-Wei^{1**}

(College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

(Key Lab of Dairy Biotechnology and Bioengineer, Education Ministry of China, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

Abstract The acid- and bile-tolerant, the transit tolerance, the ability to adhere to human intestinal cells and the ability to assimilate cholesterol of seven lactic acid bacteria and Bifidobacteria strains were studied by an *in vitro* method. The abilities to adhere to CCL-187 cells were different between all strains tested($P < 0.05$) and high attachment was observed with *Enterococcus faecium* M1. All strains tested were considered intrinsically resistant because the viability of them can remain $> 95\%$ when incubated in simulated gastric and small intestinal juice for 3h and 4h respectively. All strains have the ability to grow in the presence of bile, and the ability varied among the strains. The cholesterol assimilated ranged from 25% to 54%. *Enterococcus faecium* A30, A31 and *Lactobacillus acidophilus* A878, PB1, which assimilated more than 40% cholesterol from circumstances, can be good hypocholesterolemic candidate strains for functional food.

Key words Probiotic bacteria, Adhesion, Acid-tolerance, Bile-tolerance, Assimilate cholesterol

肠道菌系平衡是关系到人体营养和健康至关重要的因素,益生菌对人体肠道菌系有很好的调节作用,这使得益生菌的研究成为功能食品研究的热点。早在 20 世纪 20 年代初国外就开始益生菌的研究,目前已有许多成熟的益生菌产品在全球范围内热销,如 L. GG、益力多等^[1]。我国在这方面的研究起步较晚,成果很少。虽然近两年有些企业开始生产和宣传益生菌产品,但大多采用国外的菌种,真正具有自主知识产权的益生菌产品寥寥无几。要改善这

种局面,必须加强基础工作,从益生菌菌种的筛选及功能特性研究入手,逐步深入,开发自主知识产权的益生菌产品。

益生菌必须满足一定的条件^[2,3],其中能够耐受消化道的一系列不良环境而活着到达并定植于宿主肠道是其发挥益生作用的必要前提,也是益生菌筛选的重要指标。本研究旨在通过科学的实验方法,对几株乳酸菌对人体消化道不良环境的抵抗能力、在肠道上皮的定植能力及降胆固醇潜力进行研究,

* 黑龙江省十一科技攻关资助项目(No. GA06B201-4),国家十一五奶业支撑计划资助课题项目(No. 2006BAD 04A 06, No. 2006BAD 04A 09)

** 通讯作者 Tel: 0451-86282901, E-mail: lanweizhang@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-04-03, 修回日期:2007-06-22

以期筛选出最具益生潜力的菌株,为益生菌的进一步开发利用奠定良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验用菌种及细胞组织

7株乳酸菌均为本实验室保存菌种,包括 *Lactobacillus acidophilus*: *La.* A878 和 *La.* PB1; *Enterococcus faecium*: *Ent.* A30、*Ent.* A31 和 *Ent.* M1; *Bifidobacterium*: *Bif.* PBA 和 *Bif.* INF。

大肠癌腺细胞 CCL-187(中国医药大学)。

1.2 培养基及培养条件

乳杆菌和肠球菌采用改良 MRS 培养基,37℃过夜培养活化,双歧杆菌采用改良 TPY 培养基^[4] 37℃厌氧培养 24h 活化。

1.3 粘附能力检测

CCL-187 细胞传代培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖细胞培养液(GIBCO)中,于 CO₂ 培养箱(REVCO)(5% CO₂、95% 空气)中 37℃培养,每 48h 换培养液 1 次,长成单层后接种于含盖玻片的六孔组织细胞培养板中,继续培养 48h 后,用无菌 PBS 清洗 1 次,将 1mL 细菌培养物与 1mL DMEM 细胞培养液混合,加入到 6 孔培养板各孔中,37℃ CO₂ 培养箱中培养 1.5h,取出盖玻片, PBS 清洗 5 次,甲醇固定,革兰氏染色及 HE 染色,油镜下观察粘附情况。

细菌粘附指数计算:于油镜下(1500×)随机选取 20 个视野,计数细胞上粘附的细菌个数,粘附指数 = 细菌数/100 个细胞(即平均每 100 个细胞粘附的细菌个数)。

1.4 耐胆汁能力监测

活化后菌种 1% 接种于含胆汁的液体培养基中

(添加 0.2% 硫乙醇酸钠,0.3% 牛胆汁),同时接种不含胆汁培养基作为对照。37℃培养,每小时测吸光值(OD_{620nm}),直到吸光值增加 0.3 个单位以上停止培养,以时间和 OD_{620nm} 做生长曲线,根据延迟时间(细菌在含胆汁和不含胆汁培养基中生长时吸光值增加 0.3 个单位所需的时间之差)的长短来判断该菌对胆汁的耐受能力。

1.5 细菌对胃肠转运耐受能力监测

按 Charteris^[5]方法进行。

1.6 细菌生长过程中降胆固醇作用的监测

实验方法在前人基础上^[6,7]略加改进:在培养基(MRS,TPY)中添加 0.2% 巯基乙酸钠、0.3% 牛胆汁、15% 马血清配制高胆固醇培养基(以马血清作为胆固醇来源),接种 1% 细菌培养物,以不接种高胆固醇培养基作为空白对照,37℃厌氧培养 16h 后离心(4℃,12000r/min)10min 除去菌体细胞,测定上清液的胆固醇含量(采用直接皂化-比色法测定),两者差值即为菌体生长过程中代谢胆固醇的量。

2 结果与讨论

2.1 菌株对肠细胞的粘附性

人的大肠癌细胞系 CCL-187 细胞贴壁生长,形态以多边形上皮样为主,是接近正常人大肠组织的分化程度较高的细胞。各菌与 CCL-187 细胞混合培养后,在细胞周围及表面有细菌存在(见图 1),细胞和细菌的形态较混合培养前无明显差别。说明细菌能粘附于上皮细胞。受试菌株的粘附能力存在显著差异($P < 0.05$) (见表 1)。这可能与菌体细胞壁组成的不同和其自身是否分泌的特异性粘附素有关^[8]。*Ent.* M1 的粘附能力最强,平均每 100 个类

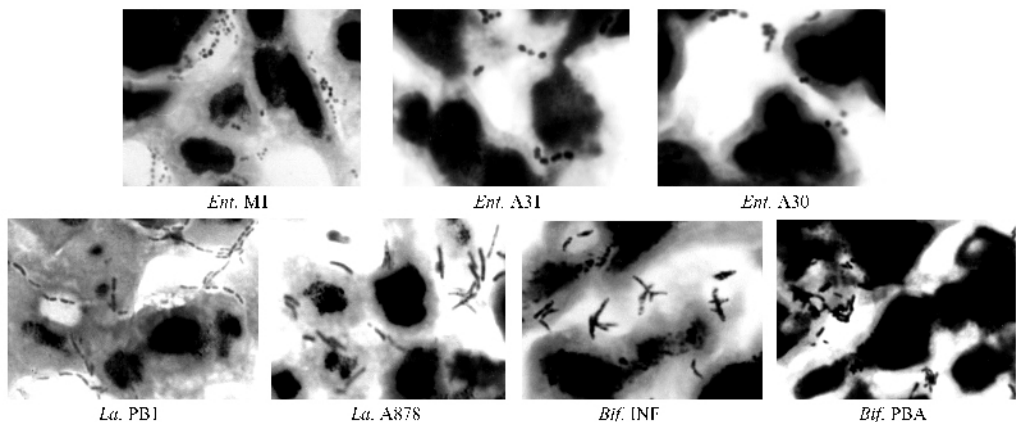


图 1 在光学显微镜下粘附后的 CCL-187 和细菌(油镜 × 1000)

上皮细胞上可粘附的菌数超过 200 个; *La*. PB1, *Bif*. PBA, *Bif*. INF 和 *Ent*. A31 次之, 每百个细胞上粘附菌数 100 个以上; 其余各菌的粘附数量较低。

表 1 各菌对 CCL-187 粘附指数(粘附的细菌数/100 细胞)

菌代号	粘附指数	菌代号	粘附指数
<i>Ent</i> . M1	270.7 ± 58.6 ^a	<i>Bif</i> . PBA	117.3 ± 21.3 ^d
<i>Ent</i> . A31	111.0 ± 17.5 ^d	<i>La</i> . PB1	192.1 ± 59.3 ^{bc}
<i>Ent</i> . A30	65.3 ± 22.9 ^e	<i>La</i> . A878	56.9 ± 17.5 ^{ef}
<i>Bif</i> . INF	172.0 ± 25.3 ^c		

注: 上标不含有相同字母的为差异显著($P < 0.05$)

表 2 乳蛋白存在时模拟胃转运对菌株存活(\lg cfu/mL)的影响

菌株	模拟胃转运过程中菌数变化(\lg cfu/mL)			乳蛋白对菌体的影响	
	0min	90min	180min	90min	180min
<i>La</i> . A878	8.76 ± 0.03	8.53 ± 0.00 ^{**}	8.74 ± 0.03	8.76 ± 0.03	8.77 ± 0.06
<i>La</i> . PB1	8.98 ± 0.03	8.94 ± 0.03	8.78 ± 0.05 ^{**}	8.96 ± 0.03	8.93 ± 0.00
<i>Ent</i> . M1	9.31 ± 0.07	8.83 ± 0.03 ^{**}	8.77 ± 0.04 ^{**}	8.87 ± 0.04 ^{**}	9.01 ± 0.04 ^{**}
<i>Ent</i> . A30	8.56 ± 0.03	8.38 ± 0.03 ^{**}	8.60 ± 0.00	8.57 ± 0.01	8.56 ± 0.04
<i>Ent</i> . A31	8.52 ± 0.01	8.34 ± 0.03 [*]	8.55 ± 0.01	8.40 ± 0.13	8.38 ± 0.03 [*]
<i>Bif</i> . PBA	8.95 ± 0.01	ND	8.69 ± 0.05 [*]	ND	8.58 ± 0.30 [*]
<i>Bif</i> . INF	7.06 ± 0.08	ND	6.73 ± 0.04 ^{**}	ND	6.87 ± 0.04 [*]

注: F 检验结果与对照(0min)菌数相比较 * 表示 $P < 0.05$ 差异显著, ** 表示 $P < 0.01$ 差异极显著

表 3 乳蛋白存在时模拟小肠转运对菌株存活(\lg cfu/mL)的影响

菌株	模拟小肠转运中菌数变化(\lg cfu/mL)		乳蛋白对菌体的影响
	0min	240min	240min
<i>La</i> . A878	8.76 ± 0.03	8.76 ± 0.00	8.66 ± 0.00 [*]
<i>La</i> . PB1	8.98 ± 0.03	8.95 ± 0.05	8.94 ± 0.01
<i>Bif</i> . PBA	8.95 ± 0.01	8.72 ± 0.02	8.89 ± 0.01
<i>Bif</i> . INF	7.06 ± 0.08	6.82 ± 0.06 ^{**}	6.87 ± 0.04 [*]
<i>Ent</i> . M1	9.31 ± 0.07	9.29 ± 0.01	9.28 ± 0.05
<i>Ent</i> . A30	8.56 ± 0.03	8.81 ± 0.03 ^{**}	8.67 ± 0.08 [*]
<i>Ent</i> . A31	8.52 ± 0.01	8.66 ± 0.04	8.59 ± 0.01

注: F 检验结果与对照(0min)菌数相比较 * 表示 $P < 0.05$ 差异显著, ** 表示 $P < 0.01$ 差异极显著

当有混合乳蛋白质存在时, 菌体在模拟胃转运中的存活率提高, *La*. A878、*La*. PB1 和 *Ent*. A30 在整个模拟胃转运过程中活菌数几乎没有下降。Conway 等也报道乳酸菌在调到低 pH 的胃液中的存活率可通过添加脱脂乳而得到提高^[9], 说明在胃转

2.2 对消化道环境的耐受能力

2.2.1 菌体对胃肠转运耐受能力: 从表 2 和表 3 可见, 受试菌株大多数都能顺利通过胃肠转运到达下部肠道中。在模拟胃转运过程中菌株活菌数虽有不同程度下降, 但培养 3h 后都能保持 95% 以上存活。在模拟小肠转运过程中只有 *Bif*. INF 活菌数略有降低, 其余各菌株均无明显下降, *Ent*. A30 菌数还有所增加。这说明多数菌株对模拟胰液都有一定抵抗力, 能在其中维持活力达 4h 以上。

运过程中乳蛋白存在能给菌体提供一定的保护作用。但在模拟胰液中乳蛋白的存在仅对双歧杆菌具有一定的保护作用, *La*. A878 的菌数较无乳蛋白组降低。这与 Charteris^[5] 研究结果不完全一致, 可能是由于受试菌株的不同或试验条件的差异所导致的, 其原因有待进一步研究。

2.2.2 菌株的胆汁耐受能力: 菌株在含胆汁培养基中生长的延迟时间进行统计分析表明(表 4)各菌的胆汁耐受能力存在显著差异($P < 0.05$)。 *La*. PB1 和 *Bif*. PBA 的生长几乎不受胆汁的影响, 延迟时间为零, *Ent*. M1、*Ent*. A30、*Ent*. A31 的延迟时间也比较短, 胆汁耐受能力较强, 而 *Bif*. INF 对胆汁较敏感。

试验还发现各菌株在无胆汁培养基(无胆汁)中的生长速度差异也很大(试验数据略)。Gilliland 等早在 1977^[10] 年就报道在无胆汁培养基中生长缓慢的嗜酸乳杆菌表现出的胆汁耐受能力也较差。进一步研究^[6, 11, 12] 发现乳杆菌在 MRS 中的生长速度快并不代表其在含胆汁 MRS 中也能迅速生长。这说

明细菌的胆汁耐受能力的差异除与菌株本身的差异有关外,也可能受其所处的生长环境影响。

表4 细菌对胆汁的耐受能力比较结果

菌代号	OD _{620nm} 值增加0.3个单位所需时间(h)		
	不含胆汁	含0.3%胆汁	延迟时间*
<i>Ent.</i> M1	3.20 ^f	3.62 ^d	0.42 ^b
<i>Ent.</i> A30	4.04 ^c	4.50 ^c	0.46 ^b
<i>Ent.</i> A31	3.71 ^{fe}	4.20 ^c	0.49 ^b
<i>La.</i> PB1	3.57 ^{fe}	3.57 ^d	0.00 ^c
<i>La.</i> A878	6.26 ^d	7.12 ^a	0.86 ^a
<i>Bif.</i> PBA	7.17 ^{cb}	7.21 ^a	0.04 ^c
<i>Bif.</i> INF	8.69 ^a	>9(9h, OD值增加0.211)	

注:上标不含有相同字母的数据之间差异显著($P < 0.05$)

2.3 菌株生长过程中降胆固醇效果

从表5数据可见,不同菌株降胆固醇水平差异显著($P < 0.05$)。说明此体外培养的方法可以用于降胆固醇潜力菌株的初步筛选。本试验中不同菌株除去胆固醇的量在68.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~142.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (25%~54%)之间变化。*Ent.* A30、*Ent.* A31、*La.* A878和乳杆菌PB1可使培养基中胆固醇含量下降40%以上,

表5 不同菌株在培养基中生长时降低胆固醇的量

菌株代号	降胆固醇量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	降胆固醇量(%)
<i>Ent.</i> A31	128.1	48.65 ^{abc}
<i>Ent.</i> A30	142.7	54.20 ^a
<i>Ent.</i> M1	87.9	33.35 ^{bed}
<i>La.</i> PB1	116.7	44.30 ^{abc}
<i>La.</i> A878	142.7	54.20 ^a
<i>Bif.</i> PBA	68.4	25.20 ^d
<i>Bif.</i> INF	89.5	32.95 ^{bed}

注:上标中不含有相同字母的数据之间差异显著($P < 0.05$)

是良好的降胆固醇备选菌株。*Ent.* M1、*Bif.* INF和*Bif.* PBA降胆固醇数量较低。

3 结论

实验结果表明本实验采用的体外模拟方法适用于益生菌株的初步筛选。受试7株乳酸菌中*Ent.* M1、*Ent.* A31、*La.* PB1、*Bif.* INF和*Bif.* PBA对模拟胃肠转运和胆汁的耐受能力都很强,并能够粘附与模拟肠细胞表面,说明这些菌株有可能活着通过人体上消化道并在肠道中定植;*Ent.* A30、*Ent.* A31、*La.* A878和*La.* PB1能使环境中的胆固醇降低40%以上,是良好的降胆固醇备选菌株。对这些潜在益生菌的功能特性有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 刘清泉. 中国食品添加剂, 2006, 6: 47~60.
- [2] Maria S, Gunnar M, Rangne F, et al. J Biotech, 2001, 84: 197~210.
- [3] Chandan R C, J Dairy Sci, 1999, 82: 2245~2256.
- [4] 熊德鑫. 厌氧菌分离和鉴定方法. 南昌: 江西科学技术出版社, 1986, pp. 34~36.
- [5] Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, et al. J Appl Microbiol, 1998, 84: 759~768.
- [6] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Appl Environ Microbiol, 1985, 49: 377~381.
- [7] Noh D O, Kim S H, Gilliland S E. J Dairy Sci, 1997, 80: 3107~3113.
- [8] 蒋寒青, 康白. 中国微生态学杂志, 1995, 7(1): 48~49.
- [9] Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. J Dairy Sci, 1987, 70: 1~12.
- [10] Gilliland S E, Speck M L. Appl Environ Microbiol, 1977, 33: 15~18.
- [11] Gilliland S E, Walker D K. J Dairy Sci, 1990, 73: 905~911.
- [12] Usman, Hosono A. J Dairy Sci, 1998, 82: 243~248.