

罗氏乳杆菌无细胞上清培养液移除胆固醇能力的研究

于瑞莉¹, 郭本恒^{1,2*}, 张 灏¹, 吴正钧², 王荫榆²

¹江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122;

²光明乳业股份有限公司技术中心乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436

摘要: 本文探讨了罗氏乳杆菌 DSM122460 无细胞上清培养液 (Cell-Free Supernatant, CFS) 移除胆固醇的能力。采用邻苯二甲醛法测定 DSM122460 和对照菌株 ST-III 发酵过程中及其 CFS 对胆固醇的移除能力, 并研究不同 CFS 浓度下的移除能力。并采用 HPLC 法测定 CFS 对照、热处理组和 pH7.0 组的胆盐水解酶活力, 同时测定其移除胆固醇能力。结果显示, DSM122460 不仅在发酵过程中具有较高的移除胆固醇能力, 其 CFS 也表现出较高的移除能力, CFS 中含有除胆盐水解酶以外的可移除胆固醇的蛋白类成分。这提示可能存在一种乳酸菌移除胆固醇的新机制。

关键词: 罗氏乳杆菌; CFS; 移除胆固醇; BSH; HPLC

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

Cholesterol-Reducing Activity in a Cell-Free Supernatant of *Lactobacillus reuteri*

YU Rui-li¹, GUO Ben-heng^{1,2*}, ZHANG Hao¹, WU Zheng-jun², WANG Yin-yu²

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center of Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China

Abstract: The cholesterol removal ability of cell-free supernatant (CFS) produced by growth of *Lactobacillus reuteri* DSM122460 in MRS broth was investigated. The cholesterol removal ability of *L. reuteri* train DSM122460 as well as *L. plantarum* strain ST-III during growth in MRS and the resulted CFS was assayed by o-phthalaldehyde method, respectively. In order to elucidate the correlation between BSH activity and the cholesterol removal ability of the *Lactobacillus* strains, BSH roles in cholesterol removal were measured by heat treatment and pH adjustment. The remaining BSH activities after various treatments were measured by HPLC. The results showed that *L. reuteri* strain DSM122460 not only had a high ability to remove cholesterol during its growth in MRS broth, it also demonstrated high cholesterol reduction activity in the CFS. Beside the BSH, it was speculated there may be another effective component in the CFS with the ability to remove cholesterol. It suggested that there might be a new mechanism underlying cholesterol reduction by lactic acid bacteria.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; CFS; cholesterol reduction; BSH; HPLC

人体血清中胆固醇含量过高容易引发高血压, 冠心病等心脑血管疾病。国内外的研究表明, 乳酸菌具有较强的移除胆固醇作用。虽然有大量研究发现乳酸菌在体内外具有移除胆固醇的益生功能, 但作用机理尚未定论, 只是提出几种假说: (1) 以 Gilliland^[1]为代表的同化理论者认为乳酸菌细胞直接吸收胆固醇的同化作用; (2) Klaver 和 Vander Meer 认为乳酸菌产生胆盐水解酶 (Bile salt hydrolyase,

BSH) 将结合胆盐分解为游离胆盐, 在酸性 (pH < 6.0) 条件下游离胆盐溶解度降低而与胆固醇发生共同沉淀作用^[2]; (3) 其他机理。

Taranto^[3] 认为罗氏乳杆菌具有较强的移除胆固醇能力, 并进行了深入研究。Younghoon Kim^[4] 发现嗜酸乳杆菌的 CFS 有较好的移除胆固醇能力。本文从 CFS 的角度研究了罗氏乳杆菌移除胆固醇能力, 发现它在无菌体参与和 BSH 失活的条件下仍有移除胆固醇的能力, 这表明罗氏乳杆菌 CFS 中可能含有移除胆固醇的新有效成分。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2010-09-28 接受日期: 2011-02-28

基金项目: 上海市科技委员会乳业生物工程技术研究中心 (09DZ2251400); 上海市科技委员会乳业生物技术国家重点实验室筹建 (10dz2221100)

* 通讯作者 E-mail: guobenheng@brightdairy.com

1.1.1 菌株来源、化学试剂与培养基

菌株来源:罗氏乳杆菌 DSM122460(台湾大学赠送)和植物乳杆菌 ST-III(光明乳业技术中心保藏)。菌株使用前按1%的接种量接种到MRS肉汤,在37℃培养12 h,传代两次进行活化,实验菌株在实验过程中4℃冰箱保存。

邻苯二甲醛、牛磺胆酸钠购自Sigma公司,胆固醇、卵磷脂等其他试剂为国产常规生化纯和分析纯试剂。

MRS培养基:购自德国Merck公司。

MRS-THIO液体培养基:在MRS液体培养基中加入0.2%巯基乙酸钠(THIO)。

胆固醇培养基:MRS-THIO培养基加入一定浓度的胆固醇源。

1.1.2 仪器设备

Avanti J30I 高速冷冻离心机:Beckman Coulter公司;EmusiFlxe-C3 高压细胞破碎仪:加拿大AVES-TIN(奥威斯汀)公司;PHS-25型PH计:奥立龙公司;CE7250型紫外分光光度计:BIO-AQUARIUS公司;Waters 600高相液相色谱:美国Waters公司;JY92-III超声波细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司;Heidolph2旋转蒸发器:德国Heidolph公司。

1.2 实验方法

1.2.1 卵磷脂-胆固醇胶束的制备

根据Razin^[5]等提供的方法制备胆固醇胶束,胆固醇胶束作为胆固醇培养基中的胆固醇源。具体的方法如下:准确称取22 mg卵磷脂和10 mg胆固醇(卵磷脂和胆固醇摩尔比为1.0:0.9)于具塞试管,加入CHCl₃溶剂2 mL,超声波振荡溶解。N₂流吹干溶剂,加入10 mL无菌水。试管放入冰浴,通N₂条件下超声波(130 W,20 kHz)处理15 min,停止5 min保持温度平衡,循环三次;所得的溶液于4℃,38,000×g离心20 min,所得的上清液即为卵磷脂-胆固醇胶束溶液。经0.45 μm膜过滤作为胆固醇源待用,4℃保存,2~3 d内使用,作为胆固醇源用于以下的实验。

1.2.2 胆固醇的测定

按照改良邻苯二甲醛法^[6]测定胆固醇浓度:准确吸取0.5 mL待测胆固醇溶液于具塞试管,加入1.5 mL 95%的乙醇溶液剧烈混匀,加入1 mL 50%的KOH溶液剧烈混匀,60℃水浴皂化10 min,不时振荡试管。冷却至室温,加入2.5 mL正己烷剧烈混

匀,加入1.5 mL无菌水剧烈混匀,静置10 min分层。准确吸取正己烷层1 mL于另一洁净试管,60℃N₂流吹干溶剂,加入2 mL 0.01 mg/mL邻苯二甲醛(冰醋酸)溶液剧烈混匀,室温放置10 min,边振荡边加入2 mL浓H₂SO₄充分混匀。冷却至室温,550 nm处测定吸光度。根据胆固醇标准曲线^[7]计算出胆固醇的含量。

1.2.3 菌体发酵过程中对胆固醇的移除作用

将种子液1%接种于含0.2%牛磺胆酸钠的胆固醇培养基中,放置于37℃恒温培养箱培养24 h,发酵液经12000 g,4℃,离心10 min得到上清液。未接种的含0.2%牛磺胆酸钠的胆固醇培养基做阳性对照,含0.2%牛磺胆酸钠的MRS-THIO培养基作为空白对照。按照方法1.2.2测定未接种培养基和上清液的胆固醇浓度,根据胆固醇标准曲线计算出胆固醇含量,胆固醇移除率的计算公式为:

$$\text{胆固醇移除率}(\%) = \frac{\text{未接种培养基中胆固醇浓度} - \text{上清液中胆固醇浓度}}{\text{未接种培养基中胆固醇浓度}} \times 100\%$$

1.2.4 CFS 移除胆固醇能力^[4]

菌株DSM122460在MRS培养基中37℃培养24 h后,12000 g,4℃离心10 min,收集上清液,0.45 μm膜过滤后即得到CFS,-80℃保存待用。发酵液离心后的菌体沉淀用pH7.0磷酸盐缓冲液洗涤两次,用发酵液1/10体积的磷酸盐缓冲液将菌体沉淀制成悬浮液,经超高压细胞破碎仪破碎细胞,离心后收集细胞裂解物,0.45 μm膜过滤后,-80℃保存备用。将胆固醇胶束、THIO和牛磺胆酸钠加入到CFS或细胞裂解物中,使其终浓度分别为100 μg/mL、0.2%(w/v)和0.2%(w/v)。然后置于37℃恒温培养箱,保温18 h,反应前对照组置于-80℃冰箱暂存,邻苯二甲醛法测反应前后胆固醇浓度。CFS移除胆固醇能力通过反应前后胆固醇的移除率体现。

为了研究CFS不同浓度的移除胆固醇能力,用新鲜MRS培养基将CFS稀释为原有浓度的75%,50%,25%。

1.2.5 BSH对胆固醇移除作用的影响

BSH的活力通过HPLC法测定反应液中牛磺胆酸钠(Sodium taurocholate,TC)的减少量。

将充分恢复活力的供试菌株,按1%接种量接种于MRS培养基中,37℃恒温培养箱培养24 h,

10000 g, 4 °C 离心 10 min, 上清液经过无菌过滤后, CFS 分成 A、B、C 三份, 测其 pH 值。其中, A 先经过 90 °C, 15 min 热处理, 然后 A、B、C 上清培养液按照上清培养液: 甲醇 = 2: 1 的比例缓慢加入预冷的甲醇, 4 °C 放置 1 h, 10000 g, 4 °C 离心 10 min。A、B 用 2 mL NaAc-EDTA 缓冲液 (1 mM EDTA, 50 mM 醋酸钠) 溶解沉淀, 缓冲液 pH 值和上清液 pH 相同, C 用 2 mL pH 为 7.0 的缓冲液溶解, 考马斯亮蓝法测其蛋白浓度。

酶反应: 将 A、B、C 配成蛋白浓度相同的粗酶液, 取粗酶液 500 μ L 加入到含有 0.04 mol/L 牛磺胆酸钠的螺口管中, 37 °C 水浴 30 min, 反应结束后加入 500 μ L 流动相终止反应, 缓冲液做空白对照。

HPLC 色谱条件: Waters Delta 600 HPLC 系统, 高压二元泵、PDA 检测器、在线脱气机; Nova-PakC18 (4 μ m, 3.9 mm \times 150 mm), 检测波长 205 nm, 进样量为 15 μ L。峰面积计算用 Millennium Software V3.2, 牛磺胆酸的流速 1.0 mL/min, 所用有机溶剂均为色谱纯。

流动相 A: 1000 mL 甲醇和 1.2 mL 冰乙酸混合用 5 mol/L 的 NaOH 调其 pH 值为 5.6, **流动相 B:** 1000 mL 去离子水和 1.2 mL 冰乙酸混合用 5 mol/L 的 NaOH 调其 pH 值为 5.6, 通过 0.45 μ m 聚丙烯过滤器抽滤。

1.2.6 CFS 中有效成分的初步鉴定

为了探究 CFS 中发挥移除胆固醇作用的物质, 通过乙醇抽提多糖, 乙酸乙酯萃取脂类和硫酸铵沉淀蛋白的办法进行初步鉴定。在此基础上, 用 12% 三氯乙酸和 0.5% 十二烷基硫酸钠 (dodecyl sulfate, sodium salt, SDS) 处理 CFS 进一步研究有效成分的性质。

乙醇抽提多糖方法如下: 向 CFS 中加入 95% 乙醇, 使其终体积为 75%, 4 °C 静置过夜, 9000 rpm 离心 10 min, 弃去上清, 蒸馏水溶解沉淀, 置于 -20 °C 保存待用。

乙酸乙酯抽提步骤: 按照 CFS 与乙酸乙酯为 3: 1 的关系向 CFS 中加入乙酸乙酯, 倒入分液漏斗中, 充分混匀, 静置待分层, 萃取三次。收集上层液体, 旋转蒸发掉乙酸乙酯后, 蒸馏水溶解剩余物质, 置于 -20 °C 保存待用。

向 CFS 中加入硫酸铵使其饱和度为 60%, 4 °C 静置过夜后, 12000 g 离心 10 min, 沉淀用蒸馏水溶解后 4 °C 透析两天。

CFS 中加入三氯乙酸和 SDS 使其终含量为 12% 和 0.5%, 4 °C 静置 12 h, 离心, 弃去沉淀, 上清液 4 °C 透析两天。

1.3 数据统计与分析

文中数据为三次平行测定值的平均值, 经 one-way ANOVA 分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, Origin 软件 (Origin 7.5, 美国 Origin Lab 公司) 进行数据绘图。

2 结果

2.1 菌体发酵过程、CFS 和细胞裂解物移除胆固醇能力的比较

罗氏乳杆菌和植物乳杆菌都是目前具有较高移除胆固醇能力的乳酸菌。其中 ST-III 的移除胆固醇的机理认为主要是同化作用和沉淀作用共同起作用, 同化作用占主要作用^[8]。如图 1 所示, 同样在菌体发酵过程中具有较高降低胆固醇能力的乳酸菌, ST-III 只在发酵过程时表现出较高的胆固醇移除能力, 移除率为 67.6%, 其 CFS 移除胆固醇能力相对较弱, 只有 9.14%。而 DSM122460 除了在菌体发酵过程中具有很高的胆固醇移除能力, 在无细胞存在时的 CFS 中也有较高的胆固醇移除能力, 移除率为 68.57%。另外, 对 DSM122460 和 ST-III 进行细胞破碎后得到的细胞裂解物按照方法 1.2.4 测定移除胆固醇能力, 发现两者的细胞裂解物基本上不表现移除胆固醇的能力。

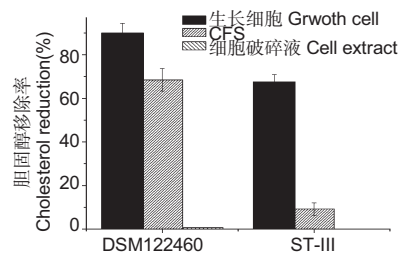


图 1 *L. reuteri* DSM122460 和 *L. plantarum* ST-III 的生长细胞、CFS 和细胞裂解物在含有 0.2% 的牛磺胆酸钠的胆固醇培养基中移除胆固醇能力比较

Fig. 1 Cholesterol removal by Growth (black bars), the Cell-Free Supernatant (CFS, grey bars) and cell extract (pattern bars) in an MRS-THIO Broth Supplemented with 0.2% Sodium Taurocholate, plus cholesterol Micells of *L. reuteri* DSM122460 and *L. plantarum* ST-III

用新鲜 MRS 液体培养基对 CFS 进行梯度稀释,

按照方法 2.1.4 保温。结果显示 CFS 的胆固醇移除能力随着浓度的减少而降低,如图 1 所示。

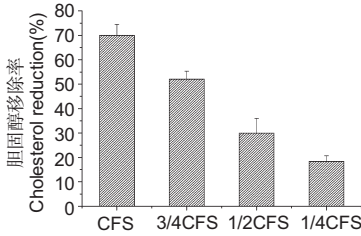


图 2 *L. reuteri* DSM122460 不同浓度 CFS 对移除胆固醇能力的影响

Fig. 2 The effects on Cholesterol Removal by CFS of *L. reuteri* DSM122460 at different concentrations

2.2 BSH 对移除胆固醇能力的影响

自从发现乳酸菌在肠道中可使结合胆盐分解为游离胆盐以来,BSH 被认为在乳酸菌移除胆固醇方面起着关键作用。BSH 将结合胆盐水解为游离胆盐后,游离胆盐需要在酸性条件下(pH < 6.0)才能

和胆固醇发生共沉淀作用,从而起到移除胆固醇的能力。M. P. Taranto^[4]报道罗氏乳杆菌 BSH 为胞内酶,相对分子量为 80 KDa,最适 pH 为 5.2,最适温度为 42 ℃。本文为了研究 BSH 对罗氏乳杆菌的 CFS 移除胆固醇能力的影响,将 CFS 经过加热处理(90 ℃、15 min)和调节体系 pH 值(pH7.0),再观察其移除胆固醇能力的变化,从而推断 BSH 对 *Lb. reuteri* DSM122460 CFS 移除胆固醇能力的影响。

DSM122460 发酵后 CFS 的 pH 值为 4.4,CFS 经过甲醇沉淀提取粗酶液,粗酶液经缓冲液溶解与 TC 反应后用 HPLC 分析残余 TC 的含量,结果如表 1 所示,TC 标准品的出峰时间在 6.7 min 左右出峰,样品组中 6.7 min 左右出的峰是 TC 组分。

TC 浓度的计算公式:空白对照中 TC 标准品的浓度/样品中的 TC 浓度 = TC 标样的峰面积/样品中 TC 的峰面积。BSH 的酶活单位:1U = $\frac{(\text{空白对照 TC} - \text{样品 TC}_{\text{nmol}})}{T(\text{min})}$

表 1 牛磺胆酸钠含量检测结果

Table 1 The result of the detected sodium taurocholate

	出峰时间 Peak time (min)	峰面积 Area (%)	TC (mmol/L)	BSH 活力 BSH activity (U)
TC 空白对照 TC control	6.63 ± 0.08	19.34 ± 0.19	40.00	-
A: CFS 对照 CFS control	6.55 ± 0.07	6.04 ± 0.36	12.49 ± 0.74	458.5 ± 12.3
B: 热处理 Heat treatment	6.27 ± 0.10	14.09 ± 0.89	29.14 ± 1.84	181.0 ± 28.7
C: pH7.0	6.35 ± 0.14	13.32 ± 0.43	27.54 ± 0.98	207.6 ± 16.4

CFS 对照组和经过处理的 CFS 其 BSH 活力和移除胆固醇能力的比较如图 3 所示,CFS 对照组同

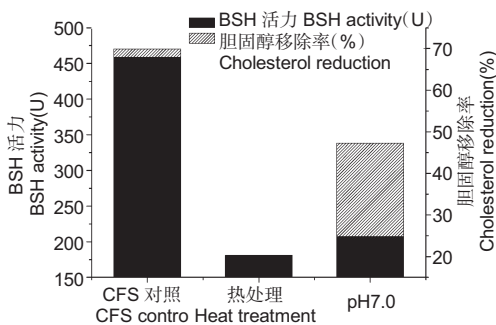


图 3 经过热处理、pH 处理和未处理 CFS 的 BSH 活力和移除胆固醇能力比较

Fig. 3 Effects of Heat, pH Treatment and CFS control on the Cholesterol Reduction (black bars) and BSH Activities (grey bars) of a Cell-Free Supernatant (CFS)

时具有较强移除胆固醇能力和强度相当的 BSH 活力。将 pH 调为 7.0 后,CFS 具有较低的 BSH 活力,此时虽然还有 BSH 活性,但是因为只有在酸性条件下,游离胆盐才能和胆固醇共同沉淀下来,理论上讲 pH7.0 时通过共沉淀作用移除胆固醇的能力应该比较低,但是图 3 中显示 pH7.0 时移除胆固醇的能力仍能保持在 CFS 对照组的 70% 左右;而经过热处理(90 ℃、15 min)的 CFS 尽管残留了较低 BSH 活力,但其胆固醇移除能力几乎丧失殆尽。

2.3 CFS 有效成分的初步鉴定

CFS 乙醇抽提物有 20% 的移除胆固醇能力,乙酸乙酯萃取物只有百分之几的移除能力,硫酸铵沉淀后有 45% 的移除能力。另外,CFS 经过 12% 三氯乙酸或 0.5% SDS 除去蛋白后,基本上没有移除胆固醇能力。

3 讨论

本实验从 CFS 的角度研究罗氏乳杆菌移除胆固醇的能力。实验结果发现罗氏乳杆菌 DSM122460 和植物乳杆菌 ST-III 在发酵过程都具有较好的移除胆固醇能力,但是就对 CFS 而言,罗氏乳杆菌 DSM122460 的移除胆固醇能力要明显强于 ST-III,可达到 68.57% 左右。进一步对 CFS 进行梯度稀释后,结果表明 CFS 的移除胆固醇能力随浓度的降低而降低,证明 CFS 中含有可移除胆固醇的有效成分。

但是罗氏乳杆菌中的 BSH 在体外移除胆固醇的过程中起着非常重要的作用,所以必须排除 CFS 中 BSH 的影响。经过热处理可使 BSH 失去活力,将 CFS 调 pH 为 7.0 时由其起作用的游离胆酸和胆固醇的沉淀作用不容易发生,也可以排除 BSH 的影响。结果显示经过热处理的 CFS 具有较低的 BSH 活性和移除胆固醇能力,pH 为 7.0 的 CFS 在具有较低 BSH 活性的情况下仍然具有较高的移除胆固醇能力,可以表明 CFS 中除了 BSH 以外还有可以移除胆固醇的有效成分。CFS 经过盐析后的蛋白沉淀有较高的移除胆固醇能力,但经过 SDS 和三氯乙酸除蛋白后,基本没有移除胆固醇的能力,既可证明 CFS 中此有效成分为蛋白质类。

后续工作将致力于研究此有效成分的分离,进一步纯化并提取出该物质,并分析其移除胆固醇的作用机理。

参考文献

- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49:377-381.
- Klaver FR, Vander Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59:1120-1124.
- Taranto MP, Sesma F, De Valdez GF. Bile salt hydrolase plays a key role on cholesterol removal by *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol Lett*, 1997, 19:845-847.
- Kim Y, Whang JY, Whang KY, et al. Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72:1483-1490.
- Razin S, Kutner S, Efrati H, et al. Phospholipid and cholesterol uptake by mycoplasma cells and membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 598:628-640.
- Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res*, 1973, 14:364-366.
- Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci*, 1990, 3:905-911.
- Liu J(刘娟), Wang YY(王荫榆), Wu ZJ(吴正钧), et al. Study on mechanism of cholesterol removal by *Lactobacillus plantarum* ST-III Strain. *Ind Microbiol* (工业微生物), 2008, 38(5):71-91.
- Wang XG, Wang HR, Hu XJ. Extraction and analysis of *Actinidia chinensis* seed oil. *China Oils Fats*, 2004, 29(5):58-60.
- Zhang YS, Zhao YW. Comparison of four extraction methods on Chinese gooseberry seed oil yield. *J Chin Cereals Oils Assoc*, 2007, 22:76-78.
- Susana PA, Cabrita ARJ, Antonio JMF, et al. Improved method for fatty acid analysis in herbage based on direct transesterification followed by solid-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2008, 1209:212-219.
- Mulder C, Schouten JA, Poppensnijders C. Determination of free fatty acids: A comparative study of the enzymatic versus the gas chromatographic and the colorimetric method. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1983, 21:823-827.
- Juarez M, Polvillo O, Conto M, et al. Comparison of four extraction/methylation analytical methods to measure fatty acid composition by gas chromatography in meat. *J Chromatogr A*, 2008, 1190:327-332.

(上接第 75 页)