

文章编号:1673-1689(2009)06-0850-04

分离自酸菜汁的乳酸乳球菌体外去除胆固醇特性

尹军霞, 沈国娟, 谢亚芳

(绍兴文理学院 生命科学学院, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 将从自然发酵的酸菜汁中分离鉴定的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)接种于高胆固醇培养液 MRSO-CHOL 中, 分别改变菌的培养时间和接种量以及培养基中胆盐质量浓度和胆盐种类, 发现乳酸乳球菌对培养液中胆固醇的体外去除率在 72 h 前随时间的增加而提高, 72~96 h 基本维持稳定, 96 h 后下降; 随着接种量的增加, 胆固醇的去除率增加; 培养液不含胆盐时, 乳酸乳球菌的胆固醇去除率很低, 仅为 4.51%。胆盐质量浓度为 0~0.3 mg/mL 时, 随着胆盐质量浓度的升高, 胆固醇的去除率也逐渐升高。胆盐质量浓度高于 0.3 mg/mL 时, 胆固醇去除率下降; 牛磺胆酸钠对胆固醇的去除效果最佳。

关键词: 乳酸乳球菌; 胆固醇; 胆盐

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Study on Characteristic of Reducing Cholesterol in Vitro by *Lactococcus lactis* Isolated from Sauerkraut Juice

YIN Jun-xia, SHEN Guo-juan, XIE Ya-fang

(Department of Biology, Shaoxing College of Arts and Science, Shaoxing 312000, China)

Abstract: The effect of culture conditions on the cholesterol removal rate by *Lactococcus lactis* was carefully investigated in this study. The cholesterol removal rate was increased with the increasing of culture time during 0~72 h then kept constant level at 72~96 h, but declined decreased after 96 h. Also, the inoculation amount exhibited stimulation on the cholesterol removal rate. Without cholates presents in culture medium, the cholesterol removal rate reached at the lowest value (4.51%), when 0.1 to 0.3 mg/mL cholates was feed to the media, the cholesterol removal rate was increasing. The rate of removal cholesterol declined when more 0.3 mg/mL cholates supplemented to the media. Furthermore, sodium taurocholate demonstrated the highest cholesterol removal effect.

Key words: *Lactococcus lactis*, cholesterol, cholates

高脂肪、高胆固醇食物是导致人群高血脂的重要原因。国内外的有关降胆固醇研究主要集中在两个方面: 一是利用物理方法、化学方法和生物方法脱除食品中胆固醇; 二是开发食用后能在体内通

过某种作用减少血清胆固醇含量的食品或药品^[1-2]。作者从市售大白菜自然发酵酸菜汁分离并鉴定的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)具有较强的耐酸、耐胆汁盐能力; 能降低高血脂肥胖大鼠体重、

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 绍兴市重点科技项目(2007A22023)。

作者简介: 尹军霞(1970-), 女, 湖北天门人, 理学硕士, 副教授, 主要从事应用微生物方面研究。Email: yjx@zscas.edu.cn

血清总胆固醇(TC)、血清甘油三酯(TG)和脂肪在大鼠肝脏内的存积量,提高大鼠血清高密度脂蛋白(HDL-C),对大鼠没有明显毒副作用,该菌可开发成食用后能在体内减少血清胆固醇含量的食品或药品^[3]。是否该菌能脱除食品中胆固醇,以及其体外脱除胆固醇受哪些因素影响,值得研究。作者试图回答这些问题,以期为开发低胆固醇的发酵食品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 乳酸菌来源 从市售大白菜自然发酵酸菜汁中分离并保存^[3]。

1.1.2 胆固醇的测定 采用邻苯二甲醛法(OPhtalaldehyde, OPA法)

1.1.3 试剂 牛磺胆酸钠、脱氧牛磺胆酸钠、甘氨酸钠和脱氧甘氨酸钠(Sigma公司),胆固醇为分析纯。

1.1.4 MRS培养基 蛋白胨1g,牛肉浸膏1g,酵母膏0.5g,葡萄糖2g,醋酸钠0.5g, Tween80 0.1mL,柠檬酸三铵0.2g,磷酸氢二钾0.2g,硫酸镁0.02g,硫酸锰0.005g,蒸馏水100mL。

1.2 实验方法

1.2.1 高胆固醇培养液 MRSO-CHOL 的制备 准确称量胆固醇0.1g放入烧杯中,加入0.2g牛磺胆酸钠、0.1g蔗糖酯、1mL TWEEN-80搅拌均匀,再移取5mL的冰乙酸加热溶解。溶解液用超声波处理15min后,快速加入到配制好的液体MRS培养液中,调整溶液至1000mL,边加边搅拌,使其形成均匀稳定的胶体溶液^[4]。此培养液胆固醇质量浓度为0.1mg/mL,胆盐质量浓度为0.2mg/mL。

胆盐质量浓度分别为0、0.1、0.3、0.4、0.5mg/mL的高胆固醇培养液MRSO-CHOL配制成1000mL培养液中分别加入0、0.1、0.3、0.4g牛磺胆酸钠,其它成分不变。

含0.2mg/mL的甘氨酸钠、脱氧甘氨酸钠、牛磺胆酸钠、脱氧牛磺胆酸钠的高胆固醇培养液MRSO-CHOL配制成1000mL培养液中分别加入0.2g甘氨酸钠、脱氧甘氨酸钠、脱氧牛磺胆酸钠,其它成分不变。

1.2.2 不同培养时间对胆固醇去除的影响 将乳酸乳球菌MRS液体培养48h后,用PBS溶液调整菌浓度至 10^8 cfu/mL,以体积分数3%的接种量接种于高胆固醇培养液MRSO-CHOL中,接种等量

的MRS培养液为对照,37℃培养,定时取培养液,将接种乳酸乳球菌管于1500r/min离心20min,分别取上清液与对照管一同检测胆固醇质量浓度,计算胆固醇去除率。

胆固醇去除率(%)=对照胆固醇质量浓度-乳酸菌上清液胆固醇质量浓度/对照胆固醇质量浓度 $\times 100\%$

1.2.3 不同接种体积分数对胆固醇去除的影响

将乳酸乳球菌MRS液体培养48h后,用PBS溶液调整菌浓度至 10^8 cfu/mL,以体积分数1%、2%、3%、4%、5%接种于高胆固醇培养液MRSO-CHOL中,分别接种等量的MRS培养液为对照,37℃下培养72h后,测定胆固醇质量浓度,计算胆固醇去除率。

1.2.4 不同胆盐质量浓度对胆固醇去除的影响

将乳酸乳球菌MRS液体培养48h后,用PBS溶液调整菌浓度至 10^8 cfu/mL,以体积分数3%的接种量分别接种于含牛磺胆酸钠质量浓度为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL的高胆固醇培养液MRSO-CHOL中,分别接种等量的MRS培养液作为对照,37℃培养72h后,测定胆固醇质量浓度,计算胆固醇去除率。

1.2.5 不同胆盐种类对胆固醇去除的影响 将乳酸乳球菌MRS液体培养48h后,用PBS溶液调整菌浓度至 10^8 cfu/mL,以3%的接种体积分数分别接种于含0.2mg/mL的甘氨酸钠、脱氧甘氨酸钠、牛磺胆酸钠、脱氧牛磺胆酸钠的高胆固醇培养液MRSO-CHOL中,分别接种等量的MRS培养液为对照,37℃培养72h后,测定胆固醇质量浓度,计算胆固醇去除率。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间对胆固醇去除率的影响

Tahri等^[5-7]研究表明,乳酸菌对胆固醇的去除是共沉淀作用和吸收作用共同作用的结果。共沉淀去除胆固醇的原理是乳酸菌在生长过程中产生胆盐水解酶。该酶降解结合态胆盐转变为游离态胆盐。游离态胆盐溶解度下降,从而与胆固醇发生共沉淀,导致溶液中胆固醇的下降。王一鸣等^[5]的研究表明,共沉淀的胆固醇能重新溶解在培养液中,乳酸菌吸收进细胞的胆固醇能重新排到培养液中。图1显示,72h前,乳酸乳球菌的胆固醇去除率随时间的增加而提高,溶液中的胆固醇质量浓度不断降低;72~96h时,乳酸乳球菌的胆固醇去除率基本维持稳定(此时培养液中胆固醇质量浓度平

均为 0.043 3 mg/mL, 乳酸乳球菌共沉淀和吸收去除的胆固醇为 0.056 7 mg/mL, 胆固醇去除率平均 56.7%); 96 h 后乳酸乳球菌的胆固醇的去除率下降, 溶液中的胆固醇质量浓度反而增加。由此推测, 胆固醇的沉淀和溶解, 吸收和排出是一个动态的过程。对从大白菜自然发酵酸菜汁中分离的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) 来讲, 接种体积分数为 3% 时, 培养液中胆固醇质量浓度约为 0.043 3 mg/mL, 共沉淀和吸收去除的胆固醇约为 0.056 7 mg/mL (去除率在 56.7% 左右), 是其平衡点。72 h 前, 培养液中胆固醇质量浓度高于 0.043 3 mg/mL, 共沉淀和吸收去除的胆固醇低于 0.056 7 mg/mL, 乳酸乳球菌对胆固醇的共沉淀和吸收作用大于胆固醇的溶解和排出作用, 乳酸乳球菌去除胆固醇的量不断增加。72~96 h 时, 乳酸乳球菌对胆固醇的共沉淀和吸收作用与胆固醇的溶解和排出作用达到平衡, 胆固醇的去除率维持稳定。96 h 后, 乳酸乳球菌进入衰亡期, 大量菌停止生长, 胆盐水解酶不再产生, 共沉淀作用减少或丧失, 平衡被破坏, 胆固醇的溶解和排出作用大于胆固醇的共沉淀和吸收作用, 培养液中的胆固醇开始增加, 胆固醇去除率下降。

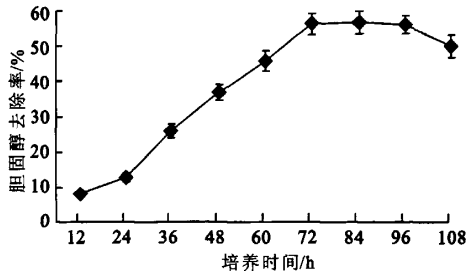


图1 不同培养时间的胆固醇去除率

Fig. 1 The rate of removal cholesterol after different culture time

图1显示, 乳酸乳球菌的胆固醇的去除率在 72 h 之前不断增加, 72 h 胆固醇的去除率接近最大值, 因此确定培养时间为 72 h。该乳酸乳球菌用于降低食品中胆固醇的发酵工业时, 发酵时间控制在 72 h 比较合适, 切忌延长发酵时间到 96 h, 否则胆固醇去除效果反而下降。

2.2 不同接种体积分数对胆固醇去除率的影响

考虑到菌株的应用及对发酵产品 pH 值的要求, 最高接种体积分数选择 5%。由图 2 可见, 乳酸乳球菌在 37 °C 下培养 72 h, 增加接种体积分数, 可以提高乳酸乳球菌的胆固醇去除率。接种体积分数为 5%, 培养液中胆固醇质量浓度为 0.037 7 mg/mL, 共沉淀和吸收去除的胆固醇为 0.062 3

mg/mL, 胆固醇去除率为 62.3%, 极显著高于接种体积分数为 3%、培养 72 h 时的胆固醇去除率 56.4% ($P < 0.01$)。究其原因可能是胆固醇去除的平衡点与每个菌去除的胆固醇量有关。接种体积分数大于 3% 时, 培养液中乳酸乳球菌的数量也大于接种体积分数为 3% 时的数量, 在接种体积分数为 3% 的平衡点 (培养液中胆固醇质量浓度为 0.043 3 mg/mL, 共沉淀和吸收去除的胆固醇为 0.056 7 mg/mL) 时, 平均每个菌共沉淀和吸收去除的胆固醇的量降低, 所以乳酸乳球菌对胆固醇的共沉淀和吸收作用大于胆固醇的溶解和排出作用, 乳酸乳球菌去除胆固醇的量也随之增加。

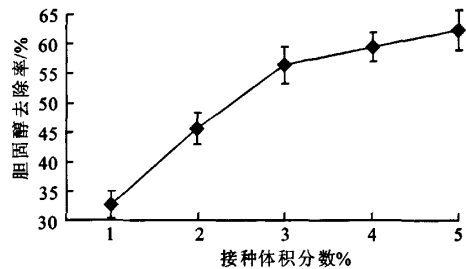


图2 不同接种体积分数的胆固醇去除率

Fig. 2 The rate of removal cholesterol under different inoculation amount

2.3 不同胆盐质量浓度对胆固醇去除率的影响

图3可以看出, 在不含胆盐的 MRSO-CHOL 培养液中, 乳酸乳球菌去除胆固醇能力仅为 4.51%, 而在含胆盐的培养基中, 表现出较强的去除胆固醇能力 (胆盐质量浓度为 0.5 mg/mL, 胆固醇去除率最低也达 38.5%)。用 Tahri 等^[5] 的理论——乳酸菌对胆固醇的去除是共沉淀作用和吸收作用共同作用的结果。乳酸菌共沉淀去除胆固醇是通过胆盐水解酶降解结合态胆盐成为游离态胆盐, 使胆固醇与之发生共沉淀, 导致溶液中胆固醇的下降。没有胆盐, 共沉淀去除胆固醇就不能实现, 乳酸菌只能通过吸收作用去除胆固醇, 所以胆固醇去除率很低。胆盐质量浓度为 0~0.3 mg/mL 时, 随着胆盐质量浓度的升高, 胆固醇的去除率也逐渐升高。胆盐质量浓度高于 0.3 mg/mL 时, 胆固醇去除率呈下降趋势, 也即该菌去除胆固醇最合适的胆盐质量浓度为 0.3 mg/mL。究其原因可能是适量增加胆盐, 产生的游离胆酸的量增加, 与之共沉淀的胆固醇的量也增加; 但胆盐质量浓度过高, 对菌的生长有所抑制, 进而影响菌的胆固醇去除率。

吕兵等的研究也表明, 分离自 Kefir 的植物乳杆菌去除胆固醇有最合适的胆盐质量浓度, 低于该质量浓度时, 胆固醇去除率随胆盐质量浓度的升高

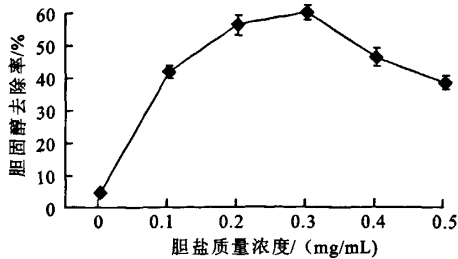


图3 不同胆盐质量浓度下胆固醇去除率

Fig. 3 The rate of removal cholesterol under different cholate concentrations

而升高;高于该质量浓度时,胆固醇去除率随胆盐质量浓度的升高而下降。但最合适的胆盐质量浓度为 0.4 mg/mL。说明对不同的乳酸菌来讲,胆盐质量浓度与去除胆固醇的规律相似,但又具有一定的特异性。

2.4 不同胆盐种类对胆固醇去除的影响

由图4可知,牛磺胆酸钠对胆固醇的去除效果最佳,接着依次是脱氧牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和脱氧甘氨酸胆酸钠。吕兵等研究结果表明,脱氧牛磺胆酸钠对植物乳杆菌胆固醇的去除效果最好,与本实验结果相差很大,说明胆盐种类对不同的乳酸菌去除胆固醇的影响差异很大,乳酸菌用于降低食品中胆固醇的发酵工业时,应根据不同菌种选合适的胆盐。

3 结语

1) 从市售大白菜自然发酵酸菜汁分离并鉴定

参考文献(References):

- [1] 刘奕琼,张灏,田丰伟.微生物降胆固醇作用研究进展[J].食品与机械,2003,10(2):135-137.
LIU Yi-qiong,ZHANG Hao,TIAN Feng-wei. Advances in the effects study of the cholesterol - reducing microbial[J]. *Food and Machinery*,2003,10(2):135-137. (in Chinese)
- [2] 王龙刚,梁爽,杨海麟,等.从乳化体系中分离纯化短杆菌产胆固醇氧化酶[J].无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报),2004,23(4):46-49.
WANG Long-gang, LIANG Shuang, YANG Hai-lin, et al. Purification of a cholesterol oxidase from *Brevibacterium* sp. in emulsified system[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry (Journal of Food Science and Biotechnology)*,2004,23(4):46-49. (in Chinese)
- [3] 尹军霞,沈国娟,沈蓉,等.酸菜汁中降胆固醇乳酸菌的分离鉴定[J].中国食品学报,2008,8(2):47-51.
YIN Jun-xia, SHEN Guo-juan, SHEN Rong, et al. Isolation and identification of cholesterol- degrading lactic acid bacteria from sauerkraut juice[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*,2008,8(2):47-51. (in Chinese)
- [4] 刘丽莉,董铁有,杨协立.6种乳酸菌降解胆固醇的体外试验[J].河南科技大学学报(自然科学版),2005,26(6):85-88.
LIU Li-Li, DONG Tie-You, YANG Xie-Li. Research on lab degrading cholesterol[J]. *Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science)*,2005,26(6):85-88. (in Chinese)
- [5] Tahri K, Grill J, Schneider F. Involvement of trihydroxy conjugated bile salts in cholesterol assimilation by *Bifidobacteria* [J]. *Current Microbiology*. 1997, 34:79-84.
- [6] Gilliland J P, Cayuela C, Antoine J M, et al. Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000,(31):154-156.
- [7] Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by *Lactococci*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85:3182-3188.

(责任编辑:李春丽)