

具降胆固醇功能的海洋源乳酸菌的筛选及 发酵条件工艺优化

万婧惊, 罗曼, 吴鹏, 黄仕新, 唐旭*, 徐长安

(自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:本研究采用邻苯二甲醛法从柏式中喙鲸(*Mesoplodon densirostris*)内脏中筛选出一株具高效降胆固醇功能的乳酸菌 HJ-S2, 利用 16S rDNA 分子生物学和 API 50CH 系统鉴定其为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。为提高乳酸菌 HJ-S2 体外降胆固醇能力, 考察了菌株的生长特性, 并从培养基条件和发酵条件两个方面, 采用单因素和正交试验进行工艺优化。优化后的培养基条件为: 蛋白胨含量 5 g/L, 葡萄糖含量 25 g/L, 胆固醇含量 1.0 g/L, 胆盐含量 2.0 g/L; 发酵条件为: 温度 37 °C, pH 6, 培养时间 24 h, 接种量 1%。在此优化条件下, 胆固醇降解率达到 69.81%, 较优化前有显著提升, 为功能性益生菌制剂的开发应用提供生产工艺及参考依据。

关键词:海洋生物学; 植物乳杆菌; 降胆固醇; 喙鲸; 发酵工艺优化

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2021.02.005

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2021)02-0220-11

胆固醇在人体内具有重要的生理作用, 是人体合成荷尔蒙以及组成神经细胞不可缺少的重要物质^[1], 在体内可转化成类固醇激素、VD₃及胆汁酸等物质。流行病学和临床研究表明, 血清胆固醇水平和心脑血管疾病的发生呈明显正相关性, 血清胆固醇水平每高出正常水平 1 mmol, 导致心血管疾病的风险便增加约 35%^[2]。营养学家推荐食物胆固醇的摄入量为每人每天 250~300 mg, 摄入过多会使血清中的胆固醇升高, 诱发冠心病、动脉粥样硬化等心血管疾病^[3-4]。因此研究开发具有降胆固醇效果的药品、保健品及食品已成为当前的研究热点。

乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB)是指一群发酵糖类产生大量乳酸的细菌总称, 是公认的安全微生物^[5]。近些年的研究表明, 定植于肠道中的有益乳酸菌群具有多种保健作用: 维持微生态平衡和肠道机能、降低血清胆固醇、缓解乳糖不耐症、改善肝功能、增强机体免疫功能及抗肿瘤等^[6]。Oh 等(2015)通过体外试验发现, 从传统发酵的小米酒中分离所得乳酸菌有作为益生菌制剂用于发酵工业的潜在用途^[7]。

李呢等(2012)、蒲博等(2014)、丁苗等(2014)证实了乳酸菌在体内的降解胆固醇功能^[8-10]。Zhang 等(2016)对降低蛋黄胆固醇的复合乳酸菌剂(嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus*、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*、双歧杆菌 *Bifidobacterium*)进行了工艺优化^[11]。付永岩等(2019)优化了 3 株具降胆固醇能力乳酸菌的发酵培养基条件, 为菌体高密度培养提供依据^[12]。目前所报道的降胆固醇乳酸菌大多来自陆源, 而海洋源乳酸菌则鲜有报道。

本研究对海平面 300 m 以深海洋哺乳动物柏式中喙鲸(*Mesoplodon densirostris*)内脏中的乳酸菌进行了降胆固醇活性筛选, 并根据筛选所得菌株的生长特性及培养基条件、发酵条件两个方面采用正交实验优化各项技术参数, 获得其对降胆固醇的优化条件, 为海洋源功能性益生菌制剂的开发应用提供技术参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

样品取自 2017 年 10 月搁浅于福建省宁德蕉城

收稿日期: 2019-09-17

基金项目:福建省海洋经济发展补助资金资助项目(FJHJF-L-2018-5); 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费资助项目(海三科 2017027); “十三五”厦门市海洋经济创新发展示范资助项目(16CZY009SF05); 海洋公益性行业科研专项资助项目(201405038)

作者简介:万婧惊(1995—), 女, 硕士研究生; E-mail: wangjingliang@tio.org.cn

* **通讯作者:**唐旭(1974—), 男, 博士, 副研究员; E-mail: tangxu@tio.org.cn

区(三都澳青海海域)的柏式中喙鲸的肠道内含物。无菌操作取样后将样品送至本实验室-20℃冰箱保存备用。

蛋白胨购自生工生物工程(上海)有限公司;胍蛋白胨购自青岛海博生物技术有限公司;菊糖购自阿拉丁试剂有限公司;胰蛋白胨、葡萄糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、胆固醇购自国药集团化学试剂有限公司;邻苯二甲醛购自麦克林试剂公司;可溶性淀粉、吐温 80 购自西陇化工股份有限公司;试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

MRS 培养基(1 L):蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 10.0 g、酵母膏 5.0 g、柠檬酸氢二铵 2.0 g、乙酸钠 5.0 g、磷酸氢二钾 2.0 g、硫酸镁 0.58 g、硫酸锰 0.2 g、吐温 80 1.0 mL、葡萄糖 20 g,蒸馏水定容至 1 L。调节 pH 到 6.4 左右,121℃灭菌 20 min。

MRS-CHOL 培养基(1 L):在上述 MRS 培养基基础上添加胆固醇 1.0 g,吐温 80 20 mL,牛胆盐 3.0 g。将 1.0 g 胆固醇置于 20 mL 吐温 80 中,加热至沸腾后使其溶解,趁热缓慢倒入培养基中,呈胶束溶液状态,此时培养基的颜色呈不透明淡黄色。配制好的培养基在 121℃灭菌 20 min 后趁热将试管晃动或上下颠倒振荡,以使该胶状物完全溶解,置于室温中自然冷却,放置备用。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株分离纯化及降胆固醇功能的筛选 将样品混合适量无菌水研磨均匀,吸取 1 mL 研磨液转移至装有含 9.0 mL 0.9%灭菌生理盐水的试管中,振荡摇匀。从 1×10^{-1} 到 1×10^{-6} 进行梯度稀释并吸取 0.15 mL 研磨稀释液涂布于 MRS(含碳酸钙)平板上,置于恒温培养箱 37℃厌氧培养 36~72 h。根据菌落的颜色、大小、光泽、透明程度等,挑取有透明圈的单菌落于 MRS 平板上进行多次划线纯化,记录菌落形态特征。将纯化菌株进行革兰氏染色、油镜和过氧化氢酶实验,凡是革兰氏染色阳性,过氧化氢酶阴性的菌株疑似为乳酸菌。纯化后菌株接种于 MRS 斜面培养基上培养,4℃保存备用。

采用邻苯二甲醛法^[13]对待测菌进行降胆固醇能力的筛选。将疑似乳酸菌连续活化 2 次后,按 2%接种量接种到 MRS-CHOL 液体培养基中,37℃厌氧培养 24 h 后取 1 mL 发酵菌液,离心(8 000 r/min)10 min 后取上清液采用邻苯二甲醛法测定上清液中胆固醇含量,按公式(1)计算降胆固醇率,实验重复 3 次。

$$\text{降胆固醇率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式(1)中: A_0 、 A_1 分别为未接菌上清液和菌株发酵上清液的胆固醇质量含量(mg/mL)。

1.3.2 菌株 HJ-S2 的分子鉴定 挑取保存于平板上 2~3 个菌落混合于 API 50CH 培养基中,制得浑浊度相当于 2 McFarland 的菌悬浮液,将此菌悬浮液依次加入 API 50CH 试剂条的孔中,用甘油覆盖保持厌氧环境,底盘加 10 mL 水使其保持湿润的气体环境,随后将试剂条浮于水上,37℃培养 48 h 观察各糖类发酵情况。结果经 API-plus 软件分析发酵糖种类确定其菌属。

采用试剂盒提取细菌 DNA,并利用 16S rDNA 通用引物(27F,1492R)进行 PCR 扩增。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳得到清晰的条带。菌株 PCR 产物送至上海生工有限公司测序,并将测序结果与 GenBank 各标准菌株序列进行 BLAST 比对,使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育进化树,完成乳酸菌的分子鉴定。

1.3.3 菌株生长特性的测定 取保存的菌种,在无菌条件下接种至 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h 后按 2%的接种量连续活化两次,得乳酸菌菌悬液。将活化后的菌株 HJ-S2 按 2%接种量接入 500 mL MRS 液体培养基中,37℃摇床培养。测定初始培养基的 OD_{600} ,前期 10 h 每间隔 1 h 测定培养液的 OD_{600} 和 pH 值,后期每间隔 3 h 测定培养液的 OD_{600} 和 pH 值,连续测定 48 h,绘制菌株 HJ-S2 的生长曲线及 pH 值变化。

1.3.4 培养基条件对胆固醇降解率的影响 分别用胰蛋白胨、大豆蛋白胨、胍蛋白胨以等量代替 MRS-CHOL 培养基的蛋白胨,将菌株 HJ-S2 按 2%接种量接种于含不同氮源的 MRS-CHOL 培养基中,于 37℃恒温摇床培养 24 h,按“1.2.1”的方法测定不同种类氮源对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。选出确定的氮源后,进一步考察氮源添加量对降解率的影响。

分别用蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、乳糖、菊糖代替 MRS-CHOL 培养基中的葡萄糖,测量方法同上,考察不同碳源及添加量对降解率的影响。

将菌株 HJ-S2 按 2%接种量接种于含胆固醇含量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL 的 MRS-CHOL 培养基中,37℃摇床培养 24 h,测定不同胆固醇含量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。

将菌株 HJ-S2 按 2%接种量接种于含牛胆盐含量分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL 的 MRS-CHOL 培养基中,37℃摇床培养 24 h,测定不同牛胆盐含量对 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。

1.3.5 不同发酵条件对胆固醇降解率的影响 以“1.3.4”实验中所确定的 MRS-CHOL 培养基的各成分含量,将活化后的菌株 HJ-S2 按 2%接种量接种于 MRS-CHOL 培养基中,37 ℃ 恒温摇床培养 54 h,每 6 h 取培养液,测定不同培养时间对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。

菌株 HJ-S2 活化后按 2%接种量接种于 MRS-CHOL 培养基中,分别于 37 ℃、38 ℃、40 ℃、41 ℃、42 ℃ 恒温摇床培养 24 h,测定不同培养温度对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。

菌株 HJ-S2 接种于初始 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10 的 MRS-CHOL 培养基中,37 ℃ 恒温摇床培养 24 h,测定不同初始 pH 对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。

菌株 HJ-S2 按 1%、2%、3%、4%、5%、6%的接种量接种于 MRS-CHOL 培养基中,37 ℃ 恒温摇床培养 24 h,测定不同接种量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响。

1.3.6 培养基、发酵条件正交试验 为了确定最佳的液体培养基配方,依据前期单因素条件对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率影响的实验结果以及细菌生长所需营养要素的基本原则,以胆固醇降解率为指标,分别设计葡萄糖、蛋白胨、胆固醇、胆盐含量 4 因素

3 水平正交试验及 pH、培养时间和接种量 3 因素 3 水平正交试验。

1.4 数据统计分析

采用 Excel 2013 软件分析数据,每个试验重复 3 次;采用统计学软件 SPSS 19.0 软件进行差异性分析,当 $p<0.05$ 时,差异被认为是有意义的,结果表示为平均值±标准差;采用 Origin 8.0 和 Excel 2013 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离纯化及降胆固醇功能筛选

从喙鲸内脏共分离纯化出 30 个单菌落,生理生化实验及形态学观察结果显示,该 30 株菌为革兰氏阳性菌,菌落形态为透明、白色或黄色且边缘规则,油镜下观察菌体形态为球状或杆状,过氧化氢酶试验为阴性,符合乳酸菌属的特征。将所得乳酸菌进行降胆固醇能力筛选实验,其中降解率小于 10%的有 6 株菌,10%~20%的有 8 株菌,>20%~30%的有 8 株菌,>30%~40%的有 5 株菌,40%以上的有 3 株菌 (HJ-W33、HJ-W64、HJ-S2), 降解率分别为 40.69%、40.78%、48.82%,其中 HJ-S2 (CGMCC No.: 17720) 的降解率最高为 48.82%,具有较高的潜在研究价值(表 1)。

表 1 各分离菌株的降胆固醇能力
Tab. 1 Cholesterol-lowering ability of isolated strains

编号	降解率/%	编号	降解率/%	编号	降解率/%	编号	降解率/%
HJ-W33	40.69±0.29	HJ-WX3	8.43±0.09	HJ-C71	10.52±0.19	HJ-W69	13.96±0.27
HJ-W12	20.52±0.21	HJ-C12	19.80±0.04	HJ-S1	20.61±0.62	HJ-WX2	6.31±0.25
HJ-W14	15.84±0.09	HJ-C15	26.70±0.16	HJ-S2	48.80±0.17	HJ-C42	20.70±0.23
HJ-W32	7.98±0.15	HJ-C21	14.20±0.05	HJ-S3	38.71±0.52	HJ-C61	9.41±0.31
HJ-W35	25.93±0.08	HJ-C23	5.51±0.27	HJ-S5	35.05±0.24	HJ-W73	36.31±0.19
HJ-W36	30.61±0.15	HJ-C3	10.32±0.19	HJ-F1	21.42±0.31	HJ-W63	30.61±0.26
HJ-W62	10.42±0.26	HJ-C5	6.24±0.07	HJ-W64	40.78±0.82		
HJ-W61	25.21±0.57	HJ-W71	23.12±0.41	HJ-W67	15.21±0.36		

2.2 具降胆固醇功能乳酸菌的鉴定

对菌株 HJ-S2 进行 API 50CH 碳水化合物发酵鉴定,将发酵结果(表 2)输入 API 数据库进行比对分析,鉴定其为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),后续为了使鉴定结果更精准,结合 16S rDNA 序列分析进行分子水平的鉴定。

菌株 HJ-S2 的 PCR 产物大小为 1.5 kb 左右,符

合 16S rDNA 序列长度。将扩增后的 PCR 产物测序结果与已知标准菌株序列进行同源性对比,BLAST 结果显示该菌株的序列与登录号为 LC379973.1、CP0237771.1 以及 MH779888.1 等植物乳杆菌的 16S rDNA 基因组序列相似性均为 100%,证实了菌株 HJ-S2 为植物乳杆菌 *L. plantarum* (GenBank 登录号 MK248728)。使用 MEGA 7.0 软件构建了其系统

发育树,如图 1 所示。

表 2 乳酸菌 HJ-S2 的 API 50CH 鉴定结果
Tab. 2 API 50CH result of lactic acid bacteria HJ-S2

碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2	碳水化合物	HJ-S2
S 甘露醇	+	D-葡萄糖	+	D-纤维二糖	+	D-麦芽糖	+	木糖醇	-
赤藻糖醇	-	D-果糖	+	甲基-D-吡喃甘露糖苷	-	D-乳糖	-	D-龙胆二糖	+
D-阿拉伯糖	-	D-甘露糖	+	甲基-D-吡喃葡萄糖苷	-	D-蜜二糖	-	D-土伦糖	+
L-阿拉伯糖	+	L-山梨糖	-	N-乙酰-葡糖胺	-	D-蔗糖	+	D-来苏糖	-
D-核糖	+	ARBULIN	+	L-鼠李糖	-	D-海藻糖	+	D-塔格糖	-
D-木糖	-	卫茅醇	-	七叶灵柠檬酸铁铵	+	菊糖	-	D-岩藻糖	-
L-木糖	-	肌醇	-	D-侧金盏花醇 I	-	D-松三糖	+	L-岩藻糖	-
苦杏仁甙	+	甘露醇	-	2-酮基-葡萄糖酸盐	-	D-棉子糖	-	D-阿拉伯糖	-
葡萄糖酸钾	+	山梨醇	-	5-酮基-葡萄糖酸盐	+	淀粉	+	L-阿拉伯糖	-
D-乳糖	+	水杨苷	+	甲基-βD-吡喃木糖苷	-	糖原	+		

注:“+”为阳性;“-”为阴性。

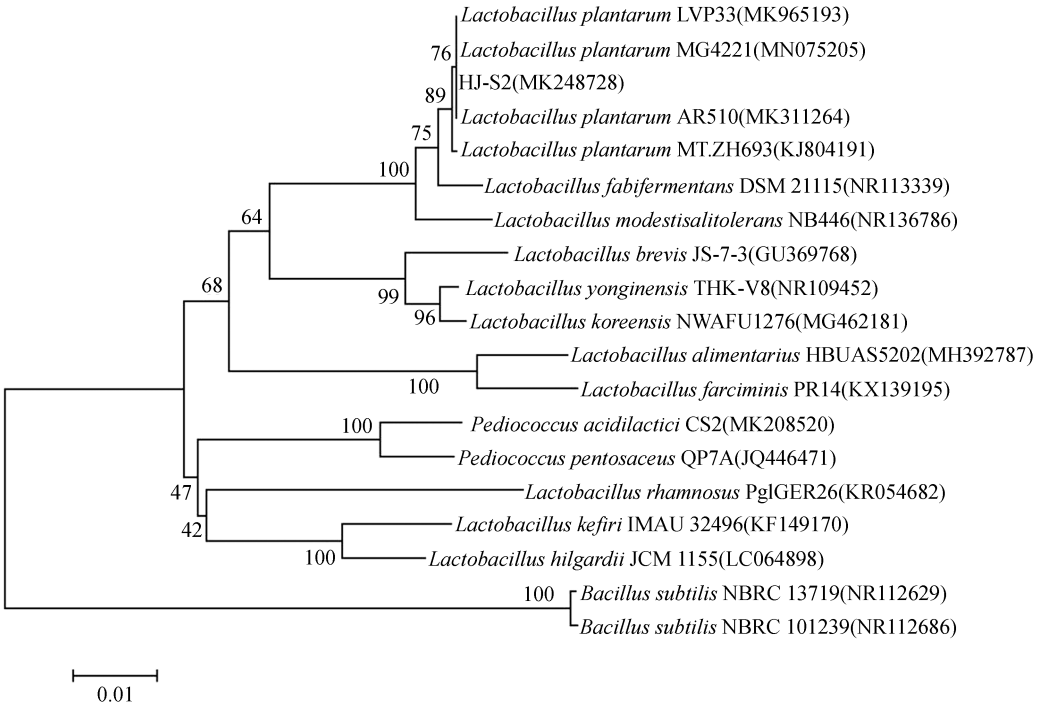


图 1 菌株 HJ-S2 的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of strain HJ-S2

2.3 菌株的生长特性

菌株 HJ-S2 的生长特性如图 2 所示。前期 0~3 h 是生长延滞期,该阶段菌株适应培养环境,繁殖缓慢,数量增长较少, OD_{600} 由 0.25 缓慢上升至 0.38, pH 值从初始培养基的 6.10 下降至 5.63。3~24 h 是菌株生长对数期,该阶段细菌代谢和繁殖快速增长,

生长迅速,细菌数呈对数式生长, OD_{600} 由 0.38 迅速上升至 1.65, pH 值迅速从 5.63 下降至 3.72 左右。24~34 h 为菌株生长的稳定期,其间活菌数达到最大值且基本保持不变,菌体代谢和繁殖平衡,代谢产物持续积累, OD_{600} 维持在 1.65 左右,此时酸性代谢产物趋于稳定,体系 pH 值稳定在 3.70 左右。34~

48 h 是菌株的衰亡期,该阶段活菌数略有降低,部分菌株衰老死亡,且菌株活性降低并趋于停滞, OD_{600} 从 1.65 降至 1.50 左右且具持续缓慢降低的趋势,菌体的凋亡使部分酸性代谢产物减少,pH 值略有回升,从3.70回升至 3.90 左右。由此可见,菌株 HJ-S2 生长速率较快且产酸能力强,适合发酵法制备功能性微生态制剂。

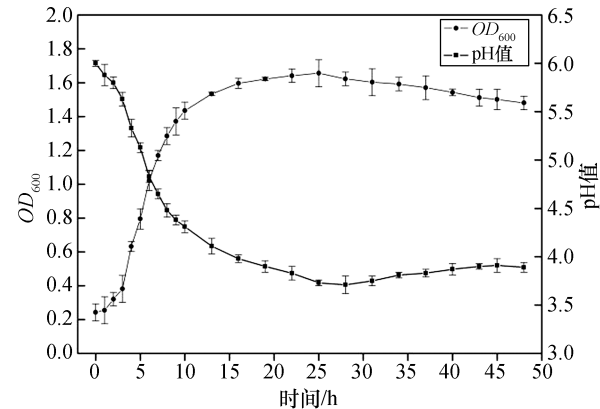


图 2 菌株 HJ-S2 的生长特性

Fig. 2 Growth characteristics of strain HJ-S2

2.4 不同氮源和碳源对胆固醇降解率的影响

考察不同氮源对胆固醇降解率的影响结果如图 3(a) 所示。同一菌株在含不同氮源的 MRS-CHOL 培养基中胆固醇降解率差异显著 ($p<0.05$)。菌株 HJ-S2 在以蛋白胨为氮源的培养基中胆固醇降解率最高,胰蛋白胨略低,胨蛋白胨较低,大豆蛋白胨最低。此外,蛋白胨价格也相对较低,综合考虑选择蛋白胨作为发酵氮源。进一步对考察不同蛋白胨添加量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响,结果如图 3 (b) 所示,氮源含量对菌株的胆固醇降解率有一定影响。当蛋白胨含量为 10 g/L,降解率最高,达到 39.28%;当继续提高蛋白胨的添加量,降解率有所下降,维持在 25.80%左右,由此确定正交试验水平为蛋白胨含量 5、10、15 g/L。

考察不同碳源对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响结果如图 3 (a) 所示。菌株在含不同碳源的 MRS-CHOL培养基中胆固醇降解率差异显著 ($p<0.05$)。菌株 HJ-S2 在以葡萄糖为碳源的培养基中胆固醇降解率最高,乳糖、麦芽糖、菊糖次之,而可溶性淀粉作为碳源时降解率最低。葡萄糖作为单糖,微生物能很好地直接吸收利用,因此选择葡萄糖作为发酵碳源。

进一步考察葡萄糖不同添加量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响,结果图 3(b) 所示。当葡萄糖添

加量为 20 g/L 时,菌株 HJ-S2 对胆固醇的降解率最高,达到 42.13%,当继续提高葡萄糖的添加量,降解率反而下降维持在 29.30%左右。因为碳源含量过高使菌体生长过快,过早衰老发生自溶,从而影响菌体对胆固醇的吸收^[14]。由此确定正交试验中葡萄糖含量为 15、20、25 g/L。

2.5 胆固醇、胆盐含量对胆固醇降解率的影响

不同胆固醇含量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响如图 4 (a) 所示。菌株 HJ-S2 对胆固醇的降解率随胆固醇含量的升高先增大后减少,当胆固醇含量为 1.0 g/L 时,降解率达到最大值为 38.94%,随着胆固醇含量的增加,降解率略有降低,后续维持在 26.13%左右。由此确定正交试验中胆固醇含量为 0.5、1.0、1.5 g/L。

不同胆盐含量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响如图 4 (b) 所示。菌株 HJ-S2 对胆固醇的降解率随胆盐含量升高先增大后减少,胆盐含量为 1.0 g/L 时,胆固醇降解率较低为 18.62%;当胆盐含量为 2.0 g/L 时,降解率达到最大值为 43.99%;胆盐含量达到 3.0 g/L 时,胆固醇降解率达到了 38.62%左右,随着胆盐含量的升高,胆固醇降解率也相应减小后续维持在 37.51%左右。由此确定正交试验中胆盐含量为 1.5、2.0、2.5 g/L。

2.6 发酵时间、培养温度对胆固醇降解率的影响

发酵时间对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响如图 4 (c) 所示,结合菌株生长曲线进行分析,0~3 h 为菌株的生长延滞期,菌体适应培养环境,繁殖缓慢,数量增长较少,此阶段胆固醇降解率较低;3~24 h 为菌株的对数生长期,此阶段细菌数量呈指数增长,细菌代谢繁殖快速增长,培养基中胆固醇含量急剧下降,当培养到 24 h 时,胆固醇降解率达到最大 42.18%;24~34 h 为乳酸菌生长的稳定期,胆固醇降低率不再增加且略有下降;34~54 h 为菌株的衰亡期,部分菌体衰老死亡,胆固醇降低率逐渐稳定在 32.15%左右。

不同培养温度对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响,结果如图 4 (d) 所示。不同培养温度对菌株的降胆固醇能力有一定影响,当培养温度为 34 ℃ 时,胆固醇降解率最低为 25.82%左右;当温度为 37 ℃ 时,菌株 HJ-S2 对胆固醇降解率最高达 41.39% 且与 38 ℃ 时的降解率相差不大;温度达到 40 ℃ 以上时,使菌体活性相应降低,影响菌体对胆固醇的吸收从而使胆固醇降解率稍有降低。因此后续实验一直在 37 ℃ 进行分离培养,且菌体的最适温度为 37 ℃,温度过低或过高都会影响菌体的生物活性。

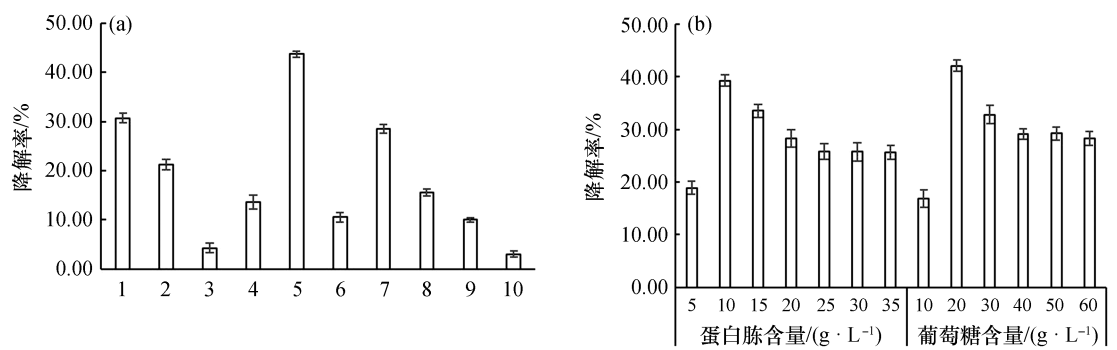


图3 氮源和碳源对胆固醇降解率的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen and carbon sources on cholesterol degradation rate

(a) 为不同碳源和氮源对降解率的影响;其中 1~10 分别表示蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、胚蛋白胨、葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、菊糖、可溶性淀粉,(b) 为蛋白胨、葡萄糖含量对降解率的影响。

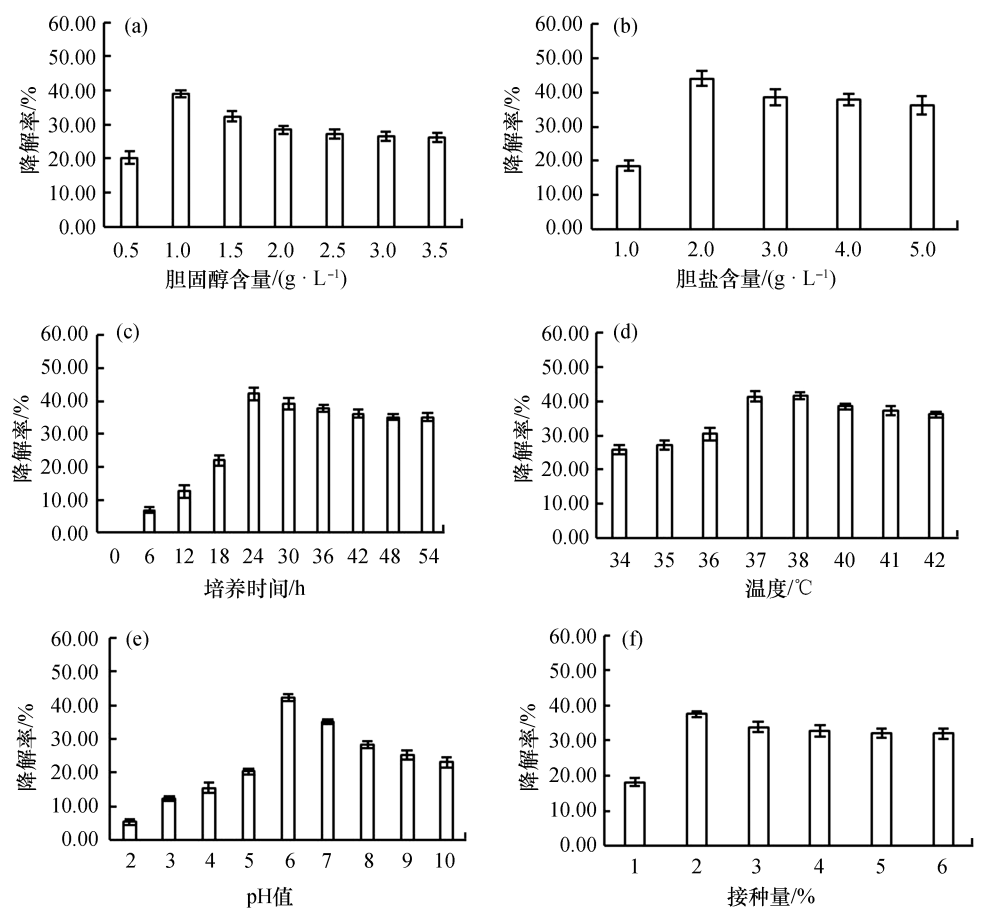


图4 各单因素对胆固醇降解率的影响

Fig. 4 Effects of single factor on cholesterol degradation rate

(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 分别为胆固醇含量、胆盐含量、培养时间、pH 值、接种量对降解率的影响。

2.7 初始 pH 值、接种量对胆固醇降解率的影响

不同 pH 值对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响如图 4(e) 所示。培养基的初始 pH 值对菌株 HJ-S2 的胆固醇降解率有很大影响。在 pH 值低于 5 时,胆固醇降解率较低,因为菌株在低 pH 值条件下,活

性较低,从而影响菌株的降胆固醇效果。但菌株 HJ-S2 在初始培养基 pH 值为 2 的条件下仍具有降解胆固醇作用,降解率为 5.41%,说明菌株对酸环境有很好的的耐受性。随着 pH 值的升高,降解率不断升高,在 pH 值为 6 时达到最高点,此环境下的乳

酸菌活性较高,降解率达到最大值为 42.24%,当 pH 值高于 6 时,胆固醇降解率逐步减少。由此确定正交试验中 pH 值为 5、6、7。

不同接种量对菌株 HJ-S2 胆固醇降解率的影响如图 4(f)所示。结果显示接种量大小对胆固醇降解率有较大影响。接种量为 1%时,胆固醇降解率较低(18.21%);随着接种量的增加,胆固醇降解率也随之逐渐增加;接种量为 2%时,胆固醇降解率达到最大值(35.21%);当接种量达到 3%以上,胆固醇降解率略有降低且基本不变维持在 32.10%左右。由此确定正交试验中接种量为 1%、2%、3%。

2.8 培养基、发酵条件正交试验

根据前期各单因素条件实验结果,按表 3 设计培养基及发酵条件正交试验,试验结果如表 4、表 5 所示。培养基条件各因素中影响程度的大小关系是

C>D>B>A,即对胆固醇降解率影响最大的是底物胆固醇含量,其余依次为胆盐含量、葡萄糖含量、蛋白胨含量。正交优化结果显示,A₁B₃C₂D₂条件下菌株对胆固醇的降解作用最强,为最佳培养基条件配方。按 A₁B₃C₂D₂培养基条件进行重复试验,胆固醇降解率为 56.95%,即降胆固醇最优的培养基条件为:蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 25 g/L、胆固醇 1.0 g/L、胆盐 2.0 g/L。

发酵条件中各因素对胆固醇降解率的影响程度为 A>C>B,即影响最大的因素是培养基 pH 值,依次是接种量、培养时间。正交优化结果显示,A₂B₂C₁条件下菌株对胆固醇降解作用最强,为最佳发酵条件配方。按 A₂B₂C₁培养条件进行重复试验,胆固醇降解率为 69.81%,即最优培养条件为:pH 值 6,培养时间 24 h,接种量 1%。

表 3 培养基及发酵条件正交试验表

Tab. 3 Orthogonal experiment table of medium and fermentation conditions

不同水平的培养基条件				不同水平的发酵条件		
(A)蛋白胨含量 /(g·L ⁻¹)	(B)葡萄糖含量 /(g·L ⁻¹)	(C)胆固醇含量 /(g·L ⁻¹)	(D)胆盐含量 /(g·L ⁻¹)	(A)pH 值	(B)培养时间/h	(C)接种量/%
5	15	0.5	1.5	5	18	1
10	20	1.0	2.0	6	24	2
15	25	1.5	2.5	7	30	3

表 4 培养基条件正交试验结果

Tab. 4 Orthogonal test results of the medium conditions

序号	(A)蛋白胨含量/(g·L ⁻¹)	(B)葡萄糖含量/(g·L ⁻¹)	(C)胆固醇含量/(g·L ⁻¹)	(D)胆盐含量/(g·L ⁻¹)	降解率/%
1	5	15	0.5	1.5	34.12
2	5	20	1.0	2.0	52.71
3	5	25	1.5	2.5	36.37
4	10	15	1.0	2.5	39.52
5	10	20	1.5	1.5	35.27
6	10	25	0.5	2.0	45.71
7	15	15	1.5	2.0	33.02
8	15	20	0.5	2.5	32.31
9	15	25	1.0	1.5	42.75
K ₁	41.067	35.553	37.380	37.380	
K ₂	40.167	40.097	44.993	43.813	
K ₃	36.027	41.610	34.887	39.067	
R	5.040	6.057	10.106	7.746	

表 5 发酵条件正交试验结果

Tab. 5 Orthogonal test results of the fermentation conditions

序号	A:pH 值	B:培养 时间/h	C:接种量 /%	降解率 /%
1	5	18	1	38.87
2	5	24	2	42.67
3	5	30	3	35.13
4	6	18	2	51.27
5	6	24	3	56.27
6	6	30	1	66.35
7	7	18	3	40.82
8	7	24	1	51.84
9	7	30	2	39.62
K_1	38.890	43.653	52.353	
K_2	57.963	50.260	44.520	
K_3	44.093	47.033	44.073	
R	19.073	6.607	8.280	

2.9 讨论

乳酸菌是发酵食品工业重要的微生物菌种,在自然界中存在广泛多样性,水、土壤、植物及动物和人体内均有分布。乳酸菌生理功能十分广泛,不仅能改善食品风味和营养价值、提高食品的保藏性和附加值,而且具有维持机体微生物菌群平衡和肠道健康、降低血清胆固醇、缓解乳糖不耐症、增强机体免疫力等多种医疗保健功能。早在 1963 年,Shaper 等发现非洲 Samburu 部落的人们大量饮用由野生乳杆菌发酵的乳制品后,体内胆固醇含量普遍降低^[15]。近几年的国内外研究发现多种乳酸菌,如植物乳杆菌^[16]、嗜酸乳杆菌^[17]、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)^[18] 等均具有降胆固醇特性。Pereira 等 (2002) 研究证实了婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) 和嗜酸乳杆菌在体外对胆固醇的吸收作用^[19]。肖琳琳等 (2003) 构建高脂小鼠模型后用从西藏传统发酵乳中分离的乳酸菌进行实验,结果显示实验组小鼠血清中 TC、TG 含量较对照组显著降低^[20]。

本研究从生活在海平面以深 300 m 的喙鲸内脏中筛选出一株具降胆固醇功能的乳酸菌,鉴定为植物乳杆菌并编号为 HJ-S2 (CGMCC No:17720)。该菌对胆固醇的体外降解率均优于范颖等 (2018)、郭晶晶等 (2019) 及 Shehata 等 (2016) 分离纯化的乳酸

菌^[21-23],具有较高的潜在开发价值。生长特性实验显示菌株的延滞期为 0~3 h,对数期为 3~24 h,稳定期为 24~34 h,衰亡期为 34~48 h。从培养基条件 (氮源的种类和含量、碳源的种类和含量、胆固醇含量、胆盐含量) 和发酵条件 (温度、pH 值、培养时间、接种量) 两方面,采用单因素和正交试验进行发酵工艺优化。

氮源和碳源含量过高均会使菌体生长过盛,过早衰老发生自溶,从而影响菌体对胆固醇的吸收。本研究经比较选用蛋白胨作氮源,葡萄糖作碳源,能最大程度发挥菌株的降胆固醇作用。胆固醇作为底物,在较高含量时,菌体对胆固醇的吸收达到饱和,且高含量胆固醇对菌体存在一定的抑制作用,从而菌体释放出已沉淀的胆固醇使降解率减少。刘丽莉等 (2004) 研究在不同胆固醇含量条件下乳酸菌的降解效果,发现降解率先上升后下降,在 1 mg/mL 时降解率达到最高^[24],与本研究结果一致。适当的胆盐含量能提高菌体的通透性,更好地吸收培养基中的胆固醇,菌体吸收后的胆固醇参与菌体自身代谢,合成胆固醇氧化酶,最终使环境中的胆固醇含量降低。Grill 等 (2010) 研究了食淀粉乳杆菌 (*Lactobacillus amylovorus*) 和双歧杆菌在胆盐中的降胆固醇效果,发现菌株的胆固醇降解能力与胆盐的含量和种类之间有显著关系^[25]。张红星等 (2011) 研究发现菌体在一定的胆盐含量下,其胆固醇降低率较不添加胆盐的高^[26]。本研究中同样发现在胆盐含量为 2 g/L 时降解率达到最高。菌株对胆固醇的降解率与菌株生长量有着密切关系,相关研究表明,菌体生长后期环境中积累大量酸性物质,影响菌体的活性从而降低了菌体对胆固醇的吸收^[27-28]。Zhang 等 (2016)、任大勇等 (2014) 研究发现菌株发酵 23 h 左右时,对胆固醇的降低效果达到最大值^[11,29],与本研究发酵时间对胆固醇降解率影响的结果基本一致。菌体的最适温度为 37 ℃,温度过高或过低都会影响菌体的生物活性,本研究后续一直于 37 ℃ 进行分离培养。当发酵培养基中初始 pH 值较低或较高时,均不利于菌株的生长,使其胆固醇降解率下降。Noohi (2016)、Kim 等 (2016) 研究了多种乳杆菌在不同 pH 值条件下的降胆固醇能力,发现 pH 值条件不同时,胆固醇脱除能力差异显著^[30]。在 pH 6.5 以下,对胆固醇的脱除量可达 60 μg/mL,且乳酸菌在 pH 6.5 的条件下生长良好,本研究测得的菌株降解率最优 pH 值为 6。适当的活菌数能使胆固醇降低率达到最大值,最大程度发挥菌株的降胆固醇作用。姜华 (2010) 在降胆固醇乳酸菌的筛选研究中同样

也得出在接种量为 3% 左右时降解率达到最大值, 乳酸菌在生长过程中分泌乳酸, 使环境中 pH 值降低, 但低 pH 值环境不利于菌株的生长从而使胆固醇降解率降低^[31]。本研究中接种量为 2% 时降解率达到最大值。

最后, 综合最优条件设计正交试验获得了菌株优化发酵条件, 为功能性益生菌剂的开发应用提供参考依据。

3 结论

本研究从喙鲸内脏中筛选出一株具高效降解胆固醇功能的乳酸菌 HJ-S2, 经鉴定为植物乳杆菌, 并

命名为 HJ-S2。为提高植物乳杆菌 HJ-S2 的体外降胆固醇能力, 考察了菌株的生长特性, 并从培养基条件和发酵条件两个方面, 设计了正交试验方案。通过单因素试验初步确定了影响菌株胆固醇降解率各因素水平。在此基础上, 利用正交试验法对影响植物乳杆菌 HJ-S2 降解胆固醇效果的发酵培养基及培养条件进行了优化, 确定了培养基优化条件为蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 25 g/L、胆固醇 1.0 g/L、胆盐 2.0 g/L; 发酵优化条件为: 培养温度 37 ℃, pH 值 6、培养时间 24 h、接种量 1%, 在此优化条件下降解率达到 69.81%。

参考文献:

- [1] 于志会. 益生性降胆固醇植物乳杆菌的筛选、发酵特性及体内功效研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
YU Z H. Screening, fermentation properties and *in vivo* efficacy of cholesterol-lowering probiotic *Lactobacillus plantarum* strains[D]. Changchun: Jilin University, 2013.
- [2] TOSTESON H, RIDKER P M. The primary prevention of myocardial infarction[J]. European Journal of Haematology, 2010, 25(S38): 38-44.
- [3] 潘道东, 张德珍. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其降胆固醇活性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 233-237.
PAN D D, ZHANG D Z. Screening of cholesterol-reducing lactic acid bacteria and its activity in cholesterol-reducing[J]. Food Science, 2005, 26(6): 233-237.
- [4] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
HU S S, GAO R L, LIU L S, et al. Summary of the 2018 report on cardiovascular diseases in China[J]. Chinese Circulation Journal, 2019, 34(3): 209-220.
- [5] 刘艳姿. 乳酸菌的生理功能特性及应用的研究[D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2010.
LIU Y Z. The investigation on physiology functional characteristics of lactic acid bacteria and its applications[D]. Qinhuangdao: Yanshan University, 2010.
- [6] LIONG M, SHAH N. Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin; a response surface methodology approach[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 98(5): 1115-1126.
- [7] OH Y J, JUNG D S. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from omegisool, a traditionally fermented milk alcoholic beverage in Korea[J]. LWT- Food Science and Technology, 2015, 63(1): 437-444.
- [8] 丁苗, 刘洋, 葛平珍, 等. 发酵酸肉中降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及降胆固醇作用[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 203-207.
DING M, LIU Y, GE P Z, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from fermented sour meat[J]. Food Science, 2014, 35(19): 203-207.
- [9] 蒲博, 张驰翔, 王周, 等. 乳酸菌降胆固醇作用及其机理的研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(7): 5-9.
PU B, ZHANG C X, WANG Z, et al. Progress on cholesterol-lowering effect and mechanism of lactic acid bacteria[J]. China Chewing, 2014, 33(7): 5-9.
- [10] 李妮. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其降解机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012.
LI N. Screening and mechanism of cholesterol-lowering lactobacillus[D]. Xiamen: Jimei University, 2012.
- [11] ZHANG G, DING X, MIN Y U, et al. Optimization of fermentation conditions for cholesterol reduction in egg yolk by mixed *Lactobacillus* culture[J]. Food Science, 2016, 2(37): 186-190.
- [12] 付永岩, 赵悦含, 刘飞, 等. 降胆固醇乳酸菌的生长特性及发酵培养基的优化[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 1-7.
FU Y Y, ZHAO Y H, LIU F, et al. Growth characteristics of cholesterol-reducing lactic acid bacteria and optimization of fermentation[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(1): 1-7.
- [13] GOPAL P K, PRASAD J, SMART J, et al. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67(3): 207-216.
- [14] REINHOLD B, TITGEMEYER F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(2): 141-148.
- [15] SHAPER A G, JONES K W, JONES M, et al. Serum lipids in three nomadic tribes of northern kenya[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1963, 13(3): 135-146.
- [16] 周海柱, 高云航, 郭玮, 等. 高效降胆固醇植物乳杆菌的筛选及其益生潜能初探[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(2): 36-42.
ZHOU H Z, GAO Y H, GUO W, et al. Screening and evaluation of cholesterol-lowering *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Journal of China Ag-

- ricultural University, 2018, 23(2): 36-42.
- [17] GILLILAND S E, NELSON C R, MAXWELL C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(2): 377-381.
- [18] LYE H S, RAHMAT-ALI G R, LIONG M T. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(3): 169-175.
- [19] PEREIRA D I A, GIBSON G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4 689-4 693.
- [20] 肖琳琳, 董明盛. 西藏干酪乳酸菌降胆固醇特性研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 142-145.
- XIAO L L, DONG M S. Cholesterol-degrading activity of *Lactobacillus casei* isolated from Tibet koumiss[J]. Food Science, 2003, 24(10): 142-145.
- [21] 范颖, 陈思涵, 党芳芳, 等. 一株降胆固醇乳酸菌的筛选及其在模拟消化环境活性的研究[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(9): 4-7.
- FAN Y, CHEN S H, DANG F F, et al. Screening and study on activity in the simulated gastrointestinal conditions of a cholesterol-lowering lactic acid bacteria[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(9): 4-7.
- [22] 郭晶晶, 张鹏飞, 曹承旭, 等. 自然发酵豆酱中降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及对大鼠血清胆固醇的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(2): 15-24.
- GUO J J, ZHANG P F, CAO C X, et al. Cholesterol-lowering lactic acid bacteria isolated from the naturally fermented soybean sauces and their effects on serum cholesterol levels in rats[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(2): 15-24.
- [23] SHEHATA M G, EL SOHAIMY S A, EL-SAHN M A, et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2016, 61(1): 65-75.
- [24] 刘丽莉, 夏延斌. 乳酸菌 Lact.1 和 Lact.2 降解胆固醇的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, 30(3): 278-281.
- LIU L L, XIA Y B. On degrading-cholesterol of Lact.1 and Lact.2[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2004, 30(3): 278-281.
- [25] GRILL J P, CAYUELA C, ANTOINE J M, et al. Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 31(2): 154-156.
- [26] 张红星, 王甘, 刘勇, 等. 乳酸菌胆盐水解酶生理特性和分子生物学的研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 302-305.
- ZHANG H X, WANG G, LIU Y, et al. Research progress in physiological characteristics and gene sequencing of bile salt hydrolase from lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2011, 32(1): 302-305.
- [27] LIONG M T, SHAH N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(1): 55-66.
- [28] YADAV R, KHAN S H, MADA S B, et al. Consumption of probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898-fermented milk attenuates dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in male rats fed on cholesterol-enriched diet[J]. Probiotics & Antimicrobial Proteins, 2018, 11(5): 1-10.
- [29] 任大勇, 翁璐超, 刘宏锋, 等. 乳酸菌体外降解胆固醇的影响因素研究[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(5): 41-45.
- REN D Y, WENG L C, LIU H F, et al. Factors influencing *in vitro* cholesterol removal ability of lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 32(5): 41-45.
- [30] KIM M, CHOI E, KIM J, et al. Effect of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* K10 on beer fermentation; effect of bacteriocin-producing *P. acidilactici* K10 on beer fermentation[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2016, 122(3): 422-429.
- [31] 姜华. 降胆固醇功能乳酸菌的筛选及其特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- JIA H. Screening and primary study of lactic acid bacteria for cholesterol-degrading[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.

Study on screening of cholesterol-lowering marine lactobacillus and optimization of fermentation conditions

WAN Jing-liang, LUO Man, WU Peng, HUANG Shi-xin, TANG Xu*, XU Chang-an

(Third Institute of Oceanography, MNR, Xiamen 361005, China)

Abstract: A lactobacillus HJ-S2 with high effectiveness of cholesterol lowering was isolated from a beaked whale (*Mesoplodon rostris*) viscera using *o*-benzaldehyde method. The bacterium was identified as *lactobacillus plantarum* by 16S rDNA and API 50CH. In order to improve the cholesterol-lowering ability of HJ-S2 *in vitro*, the growth characteristics of the strain was investigated. Single factor and orthogonal experiment was used to optimize the condition in two aspects, the fermentation and medium. The optimized fermentation condition was set as follows: peptone 5 g/L, glucose 25 g/L, cholesterol 1.0 g/L, bile salt 2.0 g/L, temperature 37 °C, pH 6, incubation time 24 h

and inoculation amount 1%. Under the optimized condition, the cholesterol-lowering rate reached 69.81%, which significantly improved the result. Thus the optimized fermentation condition could offer production process and reference for further development in application of functional probiotics.

Key words: marine biology; *Lactobacillus plantarum*; cholesterol degradation; beaked whale; optimization of fermentation process

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2021.02.005

(责任编辑:肖 静)