

人源乳酸菌耐酸耐胆盐能力及降胆固醇作用研究

Ability of acid and bile salt resistance of lactic acid bacteria and its cholesterol lowering effect from human origin

陈大卫^{1,2} 顾瑞霞^{1,2} 鲁茂林^{1,2} 黄玉军^{1,2}

CHEN Da-wei^{1,2} GU Rui-xia^{1,2} LU Mao-lin^{1,2} HUANG Yu-jun^{1,2}

张臣臣^{1,2} 关成冉^{1,2} 张玉律^{1,2} 范晨雨^{1,2}

ZHANG Chen-chen^{1,2} GUAN Cheng-ran^{1,2} ZHANG Yu-lu^{1,2} FAN Chen-yu^{1,2}

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225009; 2. 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏 扬州 225009)

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2. Key Laboratory of Dairy Biological Technology and Safety Control, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

摘要:利用选择性培养基、人工胃液及含胆盐培养基,从如皋长寿地区的人群肠道中分离筛选出耐酸耐胆盐能力较强的乳酸菌,并研究其降胆固醇能力及方式。结果表明,分离筛选的 60 株乳酸菌在 pH 3.0 的人工胃液中存活率均 >30%;来源于中年组、老年组及长寿组的乳酸菌存活率分别为 69%, 71%, 70%, 均显著高于青少年组 ($P < 0.05$);在 0.3% 及 0.5% 胆盐培养基中的存活率均 >20%, 老年组及长寿组的乳酸菌在 0.3% 胆盐培养基中的存活率分别为 53.85%, 55.26%, 均显著高于青少年组和中年组 ($P < 0.05$);来源于长寿组的乳酸菌降胆固醇能力显著高于中年组 ($P < 0.05$), 其中, 乳杆菌属与魏斯氏菌属的胆固醇降解率显著高于肠球菌属 ($P < 0.05$), 其降胆固醇的主要方式为细胞吸收和共沉淀。来源于长寿地区人群的乳酸菌耐酸耐胆盐能力及降胆固醇能力较强, 其中长寿组的乳酸菌要高于其他年龄组。

关键词:乳酸菌; 降胆固醇; 耐酸耐胆盐; 长寿地区; 年龄组

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) with ability of acid and bile salt resistance were isolated from the feces of the longevity population in Rugao by using selective medium, artificial gastric juice and bile salt medium, and the ability of cholesterol reducing and manner were

studied. The results showed that the survival rate of all isolated 60 strains of LAB in the pH 3.0 artificial gastric juice was more than 30%, the LAB from the middle-aged group, elderly group and longevity group was significantly higher than that in the youth group ($P < 0.05$); the survival rate of LAB in the 0.3% and 0.5% bile salt culture medium was more than 20%, of which the LAB in elderly group and longevity group was significantly higher than that of youth group and middle-aged group ($P < 0.05$). The ability of cholesterol lowering of the LAB from the longevity group was significantly higher than that of middle-aged group ($P < 0.05$), the ability of cholesterol reducing of *Lactobacillus* spp. and *Weissella* spp. was significantly higher than that of *Enterococcus* spp. ($P < 0.05$), the main manners of cholesterol lowering of LAB were cell absorption and sedimentation. The LAB come from longevity population have the strong ability of acid and bile salt resistance and cholesterol lowering, and the longevity group are higher than others from other age groups.

Keywords: longevity area; age groups; Lactic acid bacteria; acid and bile salt resistance; cholesterol lowering

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:31701627);国家自然科学基金面上项目(编号:31571855);江苏省高校自然科学研究面上项目(编号:17KJB550009);江苏省高校自然科学研究重大项目(编号:17KJA550004);江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室开放课题(编号:K14003)

作者简介:陈大卫,男,扬州大学讲师,博士。

通信作者:顾瑞霞(1963—),男,扬州大学教授,博士。

E-mail: rxgu@yzu.edu.cn

收稿日期:2017-07-12

膳食中的胆固醇是人体所需胆固醇的重要来源,但由于现代人类生活方式的改变,人们从膳食中获得的胆固醇已超过人体自身所需^[1],过量胆固醇的吸收也使得血清中的胆固醇水平过高,进而导致心血管疾病的发生^[2];而药物是心血管疾病的主要治疗方式,但对机体有一定的负面作用且成本较高,不是疾病长期治疗的最适方案。有研究^[3]表明,血清中胆固醇水平的降低对于心血管病的发生具有较好的预防作用;也有研究^[4]发现,乳酸菌能够降低人和动物血清中的胆固醇水平。

进一步研究^[5]发现,当益生菌的使用对象与其来源相一

致时,其对使用对象的益生功能就会得到增强;而由于来源于体外的益生菌的生长条件与其在宿主体内的生长条件差异较大,不利于其在宿主胃肠道内的存活。由此,许多研究人员^[6]认为最适的益生菌菌株最好是来自于宿主自身的胃肠道,这样才能在宿主胃肠道的胃酸、胆汁等一系列不良环境中存活下来,进而发挥其益生作用。所以来源于长寿地区人群的具有降胆固醇作用的乳酸菌是理想的辅助降胆固醇候选益生菌株,但是不同来源及不同种属的乳酸菌耐酸耐胆盐能力及降解胆固醇能力对益生乳酸菌的筛选起着重要作用,同时其降胆固醇的方式包括细胞吸收、共沉淀等,也对降胆固醇益生菌的筛选产生了较大的影响^[7-8]。目前关于这方面的研究较少,麦热姆妮萨·艾麦尔^[9]研究了来源于长寿地区长寿人群肠道乳酸菌的胆固醇降解能力及耐胆盐能力,但是关于来源于长寿地区不同年龄人群(青少年、中年、老年、长寿)的乳酸菌降解胆固醇及耐胆盐能力是否具有差异性还缺乏进一步的研究。因此,本研究拟从如皋长寿地区的人群粪便中分离筛选出具有耐酸耐胆盐功能的乳酸菌,研究不同年龄人群及不同种属来源的乳酸菌的降胆固醇能力及其体外降胆固醇的方式,为来源于长寿地区人群的乳酸菌具有较强耐酸耐胆盐能力及降胆固醇能力提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

胃蛋白酶:分析纯,北京索莱宝科技有限公司;

胆固醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

胆盐:分析纯,美国 Difco 公司;

dNTP、Taq 酶、引物:上海生工生物工程技术有限公司;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒:上海生工生物工程公司。

1.1.2 主要仪器设备

超净工作台:SW-CJ-1F 型,苏州净化设备有限公司;

生化培养箱:SPX-150BSH 型,上海新苗医疗器械制造有限公司;

全自动灭菌锅:JF-SX-500 型,日本 TOMY 公司;

水平电泳槽:HE-120 型,上海天能仪器设备有限公司;

PCR 仪:Mastercycler nexus 型,德国 Eppendorf 公司

凝胶成像系统:TGS-2026 型,上海天能仪器设备有限公司;

显微镜:Olympus CX41 型,日本 Olympus 公司;

高速冷冻离心机:H2500R-2 型,长沙湘仪离心机仪器有限公司;

厌氧工作站:Bugbox 型,英国 Ruskin 公司。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂的配制

(1) 模拟人工胃液及胆盐培养基:参考文献^[10]²³。

(2) 胆固醇培养基:参考文献^[11]的方法制备胆固醇胶束,将其加入到 MRS 液体培养基中,使其终浓度为 0.1 mg/mL,调整 pH 至 6.5±0.2,121 °C 灭菌 15 min,冷却备用。

1.2.2 乳酸菌的分离 将从江苏如皋长寿乡采集的不同年

龄人群[青年组(<44 岁)、中年组(45~59 岁)、老年组(60~89 岁)、长寿组(>90 岁)]的粪便样品经梯度稀释后,采用选择性培养基分离样品中的乳酸菌^[12],37 °C 培养 48 h,分离纯化菌落,并接种至 MRS 液体培养基中培养,4 °C 冷藏备用。

1.2.3 乳酸菌的鉴定 对乳酸菌进行革兰氏染色,并观察其菌体形态,然后进行运动性、KOH 等生理生化试验。参考文献^[13]的方法提取乳酸菌的基因组 DNA,并对其进行 16S rDNA 扩增,检测扩增产物后进行测序,将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性比对。

1.2.4 乳酸菌的菌体处理

(1) 乳酸菌菌体的洗涤:取活化好的 5 mL 菌悬液离心(5 000×g,10 min),收集菌体沉淀,用 5 mL PBS(0.1 mol/L, pH 7.0)缓冲液冲洗并重新悬浮沉淀菌体^[14]。

(2) 乳酸菌菌体的破碎:取 1 mL PBS 悬浮的菌悬液,加入 10 μL(50 mg/L)溶菌酶及 10 μL(10% SDS),37 °C 水浴 1 h,然后用超声波细胞粉碎机破碎,条件为 130 W、20 kHz,40% 破碎 15 次(10 s/次)^[14]。

1.2.5 乳酸菌耐酸耐胆盐能力的测定 参考文献^[10]²⁴的方法,分别测定乳酸菌在 pH 3.0 和 pH 2.0 的人工胃液中及含 0.3%、0.5% 胆盐的 MRS 培养基中培养 3 h 的活菌数,按式(1)计算其存活率。

$$S = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S——存活率,%;

C₁——3 h 的活菌数,CFU/mL;

C₂——0 h 的活菌数,CFU/mL。

1.2.6 乳酸菌胆固醇降解率的测定 将乳酸菌按 3% 的接种量接种至含胆固醇的 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 h 后按 GB/T 5009.128—2003 测定其胆固醇含量,并按式(2)计算其降解率。

$$LE = \frac{L_1 - L_2}{L_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

LE——胆固醇降解率,%;

L₁——未接菌的含胆固醇的 MRS 液体培养基中测得的胆固醇 OD 值;

L₂——接种乳酸菌的含胆固醇的 MRS 液体培养基中测得的胆固醇 OD 值。

1.2.7 乳酸菌降胆固醇方式 根据文献^[14]的方法测定乳酸菌通过共沉淀及细胞吸收方式降解的胆固醇,分别按式(3)、(4)计算共沉淀和细胞吸收的胆固醇降解率。

$$LE_1 = \frac{A}{B} \times 100\%, \quad (3)$$

$$LE_2 = \frac{(C+D-A)}{B} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

LE₁——共沉淀作用的胆固醇降解率,%;

LE₂——细胞吸收作用的胆固醇降解率,%;

A——培养后沉淀冲洗上清液中胆固醇的含量,μg/mL;

B——未接种的含胆固醇的 MRS 液体培养基中胆固醇含量, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

C——菌体破壁上清液中胆固醇的含量, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

D——破壁后乙醇悬浮上清液中胆固醇的含量, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.8 数据统计与处理 采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的来源及其耐酸耐胆盐能力

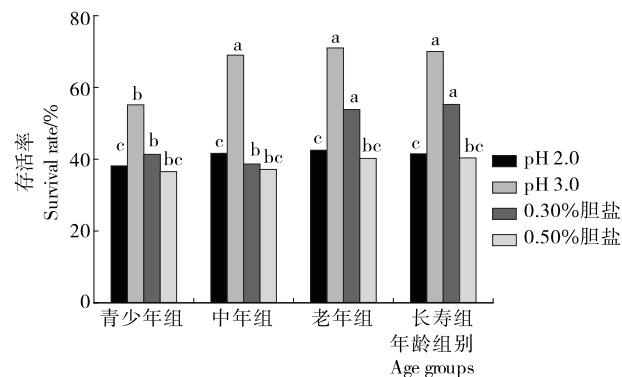
从采集的 31 份样品中分离得到 108 株菌株,对分离的菌株进行革兰氏染色发现,100 株菌株为革兰氏阳性,92 株菌株无运动性,8 株菌株产气;有 16 株菌株过氧化氢酶试验为阳性,12 株 KOH 试验为阴性,12 株菌株不产酸。综合分析,将 16 株非乳酸菌排除,将 92 株菌初步判定为乳酸菌。并筛选出耐酸、耐胆盐能力较强的乳酸菌,其来源及耐酸、耐胆盐能力分别见表 1 和图 1。

试验表明,筛选出的 60 株耐酸、耐胆盐能力较强的乳酸菌,其在 pH 2.0 和 pH 3.0 的模拟人工胃液中存活率均 > 30%,其在 0.3% 和 0.5% 的胆盐条件下的存活率均 > 20%。图 1 表明,来源于中年组、老年组及长寿组的乳酸菌在 pH 3.0 的人工胃液中的平均存活率均 > 69%,要显著高于青少年组 ($P < 0.05$) 的 55%,而且三者的乳酸菌在 pH 2.0 的人工胃液中的平均存活率大于青少年组的,但不显著 ($P > 0.05$);

表 1 乳酸菌的来源

Table 1 The source of LAB

组别	菌株
长寿组	d2, f1, f5, f8, f2, f18, o6, o9, v5, w9, a2, w5, w14, w15, af20, b2, T2
老年组	c8, 双 c6, c10, e2, g1, g7, g15, 双 g1, q5, d8, ad20, 双 ad3, 双 d8, 双 at7
中年组	k4, k10, k11, k14, v1, R10, R11, R12, R18, ah2, ah14, ah15, ah16, as16, as17
青年组	双 J6, i9, T3, i11, aj12, a9, ai7, ai16, 双 ao7, p5, ar1, av1, ar7, ar19



同一指标不同字母表示数据存在显著差异 ($P < 0.05$)

图 1 不同年龄组的乳酸菌耐酸、耐胆盐能力

Figure 1 The ability of acid and bile salt tolerance of lactic acid bacteria from different age groups

而来源于老年组和长寿组的乳酸菌在 0.3% 的胆盐条件下的平均存活率均 > 50%,显著高于青少年组和中年组的 41% ($P < 0.05$),而且老年组和长寿组的乳酸菌在 0.5% 的胆盐条件下要高于青少年组和中年组的,但不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 生理生化试验 参考伯杰氏鉴定手册^[15]对 60 株乳酸菌的生理生化性质进行试验,部分菌株的试验结果见表 2。

分离筛选到的 60 株乳酸菌经生理生化试验初步鉴定,5 株为魏斯氏菌属 (*Weissella* spp.),能在 15 °C 和 45 °C 条件下生长,能利用蔗糖、果糖、纤维二糖,不能利用阿拉伯糖、木糖和棉籽糖;8 株为乳杆菌属 (*Lactobacillus* spp.),能在 15 °C 和 45 °C 条件下生长,能利用葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖,不能利用山梨醇、木糖、松三糖。47 株为肠球菌属 (*Enterococcus* spp.),能在 15 °C 和 45 °C 条件下生长,能利用山梨醇、果糖、麦芽糖、甘露糖,不能利用木糖、棉籽糖。

表 2 乳酸菌的生理生化鉴定[†]

Table 2 The identification of physiology and biochemistry of LAB

项目	f2	o9	f1	f5	e2
细胞形态	球状	球状	杆状	杆状	短杆状
革兰氏染色	+	+	+	+	+
接触酶	-	-	-	-	-
运动性试验	-	-	-	-	-
硝酸盐还原试验	-	-	-	-	-
明胶液化试验	-	-	-	-	-
吲哚试验	-	-	-	-	-
产 H ₂ S 试验	-	-	-	-	-
15 °C	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+
核糖	-	+	+	+	-
松三糖	-	+	-	-	+
鼠李糖	-	+	-	-	+
葡萄糖	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	-	-	-
甘露糖	+	+	-	+	ND
麦芽糖	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	-	-	+
棉籽糖	-	-	+	+	-
阿拉伯糖	+	-	+	-	-
木糖	-	-	-	-	-
果糖	+	+	+	+	+
山梨醇	+	+	-	-	-
蜜二糖	+	-	+	+	+
蔗糖	-	+	+	+	+
鉴定结果	屎肠球菌	粪肠球菌	罗伊乳杆菌	发酵乳杆菌	魏斯氏菌属

† “+”90% 菌株为阳性;“-”90% 菌株为阴性;“ND”表示未测定。

2.2.2 乳酸菌的 16S rDNA 鉴定 采用 16S rDNA 引物^[13]对乳酸菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,得到特异性扩增产物,检测后送至某测序公司进行测序,对测得的序列进行相似性分析,结果见表 3。

表 3 乳酸菌的 16S rDNA 鉴定

Table 3 The identification of LAB by 16S rDNA

属	种	菌株
肠球菌	<i>Enterococcus hirae</i>	g7、R10、R12
	<i>Enterococcus faecalis</i>	o9、d8、ad20、双 ad3、双 d8、双 g1、q5、R11
	<i>Enterococcus durans</i>	ah16、k4、k10、k11、k14、i9、T3、i11、ai7、ai16
	<i>Enterococcus faecium</i>	c8、f8、f2、f18、g1、ar7、R18、w9、a2、w5、w14、w15、双 ao7、p5、ar1、av1、af20、双 at7、ah2、ah14、ah15、as16、as17、双 J6、ar19、aj12
乳杆菌	<i>Lactobacillus paracasei</i>	T2
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	f1、d2
	<i>Lactobacillus mucosae</i>	g15、a9
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	f5、v1、v5
魏斯氏菌	<i>Weissella cibaria</i>	b2、o6、双 c6、c10、e2

通过相似性分析发现,测序得到的序列与 GenBank 数据库中的序列同源性均在 98% 以上。结合生理生化试验及 16S rDNA 测序比对的结果,将 60 株菌株鉴定为肠球菌、乳杆菌及魏斯氏菌 3 个属 9 种菌,分别为海氏肠球菌、粪肠球菌、耐久肠球菌、尿肠球菌、副干酪乳杆菌、罗伊乳杆菌、黏膜乳杆菌、发酵乳杆菌及食窦魏斯氏菌。

2.3 菌株降解胆固醇能力

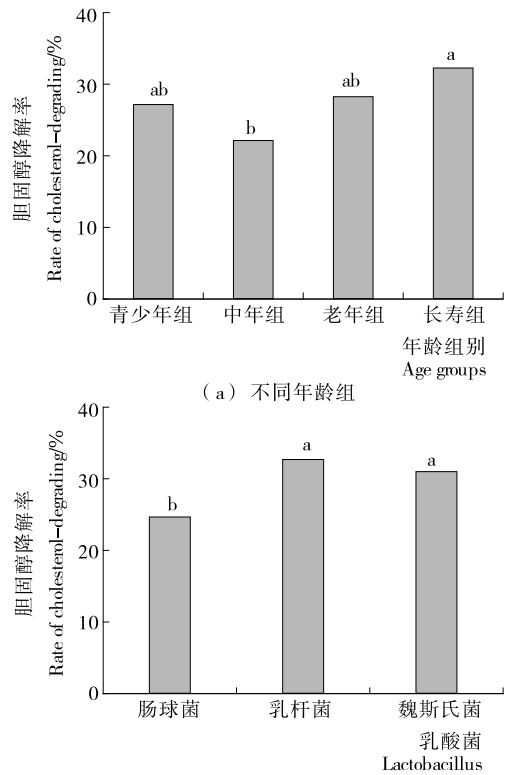
不同年龄组及不同种属的乳酸菌胆固醇降解率见图 2。

由图 2(a)可知,不同来源的乳酸菌的胆固醇降解率差异较大,其中来源于长寿组的乳酸菌的胆固醇平均降解率为 32.26%,显著高于中年组的 22.13%($P < 0.05$),老年组与青少年组分离的乳酸菌对胆固醇的降解率相近。图 2(b)表明,乳酸菌降解胆固醇存在属间的差异性,乳杆菌属和魏斯氏菌属的胆固醇平均降解率 > 31%,显著高于肠球菌属的 24.6%($P < 0.05$);乳杆菌属中有 87.5% 的菌株胆固醇降解率 > 20%,而肠球菌属中为 55%。

2.4 菌株降胆固醇的方式

将乳酸菌的菌体进行洗涤和破壁后,测定其通过细胞吸收和共沉淀 2 种方式对胆固醇的降解率。试验研究了胆固醇降解率 > 30% 的 12 株乳酸菌的胆固醇降解方式,结果见表 4。

由表 4 可知,从如皋长寿地区分离的乳酸菌降解胆固醇的主要方式为细胞吸收和共沉淀作用,这 2 种方式的胆固醇降解率占总降解率的 80% 以上,菌株 b2、d2 通过菌体吸收降解胆固醇的能力显著低于其他菌株($P < 0.05$),而其通过共沉淀作用降解胆固醇的能力显著高于其他菌株($P < 0.05$),



柱形图上不同字母表示数据存在显著差异($P < 0.05$)

图 2 乳酸菌降解胆固醇能力

Figure 2 The ability of cholesterol-reducing of LAB

表 4 乳酸菌体外降解胆固醇的方式[†]

Table 4 The manner of cholesterol-reducing of LAB in vitro ($n = 3$)

菌株	胆固醇降解率	菌体吸收所占比例	共沉淀作用所占比例
b2	39.00 ± 2.04 ^{bc}	28.42 ± 1.76 ^a	58.96 ± 2.75 ^g
c10	36.87 ± 2.31 ^{abc}	57.32 ± 1.33 ^{cde}	25.13 ± 2.25 ^b
d2	49.00 ± 3.10 ^d	29.35 ± 2.35 ^a	58.04 ± 1.51 ^g
e2	37.00 ± 2.13 ^{bc}	32.75 ± 2.23 ^{ab}	45.48 ± 3.33 ^{def}
f2	44.67 ± 2.52 ^{cd}	62.17 ± 3.33 ^e	36.51 ± 2.21 ^c
双 J6	48.00 ± 3.00 ^d	65.94 ± 2.56 ^e	23.94 ± 4.57 ^b
k10	30.67 ± 3.06 ^a	89.33 ± 4.58 ^f	8.67 ± 1.53 ^a
o6	39.33 ± 4.04 ^{bc}	45.75 ± 3.73 ^{cde}	49.67 ± 3.45 ^{ef}
T2	42.33 ± 3.51 ^{cd}	49.22 ± 3.12 ^c	36.07 ± 2.01 ^c
v5	41.67 ± 4.51 ^{cd}	68.04 ± 3.12 ^e	25.58 ± 2.57 ^b
ah2	42.00 ± 3.61 ^{cd}	58.45 ± 2.59 ^{de}	38.45 ± 3.50 ^{cd}
a9	31.27 ± 2.05 ^{ab}	57.18 ± 2.77 ^{cde}	41.99 ± 2.56 ^{cde}

† 同列比较不同字母表示数据存在显著性差异($P < 0.05$)。

而菌株 k10、双 J6、v5、f2 主要通过细胞吸收来降解胆固醇,其通过细胞吸收降解胆固醇的能力显著高于其他菌株($P < 0.05$)。

3 结论

已有研究^[16]表明,人的胃液 pH 值通常为 3.0 左右,空腹或食用酸性食品时 pH 值为 1.50,小肠的胆汁盐含量在 0.03%~0.30%;对酸和胆盐耐受性较低的乳酸菌在此环境

下,无法存活,而存活下来的乳酸菌在酸和胆盐环境因素的作用下则形成了耐受性,因此从长寿地区的人群中分离获得的乳酸菌具有较强的耐酸耐胆盐能力。但不同年龄人群的胃肠道环境差异较大,有研究^[17]表明,年龄的变化会引起人的胃液分泌发生变化,进而导致肠道的 pH 产生较大的差异;还有研究^[18]发现,细胞质中的 pH 值保持在一个合适的水平是乳酸菌能够在较低的 pH 条件下存活的重要因素,在此过程中, F₁F₀-ATP 酶发挥着重要的作用,而人体胃肠道中的 pH 环境也有助于 F₁F₀-ATP 酶活性的发挥^[19],因此,来源于人体肠道中的乳酸菌具有较强的耐酸能力。同时,不同年龄人群肠道中 pH 环境的不同则影响了分离的乳酸菌的耐酸能力。

不同年龄对胆固醇的需求量不同,在婴幼儿和青少年需求量比较大,随着年龄的增大,人体对胆固醇的消耗逐渐减少^[20]。青年人群对胆固醇的消耗要大于老年人群,因此,肠道内的胆固醇积累的较少,肠道内的乳酸菌受胆固醇的作用也较少;而老年人群对胆固醇的需求较少,体内过多的胆固醇需要在肠道内被代谢,导致肠道内的乳酸菌受胆固醇的作用较大,使得来源于老年人群肠道的乳酸菌需要降解较多的胆固醇。乳酸菌可以通过细胞壁、细胞膜吸收或吸附胆固醇来发挥其降胆固醇作用,本研究也发现,通过菌体吸收胆固醇是乳酸菌降胆固醇的主要方式。因此,乳酸菌的细胞壁和细胞膜的结构对菌体发挥吸收胆固醇的作用产生重要的影响^[7-8],而肠球菌和乳杆菌的细胞壁及细胞膜结构存在一定的差异,这可能是乳酸菌降解胆固醇存在属间差异的一个重要原因。

来源于长寿地区人群的乳酸菌具有较强的耐酸耐胆盐能力和降胆固醇能力,而乳杆菌属与魏斯氏菌属的胆固醇降解率显著高于肠球菌属($P < 0.05$),其降胆固醇的主要方式为细胞吸收和共沉淀。

本研究还发现,分离获得乳酸菌中,肠球菌数量较多,其次是乳杆菌,与已有的研究^[9]结果相似,表明肠球菌可能是如皋长寿地区人群肠道中的优势菌群,同时还有较多的罗伊乳杆菌、发酵乳杆菌及副干酪乳杆菌等益生菌;由于大部分肠道微生物不能通过培养的方法进行分离鉴定^[21],因此通过培养的方法来分离人群肠道中的乳酸菌存在一定的局限性,需要利用分子等技术来进一步验证。

参考文献

[1] WANG D Q. Regulation of intestinal cholesterol absorption[J]. Annual Review of Physiology, 2007, 69: 221-248.

[2] LEE C M Y, BARZI F, WOODWARD M, et al. Adult height and the risks of cardiovascular disease and major causes of death in the Asia-Pacific region; 21 000 deaths in 510 000 men and women[J]. International Journal of Epidemiology, 2009, 38(4): 1 060-1 071.

[3] BOGERS R P, BEMELMANS W J, HOOGENVEEN R T, et al. Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons[J]. Archives Internal Medicine,

2007, 167(16): 1 720-1 728.

[4] JONES M L, MARTONI C J, PARENT M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults [J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(10): 1 505-1 513.

[5] 高权新, 吴天星, 王进波. 肠道微生物与寄主的共生关系研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 519-526.

[6] MARIA S, GUNNAR M, RANGNE F, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 84(3): 197-215.

[7] 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.

[8] LYE H S, RUSUL G, LIONG M T. Removal of cholesterol by *lactobacilli* via incorporation and conversion to coprostanol[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(4): 1 383-1 392.

[9] 麦热姆妮萨·艾麦尔. 长寿老人肠道益生菌的分离鉴定及长寿机理的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2012: 22-23.

[10] 王俊国. 降胆固醇益生乳杆菌的筛选及其降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.

[11] 刘丽莉, 夏延斌, 唐青春. 降胆固醇的乳酸菌筛选研究[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 59-62.

[12] 王友湘, 陈庆森, 阎亚丽. 用于乳酸菌分离鉴定的几种培养基的筛选及应用[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 374-377.

[13] 吕源玲. 耐酸耐胆盐益生乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 42-45.

[14] 王一鸣, 范小兵, 杨虹, 等. 体外去除胆固醇菌株的筛选及其作用机理研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 43-47.

[15] 布坎南 R E, 吉布斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 660-721.

[16] HUNGER W, PEITERSEN N. New technical aspects of the preparation of starter culture[J]. Bulletin of the International Dairy Federation, 1992, 277: 17-21.

[17] 李晓华, 李方儒. 老年人空腹胃液 pH 值和胃蛋白酶观察[J]. 武警医学院学报, 2002, 12(1): 52-54.

[18] KOBAYASHI H. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(1): 72-76.

[19] KOBAYASHI H, SUZUKI T, UNEMOTO T. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(2): 627-630.

[20] 柯元南, 张红. 胆固醇的功过是非[J]. 中老年保健, 2017(2): 10-11.

[21] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5 728): 1 635-1 638.