

## 模拟人体胃肠道环境筛选益生乳杆菌

赵芳 李艳琴\* 李彬春

(山西大学生物技术研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西 太原 030006)

**摘要:**【目的】筛选具有益生特性的乳杆菌作为保健型酸奶的候选菌株。【方法】从健康人肠道和奶豆腐中分离筛选出耐受人工胃液的乳杆菌, 对其进行体外益生特性(人工胃肠液耐受性、胆盐耐受性、抑菌活性及胆固醇降解能力)研究。【结果】从在乳杆菌分离培养基上有溶钙圈的 41 株菌株中筛选出 5 株耐酸、耐人工胃液较强的菌株, 经 16S rRNA 基因测序鉴定, 其中 3 株为乳杆菌, 分别命名为植物乳杆菌 LpMT-3、植物乳杆菌 LpMT-5 和唾液乳杆菌 LsAF-7。在人工胃液中 3 株菌的耐受力均强于商品化的对照菌株 LGG (鼠李糖乳杆菌 GG); 转入肠液 4 h 后直至 26 h, LpMT-5 存活率基本稳定在 45% 左右, 仅次于 LGG。胆盐浓度为 0.10% 时, 3 株乳杆菌的耐胆盐能力均强于 LGG; 胆盐浓度为 0.20% 时, LpMT-3 和 LsAF-7 仍能存活。3 株乳杆菌均具有抑菌活性, 对粪肠球菌的抑制最明显, 其次是金黄色葡萄球菌, 对大肠杆菌、沙门氏菌的抑制作用较差。3 株乳杆菌对胆固醇的清除效力依次为 LpMT-3>LpMT-5>LsAF-7; 清除率依次为 LsAF-7>LpMT-3>LpMT-5。【结论】筛选出 3 株适应人体胃肠液环境、耐胆盐、抑菌及降胆固醇活力强的乳杆菌, 可作为进一步开发新的益生菌产品和保健型酸奶的菌株。

**关键词:** 分离筛选, 乳杆菌, 人工胃肠液耐受性, 胆盐耐受性, 降胆固醇

## Screening of probiotic *Lactobacillus* in simulated gastrointestinal environment

ZHAO Fang LI Yan-Qin\* LI Bin-Chun

(Institute of Biotechnology of Shanxi University, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

**Abstract:** [Objective] To screen probiotic *Lactobacillus* as candidate strains for healthy yoghurt. [Methods] *Lactobacilli* isolated from healthy human feces and Milk Tofu were tested and screened by tolerance to simulated gastric juice. Probiotic potential was determined based on resistance to simulated gastrointestinal juice and bile salts, antibacterial activity, and cholesterol degradation ability. [Results] Results show that 41 bacterial strains with dissolved calcium were obtained from the *Lactobacillus*

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31400684); Natural Science Foundation of Shanxi (No. 2014021030-3); Scientific Research Foundation for Talent Construction of Shanxi University (No. 206533801001)

\*Corresponding author: Fax: 86-351-7011499; E-mail: yanqin@sxu.edu.cn

**Received:** November 10, 2015; **Accepted:** February 03, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 10, 2016

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31400684); 山西省基础研究项目(No. 2014021030-3); 山西大学引进人才建设项目(No. 206533801001)

\*通讯作者: Fax: 86-351-7011499; E-mail: yanqin@sxu.edu.cn

**收稿日期:** 2015-11-10; **接受日期:** 2016-02-03; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-10

isolation medium. Five strains with high tolerance to low pH and simulated gastric juice were selected from the screened strains and identified by 16S rRNA gene sequencing. Three strains were *Lactobacillus*, named as *Lactobacillus plantarum* (LpMT-3), *Lactobacillus plantarum* (LpMT-5) and *Lactobacillus salivarius* (LsAF-7). These three *Lactobacillus* strains exhibited higher tolerance to simulated gastric juice than the commercially available LGG (*Lactobacillus rhamnosus* GG). After the *Lactobacillus* strains were transferred to intestinal juice for 26 h, survival rate of LpMT-5 was stable at approximately 45%, lower than LGG (49%). The three *Lactobacillus* strains displayed higher tolerance to bile salt than LGG when the concentration of bile salt was 0.10%. LpMT-3 and LsAF-7 were still alive when the concentration of bile salt was increased to 0.20%. All the three strains exhibited antibacterial activity, especially to *Enterococcus faecalis*, followed by *Staphylococcus aureus*, and the least inhibition effect to *Escherichia coli* and *Salmonella*. All three *Lactobacillus* strains also showed cholesterol-reducing ability. **[Conclusion]** Three strains of *Lactobacillus* could be taken as the strains to further develop new probiotic products and health yogurt.

**Keywords:** Isolation and screening, *Lactobacillus*, Simulated gastrointestinal fluid tolerance, Bile salt tolerance, Cholesterol reducing

益生菌是指对宿主健康有一定促进作用的微生物<sup>[1]</sup>。理想的益生菌定义基于以下标准:耐胃酸和胆盐,在肠道中有较强繁殖能力,与宿主消化道具有强大的黏附能力,对宿主细胞无致病性和毒副作用,能减少病原微生物等<sup>[2]</sup>。目前市场上常见的益生菌主要有:鼠李糖乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、双歧杆菌等。2015年,Xu等<sup>[3]</sup>和Liu等<sup>[4]</sup>分别对新疆和西藏的38个自然发酵乳样品进行高通量测序研究,均得出了乳杆菌属为绝对优势菌群的结论。

乳杆菌作为一种优良益生菌,可有效改善宿主的肠道环境、抑制有害菌的生长<sup>[5-6]</sup>、提高免疫力<sup>[7]</sup>、调节肠道黏膜屏障功能<sup>[8]</sup>、降低胆固醇含量<sup>[9]</sup>,为宿主健康生长提供保证。随着乳杆菌益生作用的深入研究,越来越多的乳杆菌被广泛应用于生物技术、食品制作和医疗领域。

益生菌在宿主中的存活和定殖能力是其发挥益生作用的前提,来源于人体胃肠道的菌更容易在人体肠道定殖。传统的天然发酵食品因长期食用而更具有安全性。基于以上原因,本研究拟从成人粪便和传统发酵食品奶豆腐中分离、筛选既耐受人工胃肠液、耐胆盐,又具有抑菌活性和降胆固醇能力的菌株,这对于开发新的益生菌产品促进人类健康

具有重要的现实意义和广阔的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料:**成人粪便采自山西大学学生(样本10名,男女各5名,年龄在20-25岁之间),用无菌竹棒挑取自然排出的粪便,置于无菌采集管中,2 h内分离其中菌株。奶豆腐购自内蒙古赤峰市牧民(自制),24 h内分离其中菌株。

**1.1.2 对照菌株:**鼠李糖乳杆菌 GG ATCC53103 (LGG),购于 Culturelle LGG 并从中分离纯化。

**1.1.3 试剂:**磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、胆固醇、巯基乙酸钠、胆盐、邻苯二甲醛、浓硫酸、冰醋酸、正己烷、氢氧化钾、胃蛋白酶、胰蛋白酶等均为分析纯。

**1.1.4 培养基:**MRS 培养基<sup>[10]</sup>:用于乳酸菌的培养和计数。乳杆菌分离培养基:MRS 培养基中加10 g/L CaCO<sub>3</sub>。胆盐培养基<sup>[11]</sup>:MRS 培养基中加入2 g/L 巯基乙酸钠和不同浓度的胆盐,用于菌株耐胆盐能力的测定。胆固醇培养基:按参考文献[12]所述,胆盐浓度改为1 g/L,用于菌株降胆固醇活力的测定。

**1.1.5 人工胃液制备<sup>[11]</sup>:**NaCl 0.20%、胃蛋白酶0.30%,HCl调pH至2.5,过滤除菌备用。

**1.1.6 人工肠液制备<sup>[11]</sup>**: 胰腺液: 胰蛋白酶 0.10%, 调 pH 至 8.0, 过滤除菌备用。胆液: 胆盐 1.80%, 调 pH 至 8.0, 过滤除菌备用。将胰腺液和胆液以 2:1 混合即为人工肠液。

## 1.2 耐人工胃液乳杆菌的分离、纯化及筛选

**1.2.1 乳杆菌的分离和纯化**: 将收集的样品经梯度稀释, 用倾倒平板法, 乳杆菌分离培养基 37 °C 厌氧培养 48 h, 挑取周围有溶钙圈的单菌落, 用平板划线法纯化 3 次用于后续实验或冷冻保藏。

**1.2.2 耐酸性菌株筛选<sup>[11]</sup>**: 将纯化的菌株接种于 pH 3.0 的 MRS 培养基中, 37 °C 厌氧静置培养 72 h, 以  $\Delta A_{600}$  (菌株在 72 h 和 0 h 时 600 nm 处吸光度之差) 为指标, 筛选耐酸菌株。

**1.2.3 耐人工胃液菌株的筛选<sup>[11]</sup>**: 取 1.0 mL 菌悬液 (浓度约为  $1 \times 10^9$  CFU/mL) 与 9.0 mL pH 2.5 的人工胃液混合后, 37 °C 厌氧静置培养, 分别在开始 (0 h) 和 3 h 取样, 倾注培养法测定活菌数并计算其存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{N_1}{N_0} \times 100$$

$N_1$ : 人工胃液处理 3 h 后的活菌数;  $N_0$ : 0 h 的活菌数。

## 1.3 菌种鉴定

细菌通用引物扩增 16S rRNA 基因片段<sup>[13]</sup>并测序, 将结果与 GenBank 中数据比对。

## 1.4 菌种的驯化

对筛选得到的乳杆菌和对照菌株进行驯化。将菌种在 pH 2.5 的人工胃液中处理 2 h 后, 在 MRS 固体培养基划线培养, 选取生长状态好的菌落转接至液体 MRS 培养基 37 °C 静置厌氧培养 24 h, 重复前面的操作 3~5 次。平板计数, 计算存活率。

## 1.5 乳杆菌益生特性的研究

**1.5.1 乳杆菌对人工胃肠液耐受性测定**: 将 1 mL 菌悬液与 9 mL 人工胃液混匀置 37 °C 厌氧静置培养。在 0、2 h 分别取样, 测定其活菌数。然后吸取 1 mL 处理 2 h 的含菌人工胃液与 9 mL pH 8.0 人工肠液混合, 置 37 °C 继续厌氧静置培养, 分别在 6、

10、14、26 h 取样测定活菌数, 计算存活率。

**1.5.2 乳杆菌胆盐耐受性的测定**: 将活化的乳杆菌以 1% 接种于胆盐培养基 (胆盐浓度 0%~0.25%) 中, 37 °C 厌氧静置培养, 每隔 1 h 取样, 于波长 620 nm 处测定 OD 值, 直到 OD 值增加 0.3 个单位以上或时间达到 24 h 为止。计算菌株生长迟滞期。

迟滞期 (LT) = 胆盐培养基中菌株的吸光值增长 0.3 个单位所需时间 - 无胆盐培养基中菌株的吸光值增长 0.3 个单位所需时间。

**1.5.3 乳杆菌抑菌活性测定**: 以 4 种常见的人体肠道有害菌或条件致病菌 (大肠杆菌、沙门氏菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌) 为靶标, 采用牛津杯法测定样品的抑菌活性<sup>[14]</sup>。

**1.5.4 乳杆菌降胆固醇特性测定**: 选择邻苯二甲醛法<sup>[14]</sup>。菌株按 1% 接种于 5 mL 胆固醇培养基中, 37 °C 静置厌氧培养 24 h。测定波长 550 nm 处 OD 值, 然后 4 000 r/min 离心 10 min, 上清用于测定胆固醇含量。未接菌的胆固醇培养基作为对照。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{B-S}{B} \times 100$$

$$\text{清除效力}[\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{OD})] = \frac{B-S}{\text{OD}}$$

$B$ : 未接种的培养基中胆固醇浓度, mg/L;  $S$ : 发酵上清中胆固醇浓度, mg/L;  $OD$ : 发酵 24 h 后  $A_{600}$  值。

## 1.6 数据分析

数据采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析, 采用 Origin 软件做图。所有试验均重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐人工胃液乳杆菌的分离、纯化及筛选

**2.1.1 乳杆菌的分离、纯化**: 挑选乳杆菌分离培养基上周围有溶钙圈的菌落, 经分离纯化, 共筛出源于人体肠道的细菌 25 株, 源于奶豆腐的细菌 16 株。经过连续传代, 留取溶钙圈稳定并生长速度较快的 15 株菌用于后面的实验。

**2.1.2 耐酸性菌株筛选**: 乳杆菌食入人体后能否抵

抗胃液较强的酸性环境是益生菌在肠道存活并定殖的先决条件。实验选用 pH 3.0 的 MRS 培养基进行耐酸性菌株的筛选, 结果见表 1。

由表 1 可知, 各菌株间对低 pH 的耐受性差异较大, 源自奶豆腐菌株的 $\Delta A_{600}$  普遍大于源自人体肠道的菌株。本实验选取 $\Delta A_{600}>0.3$  的 8 株菌进行下一步实验。

**2.1.3 耐人工胃液菌株的筛选:** 人体胃液主要成分包括胃酸和胃蛋白酶, 这些分泌物具有抗菌性。

作为益生菌, 必须具备耐受胃液的能力。由表 2 可知, 各菌株在酸性培养基中的生长情况与在人工胃液中的耐受能力并不一致, MT-6 与 AF-7 在 pH 3.0 培养基中的生长情况相当, 但在人工胃液中的存活率却相差 10 倍。

**2.2 菌种鉴定**

综合菌株在 pH 3.0 MRS 上的生长情况和对 pH 2.5 人工胃液的耐受情况, 选取 MT-3、MT-5、MT-6、AF-5、AF-7 菌株进行鉴定, 结果见表 3。MT-3、

表 1 筛选菌株在 pH 3.0 的 MRS 中生长情况 Table 1 Survival of the screened strains in culture medium at pH 3.0					
来源 Source	菌株 Strains	$\Delta A_{600}$	来源 Source	菌株 Strains	$\Delta A_{600}$
来自成人粪便 From adult feces	AF-1	0.046±0.024a	来自奶豆腐 From milk tofu	MT-1	0.953±0.052e
	AF-4	0.047±0.024a		MT-2	0.307±0.031abc
	AF-5	1.100±0.120e		MT-3	1.083±0.157e
	AF-6	0.059±0.062a		MT-4	1.064±0.201e
	AF-7	0.370±0.007d		MT-5	0.333±0.103cd
	AF-8	0.226±0.068bcd		MT-6	0.313±0.04bcd
	AF-10	0.193±0.049abc			
	AF-14	0.150±0.075ab			
	AF-15	0.057±0.071a			

注: a、b、c、d、e 不同字母表示差异性显著 ( $P<0.05$ ).  
Note: a, b, c, d, e: The same column followed by different superscript letters differ significantly ( $P<0.05$ ).

表 2 筛选菌株对人工胃液的耐受能力 Table 2 Tolerance of the screened strains in artificial gastric juice			
菌株 Strains	活菌数 The number of live bacteria (CFU/mL)		存活率 Survival rate (%)
	$N_0$ (0 h)	$N_1$ (3 h)	
AF-5	$(5.20\pm0.40)\times10^8$	$(3.47\pm0.18)\times10^7$	6.68±0.17d
AF-7	$(1.70\pm0.08)\times10^9$	$(1.79\pm0.03)\times10^7$	1.05±0.03b
MT-1	$(7.37\pm0.03)\times10^8$	$(2.50\pm0.46)\times10^6$	0.34±0.05ab
MT-2	$(1.59\pm0.09)\times10^9$	$(6.86\pm0.11)\times10^6$	0.43±0.02ab
MT-3	$(1.31\pm0.05)\times10^9$	$(2.53\pm0.01)\times10^7$	1.93±0.04c
MT-4	$(6.77\pm0.93)\times10^8$	$(6.10\pm1.90)\times10^5$	0.09±0.02a
MT-5	$(1.77\pm0.33)\times10^8$	$(3.42\pm0.20)\times10^6$	1.97±0.26c
MT-6	$(6.47\pm1.37)\times10^8$	$(6.75\pm0.64)\times10^7$	10.62±1.36e

注: a、b、c、d、e 不同字母表示差异性显著 ( $P<0.05$ ).  
Note: a, b, c, d, e: The same column followed by different superscript letters differ significantly ( $P<0.05$ ).

表 3 菌株鉴定结果  
Table 3 The identification results of isolated strains

菌株 Strains	同源性菌株 Closest relative	相似性 Similarity (%)	登录号 Accession No.
MT-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain FJ005	100	KT371517
MT-5	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 strain	100	KT371518
MT-6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain MB2M14	100	KT371519
AF-5	<i>Enterococcus mundtii</i> QU 25	99	KT371515
AF-7	<i>Lactobacillus salivarius</i> str. Ren	100	KT371516

MT-5 为植物乳杆菌, MT-6 为表皮葡萄球菌, AF-5 为蒙氏肠球菌, AF-7 为唾液乳杆菌。选择 3 株乳杆菌进行后续试验, 分别命名为 LpMT-3、LpMT-5 和 LsAF-7。

### 2.3 菌种的驯化

为了提高菌株对胃液的耐受性, 对菌株进行驯化, 结果见图 1。经过 3–5 次 pH 2.5 人工胃液的驯化, 3 株菌的存活率增加了 0.3–3.0 倍。

### 2.4 乳杆菌益生特性的研究

#### 2.4.1 乳杆菌对人工胃肠液的耐受力测定: 外来细

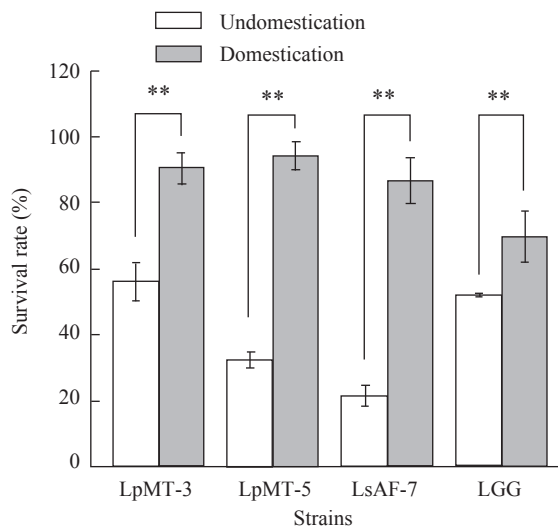


图 1 驯化前后菌株的存活率

Figure 1 Survival rate of strains before and after domestication

注: 存活率: pH 2.5 人工胃液处理 2 h 的乳杆菌的生存能力;

\*\* : 同未驯化的菌株相比具极显著性 ( $P < 0.01$ ).

Note: Survival rate: Effects of gastric juice on the viability of *Lactobacillus* strains after 2 h represented as survival rate; \*\*: Compared with undomesticated strains ( $P < 0.01$ ).

菌除经过胃消化外还必须经过小肠的消化转运才能到达它们的目的地定殖并发挥作用, 因此, 研究对分离的 3 株乳杆菌耐受胃肠液的能力进行了测定, 并以 LGG 为对照, 结果见图 2。由图 2 可知, 分离菌株在人工胃液中的耐受力均强于对照菌。转入肠液后, LGG 前 4 h 菌量不但没有减少, 反而还有增加, 之后, 存活率缓慢降低, 直至 26 h 的 49.54%; LpMT-5 前 4 h 菌量急剧减少, 之后, 存活率基本稳定在 45% 左右, 仅次于 LGG。LsAF-7 和 LpMT-3 的耐胃肠液能力均较差, 26 h 的存活率分别为 12.28% 和 1.50%。

**2.4.2 乳杆菌耐胆盐能力测定:** 对胆盐的耐受能力不仅决定着乳杆菌进入肠道后的活性状态, 而且对于其发挥降胆固醇功能具有重要意义。小肠中胆汁浓度在 0.03%–0.30% 范围内波动, 本实验据张旻对乳酸菌胆盐耐受性的测定, 选择胆盐梯度进行研究<sup>[15]</sup>, 结果见表 4。菌株耐胆盐能力以其生长的迟滞期  $LT$  表示,  $LT$  越大表示菌株的胆盐耐受性越差。由表 4 可知, 胆盐浓度为 0.10% 时, 4 株菌均能生长, 耐胆盐能力为 LsAF-7 > LpMT-3 > LpMT-5 > LGG。胆盐浓度为 0.15% 时, LpMT-5 和 LGG 被完全抑制; 胆盐浓度为 0.25% 时, 其余 2 株菌也不能生长。

**2.4.3 乳杆菌的抑菌活性测定:** 抑菌活性被认为是益生菌竞争性地杀死或抑制肠道中有害微生物的一个重要的指标。由表 5 可知, LpMT-3 和 LsAF-7 的抑菌活性略强于其它菌株, 4 株菌对粪肠球菌的抑制作用最明显, 其次是金黄色葡萄球菌, 对大肠杆菌、沙门氏菌的抑制作用较差。

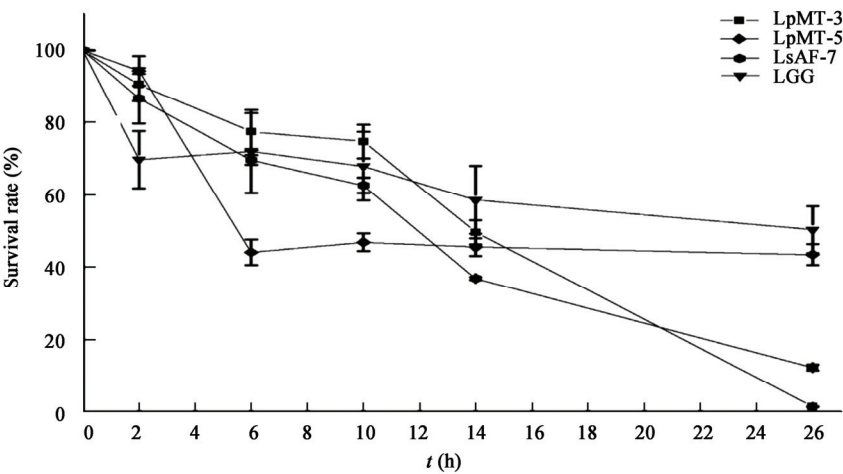


图 2 菌株经人工胃肠液处理后的存活率

Figure 2 Survival rate of *Lactobacillus* in artificial gastrointestinal juice

注：0-2 h：菌株对人工胃液的耐受；2-26 h：菌株对人工肠液的耐受。  
Note: 0-2 h: Tolerance to simulated gastric juice; 2-26 h: Tolerance to simulated intestinal juice.

表 4 菌株对不同浓度胆盐的耐受性						
Table 4 Assessment of bile tolerance of culture of organisms to different bile concentration						
菌株 Strains	胆盐浓度 Concentrations of bile salts (%)					
	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
LpMT-3	0.00	3.22±0.05	4.33±0.14	6.36±0.13	8.42±0.63	—
LpMT-5	0.00	2.83±0.17	8.89±0.10	—	—	—
LsAF-7	0.00	1.47±0.05	2.14±0.05	3.06±0.42	6.75±0.08	—
LGG	0.00	1.81±0.10	10.58±0.29	—	—	—

注：—：代表菌株被完全抑制。  
Note: —: Representative strain was completely inhibited.

表 5 菌株的抑菌活性				
Table 5 The restrain function of strains against harmful bacteria				
菌株 Strains	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
LpMT-3	9.67±0.58 +	15.17±0.42 ++	17.5±0.5 +++	15.83±1.04 +++
LpMT-5	9.17±0.29 —	13.13±0.81 ++	18.5±0.5 ++++	16.17±0.76 +++
LsAF-7	12.67±0.58 ++	11.83±0.29 +	19.67±0.29 ++++	15.9±0.66 +++
LGG	11.00±1.00 +	12.17±0.29 +	20.5±0.5 ++++	14.17±0.29 ++

注：数值为抑菌圈直径(mm)；++++：直径 19-24 mm；+++：16-18 mm；++：13-15 mm；+：10-12 mm；—：没有抑菌圈。  
Note: Value is the diameter of the antibacterial zone (mm); ++++: Diameter between the 19-24 mm; +++: Diameter between the 16-18 mm; ++: Diameter between the 13-15 mm; +: Diameter between the 10-12 mm; -: No effect.



**2.4.4 乳杆菌的降胆固醇作用:**以吸光度  $A_{550}$  为横坐标,胆固醇浓度(mg/L)为纵坐标绘制标准曲线。计算回归方程为  $y=647.04x$ ;  $R^2=0.9962$ 。将各菌株测定结果带入回归方程,计算胆固醇浓度、胆固醇清除率和清除效力。表 6 结果表明:4 株菌对胆固醇的清除效力依次为 LGG>LpMT-3>LpMT-5>LsAF-7;清除率依次为 LsAF-7>LpMT-3>LGG>LpMT-5。LsAF-7 单个细胞清除胆固醇能力差,但其耐胆盐能力强,生长快,所以清除率高;LGG 单个细胞清除胆固醇能力大,但其生长受胆盐抑制明显,所以清除率较低。这一结果与前面的耐胆盐能力测定结果一致。因此,菌株自身的代谢特性与生长情况共同影响其降胆固醇能力的大小。

### 3 讨论

益生菌被摄入人体后,在人体肠道中存活和定殖能力的强弱直接决定着其是否能发挥益生作用,因此耐胃酸、肠液等特性是优良乳杆菌作为益生菌的一个重要指标<sup>[16]</sup>。已有研究表明<sup>[17]</sup>,胃液 pH 值因饮食结构不同而波动很大,通常 pH 值为 3.0 左右,空腹或食用酸性食物时 pH 值低至 1.5,食用碱性食物 pH 值可高达 4.0–5.0,食物通过时间为 1–2 h。本研究发现,分离菌株在 pH 2.0 人工胃液中处理 2 h 几乎都无法存活。该结果与以往研究结果类似<sup>[18]</sup>,这也提示我们益生菌应避免空腹食用。通过模拟胃肠道条件对乳杆菌进行体外筛选,只能预测菌株在无食物保护条件下的体内存活状况。当菌株混于食品中时,情况则可能会发生些许改变。

但体外的生存测试仍然有可能反应细菌在胃肠道条件下可能存在的问题,揭示细菌数量的变化趋势。

对菌株的益生特性进行评估时,通常会选择著名的商业益生菌作为对照,本实验选用的鼠李糖乳杆菌 GG ATCC53103 是从健康人体内分离而得,每天被超过 500 万的人摄入<sup>[19]</sup>。Goldin 等<sup>[20]</sup>研究 LGG 对胃液的耐受性,发现在 pH 3.0 的胃液中加入  $3.24 \times 10^8$  的 LGG,2 h 的活菌数为  $2.04 \times 10^8$ ,存活率达到 62.96%,而当 pH 为 1.0 时,活菌数迅速下降,0.5 h 活菌数为 0。本实验中对对照菌株 LGG 在 pH 2.5 的胃液中孵育 2 h,存活率达到 69.78%,在 pH 1.0 的条件下不能存活,与前者研究结果类似。而本文筛选的 3 株乳杆菌在 pH 2.5 的胃液中孵育 2 h,存活率达到 86.65%以上,均高于 LGG。

小肠是人体内胆固醇合成和吸收的重要场所,也是益生菌发挥其降胆固醇作用的主要部位,所以益生菌必须具有胆盐耐受性。小肠中胆汁浓度在 0.03%–0.30% 范围内波动。本实验通过比较吸光值增加 0.3 个单位的迟滞期来判断菌株胆盐耐受性。结果表明,胆盐浓度为 0.10% 时,4 株菌均能生长,胆盐浓度为 0.25% 时,所有的菌株均完全被抑制。杨焱炯<sup>[10]</sup>从健康人肠道分离的乳杆菌和双歧杆菌在胆盐浓度为 0.1% 时菌株被完全抑制。包艳<sup>[11]</sup>从自然发酵乳制品和酸粥分离到的植物乳杆菌,在胆盐浓度大于 0.3% 时,菌株几乎都没有受到抑制。与他们相比,本实验菌株的胆盐耐受性居中。Argyri 等<sup>[1]</sup>认为一些食物成分的保护功效能提高菌株对胆盐的耐受性,因此推断,益生菌在体内的存活状况可能会提高。另外,在体外对益生菌耐胆盐特性的研究通过存活和生长两种方式研究。本文对人工肠液的耐受实验中,人工肠液添加了 0.60% 的胆盐,相当于是对存活实验的补充。结果表明,人工肠液处理 26 h, LpMT-5 存活率为 45%,仅次于 LGG。益生菌应具有调节人体肠道菌群平衡的功能,因此需要判断其对肠道常见致病菌的抑菌活性。本研究所获菌株对 4 种指示菌均有抑制作用,且对革兰氏阳性菌的抑制作用较大,这与赵佳锐<sup>[14]</sup>的研究结果类似。

表 6 菌株体外降胆固醇能力  
Table 6 The cholesterol reducing capacity of *Lactobacillus*

菌株 Strains	清除效力 Cholesterol reducing ability [mg/(L·OD)]	清除率 Cholesterol reducing rate (%)
LpMT-3	35.17±8.25	28.77±6.75
LpMT-5	19.49±6.32	8.00±2.60
LsAF-7	18.63±3.71	29.22±5.83
LGG	55.09±5.48	22.15±2.20

目前,文献中多以清除效力和清除率共同衡量菌株体外降胆固醇能力。清除效力是将清除效果归一化,表示单位细菌生长能够清除的胆固醇量,所以从单个细胞的角度讲以清除效力作为依据具有可比性<sup>[21]</sup>。而对于宿主来说,总的清除胆固醇量是衡量菌株降胆固醇能力强弱的依据,清除率是胆固醇清除量与总胆固醇量的比值,包含了个体自身的代谢特性和群体的生长情况,从这个方面来看以清除率作为依据更具有说服力。

本实验从健康人肠道和奶豆腐中分离筛选出耐酸、耐胃液较好的乳杆菌,对其进行鉴定,之后经人工胃肠液耐受性、胆盐耐受性、抑菌活性、及胆固醇降解能力等益生特性的研究,获得3株具有益生特性的乳杆菌,可以作为研制保健型酸奶的候选菌株。LpMT-5在模拟人体胃肠液中存活率最高,这是其益生活性的前提;LpMT-3和LsAF-7耐胆盐、抑菌及降胆固醇的能力强。我们可通过进一步的动物体内实验,更准确的评价3株菌的特性。

## 参考文献

- [1] Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KG, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 282-291
- [2] Brown M. Modes of action of probiotics: recent developments[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011, 10(14): 1895-1900
- [3] Xu HY, Liu WJ, Sudu Q, et al. Assessment of the bacterial and fungal diversity in home-made yoghurts of Xinjiang, China by pyrosequencing[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(10): 2007-2015
- [4] Liu WJ, Xi XX, Sudu Q, et al. High-throughput sequencing reveals microbial community diversity of Tibetan naturally fermented yak milk[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(3): 1741-1751
- [5] Su BX, Ai J, Zhu DQ, et al. Inhibition of *Streptococcus pyogenes* by *Lactobacilli* metabolites[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 117-124 (in Chinese)  
苏本宪, 艾静, 朱德全, 等. 乳杆菌代谢产物对化脓性链球菌的抑制作用[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 117-124
- [6] Wang H, Gong HS, Meng XC. Partial characteristics of the bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis*[J]. Microbiology China, 2011, 38(7): 1036-1042 (in Chinese)  
王辉, 贡汉生, 孟祥晨. 一株短乳杆菌所产细菌素的部分特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1036-1042
- [7] Shi YJ. Study on the effects of *delbrueckii Lactobacillus* on intestinal immunity in nursing piglets[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
石英军. 德氏乳酸杆菌对哺乳仔猪肠道免疫的影响研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2012
- [8] Cao L. Regulation and mechanism of *Lactobacillus* on intestinal mucosal barrier function in broiler chickens[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2012 (in Chinese)  
曹力. 乳酸杆菌对肉鸡肠道黏膜屏障功能的调节及机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2012
- [9] Bierg AT, Ktistensen M, Ritz C, et al. Four weeks supplementation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L. *casei* W8<sup>®</sup> shows modest effect on triacylglycerol in young healthy adults[J]. Beneficial Microbes, 2015, 6(1): 29-39
- [10] Yang YJ. The Screening of antihypertensive probiotiv[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2006 (in Chinese)  
杨焱炯. 具有降血压功能的益生菌的筛选[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2006
- [11] Bao Y. Studies on fermentation characteristic and hypolipidemic effects of *Lactobacillus plantarum* P8[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2011 (in Chinese)  
包艳. 益生菌 *Lactobacillus plantarum* P8发酵特性和降血脂功效的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2011
- [12] Li TT. Screening and applied research *in vivo* of cholesterol-lowering probiotic lactic acid bacteria[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese)  
李婷婷. 降胆固醇益生乳酸菌的筛选及其在大鼠体内的应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2013
- [13] Guo PL. Isolate, mutation and optimum incubation of phosphorus solubilizing microorganisms in soil[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Shanxi University, 2009 (in Chinese)  
郭佩莉. 土壤中解磷微生物的筛选及诱变育种[D]. 太原: 山西大学硕士学位论文, 2009
- [14] Zhao JR. Screening, identification and study on antibacterial activity and cholesterol-lowering potential of probiotics from the human gastrointestinal tract[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2005 (in Chinese)  
赵佳锐. 人体肠道益生菌的分离鉴定, 抑菌和降脂功能研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2005
- [15] Zhang M. Screening of *Lactobacillus* for efficient cholesterol-lowering and study on its mechanisms[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2006 (in Chinese)  
张旻. 降胆固醇功能乳杆菌的筛选及降解机理研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2006
- [16] Del Piano M, Morelli L, Strozzi GP, et al. Probiotics: from research to consumer[J]. Digestive and Liver Disease, 2007, 38(S2): S248-S255
- [17] Guo XH, Kim JM, Nam HM, et al. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties[J]. Anaerobe, 2010, 16(4): 321-326
- [18] Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation *in vivo* findings[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2S): 386S-392S
- [19] Hibberd PL, Kleimola L, Fiorino AM, et al. No evidence of harms of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in healthy elderly—a phase I open label study to assess safety, tolerability and cytokine responses[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113456
- [20] Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, et al. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract[J]. Digestive Diseases and Sciences, 1992, 37(1): 121-128
- [21] Wang XJ. Study on the optimization of screening conditions of cholesterol-reducing *Lactobacillus in vitro*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Qingdao Agricultural University, 2010 (in Chinese)  
王晓君. 降胆固醇乳酸菌体外筛选条件优化的研究[D]. 青岛: 青岛农业大学硕士学位论文, 2010