

酸茶中降胆固醇乳酸菌筛选及安全性与益生特性研究

黄芳, 刘欣桐, 黄佳蓉, 吴苇桐, 孔小慧, 姚庆博, 曾新安, 黄燕燕*
(佛山大学食品科学与工程学院 广东省食品智能制造重点实验室 广东佛山 528225)

摘要 目的:从云南德昂酸茶中分离筛选出具有高胆固醇降解率的乳酸菌,对其进行生理生化鉴定、安全性评价和益生特性研究。方法:通过耐酸性、胆盐耐受性、产酸特性以及降胆固醇的能力筛选,确定 1 株性状优良的乳酸菌,经系列鉴定、验证,该菌株为植物乳植杆菌,命名为 HYY-S10。对 HYY-S10 进行安全性评价及益生特性研究,包括溶血性、抗生素耐药性、抑菌能力、胃肠液耐受性以及肠道中的定植能力等。结果:HYY-S10 不产生溶血毒素;对抗生素具有一定的耐药性,具有较好的胃肠液耐受能力和肠道定植能力,产酸能力和对大肠杆菌的抑菌效果显著高于酸茶中分离的其它菌株。该菌在 4 h 时进入对数生长期,OD_{600nm} 值达 1.836,胆固醇降解率高达 91%。结论:从酸茶中发现具有降胆固醇特性的优良乳酸菌菌株,为茶源益生菌的开发和功能性微生态制剂的开发提供理论参考,然而其降胆固醇机制仍需进一步探究。

关键词 植物乳杆菌; 酸茶; 筛选; 安全性; 益生性

文章编号 1009-7848(2025)03-0082-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.03.009

胆固醇是环戊烷多氢菲的一种衍生物,化学式为 C₂₇H₄₆O,可提供重要的营养物质参与人体生长代谢,并具有激活机体免疫细胞和维持心脑血管健康的作用^[1]。然而,随着人们生活水平的提高,饮食和生活习惯的不规律导致高血脂症和心脑血管疾病逐渐成为威胁人类健康的常见病^[2]。

大量研究表明,乳酸菌及其制品可以降低体内胆固醇含量,降低心脑血管病的发病率,其作用机理主要包括共沉淀和同化吸收作用^[3]。Kim 等^[4]发现植物乳植杆菌 K10 可以有效抗肥胖,还能抵抗其它有害细菌的生长。Lim 等^[5]研究了植物乳植杆菌 K8 的副益生菌乳酸菌裂解酶(LAB-P)对高脂饮食肥胖小鼠诱导的炎症的影响,结果显示总胆固醇和低密度脂蛋白分别下降了 23%和 42%。Fossi 等^[6]从传统棕榈酒和玉米啤酒中筛选出 1 株具有胆固醇降解能力的乳酸菌,并发现该菌株能有效降低大鼠血清中的 LDL-c 和 HDL-c,这是心血管疾病的主要危险因素。综上所述,乳酸菌降胆

固醇是目前国内外研究的热点。然而,国内对降胆固醇乳酸菌的研究才起步,对其研究具有重要意义。

本研究从云南德昂酸茶中筛选出高产酸、高胆固醇降解率、耐酸、耐胆盐以及具有明显抑菌能力等优点的乳酸菌,对其进行生理生化鉴定、安全性评价和益生特性研究。在为茶酒发酵寻找适宜菌株的同时,挖掘出具有降胆固醇能力的优良菌株,为茶源益生菌的开发和功能性微生态制剂的研发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 从德昂获得未经多加工的酸茶(德昂酸茶),并将其密封包装于低温环境保存备用。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeriosis*) ATCC 7469,大肠杆菌(*E.coli*) ATCC 25922,金黄色葡萄球菌(*S.aureus*) ATCC 12598,沙门氏菌(*Salmonella*) ATCC 13314 购于广东省微生物种保藏中心。

1.1.2 试剂 琼脂粉、药敏纸片、牛胆盐、酚酞指示剂、革兰氏染色剂、二甲苯、乙酸乙酯、PBS 缓冲液,广东环凯微生物科技有限公司;血平板、总胆固醇 TC 含量测试盒,南京建成生物工程研究所;胆固醇、吐温 80,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基 MRS 液体培养基、LB 液体培养

收稿日期: 2024-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(32302242);广东省科技创新战略专项资金(2022B1212010015);广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515110426);广东省重点研发计划项目(2023B0202040002)

第一作者: 黄芳,女,硕士生

通信作者: 黄燕燕 E-mail: huang_yanyan@fosu.edu.cn

基,广东环凯微生物科技有限公司;MRS 固体培养基:向 MRS 液体培养基中添加 1.8% 的琼脂;MRS-CHOL 液体培养基:称取 MRS 培养基 54 g 配置成 1 L 的液体培养基,向其添加胆固醇 1.0 g,吐温 20 mL,牛胆盐 3.0 g。

1.2 仪器与设备

JA21002 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;PCplus384 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;FiveEasy Plus 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;XSP-10CA 生物显微镜,上海佑科仪器仪表有限公司;Quattro S 环境扫描电镜,赛默飞世尔科技公司;Thermo 1386 生物安全柜,赛默飞世尔科技公司;HS-250HC-11 恒温培养箱,上海-恒科学仪器有限公司;DICO 型台式离心机,Thermo Fisher 有限公司;LHS-24B 灭菌锅,上海尚仪仪器设备有限公司;LC-10N-50A 冷冻干燥机,上海力辰仪器科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌分离鉴定 分别取 1 g 湿茶和干茶样品至液体 MRS 培养基中,在 37 °C 下恒温培养 24 h。取 100 μ L 湿茶和干茶发酵液进行梯度稀释分别涂布于 MRS 固体培养基,于 37 °C 培养 48 h,待菌落形成,取乳白、湿润、边缘圆润、溶钙圈大、革兰氏染色为蓝紫色的菌落进行下一步实验。参照《常见细菌系统鉴定手册》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》对分离后的乳酸菌进行理化性质鉴定^[6]。

1.3.2 降胆固醇菌株筛选 参考黄燕燕等^[7]的方法加以改进,采用乳酸菌按 3% 接种量接种至 MRS-CHOL 液体培养基中,37 °C 恒温培养 48 h 后离心(2 500 r/min, 10 min)取上清液,采用邻苯二甲醛比色法于 OD_{550 nm} 测吸光度。以未接菌的 MRS-CHOL 液体培养基作为对照。依公式(1)计算胆固醇去除率:

$$\text{胆固醇去除率}(\%) = (A - B)/A \quad (1)$$

式中:A 为未接菌的培养基上清液在 550 nm 波长处的 OD 值;B 为接菌的培养基上清液在 550 nm 波长处的 OD 值。

1.3.3 对耐胆盐和耐酸菌株的筛选 参考余萍等^[8]的方法加以改进,配制 pH 值为 2.0、2.5、3.0 和 3.5 的 MRS 液体培养基以及 pH 值为 6.6 且分别

含 1、2、3 g/L 牛胆盐的 MRS 液体培养基。以 1% 的接种量分别接种活化后的菌液于不同条件的 MRS 液体培养基中,37 °C 恒温培养 24 h,取合适的稀释倍数吸取 100 μ L 菌液进行平板涂布,在 37 °C 下培养 24~48 h 后,选择菌落数在 30~300 范围内的平板进行菌落计数,以+、-号表示测试菌在 pH 值为 2.0、2.5、3.0 和 3.5 的 MRS 液体培养基以及 pH 6.6 且含 1、2、3 g/L 牛胆盐条件下的生长情况,同时从酸茶中筛选出的其它菌株为对照。

1.3.4 高产酸菌株的筛选 参考刘悦等^[9]的方法加以改进来绘制产酸曲线,将分离的菌株以 1×10^9 CFU/mL 的接种量接种于葡萄糖发酵培养基,振荡培养 36 h(37 °C、120 r/min)。分别于 0、12、24、36 h 取样检测用精密酸度计测 pH 值并记录,以在酸茶中筛选出的其它几株乳酸菌做对照,绘制变化曲线,选出产酸能力最强的菌株。

1.3.5 16S rDNA 基因同源性分析 将筛选出的所需乳酸菌,进行斜面保种,送至广州艾基生物技术有限公司进行 16SrDNA 菌种鉴定。参考胡静等^[10]的方法,将上述 DNA 测序得到的菌株序列在 NCBI 网站上进行同源性对比,使用邻接法并利用 MEGA 11.0 软件来构建系统进化树。

1.3.6 菌株的溶血性测定 参照赵丽娜等^[11]的方法,将筛选出的乳酸菌以及对照菌株大肠杆菌 ATCC 25922 使用血平板划线法,于 37 °C 下恒温培养 48 h 后,拍照记录平板中菌落周围有无溶血圈现象出现。

1.3.7 菌株抗生素耐药性测定 抗生素敏感性的判定参照依据为美国 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)最新版的标准。选取的抗生素种类包括卡那霉素、链霉素、氯霉素、庆大霉素、红霉素、四环素、万古霉素和氨苄西林。参照付金蕾等^[12]的方法,采用纸片扩散法分析从酸茶中筛选出来的植物乳杆菌的抗生素敏感性。将处于对数生长期的菌液以 0.1 mL 的量涂布于灭菌后的 MRS 琼脂平板上,将平板划分成四等份区域,用灭菌后的镊子夹取不同的药敏纸片贴置于每个区域上,以不加抗生素的滤纸片为对照,同时以在酸茶中筛选出的其它几株乳酸菌做对照。于 37 °C 下恒温培养 24~36 h 后,测量抑菌圈直径并记录。

1.3.8 菌株的抑菌能力测定 将大肠杆菌、单增李斯特菌、沙门氏杆菌和致病性金黄色葡萄球菌分别于 LB 培养基中进行活化^[13], 分别取各致病菌 100 μ L 均匀涂布于 MRS 琼脂平板上, 待干燥后, 在琼脂培养基上垂直放置牛津杯, 在牛津杯中分别加入单一菌液 0.1 mL, 在 37 $^{\circ}$ C 下恒温培养 24 h, 同时以在酸茶中筛选出的其它几株乳酸菌做对照, 测量抑菌圈直径并记录。

1.3.9 菌株的胃肠液耐受性测定 根据曹海鹏等^[14]的方法进行胃液耐受性测定。将稀盐酸(1 mol/L), 与 10 g 胃蛋白酶配置人工胃液, 使其 pH 值调整为 2.5, 并进行灭菌处理。经过活化处理的测试菌在人工胃液中进行培养, 在 0, 2, 4, 6 h 分别取样, 通过平板计数法测定菌落数以及存活率。按照式(2)计算菌株在人工胃肠液中的存活率:

$$\text{存活率}(\%) = (\lg N_t / \lg N_0) \quad (2)$$

式中: N_t 为乳酸菌在人工胃肠液处理 t h 后存活的数量, CFU/mL; N_0 为 0 h 时乳杆菌的活菌数, CFU/mL。

1.3.10 菌株的疏水性及自凝聚能力测定 参考温贺等^[15]的方法加以改进, 采用细菌黏着物质法(bacterial adhesion substance, BATS)测定疏水性。培养 24 h 的菌液用 PBS 缓冲液(pH=7.2)离心重悬 2 次, 第 3 次用 PBS 缓冲液(pH=7.2)调整波长 600 nm 处吸光值为 1.0, 记为 A_0 。再分别取 0.5 mL 的菌悬液分别与 0.5 mL 的二甲苯、乙酸乙酯混合, 漩涡振荡 2 min 后室温静置 20 min, 待混合液分为两相, 取下层液体测定波长 600 nm 处吸光值, 记为 A_1 。按照式(3)计算菌株的疏水率。同样参考温贺等^[15]的方法对菌株的自凝聚力进行测定, 将菌液在试管中静置 1, 24, 48 h 后, 取 0.3 mL 上清液在波长 600 nm 处测定吸光值, 记为 A_t 。按照公式(4)计算菌株的自凝聚力。

$$\text{疏水率}(\%) = (1 - A_t / A_0) \quad (3)$$

式中: A_0 为与有机溶剂混合前菌液在波长 600 nm 处测量的吸光值; A_t 为有机溶剂混合后菌液在波长 600 nm 处测量的吸光值。

$$\text{自凝聚力}(\%) = (1 - A_t / A_0) \quad (4)$$

式中: A_0 为时间在 0 h 时在波长 600 nm 处测量的吸光值; A_t 为在时间分别为 1, 24, 48 h 时在波长 600 nm 处测量的吸光值。

1.3.11 菌株扫描电镜分析 将培养 24 h 的乳酸菌菌液按照 Huang 等^[16]的方法制备扫描电镜样品, 干燥后喷金, 置于环境扫描电镜中拍照。

1.3.12 菌株的生长特性曲线测定 参考丁媛等^[17]的方法进行改进, 将从上述试验中筛选出来的乳酸菌接种至 MRS 液体培养基中, 以测定不同时间点下的 $OD_{600\text{nm}}$ 和 pH 值, 并绘制生长曲线。

1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次, 本试验数据为平均值 $\pm$ 标准偏差, 试验数据用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析, 采用 Duncan's 法进行多重比较, $P < 0.05$ 的差异被认为具有统计学意义。采用 Origin 2018 和 MEGA 11.0 对所得结果进行作图。

2 结果与分析

2.1 菌株革兰氏染色结果

从图 1a 中可以看出, 菌落外观湿润, 边缘整齐, 形态均为圆形, 颜色为乳白色。从图 1b 中可以看出, 样品中分离纯化的菌株均呈杆状, 独立分布, 并且革兰氏染色结果呈蓝紫色, 表示为革兰氏阳性菌。

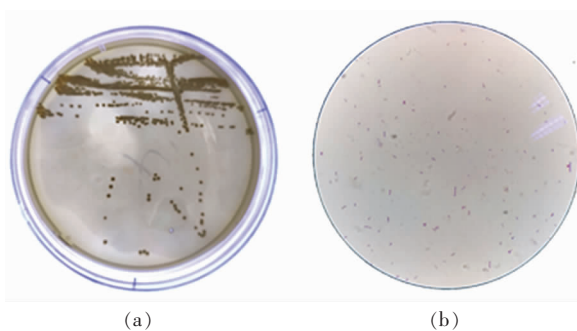


图 1 乳酸菌形态图

Fig.1 Morphological map of lactic acid bacteria

2.2 理化性质鉴定结果

筛选出的具有过氧化氢酶阴性、淀粉水解阴性、VP 试验阴性、MR 试验阳性、明胶液化阴性、吡啶试验阴性的理化性质的乳酸菌, 分别为 S10、S6、S11、S29、干 30(表 1)。

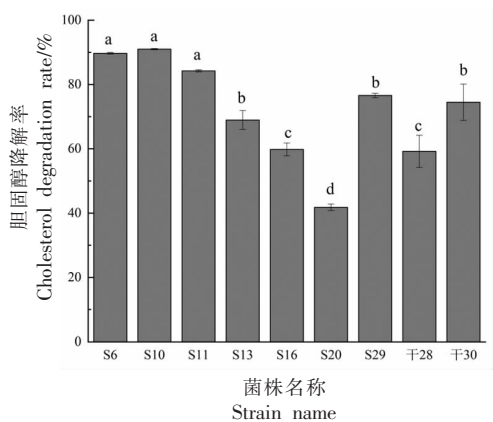
2.3 降胆固醇乳酸菌初筛结果

图 2 显示了筛选出的 9 株乳酸菌对胆固醇的降解率。其中, 菌株 S10、S6、S11、S29、干 30 的降解率均大于 70%, S6 的胆固醇降解率高于 85%,

表 1 理化性质鉴定结果

Table 1 Identification results of physical and chemical properties									
药敏纸片名称	S6	S10	S11	S13	S16	S20	S29	干 28	干 30
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解	-	-	-	+	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶	-	-	-	+	+	+	-	+	-
吲哚	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。



注：图中字母表示差异显著， $P<0.05$ 。

图 2 乳酸菌胆固醇降解率

Fig.2 Lactic acid bacteria cholesterol degradation rate

S10 的胆固醇降解率达到 91.00%，这些降解率均高于黄燕燕等^[7]从开菲尔粒和泡菜水中分离的植物乳植杆菌对胆固醇的降解率(37.58%)。这可能与培养基中胆固醇含量、乳酸菌接种量及乳酸菌个体差异等因素有关。最后，初筛结果选取 S10、S6、S11、S29 和干 30 这 5 株菌株进行下一步的研究。

2.4 菌株对胆盐和酸的耐受性筛选

益生菌在食品工业中被广泛应用，其对宿主健康起到重要作用。乳酸菌和其他益生菌是否能

起到调整微生态的作用，取决于菌株能否在胃内酸性环境中以活菌状态进入小肠^[18]，细菌在胃肠道进入过程中可能受到胆盐、酸性和氧化等不利因素的胁迫^[19]。

结果如表 2 所示，5 株菌都表现出较好的酸耐受性和胆盐耐受性。这可能是因为酸性环境下，乳酸菌能够保持较好的细胞形态和细胞膜完整性，减轻酸应激对细胞的伤害^[20]。此外，在酸性环境中，乳酸菌能保持一些酶的高活性和较高的胞内 pH 值^[21]。其中，菌株 S10 在酸性条件下的生长状况较好，而从酸茶中筛选出来的其它菌株 S11、S29 和干 30 在 pH 值为 2.5 时显示出较弱的生长能力。

人体肠道中含有一定量的胆盐，胆盐可以抑制和干扰肠道细菌的生长，损害益生菌在肠道内生存和发挥作用的结^[22]，菌株 S10 在含有 1,2,3 g/L 牛胆盐的 MRS 液体培养基中均能表现出良好生长状态或一般生长状态。而菌株 S6、S11 和 S29 在牛胆盐质量浓度为 3 g/L 的培养基中显示出较弱的生长状态，菌落较少。总的来说，菌株 S10 表现出良好的胆盐和酸耐受性，预测其可在实际的胃和肠道环境中存活。

表 2 S10 对酸和胆盐的耐受结果

Table 2 Results of acid and bile salt tolerance of S10								
菌种编号	样品来源	pH 值				牛胆盐/(g/L)		
		3.5	3	2.5	2	1	2	3
S6	湿茶	+++	+++	++	+	+++	++	+
S10	湿茶	+++	+++	++	+	+++	++	++
S11	湿茶	++	++	+	+	++	++	++
S29	湿茶	+++	++	+	+	+++	+	+
干 30	干茶	+++	++	+	+	+++	++	++

注：“+++”表示生长良好；“++”表示生长一般；“+”表示生长较弱；“-”表示无生长。

2.5 菌株产酸曲线的绘制

乳酸菌的产酸能力对于发酵产品的组织结构和品质有重要影响^[23]。通过对从上述试验中筛选出的菌株 S10、S6、S11、S29、干 30 进行产酸曲线绘制,可以看出菌株 S10 随着时间的变化,pH 值逐渐降低,在 0~24 h 内产酸速率较快,在 36 h 时 pH 值降至 3.72。与其它选取的菌株相比,菌株干 30 的产酸速率最快,但菌株 S10 的产酸能力最强。

2.6 菌株的 16S rDNA 测序结果

经过对筛选出的乳酸菌 S10 进行 16S rDNA 测序,并导入 NCBI 网站的 BLAST 进行同源性比对,在 NCBI 数据库中选择了适合的菌株进行系统发育树构建和系统分析。结果显示,乳酸菌 S10 与已知的植物乳植杆菌序列有较高的同源性。结合生理生化特征分析,确定此菌株为植物乳植杆菌,并将其命名为 HYY-S10。该菌株于 2022 年 9 月 9 日被保藏于广东微生物菌种保藏中心,保藏编号为 GDMCC 62784。

2.7 植物乳植杆菌 HYY-S10 溶血活性评价

乳酸菌代谢可能会产生溶血毒素,导致红细胞溶解,引发疾病和其它反应^[24]。溶血性可以分为 α 溶血和 β 溶血。 α 溶血又被称为草绿溶血,菌落周围的培养基会出现 1~2 mm 草绿色的环状区域,由高铁血红蛋白引起,一般不会引起疾病。 β 溶血又被称为完全溶血,细菌产生的溶血素会使红细胞完全溶解,在菌落周围形成透明的溶血环,可能会引起猩红热、扁桃体炎等疾病^[25]。

常使用血平板划线法来检测细菌的溶血性。结果显示,植物乳植杆菌 HYY-S10 菌落的周围出现了草绿环,被认定为 α 溶血;与此同时,大肠杆菌的菌落周围出现明显的透明溶血圈,被认定为 β 溶血,这表明 HYY-S10 及其代谢产物对血细胞没有损害性,一般不会引起疾病。

2.8 植物乳植杆菌 HYY-S10 耐药性评价

抗生素耐药性是评估益生菌安全性的重要指标之一。由于畜牧业等行业过度使用抗生素,导致乳酸菌中获得性耐药基因的出现和传播。这些基因有可能转移到人体胃肠道的微生物群落中,甚至转移到致病菌中,存在潜在的安全隐患^[26]。因此,对乳酸菌的抗生素耐药性进行筛查并评估其

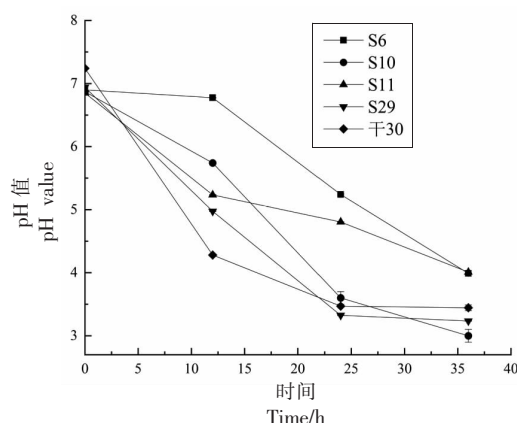


图3 产酸曲线

Fig.3 Acid production curve

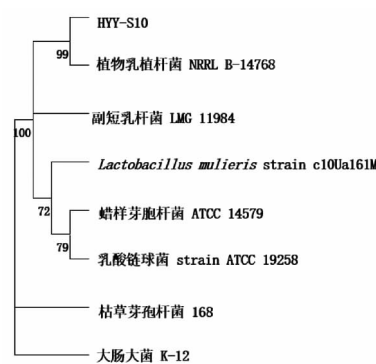


图4 植物乳植杆菌 HYY-S10 的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* HYY-S10

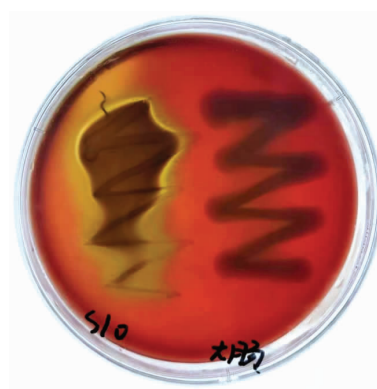


图5 溶血活性检测结果

Fig.5 Detection result of hemolysis test

安全性具有重要意义。

植物乳植杆菌 HYY-S10 的抗生素耐药性检测结果如表 3 所示,选取的抗生素种类包括卡那霉素、链霉素、氯霉素、庆大霉素、红霉素、四环素、

万古霉素和氨苄西林。植物乳植杆菌 HYH-S10 除了对红霉素和氯霉素的产生的抑菌圈直径分别在 I(中度敏感)和 S(敏感)范围内,对其它各类抗生素产生的抑菌圈直径均在 R(耐药)范围内,即 HYH-S10 对氨苄西林、万古霉素、四环素、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、红霉素具有一定抗性。分析认为 HYH-S10 多重耐药的原因有两个方面:一方面,酸茶中抗生素残留可能导致乳酸菌从外界获得耐药基因,另外,抗生素的选择性压力也可能导致乳酸菌发生基因突变从而产生耐药基因^[27]。

2.9 植物乳植杆菌 HYH-S10 的抑菌能力

乳酸菌抑制有害微生物的机制包括以下方面:1)在发酵过程中产生的有机酸导致细胞质酸化,改变胞内渗透压并抑制大分子物质的合成。此外,乳酸菌还可以通过破坏酶的活性来发挥抑菌作用^[28]。2)乳酸菌还可以通过生产细菌数来对目的细菌产生损害,这主要通过特异性和非特异性作用目标来破坏细胞膜的完整性和通透性^[29]。此外,细菌素还可以进入细胞并干扰 DNA 和蛋白质的正常代谢,或 DNA 直接结合,从而致使目的细菌死亡或受到抑制^[30]。3)乳酸菌衍生的糖脂类生物表面活性剂可以通过预防细菌附着和抑制生物膜形成来发挥抑菌作用^[31]。

本试验选取了金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、单增李斯特菌和沙门氏菌作为指示菌,根据抑菌圈直径判断植物乳植杆菌 HYH-S10 的抑菌活性。结果如图 6 所示,菌株对金色葡萄球菌、单增李斯特菌、沙门氏菌的抑菌能力相差不大,其抑菌圈直径接近,且抑菌效果明显,其中 HYH-S10 对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌能力明显高于对其他两种菌的抑菌能力。这与李小宁等^[13]和所元东^[32]得出的结果类似。其中一种可能的原因是,植物乳植杆菌产生的上清液能够抑制大肠杆菌运动能力,降低胞外物质分泌量,并对大肠杆菌生物膜形成有抑制作用。此外,它还具有一定的成熟大肠杆菌生物膜清除能力^[32]。

2.10 植物乳植杆菌 HYH-S10 胃肠液耐受性

图 7 和表 4 为植物乳植杆菌 HYH-S10 在 pH=2.5 的人工胃液中 6 h 内的存活率。在经过 pH 值为 2.5 的条件处理下,HYH-S10 存活率随时间的变化逐渐下降。在前 2 h 内,HYH-S10 的存活率

表 3 抑菌圈直径及抗性结果(cm)

Table 3 Diameter of bacteriostatic circle and antibiotic resistance results for the testing strains (cm)

药敏纸片名称	HYH-S10	抗生素敏感等级
氨苄西林	1.600 ± 0.100 ^{bc}	R
万古霉素	0 ^d	R
四环素	1.050 ± 0.050 ^c	R
卡那霉素	0 ^d	R
链霉素	0 ^d	R
庆大霉素	0 ^d	R
红霉素	1.950 ± 0.250 ^{ab}	I
氯霉素	2.250 ± 0.050 ^a	S

注:抗生素敏感等级:R 为耐药,I 为中度敏感,S 为敏感,图中字母表示差异显著,P<0.05。

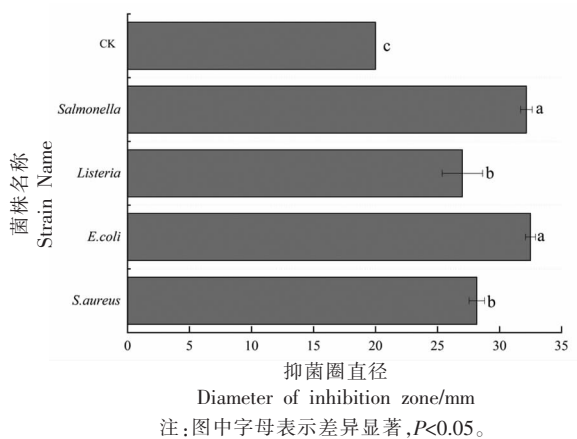


图 6 抑菌圈直径大小

Fig.6 Diameter of bacteriostatic ring

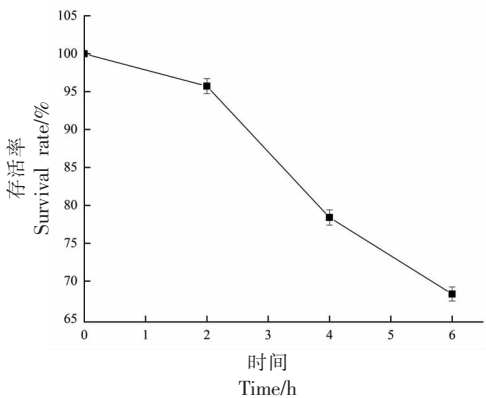


图 7 植物乳植杆菌 HYH-S10 胃液耐受性结果

Fig.7 Tolerance of *Lactiplantibacillus plantarum* HYH-S10 to artificial gastric juice

保持在 90%以上,活菌数对数值变化较小。然而,在 2 h 后,HYH-S10 的活菌数对数值下降速度变

快,6 h 时存活率为 67.62%。根据这些结果可以得出,HYY-S10 对胃液具有一定的耐受性,能够在胃液中存活,并且在人体胃肠道中发挥良好的益生功能。此结果高于郭芸等^[33]研究植物乳植杆菌 BN-3 在人工胃液中培养 4 h 时的活菌数 $(2.36 \pm 0.38) \times 10^6$ CFU/mL。

2.11 植物乳植杆菌 HYY-S10 疏水性和自凝聚力分析

人体主要在小肠吸收胆固醇,菌株需要在小肠黏附并定植在肠黏膜表面才能对人体产生作用^[7]。微生物之间和微生物与宿主细胞之间的黏附是微生物在人体肠道内定植和生长的基础^[34]。已有研究表明,疏水性和自凝聚力是菌株附着于肠上皮细胞的能力的关键因素,疏水性高且自凝聚力强的乳酸菌具有强的黏附性^[35]。

使用二甲苯、乙酸乙酯作为吸附剂,结果由图 8 可知,植物乳植杆菌 HYY-S10 在二甲苯中的疏水性高于在乙酸乙酯中的疏水性,达到 44.66%,此结果超过了宋莺丽等^[35]筛选的菌株疏水性 (31.92%),说明 HYY-S10 具有较好的疏水性和一定的黏附能力。

菌株自凝聚力的结果由图 9 可知,随着静置时间的延长,HYY-S10 的自凝聚力也随之提高。与之前的研究相比^[36],HYY-S10 菌株具有更高的自凝聚力,达到了 91.81%的水平,这表明 HYY-S10 菌株具有良好的自凝聚力,并有望在肠道中

表 4 植物乳植杆菌 HYY-S10 在人工胃液中活菌数变化
Table 4 Viable cell count in artificial gastric juice of *Lactiplantibacillus plantarum* HYY-S10

时间/h	人工胃液/[lg(CFU/mL)]
0	8.392 ± 0.064^a
2	8.033 ± 0.023^b
4	6.580 ± 0.076^c
6	5.732 ± 0.101^d

注:表中字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

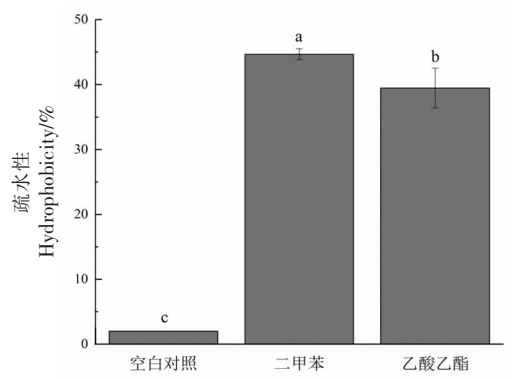
定植。

2.12 植物乳植杆菌 HYY-S10 扫描电镜分析

对筛选出的植物乳杆菌 HYY-S10 进行扫描电镜观察,结果如图 10 所示,发现 HYY-S10 呈现短杆状、光滑饱满、没有鞭毛和芽孢,与 Huang 等^[16]观察植物乳植杆菌 DMDL9010 的结果一致。

2.13 植物乳植杆菌 HYY-S10 生长曲线

从酸茶中筛选的高降解胆固醇能力的植物乳植杆菌 HYY-S10 进行生长曲线的绘制,结果如图 11 所示,HYY-S10 在 0~4 h 时生长缓慢,处于迟滞期。其后,在 4 h 时开始进入对数生长期,在 14~16 h 时生长速率减慢并进入稳定期,OD_{600 nm} 值达到 1.836。同时 HYY-S10 在 4 h 时开始大量产酸,pH 值逐渐降低,与生长情况相匹配,12 h 后菌液 pH 值开始趋于稳定,培养到 24 h 时,pH 值降到 3.84。



注:图中字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 8 植物乳植杆菌 HYY-S10 的疏水性
Fig.8 Hydrophobicity determination of *Lactiplantibacillus plantarum* HYY-S10

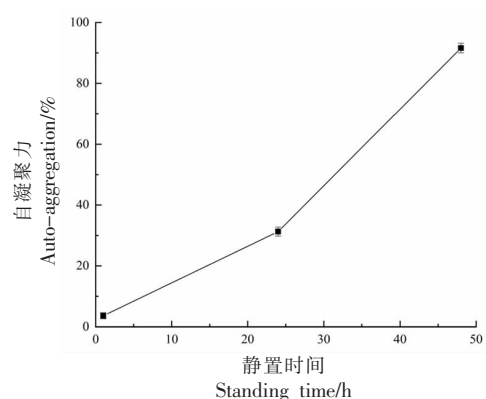


图 9 植物乳植杆菌 HYY-S10 的自凝聚力
Fig.9 Determination of self-cohesion of *Lactiplantibacillus plantarum* HYY-S10

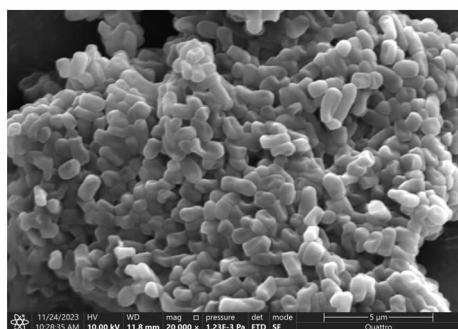


图 10 植物乳植杆菌 HYH-S10 的扫描电镜图

Fig.10 Scanning electron microscope image of *Lactiplantibacillus plantarum* HYH-S10

3 结果与讨论

高胆固醇水平是引起心脑血管疾病的主要原因。乳酸菌是一种受广泛关注的益生菌,许多研究已经证实一些乳酸菌具有降低胆固醇的作用^[35]。为了筛选出具有降胆固醇能力、适应胃肠道环境并能在肠道中定植的乳酸菌,需要对菌株进行耐酸、耐胆盐、疏水性、自聚力、代谢产物抑菌性、抗生素耐药性和溶血性等指标的测定。

基于以上试验背景,与目前所报道的文献相比,本试验成功从云南的德昂酸茶中分离筛选出 1 株的高胆固醇降解率的乳酸菌,经鉴定为植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。该菌株对胆固醇的降解率高达 91.00%,其自凝聚力和疏水性分别达到 91.81%和 44.66%,pH 3.0 下 6 h 存活率高达 67.62%,且该菌株具有高产酸、耐胆盐、抑菌能力显著、不产溶血毒素,对抗生素有抗性等优点,是为数不多的满足进入胃肠道存活率高同时高效降胆固醇的优良乳酸菌。万婧婧等^[37]测定了从喙鲸内脏分离出的植物乳杆菌 HJ-S2 的胆固醇降解能力达到 48.82%,在 pH 3.0 的酸环境中耐受率达到 82.73%,在 0.3%胆盐环境中耐受率达到 80.62%。赵丽娜等^[11]研究了从新疆传统赛里木酸奶中分离筛选出来的具有较优基础特性菌株的降解胆固醇能力,结果显示植物乳杆菌 R2-5、R2-7 和 R4-2 对胆固醇的降解力分别为 48.19%、48.92%和 48.52%。黄燕燕等^[7]在开菲尔粒和陈年泡菜水中分离出植物乳植杆菌 DMDL 9010,它具有 37.58%的胆固醇降解率,在 pH 3.0

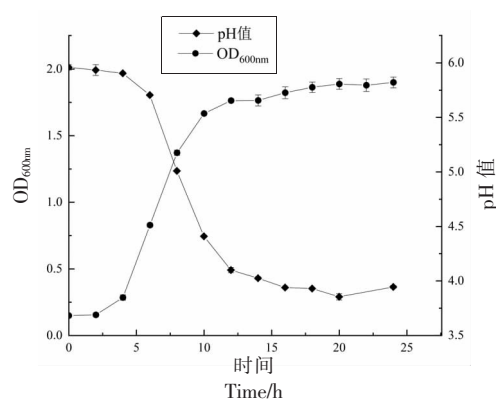


图 11 植物乳植杆菌 HYH-S10 的生长曲线

Fig.11 Growth curve of *Lactiplantibacillus plantarum* HYH-S10

时的存活率为 80.12%,并且具有高达 35.48%的胆盐耐受性和 40%的疏水性。以上结果的差异性由多种因素引起的,包括乳酸菌菌株的差异、乳酸菌的使用剂量、降解机制不同等因素。目前已经报道的乳酸菌降胆固醇的机制主要包括菌体细胞膜的吸附作用^[38]、胆盐水解酶的作用以及产生的代谢产物对胆固醇的分解作用^[39]。

本研究发现了具有降低胆固醇特性的优良乳酸菌,丰富了我国益生菌资源库,并为茶源益生菌和功能性微生态制剂的开发提供了理论基础。这些菌株可以作为茶酒制作的助剂,方便工业生产并适应于茶酒的发酵工艺,具有广阔的应用前景。然而其降胆固醇的机制仍需进一步探索。后续研究需要进行动物试验或基因组、转录组技术分析等来进一步验证植物乳植杆菌 HYH-S10 的降胆固醇能力。

参 考 文 献

- [1] JOHNSTON T P, KOROLENKO T A, PIRRO M, et al. Preventing cardiovascular heart disease: Promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management[J]. *Pharmacological Research*, 2017, 120: 219-225.
- [2] SUT S, DALL'ACQUA S. Food-derived nutraceuticals for hypercholesterolemia management, mode of action and active ingredients[J]. *Food Bioscience*, 2023, 54: 102866.
- [3] LIM J J, JUNG A H, JOO SUH H, et al. *Lacti-*

- plantibacillus plantarum* K8 -based paraprobiotics prevents obesity and obesity-induced inflammatory responses in high fat diet-fed mice[J]. Food Research International, 2022, 155: 111066.
- [4] KIM S, HUANG E, PARK S, et al. Physiological characteristics and anti-obesity effect of *Lactobacillus plantarum* K10 [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(3): 554-569.
- [5] FOSSI B T, EKABE D E, TOUKAM L L, et al. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional cameroon palm wine and corn beer exhibiting cholesterol lowering activity[J]. Heliyon, 2022, 8(11): e11708.
- [6] 陈雨, 吉巧琳, 李智昊, 等. 高产乳酸菌株的筛选、鉴定及发酵条件研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2023, 32(2): 183-191.
- CHEN Y, JI Q L, LI Z H, et al. Study on screening, identification and fermentation conditions of high yield *Lactobacillus* strains[J]. Journal of Yunnan Minzu University (Natural Science), 2023, 32(2): 183-191.
- [7] 黄燕燕, 郭均, 黎恒希, 等. 降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 88-94.
- HUANG Y Y, GUO J, LI H X, et al. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for cholesterol-lowering activity and the underlying mechanism[J]. Food Science, 2018, 39(6): 88-94.
- [8] 余萍, 矫艳平, 张春宇, 等. 具有降胆固醇功能的罗伊氏乳杆菌的筛选及其益生作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 106-113.
- YU P, JIAO Y P, ZHANG C Y, et al. Screening for cholesterol-lowering *Lactobacillus reuteri* strains and analyzing their probiotic effectiveness[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 106-113.
- [9] 刘悦, 字学娟, 陈婷, 等. 海南天然饲草青贮饲料中乳酸菌分离鉴定及优良菌株筛选[J]. 草地学报, 2022, 30(10): 2819-2826.
- LIU Y, ZI X J, CHEN T, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from natural forage silage in Hainan and screening of excellent strains[J]. Journal of Grassland Science, 2022, 30(10): 2819-2826.
- [10] 胡静, 黄爱兰, 黄顺, 等. 四川泡菜中植物乳杆菌的筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2022, 38(10): 86-91.
- HU J, HUANG A L, HUANG S, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* in Sichuan Paocai[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(10): 86-91.
- [11] 赵丽娜, 李钰炜, 张娜, 等. 新疆赛里木酸奶源降胆固醇植物乳杆菌的筛选鉴定及其安全性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 79-85.
- ZHAO L N, LI Y W, ZHANG N, et al. Screening, identification and safety of cholesterol-lowering *Lactobacillus plantarum* from Sayram Ketteki in Xinjiang[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 79-85.
- [12] 付金蕾, 高丽, 黄雯静, 等. 鹅盲肠乳酸菌的筛选及抑菌能力分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, 23(6): 73-77, 154.
- FU J L, GAO L, HUANG W J, et al. Screening of cecal lactic acid bacteria in goose and analysis of its antibacterial ability[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 23(6): 73-77, 154.
- [13] 李小宁, 李军, 尹杨燕, 等. 植物乳杆菌抑菌蛋白的分离鉴定及抑菌特性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(8): 3263-3272.
- LI X N, LI J, YIN Y Y, et al. Isolation, identification and antibacterial property of antibacterial proteins from *Lactobacillus plantarum*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(8): 3263-3272.
- [14] 曹海鹏, 徐兴娜, 文小飞. 一株强抑菌活性植物乳杆菌的分离及益生性能研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(6): 141-146.
- CAO H P, XU X N, WEN X F. Isolation and probiotic property of a *Lactobacillus plantarum* strain with strong antimicrobial activity[J]. China Brewing, 2021, 40(6): 141-146.
- [15] 温贺, 肖凤艳, 段翠翠, 等. 植物乳杆菌 Sc52 益生特性评价及其在降血糖产品中的应用[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 148-154.
- WEN H, XIAO F Y, DUAN C C, et al. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Sc52 and its application in a hypoglycemic product[J]. Food Science, 2018, 39(6): 148-154.
- [16] HUANG Y Y, LIU D M, JIA X Z, et al. Whole genome sequencing of *Lactobacillus plantarum* DMDL 9010 and its effect on growth phenotype un-

- der nitrite stress[J]. LWT, 2021, 149: 111778.
- [17] 丁媛, 郑博予, 祁宏伟. 牛源益生性优良乳酸菌菌株的筛选[J]. 吉林畜牧兽医, 2022, 43(10): 1-2.
DING Y, ZHEN B Y, QI H W, et al. Screening of beneficial lactic acid bacteria strains from cattle [J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2022, 43(10): 1-2.
- [18] 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.
- [19] DAI L, SAHIN O, TANG Y, et al. A mutator phenotype promoting the emergence of spontaneous oxidative stress-resistant mutants in *Campylobacter jejuni*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(24): 01685
- [20] LI X, TAN G, CHEN P, et al. Uncovering acid resistance genes in lactic acid bacteria and impact of non-viable bacteria on bacterial community during Chinese strong-flavor baijiu fermentation[J]. Food Research International, 2023, 167: 112741.
- [21] YANG H, WANG D, JIN Y, et al. Arginine deiminase pathway of *Tetragenococcus halophilus* contributes to improve the acid tolerance of lactic acid bacteria[J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104281.
- [22] PINTO M G V, FRANZ C M A P, SCHILLINGER U, et al. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109(3): 205-214.
- [23] 李奕荃, 刘璐, 赵军英, 等. 具有胆固醇降解能力的人源乳酸菌筛选及其特性研究[J]. 中国乳品工业, 2022, 50(3): 4-7, 36.
LI Y T, LIU L, ZHAO J Y, et al. Screening of human lactic acid bacteria with cholesterol-degrading ability and research of their characteristics[J]. China Dairy Industry, 2022, 50(3): 4-7, 36.
- [24] EFFENBERGER-NEIDNICH K, HARTMANN M. Mechanisms of hemolysis during sepsis[J]. Inflammation, 2018, 41(5): 1569-1581.
- [25] CANÉ L, SAFFIOTI N A, GENETET S, et al. Alpha hemolysin of *E. coli* induces hemolysis of human erythrocytes independently of toxin interaction with membrane proteins[J]. Biochimie, 2024, 216: 3-13.
- [26] CHAMPAGNE C P, GOMES DA CRUZ A, DAGA M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 22: 160-166.
- [27] 杨晴, 王荣春, 孙玥, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其性能研究 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 46-52.
YANG Q, WANG R C, SUN Y, et al. Screening, identification and properties of cholesterol lowering lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 46-52.
- [28] AMMOR M S, MAYO B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update[J]. Meat Science, 2007, 76(1): 138-146.
- [29] MIAO J, ZHOU J, LIU G, et al. Membrane disruption and DNA binding of *Staphylococcus aureus* cell induced by a novel antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6[J]. Food Control, 2016, 59(10): 609-613.
- [30] CASTILLO-RUIZ M, DAILLE L K, MACHUCA P, et al. Antibacterial activity of a complex bacteriocin secreted by *Staphylococcus epidermidis* against *Porphyromonas gingivalis*[J]. Archives of Oral Biology, 2023, 152: 105730.
- [31] 高芳, 包亚莉, 华晓青, 等. 乳酸菌对发酵肉制品抑菌作用及风味特征的影响研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 194-201.
GAO F, BAO Y L, HUA X Q, et al. Lactic acid bacteria: A review of their inhibitory effect on harmful microbes and effect on flavor characteristics of fermented meat products[J]. Food Science, 2023, 44(9): 194-201.
- [32] 所元东. 植物乳杆菌上清液对大肠杆菌生物膜的影响及分子机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2023.
SUO Y D. Effect of *Lactobacillus plantarum* supernatant on *Escherichia coli* biofilm and its molecular mechanism [D]. Kunming: Kunming Medical University, 2023.
- [33] 郭芸, 董双涛, 刘娜丽, 等. 功能性益生菌菌种的选育和益生性研究[J]. 中国奶牛, 2021, 4(4): 42-46.
GUO Y, DONG S T, LIU N L, et al. Selection and beneficial effects of functional probiotics[J]. China Dairy Cattle, 2021, 4(4): 42-46.

- [34] 侯幼红. 微生物细胞表面疏水性与粘附性的研究进展[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 1995, 4(2): 83-86.
- HOU Y H. Research progress on hydrophobicity and adhesion of microbial cell surface[J]. Foreign Medical Dermatology and Venereology, 1995, 4(2): 83-86.
- [35] 宋莺丽, 李安章, 徐帅帅, 等. 鲈鱼肠道来源降胆固醇乳酸菌分离筛选及其益生功能评价[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 44-52.
- SONG Y L, LI A Z, XU S S, et al. Isolation, screening, and probiotic function evaluation of lactic acid bacteria with cholesterol-lowering effects from the intestinal tract of seabass[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 44-52.
- [36] 玛丽娜·库尔曼, 巩燕妮, 包洪涛, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其益生元干预生长作用分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 164-171.
- MALINA K, GONG Y N, BAO H T, et al. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and the effects of prebiotics on their growth[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 164-171.
- [37] 万婧倢, 罗曼, 黄仕新, 等. 一株具降胆固醇功能的海洋源植物乳杆菌的筛选及其益生性能分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 122-128, 85.
- WAN J L, LUO M, HUANG S X, et al. Screening of a marine *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering effect[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 122-128, 85.
- [38] MIREMADI F, AYYASH M, SHERKAT F, et al. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 9: 295-305.
- [39] WALKER D K, GILLILAND S E. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* 1[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(4): 956-961.

Screening for Cholesterol-lowering Properties in Sour Tea and Assessment of Safety and Probiotic Characteristics

HUANG Fang, LIU Xintong, HUANG Jiarong, WU Weitong, KONG Xiaohui, YAO Qingbo, ZENG Xinan, HUANG Yanyan*

(School of Food Science and Engineering, Guangdong Provincial Key Laboratory of Intelligent Food Manufacturing, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong)

Abstract Objective: This study aimed to isolate and screen lactic acid bacteria with a high cholesterol degradation rate from Deang acid tea in Yunnan Province. The study also aimed to identify their physiological and biochemical characteristics, evaluate their safety and study their probiotics. Methods: Initially, a *Lactobacillus* with good characteristics was identified through screening for acid resistance, bile salt tolerance, acid production cholesterol-lowering ability and Intestinal colonization ability. After a series of identification and verification experiments, the strain was identified as *Lactiplantibacillus plantarum* and named HYY-S10. The safety and probiotic properties of HYY-S10 were evaluated, including hemolysis, antibiotic resistance, bacteriostatic ability and gastroenteric fluid tolerance. Results: HYY-S10 was found to be non-hemolytic and exhibited resistance to antibiotics. It demonstrated good tolerance to stomach and intestinal fluids and high intestinal colonization capacity, as well as high acid production ability and antibacterial effect on *Escherichia coli* compared to other strains isolated from sour tea. The bacteria entered the logarithmic growth phase at 4 hours, reaching an OD_{600 nm} value of 1.836. Moreover, it displayed a remarkable cholesterol degradation rate of 91%. Conclusion: This study successfully identified excellent lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties. These findings offer a theoretical foundation for the development of tea-derived probiotics and functional microecological preparations. However, further exploration is required to understand the cholesterol-lowering mechanism of these strains.

Keywords *Lactiplantibacillus plantarum*; sour tea; screening; security; probiotic properties