

植物乳杆菌发酵乳 对小鼠降胆固醇作用

裘迪红, 黄丽华, 陈哲科, 王妮妮, 戴 苡, 钟要红

(杭州医学院, 浙江杭州 310053)

摘要:目的:利用从泡菜中分离的一株植物乳杆菌制备发酵乳并研究其降血脂功能。方法:采用该植物乳杆菌混合市售发酵剂制备发酵乳,发酵剂与植物乳杆菌接种量分别为0.05% (V/V)和2% (V/V),发酵温度为37℃,时间14 h。采用高血脂模型小鼠研究发酵乳的降血脂功能,将30只小鼠随机分成正常组、对照组和发酵乳组3组,正常组喂基础饲料,对照组和发酵乳组喂高脂饲料,正常组和对照组灌胃生理盐水,发酵乳组灌胃发酵乳,正常组和对照组小鼠饲养14 d后采血,检测血清中的TC、TG含量,小鼠饲养28 d后,测定血清中的TC、TG、LDL-C、HDL-C含量以及肝脏中的TC、TG含量。结果表明:所得发酵乳具有清香、口感好的特点;动物实验显示,小鼠饲养14 d后,与正常组相比,对照组血清中的TC、TG含量显著升高($p < 0.05$),表明高脂模型诱导成功;28 d后,发酵组小鼠血清和肝脏中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)与对照组相比显著降低($p < 0.05$)。微生物检验结果表明,肝脏中没有发现乳酸菌,发酵乳在小鼠体内不会发生肝肠易位现象。结论:含有植物乳杆菌的发酵乳对高脂小鼠具有一定的降血脂功能,可以使小鼠血清和肝脏中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)显著降低($p < 0.05$)。

关键词:植物乳杆菌,发酵乳,高脂血症,降胆固醇作用

Hypocholesterolemic Effect of Yogurt Fermented with *Lactobacillus plantarum* on Mice

QIU Di-hong, HUANG Li-hua, CHEN Zhe-ke, WANG Ni-ni, DAI Yi, ZHONG Yao-hong

(Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Objective: This study aimed at preparation of the fermented milk using *Lactobacillus plantarum* isolated from pickled vegetables and its blood lipid reducing activity was investigated. Methods: The milk was fermented by mixing *Lactobacillus plantarum* with commercially yogurt culture. The inoculum size of commercial yogurt culture and *Lactobacillus plantarum* was 0.05% (v/v) and 2% (v/v), respectively. The fermentation was performed at 37℃ for 14 h. Hyperlipidemia mice model was employed to evaluate the blood lipid-reducing activity of the fermented milk. Thirty mice were randomly divided into three groups: normal group, control group and yogurt group according to serum TC, TG concentrations. Normal group was fed with basic feeding and the other two groups were fed with high fat feeding. Yogurt group was given fermented milk, while the normal and control groups were given physiological saline. Mice of normal group and control groups were taken blood after feeding for 14 d, and TC and TG concentrations in serum were examined. At day 28, serum TC, TG, HDLC and LDLC concentrations were determined. Results: The fermented milk possesses good sensory properties. The total cholesterol and triglyceride levels in the serum of mice significantly increased when compared with those of the control mice ($p < 0.05$) after feeding for 14 d, indicating that hyperlipidemia mice model was successfully induced. The total cholesterol and triglyceride levels in the serum and liver of yogurt group mice significantly decreased when compared with those of the control mice ($p < 0.05$). No lactic acid bacteria was observed in the liver. No hepatointestinal translocation was found for the fermented milk. Conclusion: The milk fermented with *Lactobacillus plantarum* decreased the blood lipid level in hyperlipidemia mice, in which the total cholesterol and triglyceride levels in the serum and liver of mice significantly decreased ($p < 0.05$).

Key words: *Lactobacillus plantarum*; fermented milk; hyperlipidemia; hypocholesterolemic activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)15-0313-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.15.055

引文格式: 裘迪红, 黄丽华, 陈哲科, 等. 植物乳杆菌发酵乳对小鼠降胆固醇作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 313-316.

收稿日期: 2017-10-11

作者简介: 裘迪红(1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 营养与食品卫生, E-mail: 371515334@qq.com。

基金项目: 杭州医学院科研基金项目(2015B05)。

目前,慢性病已经是全球人类健康的重大问题,动脉粥样硬化、高血压、冠心病等心血管疾病已严重威胁着人类的健康,血清中高胆固醇含量是引起众多心血管疾病的重要因素之一,甚至成为导致死亡的首要因素^[1]。目前虽然有许多用于降低胆固醇的药物,但人们更希望能够通过非药物途径来达到降低胆固醇含量的目的。

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)属于乳杆菌科中的乳杆菌属,是人体胃肠道的土著菌群,植物乳杆菌具有维持肠道内菌群平衡^[2]、降低胆固醇水平^[3]、提高机体免疫力、促进营养物质吸收^[4]等多种功能。利用益生菌降低食品和人体血清中的胆固醇,是近20年来随着人们对营养与健康要求的逐渐提高才发展起来的一项新的研究课题,其应用价值也正被越来越多的研究者和企业所看好。因此,国内外学者对植物乳杆菌的分离鉴定及其益生特性进行了大量的研究,植物乳杆菌降低血清中胆固醇的益生特性尤其引人注目,Jeun等研究了植物乳杆菌的降血脂功能,Lye等研究植物乳杆菌的降血脂功能及其机理,Jafari等研究了植物乳杆菌发酵乳的降胆固醇效果^[5-7]。冉冉在藏灵菇源酸奶复合菌发酵剂对大鼠降胆固醇的研究中发现植物乳杆菌对大鼠血清胆固醇有显著的降低作用^[8],王俊国在植物乳杆菌LIP-1对高脂血症大鼠血脂的调节作用的研究中也发现植物乳杆菌有降血脂的功能^[9]。更多的研究者开始关注植物乳杆菌产品的开发以及机理的研究。目前,国内市场尚未出现以降胆固醇功能为主的功能性发酵乳,因此开发降胆固醇发酵乳,对高脂血症的人群进行营养干预,以期达到降低血脂、预防心血管疾病的目的,是预防慢性病的一条途径。

本实验从泡菜中分离出一株体外胆固醇降解率为45%的植物乳杆菌,经过牛乳发酵的风味研究发现,该菌在牛乳培养基中能产生独特的风味,因此把该菌应用到降胆固醇发酵乳的制备中。为缩短发酵时间,采用混合乳酸菌发酵制备发酵乳,为了解其降血脂功能,采用高脂模型小鼠研究发酵乳在体内的降血脂功能,以期将来降胆固醇乳制品的生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜牛乳 蒙牛牌,购于超市;菌种 植物乳杆菌,实验室分离鉴定获得;商业发酵剂(嗜酸链球菌、保加利亚乳杆菌) 北京川修科技有限公司;昆明雄性小鼠 6周龄,体重38~44 g,许可证号SCXK(沪)2012-0002,上海斯莱克实验动物有限责任公司;动物房条件 温度(20±2)℃,湿度78.5%,每天12 h光照,12 h黑暗;基础饲料配方(W/W):面粉20%,米粉10%,玉米20%,麸皮25%,豆料20%,骨粉2%,鱼粉;高脂饲料配方(W/W):基础饲料83.8%,胆固醇1%,猪油10%,牛胆盐0.2%,蛋黄5%;MRS肉汤培养基 航景生物科技有限公司。

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)和高密度脂蛋白(HDL-C)含量试剂

盒 德赛诊断系统(上海)有限公司;0500790S 日立7020 全自动生化分析仪 上海曼普生物科技有限公司;PL4002 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;H-205R 台式高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;QHZ-12A 组合式恒温振荡培养箱 上海沪西分析仪器厂有限公司;HWS 恒温恒湿培养箱 宁波江南仪器厂;LDZX-50KB 立式高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂;紫外分光光度计、FE20 实验室 PH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DK-8D 型电热恒温水浴锅 上海一恒温控科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 植物乳杆菌发酵液的制备 取0.4 mL活化的植物乳杆菌于10 mL MRS肉汤培养基中,37℃摇床培养至菌体浓度约为 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL。

1.2.2 发酵乳的制备 混合菌发酵:新鲜牛乳预热到70℃,于40 MPa下均质,95℃杀菌5 min冷却至37℃,按比例加入植物乳杆菌和商业发酵剂发酵,植物乳杆菌添加比例为2%(v/v),商业发酵剂的添加量为0.05%(v/v),37℃静止培养,14 h后停止发酵,测定发酵乳的pH,同时用选择培养基测定植物乳杆菌活菌数。

1.2.3 高脂模型的建立和灌胃方法 动物分组和饲养安排:小鼠自由饮水,基础饲料饲喂一周后,按体重和TC平均分配原则将小鼠分成正常组、对照组和发酵乳组3组,每组10只。不同处理组喂食情况分别为:正常组:喂基础饲料,每天每只灌胃0.4 mL生理盐水;对照组:喂高脂饲料,每天每只灌胃0.4 mL生理盐水;发酵乳组:喂高脂饲料,每天每只灌胃0.4 mL自制发酵乳。其中,正常组和对照组小鼠饲养14 d后采血,检测TC、TG,评价是否形成高脂血症。小鼠饲养期间,每天保持充足的食物和饮水,期间每天记录小鼠的体重和摄食量。

1.2.4 实验动物的处理与检测方法

1.2.4.1 体重、摄食量和饲料利用率的测定 小鼠饲养期间,每天定时称量摄食量并记录,每周称一次体重,计算饲料利用率:饲料利用率(%) = 体重/摄入量 × 100。

1.2.4.2 血清中TC、TG、LDL-C和HDL-C含量的测定 小鼠饲养28 d禁食12 h,眼眶静脉丛采血,4℃冰箱静置3 h,离心(3000 r/min,15 min,4℃),取血清,试剂盒测定小鼠血清中的TC、TG、LDL-C和HDL-C含量。

1.2.4.3 脏器指数的测定 末次灌胃24 h后,称量体重,立即摘取心脏、肝脏、脾脏和肾脏,生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,与小鼠最终体质量的比值即为脏器指数。

1.2.4.4 肝脏TC、TG含量的测定 把肝脏0.5 g加入5 mL甲醇-氯仿(V/V=2:1)进行研磨,用甲醇氯仿(2:1)混合液收集,定容至10 mL后于45℃水浴1 h,于4℃离心(8000 × g,10 min),取30 μL上清液,用试剂盒测定TC和TG含量。

1.2.4.5 安全性评价 小鼠采血处死后,无菌操作取

出肝脏,称重后,转移到灭菌培养皿,4℃冷藏,30 min 内测定肝脏组织中是否有乳酸菌。具体方法:无菌条件切取肝脏2 g,灭菌 PBS 缓冲溶液(pH6.8)悬浮,均质机均质,溶液涂布 MRS 平板,37℃厌氧培养72 h,观察平板有无菌落。

1.2.5 数据处理 实验结果采用 SPSS 软件进行数据统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p > 0.05$ 表示无显著变化。

2 结果与分析

2.1 发酵乳的制备

由于植物乳杆菌是营养缺陷型菌株,在牛乳中发酵能力差^[10],而商业发酵剂的主要菌株是嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌,具有较强的发酵能力,所以本实验选择混合发酵的方法,在传统的发酵乳发酵过程中添加植物乳杆菌进行协同发酵,以此来提高植物乳杆菌的发酵能力。按植物乳杆菌添加比例为2%,商业发酵剂的添加量为0.05%,加入商业发酵剂和植物乳杆菌,37℃培养14 h后,所得发酵乳口感细腻,组织均匀,有酸奶独特的风味,发酵乳中的植物乳杆菌的活菌数为 10^6 cfu/mL。

2.2 发酵乳对高脂血症小鼠的影响

2.2.1 小鼠的高脂血症模型的建立 如表1所示,在实验14 d后,与正常组相比,对照组小鼠血清中TC、TG显著升高($p < 0.05$),表明高脂模型诱导成功。

2.2.2 发酵乳对高脂小鼠的体重、摄食量、饲料利用率及脏器指数的影响 在整个喂养期间,三组小鼠毛色光洁,食欲正常,均未出现异常体征,未发生自然死亡。由表2和表3可知,发酵乳组小鼠的体重、摄食量、饲料利用率和脏器指数与正常组相比,无显著差异($p > 0.05$),说明植物乳杆菌对小鼠没有毒副作用。对照组的体重、摄食量和饲料利用率比其它

表1 正常组、对照组小鼠血清中的TC、TG含量

Table 1 TC and TG contents in serum of mice innormal group and control group

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
正常组	2.11 ± 0.58	0.80 ± 0.13
对照组	3.93 ± 0.74 *	1.55 ± 0.32 *

注: * 表示与正常组相比,差异显著($p < 0.05$)。

两组显著增高($p < 0.05$)。这进一步说明了本实验高脂模型建立成功。

2.2.3 发酵乳对高脂小鼠血清TC、TG、LDL-C和HDL-C含量的影响 从表4中可以看出,28 d喂养后,与对照组相比,发酵乳组小鼠血清中TC和TG含量显著下降($p < 0.05$),分别降低了43.21%和40.31%,而LDL-C和HDL-C无显著变化($p > 0.05$)。邹华军在发酵泡菜对高脂血症大鼠的干预效果研究中也类似的结论^[11],但是二者降低程度不同。王俊国在植物乳杆菌LIP-1对高脂血症大鼠血脂的调节作用中也发现植物乳杆菌有降血脂的功能,与本文不同之处是其LDL-C降低显著($p < 0.05$),HDL-C升高显著($p < 0.05$)。分析原因主要是植物乳杆菌降胆固醇的效果受很多因素的影响,在发酵乳中的植物乳杆菌与在脱脂乳中的植物乳杆菌由于培养基不同,降血脂的程度也会不同。

2.2.4 发酵乳对高脂小鼠肝脏TC、TG含量的影响 由表5可看出,实验28 d后,与正常组相比,对照组肝脏的TC、TG显著增加($p < 0.05$),与对照组相比,灌胃发酵乳组小鼠肝脏中TC、TG显著下降($p < 0.05$),分别下降了48.95%和31.54%。这说明了饲喂植物乳杆菌发酵乳可以显著减少胆固醇在高脂小鼠肝脏中的积存($p < 0.05$)。但是饲喂植物乳杆菌发酵乳的高脂小鼠中TC和TG含量仍明显高于正常组($p < 0.05$),表明灌胃植物乳杆菌仍不能使高脂小鼠

表2 不同处理组小鼠的体重、摄食量和饲料利用率

Table 2 Body weight, total food intake and food efficiency of mice in different groups

组别	0 d 体重(g)	28 d 体重(g)	体重增量($g \cdot 28 d^{-1}$)	摄食量($g \cdot 28 d^{-1}$)	饲料利用率(%)
正常组	40.92 ± 1.53	46.06 ± 2.46	5.14 ± 1.36	182.00 ± 3.66	2.82 ± 0.75
对照组	40.78 ± 0.80	49.50 ± 3.06 *	8.72 ± 2.58 *	197.12 ± 4.25 *	4.42 ± 1.31 *
发酵乳组	40.94 ± 0.94	47.04 ± 1.02 #	6.10 ± 1.90 #	189.52 ± 3.21 #	2.97 ± 0.92 #

注: * 表示与正常组相比,差异显著($p < 0.05$); #表示与对照组相比,差异显著($p < 0.05$);表4、表5同。

表3 不同处理组小鼠的脏器指数(%)

Table 3 Organ indexes of mice in different groups(%)

组别	心脏质量/体重	肝脏质量/体重	肾脏质量/体重	脾脏质量/体重
正常组	0.47 ± 0.04	5.27 ± 0.41	1.59 ± 0.30	0.27 ± 0.14
对照组	0.48 ± 0.09	5.37 ± 0.78	1.54 ± 0.18	0.24 ± 0.07
发酵乳组	0.47 ± 0.06	5.31 ± 0.33	1.57 ± 0.23	0.27 ± 0.09

表4 不同处理组小鼠血清中的TC、TG、HDL-C、LDL-C含量(mmol/L)

Table 4 TC, TG, HDL-C and LDL-C contents in serum of mice in different groups(mmol/L)

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	2.18 ± 0.98	0.83 ± 0.39	1.83 ± 0.82	0.50 ± 0.29
对照组	4.13 ± 0.73 *	1.56 ± 0.34 *	2.16 ± 0.50	0.63 ± 0.36
发酵组	2.18 ± 0.76 #	0.93 ± 0.21 #	2.18 ± 0.50	0.40 ± 0.33

恢复到正常状态。

表5 不同处理组小鼠肝脏中的TC和TG含量(mg/g)

Table 5 TC and TG contents in liver of mice in different groups(mg/g)

组别	TC	TG
正常组	2.16 ± 0.39	7.69 ± 5.45
对照组	21.17 ± 0.73 *	53.19 ± 22.22 *
发酵乳组	11.02 ± 3.42 **	36.41 ± 11.91 **

2.2.5 肝脏的乳酸菌检测 对实验小鼠肝脏的乳酸菌检测显示,MRS平板上未发现乳酸菌菌落的形成,说明发酵乳在小鼠体内不会发生肝肠易位现象。

3 讨论与结论

目前,许多国内外研究者对乳酸菌降低胆固醇的影响因素和机理进行了研究,观点主要集中在以下3点:a.乳酸菌菌体细胞能够同化吸收胆固醇:体外研究表明,在厌氧的条件下,乳酸菌在含有胆盐的高胆固醇培养基中生长时,菌体细胞可以同化吸收介质中的胆固醇,降低介质中胆固醇的含量。Grill^[12]等发现在含有牛胆盐的高胆固醇培养基中,厌氧条件下,食淀粉乳杆菌细胞具有较强的胆固醇同化能力,可以降低培养基中约50%的胆固醇。b.乳酸菌降解结合态胆酸转变为游离态胆酸,后者由于溶解度下降与胆固醇发生共沉淀反应,从而降低胆固醇含量。Klaver^[13]等研究者认为,乳酸菌对胆固醇的降低作用是因为在酸性条件(pH < 6.0)下,胆固醇与胆盐形成了沉淀,从而降低了培养基中胆固醇的含量。人体内存在脱结合胆酸与胆固醇共沉淀现象,这一作用将阻止胆固醇进入血液循环,避免了血清中高胆固醇的出现。c.其他理论。对双歧杆菌的研究还发现,双歧杆菌通过抑制人体内活化的T细胞,控制新形成的低密度脂蛋白LDL受体,有助于降低血清胆固醇水平^[14]。植物乳杆菌降胆固醇的作用机理是复杂的,反映出来的降胆固醇的效果也是不一样的。只有了解植物乳杆菌降胆固醇机理,才能最大程度地降低血清中的胆固醇。

本实验利用从泡菜中分离的植物乳杆菌制备发酵乳,发酵剂与植物乳杆菌接种量分别为0.05%(V/V)和2%(V/V),发酵温度为37℃,时间14h,发酵乳具有清香、口感好的特点。经动物实验发现发酵乳对高脂小鼠具有一定的降胆固醇效果,高脂小鼠血清中TC和TG含量显著下降($p < 0.05$),而LDL-C和HDL-C含量无显著变化($p > 0.05$)。发酵乳在小鼠体内不会发生肝肠易位现象。为了增强发酵乳对高脂小鼠的降胆固醇能力,提高植物乳杆菌的发酵能力,植物乳杆菌的代谢、降胆固醇机理是今后研究的重点,在此基础上,优化发酵乳工艺条件,生产降胆

固醇发酵乳,对高脂血症人群进行营养干预,预防慢性病,提高全民的健康水平。

参考文献

- [1] Deaton C, Froelicher ES, Wu LH, et al. The global burden of cardiovascular disease [J]. Journal of Cardiovascular Nursing, 2011, 26(4): 5-14.
- [2] 王水泉, 包艳, 董喜梅, 等. 植物乳杆菌的生理功能及应用[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(4): 49-55.
- [3] Man G V, Spoerry A. Study of surfactant and cholesteremia in the Maasai [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1974, 27: 464-469.
- [4] Nguyen TDT, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 358-361.
- [5] Jeun J, Kim SY, Cho SY, et al. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice [J]. Nutrition, 2010, 26: 321-330.
- [6] Lye HS, Rahmat - Ali GR, Liong MT. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(3): 169-175.
- [7] Jafari AA, Larijani B, Majd HA, et al. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects [J]. Journal of Nutrition, Metabolic and Dietetics, 2009, 54(1): 22-27.
- [8] 冉冉, 王世平, 刘慧. 藏灵菇源酸奶负荷均发酵剂对大鼠降胆固醇的研究 [J]. 营养学报, 2009, 31(1): 59-62.
- [9] 王俊国, 孟和毕力格, 包秋华, 等. 植物乳杆菌 LIP-1 对高脂血症大鼠血脂的调节作用 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 6-12.
- [10] 华宝珍, 李莎, 徐爱才, 等. 植物乳杆菌 ST-III 脱脂乳的发酵工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2014, 30(11): 276-284.
- [11] 邹华军, 石磊, 张其圣, 等. 发酵泡菜对高脂血症大鼠的干预效果研究 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(23): 4309-4311.
- [12] Grill JP, Cayuela C, Antoine JM, et al. Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol [J]. Letters in Applied Microbiology, 1990, 31(2): 154-156.
- [13] Klaver FAK, Van Der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 1120-1124.
- [14] Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009, 29(4): 431-438.

欢迎订阅《食品工业科技》