

副干酪乳杆菌 HCS17-040 的筛选鉴定及其益生特性

Screening of *Lactobacillus Paracasei* HCS17-040 with triglyceride tunction and study on its probiotic characteristics

余萍 曹蓝 矫艳平 赵迪 闵祥博

YU Ping CAO Lan JIAO Yan-ping ZHAO Di MIN Xiang-bo

(江西仁仁健康产业有限公司, 江西 樟树 331200)

(Jiangxi Renren Health Industry Co., Ltd., Zhangshu, Jiangxi 331200, China)

摘要:目的:获得具有降甘油三酯功能的乳酸菌菌株。方法:从母乳及顺产的健康婴儿粪便中筛选分离乳酸菌菌株,采用单试剂法乳酸菌(GPO-PAP法)测定其甘油三酯去除能力。从中选择甘油三酯去除能力强的菌株进行形态学鉴定、生理生化及 16S rDNA 鉴定,并测定其耐受酸、胆盐和胃肠液的能力。结果:筛选分离出一株副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*),命名为 HCS17-040 (CGMCC No 19747),其甘油三酯下降率达 $(42.80 \pm 1.79)\%$;该菌株在 pH 3.0 和 pH 2.0 的环境中培养 17 h 后存活率分别为 89.39% 和 87.18%;在 3 g/L 和 5 g/L 的胆盐浓度环境中培养 17 h 后存活率分别为 94.75%, 92.97%;在人工胃液中作用 3 h,存活率为 93.93%;在人工肠液中作用 4 h,存活率高达 99.06%。结论:副干酪乳杆菌 HCS17-040 对甘油三酯具有一定的去除能力,且具有良好的耐酸、胆盐及人工胃肠液的能力。

关键词:甘油三酯;副干酪乳杆菌;筛选;鉴定;益生特性

Abstract: Objective: This study focuses on obtaining a *Lactobacillus* strain for degrading triglyceride. Methods: *Lactobacillus* was isolated from human breast milk and the faeces of healthy infants in this study, and their triglyceride degradability was determined by single reagent (GPO-PAP) method. The strains with strong degradation ability of triglyceride were selected for morphological, physiological, biochemical and 16S rDNA identification, and their tolerance to acid, bile salt and gastrointestinal juice was determined. Results: A strain of *Lactobacillus Paracasei* was isolated and then named as HCS17-040 (CGMCC

No 19747), and its degradation rate of triglyceride was $(42.80 \pm 1.79)\%$; the survival rates of the strain were 89.35% and 87.18% after 17 h culture in pH 3.0 and pH 2.0, respectively, and then reached 94.75% and 92.97% after 17 h culture in 3 g/L and 5 g/L bile salts, respectively, the survival rate was 93.93% and 99.06% in artificial intestinal fluid for 4 hours. Conclusion: *Lactobacillus Paracasei* HCS17-040 has a certain ability to remove triglycerides, and has a good ability to resist acid, bile salt and artificial gastric and intestinal fluid.

Keywords: triglycerides; *Lactobacillus paracasei*; screening; identification; probiotic characteristics

医学上,将人体一种或多种血液脂类水平异常升高称为高脂血症,主要包括高胆固醇血症、高甘油三酯血症和高低密度脂蛋白血症^[1]。近年来,由于生活习惯和饮食结构的改变,人们对高脂肪和高胆固醇食物的摄入增加,高脂血症的人群越来越多。目前高脂血症人群主要通过服用药物、加强运动量和调整饮食结构的方式加以控制,但长期食用药物对人体产生一定的副作用及运动不便等原因,部分人群的效果并不尽人意^[2]。

益生菌是一类摄入后能够以活菌状态到达肠道,通过改善寄主微生态平衡,发挥益生作用的微生物^[3-5]。益生菌具有的益生功能主要有维持肠道内正常菌群、抗感染、抗氧化、增强免疫力、抑制癌细胞、辅助降低胆固醇、促进人体对营养物质的吸收等^[6-8]。近年来国内外研究者^[9-12]发现乳杆菌、双歧杆菌等益生菌具有降胆固醇和降甘油三酯的功能,但未见关于副干酪乳杆菌降甘油三酯的研究。研究拟从母乳及顺产的健康婴儿粪便中分离筛选具有降甘油三酯功能的副干酪乳杆菌,并对其益生特性进行研究,以期为实现相关新型药物、保健食品的应用制备提供参考。

作者简介:余萍,女,江西仁仁健康产业有限公司高级工程师,硕士。

通信作者:矫艳平(1989—),女,江西仁仁健康产业有限公司工程师,硕士。E-mail: jiaoyanping12@163.com

收稿日期:2021-04-12

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品

筛菌样品为顺产且母乳喂养的健康婴儿粪便样品 3 份、母乳样品 2 份,无菌操作取样寄送至实验室,并于 -20 ℃ 条件保存备用。

1.1.2 培养基

MRS 培养基^[13]:蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母提取物 5 g,磷酸氢二钾 2 g,柠檬酸氢二铵 2 g,乙酸钠 5 g,葡萄糖 20 g,吐温 80 1 mL,七水合硫酸镁 0.58 g,四水硫酸锰 0.25 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 6.2~6.4,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

甘油三酯培养基^[14]:将 2% 的聚乙烯醇水溶液与植物油按体积比 3:1 混合,用超声波处理(控制参数每次超声 5 s,间隔时间 5 s,共超声 70 次)后混合均匀制成植物油乳化液,作为甘油三酯的来源。将植物油乳化液按 5% 的比例加入到 MRS 培养基中,调 pH 值至 6.5±0.2,115 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

改良 MRS 固体培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉粉 3 g/L,酵母粉 4 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L,柠檬酸 2 g/L,乙酸钠 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,七水合硫酸镁 0.58 g/L,四水合硫酸锰 0.25 g/L,吐温 80 0.6 g/L,碳酸钙 10 g/L,中性红 0.05 g,番茄汁 10 mL/L,琼脂粉 20 g/L,调 pH 至 5.5;115 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂及仪器

甘油三酯试剂盒:A110-1-1,南京建成生物试剂公司;
牛胆盐:TLC Sigma,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;

PBS 缓冲溶液:20X,生工生物工程(上海)股份有限公司;

无水乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

冰乙酸、浓硫酸:分析纯,中国医药集团有限公司;

硫代乙醇酸钠(巯基乙酸钠):分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

氢氧化钾:分析纯,天津市瑞金特化学品有限公司;

正己烷:分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司;

双人单面净化工作台:SW-CJ-2D 型,苏州净化设备有限公司;

电热恒温培养箱:DHP-500BS 型,北京市永光明医疗仪器厂;

立式压力蒸汽灭菌器:LDZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂;

生物显微镜:XSP-10CA 型,上海佑科仪器仪表有限公司;

电热恒温水浴锅:DZKW-S-8 型,北京市永光明医疗仪器有限公司;

超声波细胞粉碎机:SCIENTZ-II D 型,宁波新芝生物科技有限公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,美国赛默飞世尔科技有限公司;

低温高速离心机:TGL-16M 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

厌氧工作站:LAI-3DT 型,上海龙跃仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 取 500 μL 样品加入到 4.5 mL MRS(pH 至 5.5)液体培养基中稀释,混匀后再取 500 μL 加入到 4.5 mL MRS(pH 至 5.5)液体培养基中稀释,以 10 倍稀释法稀释至 10⁻⁶,取 10⁻³~10⁻⁶ 稀释度分别取 50 μL 稀释液涂布到改良 MRS 固体培养基平板上,每个梯度两次平行,将平板置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24~48 h。

挑取具有目的菌株典型特征(观察形态、大小、色泽、及其透明度等)、菌落较大、活性较强的单菌落,于改良 MRS 固体培养基平板上进行划线纯化培养,37 ℃ 培养 24~48 h,如此反复 2~3 次,直到划线平皿中菌落特征一致;将纯化菌株进行革兰氏染色,显微镜观察及过氧化氢试验,将革兰氏染色阳性及过氧化氢酶阴性的菌株定为疑似乳酸菌,将纯化后菌株接种于 MRS 斜面培养基上培养,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 降甘油三酯功能性测定

(1) 试验菌株的制备:将 1.2.1 中分离纯化的菌株划线分离出单菌落,挑取单菌落接种于 5 mL MRS 液体培养基中,37 ℃ 培养 20 h 后,再次转接至 100 mL MRS 液体培养基中,37 ℃ 培养 17 h,然后以 3% 接种量接种于 100 mL 甘油三酯培养基中,37 ℃ 培养 24 h。同时将未接种菌液的甘油三酯培养基 37 ℃ 培养 24 h。

(2) 甘油三酯含量测定:单试剂法(GPO-PAP 法)。将甘油三酯培养基和经甘油三酯培养基培养后的菌液分别取 10 mL 用冷冻离心机于 4 ℃,4 000 r/min 离心 10 min 取上清液,按甘油三酯试剂盒说明测定。按式(1)计算甘油三酯(TG)含量。

$$C_{TG} = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times M, \quad (1)$$

式中:

C_{TG} ——甘油三酯含量,mmol/L;

A_0 ——空白吸光度值;

A_1 ——样品吸光度值;

A_2 ——校准吸光度值;

M ——校准品浓度,mmol/L。

(3) 甘油三酯下降率的计算:

$$R_{TG} = \frac{C_{TG1} - C_{TG2}}{C_{TG1}} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R_{TG} ——甘油三酯下降率, %;

C_{TG1} ——总甘油三酯含量, 即未接种菌液的甘油三酯培养基中甘油三酯含量, mmol/L;

C_{TG2} ——残留甘油三酯含量, 即接种于甘油三酯培养基培养后的菌液中甘油三酯含量, mmol/L。

1.2.3 降甘油三酯功能菌株的鉴定

(1) 形态学特征鉴定: 将菌株 HCS17-040 接种至 MRS 琼脂培养基 37 °C 培养 48 h, 观察菌株形态。并挑取单个菌落进行革兰氏染色, 在生物显微镜下观察菌体形态。

(2) 生理生化及 16S rDNA 鉴定: 菌种生理生化特征鉴定及 16S rDNA 鉴定委托中国科学院微生物研究所完成。

1.2.4 耐酸性试验 用 1 mol/L 盐酸将 MRS 培养基 pH 值调至 2.0 或 3.0, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 冷却备用。以未经调整的 MRS 培养基 (pH 为 6.2~6.4) 为对照, 将活化后的副干酪乳杆菌 HCS17-040 菌液以体积分数 10% 的接种量分别接种于 MRS 对照培养基、pH 3.0 和 pH 2.0 的 MRS 培养基中。37 °C 恒温静置培养 17 h 后取样, 用灭菌的生理盐水进行 10 倍系列稀释, 分别取适宜稀释度的菌液 1 000 μ L 移入无菌空平皿中, 将冷却至 48 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿约 15 mL, 转动平皿使其混合均匀。每个稀释度 2 次重复, 37 °C 静置培养 36~48 h 后计数。按式(3)计算耐酸试验存活率。

$$S = \frac{\lg N_1}{\lg N_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S ——受试菌株存活率, %;

N_1 ——试验组培养基测得的活菌数, CFU/mL;

N_0 ——空白对照组测得的活菌数, CFU/mL。

1.2.5 耐胆盐试验 在 MRS 培养基中加入牛胆盐, 配置成胆盐质量浓度分别为 3 g/L 和 5 g/L 的 MRS 培养基, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 冷却备用。以不添加牛胆盐

的 MRS 培养基为对照, 将活化后的副干酪乳杆菌 HCS17-040 菌液按照体积分数 10% 的接种量分别接种于上述培养基中, 37 °C 恒温静置培养 17 h 后取样, 用灭菌的生理盐水进行系列 10 倍稀释, 分别取适宜稀释度的菌液 1 000 μ L 移入无菌空平皿中, 将冷却至 48 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿约 15 mL, 转动平皿使其混合均匀。每个稀释度 2 次重复, 37 °C 静置培养 36~48 h 后计数。按式(3)计算耐胆盐试验菌株存活率。

1.2.6 模拟胃液试验 配制人工胃液: 取稀盐酸 16.4 mL, 加蒸馏水 800 mL; 加入胃蛋白酶 10 g (1 g/100 mL), 摇匀后用蒸馏水稀释至 1 000 mL, 调节 pH 值至 2.0, 0.22 μ m 有机滤膜过滤除菌。

取活化后的副干酪乳杆菌 HCS17-040 菌悬液 10 mL 进行离心 (5 000 $\times$ g, 10 min, 5 °C), 将获得的菌泥用 PBS 缓冲液冲洗 2 次后重悬于 10 mL 人工胃液中, 37 °C 消化 3 h, 并分别于 0, 3 h 取样测活菌数。按式(3)计算模拟胃液试验菌株存活率。

1.2.7 模拟肠液试验 配制人工肠液: 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液将 PBS 缓冲液 pH 调节至 8.0 后灭菌, 再加入 1.0 g/L 的胰蛋白酶使其溶解, 0.22 μ m 有机滤膜过滤除菌。

取活化后的副干酪乳杆菌 HCS17-040 菌悬液 10 mL 进行离心 (5 000 $\times$ g, 10 min, 5 °C), 将获得的菌泥用 PBS 缓冲液冲洗 2 次后重悬于 10 mL 人工肠液中, 37 °C 下培养, 并分别于 0, 2, 4 h 取样测活菌数。按式(3)计算模拟肠液试验菌株存活率。

1.2.8 数据处理 每个试验重复 3 次, 采用 SPSS 19.0 软件和 Excel 软件进行数据分析, 当 $P < 0.05$ 时, 差异被认为是具有意义的, 结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。

2 结果与分析

2.1 菌株降甘油三酯能力筛选

从婴儿粪便及母乳样品中共筛选分离出 6 株具有降甘油三酯功能的菌株, 见表 1。6 株菌均为革兰氏染色阳性, 过氧化氢酶阴性, 球状或杆状, 初步判断为乳酸菌。其中菌株 HCS17-040 的甘油三酯下降率最高, 达到 (42.80 $\pm$ 1.79) %, 其可能是通过吸收或吸附的方式将甘

表 1 菌株筛选结果

Table 1 Results of strain screening

菌株编号	菌落形态	细胞形状	甘油三酯下降率/%
HCS190306	圆形, 乳白色, 边缘规则, 表面光滑	杆状	29.50 $\pm$ 0.89
HCS190307	白色, 圆形, 表面光滑	短粗杆状	18.27 $\pm$ 0.97
HCS190308	圆形凸起, 边缘整齐, 白色, 表面光滑	短杆状	22.30 $\pm$ 1.16
HCS190309	圆形, 乳白色, 无光泽	球状	30.70 $\pm$ 1.08
HCS190310	圆形, 乳白色, 无光泽	球状	19.40 $\pm$ 0.90
HCS17-040	圆形, 白色, 边缘整齐, 表面光滑	杆状	42.80 $\pm$ 1.79

油三酯利用^[15]。故选择菌株 HCS17-040 进行菌种鉴定及益生作用研究。

2.2 降甘油三酯功能菌株的鉴定

2.2.1 菌株的形态学鉴定 将菌株 HCS17-040 接种至 MRS 琼脂培养基 37 ℃ 培养 48 h 后观察菌株形态,结果见图 1。单菌落直径约 1~2 mm,圆形凸起,颜色呈白色,菌落表面光滑细密。挑取单个菌落进行革兰氏染色并在生物显微镜下观察菌体形态,结果如图 2 所示,革兰氏染色阳性,细长杆状,长宽比大约为 1:3~2:3,长短不均一,成单或成对、成链排列。

2.2.2 生理生化及 16S rDNA 鉴定 菌株 HCS17-040 生理生化鉴定结果如表 2 所示,根据菌种的细胞形态、生理生化特征、16S rDNA 基因序列、pheS 基因序列等试验数据综合分析,参考《伯杰氏系统细菌学手册》,并通过在美国生物工程信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)查阅国际相关的基因库,将副干酪乳杆菌 CGMCC No 19747 的 16S rDNA 序列与 GenBank 提交菌株序列相似性比较(见表 3),鉴定菌种 HCS17-040 为副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)。

2.3 耐酸性试验

益生菌进入人体后主要在肠道内发挥有益作用,因此必须具有较强的耐受胃酸能力,才能以较高的存活性通过胃环境。人体在空腹时胃液 pH 为 2.0 以下,进食后 pH 能达到 3.0 左右^[16-17]。因此试验选定 pH 3.0 和 pH 2.0 进行检验菌株 HCS17-040 的耐酸性能力。结果

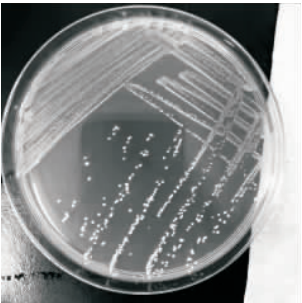


图 1 菌株 HCS17-040 的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strain HCS17-040

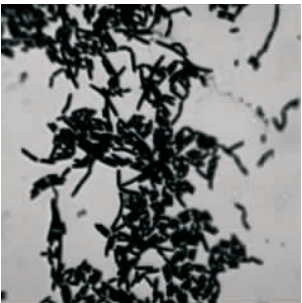


图 2 菌株 HCS17-040 的菌体形态

Figure 2 Morphology of strain HCS17-040 (16×100)

见表 4,副干酪乳杆菌 HCS17-040 菌株经过 pH 3.0 和 pH 2.0 环境下 37 ℃ 培养 17 h,活菌数虽有所下降,但都在 10⁸ CFU/mL 以上,能够满足益生菌在人体内发挥作用的浓度要求(10⁶ 以上)^[18]。菌株存活率分别可达到

表 2 菌株 HCS17-040 生理生化试验结果

Table 2 Physiological and biochemical test results of strain HCS17-040

项目	结果	项目	结果	项目	结果
氧化酶	—	卫茅醇	—	菊糖	+
接触酶	—	肌醇	—	松三糖	+
甘油	—	甘露醇	+	棉子糖	—
赤藓醇	—	山梨醇	+	淀粉	—
D-阿拉伯糖	—	α-甲基-D-甘露糖甙	—	糖原	—
L-阿拉伯糖	—	α-甲基-D-葡萄糖甙	+	木糖醇	—
D-核糖	+	N-乙酰-葡萄糖胺	+	龙胆二糖	+
D-木糖	—	苦杏仁甙	+	D-松二糖	+
L-木糖	—	熊果甙	+	D-来苏糖	—
阿东醇	+	七叶灵	+	D-塔格糖	+
β-甲基-D-木糖甙	—	水杨苷	+	D-岩藻糖	—
D-半乳糖	+	纤维二糖	+	D-阿拉伯糖醇	—
D-葡萄糖	+	麦芽糖	+	L-阿拉伯糖醇	—
D-果糖	+	乳糖	+	葡萄糖酸盐	—
D-甘露糖	+	蜜二糖	—	2-酮基-葡萄糖酸盐	—
L-山梨糖	—	蔗糖	+		
L-鼠李糖	—	海藻糖	+		

表 3 菌株 HCS17-040 的 16S rDNA 序列同源性分析
Table 3 16S rDNA sequence homology analysis of strain HCS17-040

名称	同源性/%
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain ZFM54 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain SRCM103299 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. tolerans strain 7112-2 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> IJH-SONE68 DNA, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain LC355 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain Lpc10 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain EG9 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. paracasei strain TMW 1.1434 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain FAM18149 chromosome, complete genome	100
<i>Lactobacillus paracasei</i> strain TK1501, complete genome	100

表 4 副干酪乳杆菌 HCS17-040 耐酸性试验结果
Table 4 Acid resistance test results of *Lactobacillus paracasei* HCS17-040

pH	活菌数/(CFU · mL ⁻¹)	存活率/%
对照	1.57 × 10 ⁹	——
3.0	1.66 × 10 ⁸	89.39 ± 0.23
2.0	1.05 × 10 ⁸	87.18 ± 0.50

89.39%和87.18%，耐酸能力可能与该菌株双组分信号的调节及酸环境下细胞膜组成变化、蛋白质和 DNA 的损伤修复等耐酸机制有关^[19]，该菌株具有良好的耐受酸环境的能力。

2.4 耐胆盐试验

益生菌能够在肠道内保持存活性，较强的胆汁耐受能力是先决条件。人体肠道胆盐质量浓度通常维持在 0.3~3.0 g/L^[20]，因此试验选用 3 g/L 和 5 g/L 的胆盐质量浓度考察菌株的耐胆盐能力。如表 5 所示，副干酪乳杆菌 HCS17-040 在 5 g/L 的胆盐质量浓度环境中培养 17 h 存活率仍为 92.97%，具有较强的耐胆盐能力，可能是由于该菌株在生长繁殖过程中产生胆盐水解酶来降低胆盐对自身细胞的危害或其表层蛋白对细胞的保护作用等^[21-22]。

2.5 模拟胃液试验

益生菌进入人体内经过胃环境时，胃蛋白酶原能在

表 5 副干酪乳杆菌 HCS17-040 耐胆盐试验结果
Table 5 Bile salt resistance test of *Lactobacillus paracasei* HCS17-040

胆盐浓度/(g · L ⁻¹)	活菌数/(CFU · mL ⁻¹)	存活率/%
对照	1.57 × 10 ⁹	——
3	5.40 × 10 ⁸	94.75 ± 1.76
5	3.55 × 10 ⁸	92.97 ± 1.01

胃液的酸性环境下激活杀死进入胃内的菌体，因此，益生菌不仅需要具有耐酸的能力，还需要能够耐受胃蛋白酶的能力才能存活^[23]。将菌株 HCS17-040 置于人工胃液中作用 3 h，结果见表 6，经过人工胃液作用后活菌数仍在 10⁸ CFU/mL 以上，存活率达到 93.93%，说明其具有较强的耐受胃液的能力，可以较高的活性通过胃环境进入肠道，发挥益生作用。

2.6 模拟肠液试验

肠液中除了含有大量的水分外，还有各种酶、胆汁酸等多种成分，对肠道内的菌群具有多方面的影响^[24]。益生菌耐受肠液的能力也是评价其进入肠道后是否能够保持存活的重要指标。如表 7 所示，副干酪乳杆菌 HCS17-040 菌泥在人工肠液中 37 ℃ 培养 4 h 后，菌株存活率为 99.06%，说明该菌株对肠液具有很强的耐受能力。

3 结论

试验从母乳及顺产的健康婴儿粪便样品中分离筛选出 6 株具有去除甘油三酯能力的乳酸菌，并对其降甘油

表 6 副干酪乳杆菌 HCS17-040 模拟胃液试验结果
Table 6 Results of simulated gastric juice test for *Lactobacillus paracasei* HCS17-040

时间/h	活菌数/(CFU · mL ⁻¹)	存活率/%
0	1.48 × 10 ⁹	——
3	4.15 × 10 ⁸	93.93 ± 0.88

表 7 副干酪乳杆菌 HCS17-040 模拟肠液试验结果
Table 7 Results of simulated intestinal fluid test of *Lactobacillus paracasei* HCS17-040

时间/h	活菌数/(CFU · mL ⁻¹)	存活率/%
0	1.77 × 10 ⁹	——
2	1.58 × 10 ⁹	99.42 ± 0.77
4	1.42 × 10 ⁹	99.06 ± 0.54

三酯的能力分别进行了测定,其中菌株 HCS17-040 的去除能力最强,下降率达 $(42.80 \pm 1.79)\%$ 。通过对其进行形态学鉴定、生理生化鉴定和 16S rDNA 鉴定确定菌株 HCS17-040 为副干酪乳杆菌。菌株 HCS17-040 的耐胃酸环境能力较强,在 pH 3.0,2.0 环境下 37 °C 培养 17 h 后,存活率都能保持在 87% 以上,在人工胃液中作用 3 h,存活率高达 93.93%,说明该菌株能够以较高的存活性通过胃环境进入肠道。胆盐耐受及模拟肠液试验表明,菌株 HCS17-040 具有很强的耐受胆盐及肠液的能力,在 3, 5 g/L 胆盐浓度环境中作用 17 h,菌体存活率均在 92% 以上,在人工肠液中培养 4 h 存活率为 99.06%,该菌株具有较强的耐胆盐及肠液的能力。但试验中副干酪乳杆菌 HCS17-040 的去除甘油三酯能力源于吸收、吸附,还是其他方式有待进一步研究。

参考文献

- [1] REID Gregor. Probiotics: Definition, scope and mechanisms of action[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2016, 30(1): 17-25.
- [2] GAO Y, LI D, LIU S, et al. Probiotic potential of *L. sake* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(1): 45-51.
- [3] 谢明勇, 熊涛, 关倩倩. 益生菌发酵果蔬关键技术研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 1-9.
XIE M Y, XIONG T, GUAN Q Q. Research progress on key technologies of probiotics fermentation of fruits and vegetables[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(10): 1-9.
- [4] DALIRI Eric, Banan-Mwine, LEE Byong H. New perspectives on probiotics in health and disease[J]. Food Science and Human Wellness, 2015, 4(2): 56-65.
- [5] 王笋, 吕嘉彬, 辛博, 等. 西北地区泡菜中乳酸杆菌的生物学特性[J]. 中国调味品, 2014, 39(3): 15-18.
WANG S, LU J L, XIN B, et al. Biological characteristics of lactic acid bacteria from pickles in Northwest of China[J]. China Condiment, 2014, 39(3): 15-18.
- [6] WANG Xin, WU Qing-long, DENG Kan, et al. A novel method for screening of potential probiotics for high adhesion capability[J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(7): 4 310-4 317.
- [7] PACHECO-ORDAZ R, WALL-MEDRANO A, GONI M G, et al. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 66(1): 25-31.
- [8] LEE Y K. Effects of diet on gut microbiota profile and the implications for health and disease[J]. Bioscience of Microbiota, Food and Health, 2013, 32(1): 1-12.
- [9] 陈霞, 熊智强, 夏永军, 等. 益生菌体外降解胆固醇的研究进展[J]. 工业微生物, 2020, 50(4): 52-58.
CHEN X, XIONG Z Q, XIA Y J, et al. Research advance in cholesterol-lowering by probiotics in vitro[J]. Industrial Microbiology, 2020, 50(4): 52-58.
- [10] SARANIYA A, JEEVARATNAM K. In vitro probiotic evaluation of phytase producing *Lactobacillus* species isolated from Uttapam batter and their application in soy milk fermentation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(9): 5 631-5 640.
- [11] 吴慧昊, 牛锋, 钟琦, 等. 高效降胆固醇降甘油三酯乳酸菌的分离鉴定和功能分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 157-162.
WU H H, NIU F, ZHONG Q, et al. Separation, identification and functional analysis of cholesterol-lowering and triglyceride-lowering lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 157-162.
- [12] 高玉荣, 李大鹏, 张凤琴, 等. 传统腊肠中降胆固醇降甘油三酯益生菌的筛选及鉴定[J]. 食品科技, 2020, 45(5): 14-18.
GAO Y R, LI D P, ZHANG F Q, et al. Screening and identification of probiotics with cholesterol and triglyceride-lowering activity from traditional sausage[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(5): 14-18.
- [13] 李纳. 两株益生乳酸菌培养优化及其肠道功能评价[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018: 9.
LI N. Optimization of two probiotic lactic acid bacteria and their evaluation of intestinal function[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2018: 9.
- [14] 卢海鹏. 传统酸奶乳酸菌的鉴定及降胆固醇作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018: 15.
LU H P. Identification and cholesterol lowering effect of lactic acid bacteria from traditional koumiss[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018: 15.
- [15] 王霄鹏, 吕嘉彬, 闫亚梅, 等. 五株乳杆菌益生特性及降脂性能研究[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(9): 11-14.
WANG X P, LU J L, YAN Y M, et al. Research on probiotic properties and lipid-lowering capability of five strains of *Lactobacillus*[J]. China Dairy Industry, 2015, 43(9): 11-14.
- [16] PEREIRA D, 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.
- [17] HUEY S L, MIN T L. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2009, 20(3): 169-175.
- [18] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380-383.
HU A H, AO X L, CHEN C, et al. Research progress on mechanism of lactic acid bacteria acid and bile salt resistance[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 380-383.
- [19] 田原, 季子非, 郭浩南, 等. 副干酪乳杆菌 L1 的安全性及益生性评价[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 120-126.
TIAN Y, JI Z F, GUO H N, et al. Safety and Probiotic Evaluation of *Lactobacillus paracasei* L1[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(12): 120-126.
- [20] KULLAK-UBLICK G A, STIEGER B, MEIER P J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease[J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 322-342.

(下转第 129 页)

- method of apple defects based on machine vision[J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 125-148.
- [6] 薛勇, 王立扬, 张瑜, 等. 基于 GoogleNet 深度迁移学习的苹果缺陷检测方法[J]. 农业机械学报, 2020, 51(7): 30-35.
- XUE Yong, WANG Li-yang, ZHANG Yu, et al. Apple defect detection method based on Google net deep transfer learning[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2020, 51(7): 30-35.
- [7] 夏雪, 孙琦鑫, 侍啸, 等. 基于轻量级无锚点深度卷积神经网络的树上苹果检测模型[J]. 智慧农业(中英文), 2020(1): 99-110.
- XIA Xue, SUN Qi-xin, SHI Xiao, et al. Apple detection model on tree based on lightweight anchor free depth convolution neural network[J]. Intelligent agriculture (Chinese and English), 2020(1): 99-110.
- [8] SANDLER M, HOWARD A, ZHU Meng-long, et al. MobileNetV2: Inverted residuals and linear bottlenecks[C]// Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Salt Lake: IEEE, 2018: 4 510-4 520.
- [9] BAO Wen-xia, YANG Ya-ping, LIANG Dong, et al. Multi-residual module stacked hourglass networks for human pose estimation[J]. Journal of Beijing Institute of Technology, 2020, 29(1): 110-119.
- [10] REN Shao-qing, HE Kai-ming, GRISHICK R, et al. Faster R-CNN: Towards real-time object detection with region proposal networks[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2017, 39(6): 1 137-1 149.
- [11] HE K, GKIOXARI G, DOLLÁR P, et al. Mask R-CNN[C]// Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. Venice: Computer Society, 2017: 2980-298.
- [12] REDMON J, DIVVALA S, GIRSHICK R, et al. You only look once: Unified, real-time object detection[C]// IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Piscataway, NJ: IEEE, 2016: 779-788.
- [13] LIU W, ANGUELOV D, ERHAN D, et al. SSD: Single shot multi-box detector [C]// European Conference on Computer Vision. Springer, Cham: IEEE, 2016: 21-37.
- [14] LIN T Y, GOYAL P, GIRSHICK R, et al. Focal loss for dense object detection [J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis & Machine Intelligence, 2017, 99: 2 999-3 007.
- [15] DUAN K, BAI S, XIE L, et al. Centernet: Keypoint triplets for object detection [J/OL]. arXiv. (2019-04-19) [2021-07-08]. <https://arxiv.org/abs/1904.08189>.
- [16] ZHOU Xing-yi, WANG De-quan, KRAHENBUHL P. Objects as points[J/OL]. arXiv. (2019-04-25) [2021-07-08]. <https://arxiv.org/abs/1904.07850v2>.
- [17] XIAO Bin, WU Hai-ping, WEI Yi-chen. Simple baselines for human pose estimation and tracking [J]. European Conference on Computer Vision: Springer, 2018: 472-487.
- [18] HE Kai-ming, ZHANG Xiang-yu, REN Shao-qing, et al. Deep residual learning for image recognition[C]// Proceedings of IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Las Vegas: IEEE, 2016: 770-778.
- [19] SANDLER M, HOWARD A, ZHU M, et al. Inverted residuals and linear bottlenecks: Mobile networks for classification, detection and segmentation[C]// The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Salt Lake City: IEEE, 2018: 4 510-4 520.
- [20] HOWARD A, SANDLER M, CHU G, et al. Searching for mobilenetv3[C]// Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision. Seoul: [s.n.], 2019: 1 314-1 324.

(上接第 33 页)

- [21] PATEL A K, SINGHANIA R R, PANDEY A, et al. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 162(1): 166-180.
- [22] 朱晓. 乳酸菌表层蛋白的性质、结构与功能[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 29-31.
- ZHU X. The properties, structure and functions of lactic acid bacteria S-layer proteins[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012: 29-31.
- [23] 王今雨, 满朝新, 杨相宜, 等. 植物乳杆菌 NDC75017 的降胆固
- 醇作用[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 243-247.
- WANG J Y, MAN C X, YANG X Y, et al. Cholesterol-lowering capability of probiotic *Lactobacillus plantarum* NDC75017[J]. Food Science, 2013, 34(3): 243-247.
- [24] 张扬, 袁杰利. 模拟消化环境对益生菌制剂的影响[J]. 中国微生物学杂志, 2003, 15(5): 253-255.
- ZHANG Y, YUAN J L. The effect of simulated gastrointestinal circumstance on probiotic [J]. Chinese Journal of Microecology, 2003, 15(5): 253-255.

(上接第 117 页)

- [24] 杜利平, 闫慧娇, 王晓, 等. 牡丹花低温干燥过程中生理特性及功效成分的变化研究[J]. 食品科技, 2016, 41(2): 59-64.
- DU Li-ping, YAN Hui-jiao, WANG Xiao, et al. The physiological property and functional components of peony flower during low temperature drying[J]. Food Science and Technology, 2016, 41(2): 59-64.
- [25] DUAN X, LIU W C, RENG Y, et al. Browning behavior of button mushrooms during microwave freeze-drying [J]. Drying Technology, 2016, 34(11): 1 373-1 379.
- [26] 代建武, 杨升霖, 王杰, 等. 微波真空干燥对香蕉片干燥特性及品质的影响[J]. 农业机械学报, 2020, 51(S1): 493-500.
- DAI Jian-wu, YANG Sheng-lin, WANG Jie, et al. Effect of microwave vacuum drying conditions on drying characteristics and texture structure of banana chips[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(S1): 493-500.
- [27] TEPE T K, TEPE B. The comparison of drying and rehydration characteristics of intermittent-microwave and hot-air dried-apple slices[J]. Heat and Mass Transfer, 2020, 56(11): 3 047-3 057.