

## 屎肠球菌降胆固醇作用的初步研究

吴边<sup>1,2</sup>, 柳陈坚<sup>3</sup>, 李雅迪<sup>3</sup>, 尚云<sup>1,2</sup>, 李晓然<sup>3\*</sup>

(1. 云南省第一人民医院 普外二科, 中国云南 昆明 650032; 2. 昆明理工大学附属医院 普外二科, 中国云南 昆明 650032;  
3. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 中国云南 昆明 650500)

**摘要:** 血液中胆固醇含量增加会严重威胁人类健康。利用皂化-比色法检测了22株屎肠球菌菌株体外降胆固醇的能力, 结果显示屎肠球菌的胆固醇去除率在85.93%~21.25%之间。选取3株胆盐耐受能力较好的菌进行后续研究, 其中, 屎肠球菌SP5-6L的耐酸能力较差; JS2和ML13-5菌株具有一定的耐酸和耐胆盐能力; 3株菌株的胆盐水解酶活性都很高。在0.3%胆盐培养基中, 屎肠球菌的胆固醇去除率不同, 其中ML13-5菌株的去除率由52.71%增加到68.01%。此外, 屎肠球菌无溶血性, 但其抗药性各有不同。本文对屎肠球菌降低胆固醇的机制进行了初步研究, 为进一步利用其开发相关功能性食品和药物提供了依据。

**关键词:** 屎肠球菌; 胆固醇; 耐酸耐胆盐; 抗药性; 安全性

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2018)04-0305-06

## Preliminary Study on Cholesterol Reduction by *Enterococcus faecium*

WU Bian<sup>1,2</sup>, LIU Chen-jian<sup>3</sup>, LI Ya-di<sup>3</sup>, SHANG Yun<sup>1,2</sup>, LI Xiao-ran<sup>3\*</sup>

(1. Department of General Surgery, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan, China; 2. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, Yunnan, China; 3. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, Yunnan, China)

**Abstract:** High blood cholesterol is a serious threat to human health. The cholesterol-reducing rates of 22 *Enterococcus faecium* strains were screened by the saponification-colorimetric method *in vitro*, and were found to range from 85.93%~21.25%. Three strains with better bile salt tolerant activity were selected for further studies. Among them, the acid resistance of *E. faecium* SP5-6L was poor while strains JS2 and ML13-5 were able to survive at pH 2.0 and pH 3.0 for 3 h and in 0.3%, 0.5% and 1% bile salt for 12 h without losing their viability. All three strains had a high activity of bile salt hydrolase. The cholesterol-reducing rate of strain ML13-5 was increased from 52.71% to 68.01% at 0.3% bile salt. In addition, three strains had no hemolysis, but with a different sensitivity to ten kinds of antibiotics. This preliminary study on the mechanism of cholesterol reduction by *E. faecium* provides basis for its further utilization and for development of related functional foods and drugs.

**Key words:** *Enterococcus faecium*; cholesterol; acid and bile salt resistance; drug resistance; security

(*Life Science Research*, 2018, 22(4): 305~310)

物质生活水平的不断提高改变了人类的饮食方式, 高蛋白高脂肪的饮食给人类健康带来了越来越多的负面影响。其中, 心脑血管疾病已经

成为威胁人类健康的一大重要因素<sup>[1]</sup>。血清胆固醇含量过高被认为是诱发高血压、冠心病等心血管疾病的重要因素, 降低血清胆固醇水平直接关系

收稿日期: 2018-01-02; 修回日期: 2018-06-01

基金项目: 昆明理工大学学科方向团队(14078326); 云南省科技厅—昆明医科大学应用基础研究联合专项项目[2017FE468-(122)]

作者简介: 吴边(1981-), 男, 云南昆明人, 硕士, 主治医师, 主要从事消化外科、功能性食品等方面的研究, E-mail: 6026170@qq.com; \* 通讯作者: 李晓然(1984-), 女, 河北衡水人, 博士, 昆明理工大学副教授, 主要从事微生物学方面的研究, E-mail: starkeyran@163.com。

到人类的健康水平<sup>[2,3]</sup>。目前,常用的降固醇药物可以有效降低血管中的胆固醇含量<sup>[4]</sup>。例如,他汀类药物能有效抑制体内胆固醇的从头合成途径,已被广泛应用于临床治疗。然而他汀类药物在临床上依然存在着一定比例的副作用和不确定性,尤其是在高剂量使用时<sup>[5]</sup>。例如,他汀类药物可导致横纹肌溶解症与肝脏细胞损伤,进而破坏机体内新陈代谢系统的功能<sup>[6]</sup>。因此,找寻可以增加治疗范围且毒副作用小的方法势在必行。

国内外大量研究表明,某些益生菌可有效降低生存环境中的胆固醇含量,且因其副作用小等优点一直以来成为益生菌相关研究的热点,然而大多数研究均集中于乳杆菌属<sup>[7,8]</sup>,对肠球菌属的研究相对较少。Divyashri等<sup>[9]</sup>研究证明, *Enterococcus faecium* CFR 3003 菌株在模拟胃肠道环境下,具有良好的生存能力和生化特性,但未对该菌株是否具有降胆固醇能力进行深入研究。

本研究首先检测了22株分离自云南传统发酵食品的屎肠球菌(*E. faecium*)的降胆固醇能力,并从中筛选出3株降胆固醇能力较佳的菌株,分析其耐酸耐胆盐能力、溶血性能、对抗生素的敏感程度、胆盐水解酶活性,以初步分析其胆固醇降解机制,为后续降胆固醇功能性发酵食品的研发提供菌种保证和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究所使用的22株屎肠球菌均保藏于昆明理工大学生命科学与技术学院应用微生物研究室。

实验用主要培养基: MRS肉汤培养基(pH 6.2±0.2, OXOID公司,英国); MRS改良培养基,该培养基以胆固醇代替葡萄糖作为培养基中唯一碳源,胆固醇浓度为0.192 mg/mL,其余MRS培养基组分和比例不变; MH培养基(广东环凯微生物科技有限公司); BHI培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司)。

实验用主要试剂: 胆固醇(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 甲醇(色谱纯,美国MREDA公司); 分析纯,东营天正化工有限公司); 浓硫酸(重庆川东化工集团有限公司); 牛胆盐(北京奥博星生物技术有限责任公司); 无菌脱纤维羊血(广州蕊特生物科技有限公司); 异丙醇(天津风船化学试剂科技有限公司); 甘氨酸胆酸钠(上海源叶生物科技有限公

司); 牛磺胆酸钠(TCI公司,日本)。

实验用主要溶液: FeSO<sub>4</sub>-冰乙酸-浓硫酸显色剂,将FeSO<sub>4</sub> 100 mg溶于1 mL蒸馏水中,再加入100 mL冰乙酸混合溶解,然后与100 mL浓硫酸缓慢混匀,冷却后备用; 胆固醇标准液,精确称取0.192 g胆固醇,用蒸馏水定容至1 L,即得浓度0.192 mg/mL的胆固醇标准液,然后梯度稀释得浓度依次为0 mg/mL、0.048 mg/mL、0.096 mg/mL、0.144 mg/mL、0.192 mg/mL的标准液; 甘氨酸胆酸钠标准液,精确称取0.004 9 g甘氨酸胆酸钠溶解于10 mL的甲醇中,即得浓度为1 mmol/L目标溶液,然后梯度稀释得浓度依次为0.8 mmol/L、0.6 mmol/L、0.4 mmol/L、0.2 mmol/L的标准液。

### 1.2 仪器与设备

恒温摇床(ZHWY-200D,上海智诚分析仪器有限公司); 电子分析天平(SI-234, Sartorius公司,德国); 超声波细胞破碎机(SCIENTZ-IIID,宁波新芝生物科技股份有限公司); PCR仪(PCR system 2720, ABI公司,新加坡); 高速冷冻离心机(3-18K, Sigma公司,德国); 紫外分光光度计(GENOVA公司,英国); 恒温水浴槽(KTS-2346 AS ONE,日本); YP-1002N电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); 金属浴(FUNAKOSHI公司,日本); HPLC仪和反相柱(Agilent Technologies Inc., 美国)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株复壮

将菌株用MRS液体培养基复壮两次后,当各菌株活菌数达到10<sup>12</sup> cfu/mL时,按4%接种量将菌株接种至特定的MRS液体培养基中,37℃静置培养至所需的时间。

#### 1.3.2 降胆固醇功能性屎肠球菌的测定

利用略作改良的皂化-比色法<sup>[10]</sup>对22株屎肠球菌的降胆固醇能力进行检测。将复壮后的菌株接种至50 mL MRS改良培养基中,37℃静置培养72 h,然后按照皂化-比色法处理并于490 nm波长下测定被测样品的OD值。同法处理胆固醇标准液,以胆固醇标准液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,最终根据被测样品的吸光度值计算样品中胆固醇含量,并以公式计算被测菌株的胆固醇去除率:  $R_c = (a-b)/a \times 100\%$ ,其中a表示培养基初始培养时的胆固醇浓度,b表示培养结束后培养液中胆固醇浓度。从得到的结果中,筛选出3株降解能力较佳的菌株进行后续研究。

### 1.3.3 屎肠球菌耐酸和耐胆盐能力的检测

利用平板计数法对3株屎肠球菌的耐酸能力进行检测,具体操作步骤参照已有文献<sup>[11]</sup>进行:将复壮后的菌株接种至pH分别为2.0和3.0的新鲜MRS液体培养基中,37℃静置培养3h。在0h、1h、2h、3h时间点分别吸取100μL菌液调节pH至6.2(与MRS培养基相同)后涂布于MRS琼脂培养基上,37℃静置培养24h左右,记录菌落数。

耐胆盐能力检测同上,即复壮后的菌株分别接种至含不同胆盐浓度的MRS液体培养基中,胆盐质量浓度分别为:0.3%、0.5%、1%,静置培养后涂布于MRS琼脂培养基上培养,记录菌落总数,不含有胆盐的无菌水作为空白对照。

### 1.3.4 屎肠球菌胆盐水解酶(bile salt hydrolase, BSH)活性的检测

利用高效液相色谱法检测3株屎肠球菌的BSH活性<sup>[12]</sup>。样品前处理方法如下:将复壮后的菌株接种至含有1mmol/L的甘氨酸钠和牛磺胆酸钠的新鲜MRS液体培养基中,37℃静置培养24h后,在1mL样品中加入6mol/L HCl使样品酸化(终止BSH活性反应)。甘氨酸钠作为标准品被测定。在1mL样品中加入4mL异丙醇,充分混匀10min,然后在11641r/min下离心10min,随后将4mL上层有机相移至干净的试管内,在85℃下蒸发溶剂,随后将胆盐提取物重新溶解在800μL甲醇中,再用0.45μm过滤器过滤,保存在-20℃以备后续检测。

色谱条件:溶剂A为HPLC专用甲醇;溶剂B为0.01mol/L乙酸钠(用磷酸调节pH至4.3),含有65%甲醇。流动相为35%溶剂A和65%溶剂B,无梯度洗脱,流速为1mL/min。注射样品:10μL,紫外线波长检测为202nm;保留时间为10min。以甘氨酸钠标准液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。最终根据被测样品的峰面积计算培养基中甘氨酸钠的含量,并以公式计算检测菌株对甘氨酸钠的降解率: $R_s = (c - d) / c \times 100\%$ ,其中c表示培养基初始培养时的甘氨酸钠浓度,d表示培养结束后培养基中甘氨酸钠浓度。

### 1.3.5 屎肠球菌降胆固醇能力的检测

在含有胆盐的MRS液体培养基中培养3株屎肠球菌,利用略作改良的皂化-比色法检测其降解胆固醇的能力。然后将复壮后的菌株接种至50mL胆盐浓度为0.3%的MRS改良培养基中,

在37℃下静置培养72h后,利用皂化-比色法测定培养基上清液中胆固醇的含量,从而测定菌株降解胆固醇的能力是否发生改变。

### 1.3.6 屎肠球菌的安全性评估

屎肠球菌溶血性试验<sup>[13]</sup>:将复壮后的菌株按平板法接种于含5%的无脱纤维蛋白羊血的BHI培养基中,37℃培养48h,随后观察菌株的溶血情况。金黄色葡萄球菌作为阳性对照。

屎肠球菌抗药性检测:利用略作改良的琼脂扩散法(NCCLS 2003)检测屎肠球菌的抗药性。具体步骤如下:取复壮后的菌液1mL离心,得到菌体沉淀,用无菌生理盐水洗涤菌体沉淀2次后,重新悬浮菌液。然后,取适量的菌液按平板法涂布于MH琼脂培养基中。待平板凝固后用无菌镊子取药敏纸片贴于平板表面,37℃培养24h后,测量抑菌圈直径。以大肠埃希菌ATCC 25922(菌株保藏于昆明理工大学应用微生物实验室)作为标准质控菌。

## 1.4 数据处理与分析

本研所得实验数据经Microsoft Excel 2010及RSD值计算统计软件处理,所得平均值和标准偏差均由两个以上样品的测量结果经计算得到,结果均以平均值±标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 屎肠球菌降解胆固醇的能力

以胆固醇标准浓度为横坐标,490nm下的吸光度值为纵坐标进行线性回归分析,得线性回归方程 $y = 1.792x + 1.45 \times 10^{-6}$ , $R = 0.999$  ( $R^2 = 0.9997$ )。如表1所示,这22株屎肠球菌均具有体外降解胆固醇的能力,其降解能力为85.93%~21.25%。其中SP5-6L菌株的体外降解率高达85.93%,与其他研究菌株相比,具有一定的胆固醇降解优势。

为了探讨上述菌株在体内应用的可能性,对其进行了耐酸耐胆盐试验。其中,多数菌株在胆盐条件下不能很好的生存。故文中主要选取在胆盐条件下生长良好的3株菌(SP5-6L、JS2和ML13-5)进行后续实验。SP5-6L菌株在含有胆盐的MRS液体培养基中胆固醇降解率为45.55%,与之前不含胆盐时的降解率相比,显著降低(图1),这可能是因为该菌株虽然可以耐受一定浓度的胆盐,但是其生长还是受到胆盐的影响,所以在培养过程中,活菌数也显著减少,从而造成其胆固醇降解率大幅度降低。而JS2菌株与ML13-5菌株在胆盐存

表 1 屎肠球菌降解胆固醇能力  
Table 1 The cholesterol-reducing ability of 22 *E. faecium* strains

Strains	OD <sub>490 nm</sub>	S/(mg·mL <sup>-1</sup> )	E/(mg·mL <sup>-1</sup> )	R/(%)
SP5-6L	0.015	0.027	0.165	85.93±0.38
YYH4-3L	0.020	0.036	0.156	81.37±0.42
JS2-2	0.022	0.040	0.152	79.20±0.04
LCH5-1L	0.023	0.040	0.152	78.95±0.90
JS9-1	0.024	0.042	0.150	78.15±1.07
SP3-2	0.028	0.052	0.140	72.95±1.08
SP5-1	0.033	0.059	0.133	69.35±0.33
SP5-4L	0.034	0.062	0.130	67.59±0.86
YYH4-2L	0.038	0.067	0.125	65.10±0.82
JS2	0.041	0.074	0.118	61.48±0.40
JS10-5L	0.045	0.080	0.112	58.58±0.69
ML1-2L	0.045	0.080	0.112	58.58±0.69
JS10-10L	0.046	0.082	0.110	57.44±0.38
ML13-5	0.050	0.091	0.101	52.71±1.11
JS5-12L	0.052	0.091	0.101	52.47±1.15
ML1-3L	0.052	0.091	0.098	51.22±0.62
LCH5-5L	0.056	0.100	0.092	47.90±0.12
KY2-3L	0.057	0.113	0.079	41.24±8.23
YYH4-5L	0.076	0.130	0.062	32.25±3.75
SP7-1	0.076	0.130	0.052	27.04±3.62
JS12-6L	0.080	0.148	0.044	23.12±3.96
JS7-6L	0.087	0.151	0.041	21.25±2.50

注: S: 发酵上清的胆固醇质量浓度; E: 菌株的胆固醇去除量; R: 菌株的胆固醇去除率; 表中数值均为 3 次实验的平均值, 即  $n=3$ 。

Notes: S: The concentration of cholesterol in the fermentation supernatant; E: The cholesterol removal amount; R: The cholesterol removal rate. The average value in the table is the mean value of the 3 tests,  $n=3$ .

在情况下, 虽然其胆固醇去除率有一定升高, 但涨幅不明显(图 1)。Ilavenil 等<sup>[14]</sup>的研究表明, 戊糖小球菌 KCC-23 菌株在含有 0.3%胆盐培养时, 其胆固醇的去除率可达到 70%左右。这与本文结果并不一致, 可见, 本研究中 3 株菌降解胆固醇的原理可能并不是通过 BSH 催化胆盐由结合型转变成游离型进而沉淀胆固醇, 具体的机制还需要进一步研究。

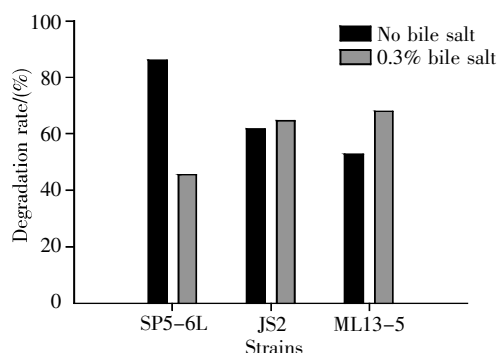


图 1 培养基中有无胆盐对 3 株菌株降解胆固醇能力的影响  
Fig.1 Influence of the bile salt on the cholesterol-reducing ability of the probiotics

## 2.2 屎肠球菌耐酸耐胆盐能力和 BSH 活性

通过在培养基中添加不同的酸和胆盐浓度来探讨酸和胆盐对这 3 株菌生长的影响。在前述结果(表 1)中, SP5-6L 菌株具有最高的胆固醇去除率(85.93%), 但是进一步的实验显示: 其无法耐受酸的影响, 胆盐浓度也会影响其生长, log cfu/mL 值由 13.03 降到 7.56 (表 2)。另外两株菌的生长也受到酸和胆盐的一定影响, 在 pH 3.0 以及不同的胆盐浓度下, JS2 菌株的活菌数降低至 50%左右; ML13-5 菌株受到酸的影响要大于胆盐, 在酸性条件下, 其活菌数大约下降至 50%左右, 而在不同浓度的胆盐下, 活菌数还能有原来的 70%以上(表 2)。在 Mandal 等<sup>[15]</sup>的研究中, 乳酸片球菌的生长也受到酸的影响, 说明体内较低的 pH 还是会对益生菌造成较大影响。

多数学者认为, 细菌中存在几种胆固醇降解机制, 其中一种机制是胆固醇的溶解度取决于胆盐的溶解度, 菌株的 BSH 可以催化结合型胆盐转变成游离性胆盐, 而后者可以与甘氨酸钠或牛磺胆酸钠结合形成沉淀, 并由粪便排出体外, 从而降低胆固醇含量<sup>[15]</sup>。这提示, 甘氨酸钠的含量

表2 尿肠球菌的耐酸耐胆盐能力(log cfu/mL)  
Table 2 Acid and bile salt tolerance of *E. faecium* strains (log cfu/mL)

Strains	Initial biomass	Acid-fast ability		Bile salt tolerance		
		pH 2.0	pH 3.0	0.3%	0.5%	1%
SP5-6L	13.03±0.05	-	-	7.56±0.01	7.17±0.08	-
JS2	12.50±0.07	-	6.75±0.06	6.84±0.07	6.88±0.09	7.29±0.02
ML13-5	12.27±0.30	6.75±0.08	6.68±0.05	9.06±0.07	9.88±0.10	9.37±0.83

注:表中数值均为3次实验的平均值,即  $n=3$ ;“-”表示菌株几乎没有生长。

Notes: All the values in the table are the average of 3 tests,  $n=3$ ;“-” indicates that the strain had almost no growth.

变化可以从侧面反映菌株 BSH 活性的变化。表3的结果显示,在 SP5-6L、JS2、ML13-5 这3种菌株培养后培养基中的甘氨酸胆酸钠浓度大大降低,由 1 mmol/L 降低到  $0.28\pm 0.05$  mmol/L,由此证明这3株菌具有较强的 BSH 活性。Anandharaj 等<sup>[16]</sup>研究证实乳杆菌属的菌株在含有甘氨酸胆酸钠的环境培养后,甘氨酸胆酸钠的浓度也从 6 mmol/L 降低至  $1.25\pm 0.12$  mmol/L,由此证实这3株尿肠球菌具有 BSH 活性,且在胆盐存在条件下,仍然具有一定的水解活性。

表3 尿肠球菌中胆盐的溶解度  
Table 3 The activity of BSH of probiotics

Strains	I/(mmol·L <sup>-1</sup> )	E/(mmol·L <sup>-1</sup> )	Degradation rate/(%)
SP5-6L	1	0.28±0	72
JS2	1	0.33±0.03	67
ML13-5	1	0.23±0.04	77

注:表中数值均为3次实验的平均值,即  $n=3$ ;“I”表示培养基初始培养时的甘氨酸胆酸钠浓度,“E”表示培养结束后培养基中甘氨酸胆酸钠浓度。

Notes: The average values in the table are the average of 3 tests,  $n=3$ ;“I” indicates the concentration of sodium glycocholate in the initial medium;“E” indicates the concentration of sodium glycocholate in the medium after culturing.

### 2.3 尿肠球菌的安全性

溶血性试验表明,文中所选3种尿肠球菌均无溶血性,都不会引起红细胞破裂,也不会产生溶血环,说明这3株菌不产生溶血素,对人体相对安全(图2)。

尿肠球菌对抗生素的敏感性测试结果表明,这3株菌对万古霉素、诺氟沙星具有抗性,SP5-6L菌株和JS2菌株对链霉素、庆大霉素具有敏感性。此外,SP5-6L菌株对氨苄青霉素具有抗性,而对其他5种抗生素表现为中间抗性;JS2菌株对四环素具有敏感性,对利福平具有抗性,而对其他4种抗生素表现为中间抗性;ML13-5菌株对氨苄青霉素具有敏感性,对链霉素表现为中间抗性,而对其他6种抗生素具有抗性(表4)。

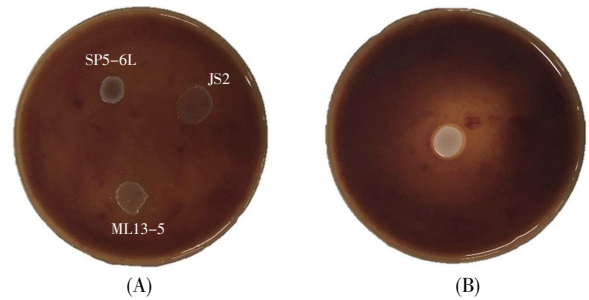


图2 三株尿肠球菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)的细菌溶血试验

Fig.2 The hemolysis of the three *E. faecium* strains (A) and the *Staphylococcus aureus* strain (B)

表4 尿肠球菌的抗药性  
Table 4 The antibiotic resistance of *E. faecium*

Antibiotics	SP5-6L	JS2	ML13-5
Ampicillin (10 μg)	R	I	S
Norfloracin (10 μg)	R	R	R
Tetracycline (30 μg)	I	S	R
Chloramphenicol (30 μg)	I	I	R
Rifampicin (5 μg)	I	R	R
Vancomycin (10 μg)	R	R	R
Erythromycin (5 μg)	I	I	R
Streptomycin (10 μg)	S	S	I
Gentamycin (10 μg)	S	S	R
Teicoplanin (30 μg)	I	I	R

注:R:抗性;I:中间抗性;S:敏感性。

Notes: R: Resistance; I: Intermediate resistance; S: Sensitivity.

### 3 结论

心脑血管疾病一直以来威胁着人类健康,探索其有效的预防和治疗方法迫在眉睫。经过半个世纪的研究和探讨,已有充分的证据证明乳酸菌可以有效降低动物或人体胆固醇水平<sup>[17-19]</sup>。目前提出的乳酸菌降低胆固醇的作用机制假说之一是:细菌产生的BSH催化结合型胆盐转变成游离型胆盐,后者与胆固醇结合以沉淀形式排出体外,从而达到降低人体内胆固醇水平的目的<sup>[7, 20, 21]</sup>。

本研究所选用的22株尿肠球菌具有不同程度的体外降解胆固醇能力(表1)。根据胆盐耐受能

力选取 3 株菌进行进一步研究,结果显示,所选用的 3 株屎肠球菌都有较强的 BSH 活性(表 3),表明传统发酵食品中可能存在大量具有胆固醇降解能力的屎肠球菌及其他种益生菌,在对这些菌株进行系统研究后开发具有降胆固醇能力的健康食品是非常有必要的。

在模拟胃酸环境下,SP5-6L 菌株几乎无法生长,由此证明该菌株耐酸能力较差,而 JS2 菌株与 ML13-5 菌株的活菌数虽然较初始培养时减少一半(表 2),但还是可以证明这两株菌具有一定的耐酸性,在体内有潜力通过胃酸的极端环境而到达肠道。SP5-6L 菌株耐胆盐能力较差(表 2),这可能是由于 BSH 催化胆盐变成胆汁酸,降低了培养基中的 pH(培养后 pH 为 4.3),而 SP5-6L 菌株的耐酸能力较差,这样活菌数显著减少,胆固醇的去除率也随之降低。此外,在培养基中添加胆盐后发现,JS2 菌株的胆固醇去除率无任何变化,而 ML13-5 菌株的去除率则增长 16%,可能的原因是:屎肠球菌可以产生一定的有机酸,在酸性条件下,胆固醇与胆汁盐共沉淀使得胆固醇水平降低<sup>[22]</sup>。

肠球菌在食物防腐和发酵方面发挥关键作用,而且可在人体和哺乳动物的肠道中产生益生元<sup>[23]</sup>,但是该菌种有时也会引发一些人类疾病,诸如菌血症、心内膜炎等感染病症<sup>[9, 24]</sup>。因此,本文对 SP5-6L、JS2、ML13-5 这 3 株菌实施了溶血性试验和抗药性测试。结果证明这 3 株菌无溶血性,但是它们对 10 种抗生素的敏感性不尽相同,其中,ML13-5 菌株对 10 种抗生素都具有一定抗药性。因此,虽然本研究对这些菌株的安全性做了相应试验,但是远远不能说明这些菌株能作为食品或药品发酵菌株投入到相应的生产中。待今后对其危害性进行进一步评估后才能考虑是否可将这些菌株投入到相应的生产应用中。

### 参考文献(References):

- [1] 牛治霞,刘恩梅,李晓东,等. 益生菌中胆盐水解酶(BSHs)研究进展[J]. 中国乳品工业(Niu Zhi-xia, Liu En-mei, Li Xiaodong, et al. Study progress of the bile salt hydrolyses enzymes (BSHs) *in vivo*[J]. China Dairy Industry), 2007, 35(9): 35-40.
- [2] 胡勇,文晓荣,常自超,等. 降胆固醇乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国乳品工业(Hu Yong, Wen Xiao-rong, Chang Zi-chao, et al. Isolation and identification of cholesterol-reducing lactic acid bacteria[J]. China Dairy Industry), 2015, 43(2): 20-23.
- [3] 赵佳锐,杨虹. 益生菌降解胆固醇的作用及机理研究进展[J]. 微生物学报(Zhao Jia-rui, Yang Hong. Progress in the effect of probiotics on cholesterol and its mechanism[J]. Acta Microbiologica Sinica), 2005, 45(2): 315-319.
- [4] Uto-Kondo H, Ayaori M, Sotherden G M, et al. Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014, 1841(9): 1247-1255.
- [5] Toth P P, Patti A M, Giglio R V, et al. Management of statin intolerance in 2018: still more questions than answers[J]. American Journal of Cardiovascular Drugs, 2018, 18(3): 157-173.
- [6] Nguyen K A, Li L, Lu D, et al. A comprehensive review and meta-analysis of risk factors for statin-induced myopathy[J]. European Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 74(9): 1099-1109.
- [7] Kim D H, Jeong D, Kang I B, et al. Dual function of *Lactobacillus kefir* DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR- $\alpha$  in adipose tissue[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(11), DOI: 10.1002/mnfr.201700252.
- [8] Lim F T, Lim S M, Ramasamy K. Cholesterol lowering by *Pediococcus acidilactici* lab4 and *Lactobacillus plantarum* lab12 in adult zebrafish is associated with improved memory and involves an interplay between *npc1l1* and *abca1*[J]. Food & Function, 2017, 8(8): 2817-2828.
- [9] Divyashri G, Krishna G, Muralidhara, et al. Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: *In vitro* and *in vivo* evidence[J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64: 1527-1540.
- [10] 张旭,胡艳,蒋桂韬,等. 蛋黄中胆固醇含量测定方法的研究[J]. 饲料博览(Zhang Xu, Hu Yan, Jiang Gui-tao, et al. Study on determination method of egg yolk cholesterol content), 2011, 2011(12): 35-38.
- [11] Zheng Y, Lu Y, Wang J, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69868.
- [12] De Smet I, Van Hoorde L, De Saeyer N, et al. *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity[J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 1994, 7(6): 315-329.
- [13] 纪旭,侯红漫,王秀玲,等. 干酪乳杆菌 GL-B 体外降胆固醇的作用机理[J]. 中国乳品工业(Ji Xu, Hou Hong-man, Wang Xiu-ling, et al. Mechanism on *L. casei* ZP-W cholesterol-lowering in vitro[J]. China Dairy Industry), 2010, 38(4): 10-12.
- [14] Ilavenil S, Vijayakumar M, Kim D H, et al. Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(2): 593-601.
- [15] Mandal V, Sen S K, Mandal N C. Effect of prebiotics on bacteriocin production and cholesterol lowering activity of *Pediococcus acidilactici* LAB5[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2009, 25(10): 1837-1847.
- [16] Anandharaj M, Sivasankari B, Santhanakaruppu R, et al. Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh[J]. Research in Microbiology, 2015, 166(5): 428-439.

- [33] Zhao H, Yang L, Baddour J, *et al.* Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism[J]. *Elife*, 2016, 5: 10250–10277.
- [34] Fong M Y, Zhou W, Liu L, *et al.* Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis[J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(2): 183–194.
- [35] Abusamra A J, Zhong Z, Zheng X, *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis[J]. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 2005, 35(2): 169–173.
- [36] Whiteside T L. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes)[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41(1): 245–251.
- [37] Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, *et al.* Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(2): 457–471.
- [38] Burke M, Choksawangkam W, Edwards N, *et al.* Exosomes from myeloid-derived suppressor cells carry biologically active proteins[J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(2): 836–843.
- [39] Clayton A, Al-Taei S, Webber J, *et al.* Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(2): 676–683.
- [40] Clayton A, Mitchell J P, Court J, *et al.* Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression[J]. *The Journal of Immunology*, 2008, 180(11): 7249–7258.
- [41] Deng Z B, Zhuang X, Ju S, *et al.* Exosome-like nanoparticles from intestinal mucosal cells carry prostaglandin E2 and suppress activation of liver NKT cells[J]. *The Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2013, 190(7): 3579–3589.
- [42] Battke C, Ruiss R, Welsch U, *et al.* Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011, 60(5): 639–648.
- [43] Melo S A, Luecke L B, Kahlert C, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 177–182.

(上接第 310 页)

- [17] 国立东, 王丽群, 蒋琛, 等. 乳酸菌调控体内胆固醇代谢综述[J]. *中国乳品工业*(Guo Li-dong, Wang Li-qun, Jiang Chen, *et al.* Regulation of cholesterol metabolism *in vivo* by lactic acid bacteria: a review[J]. *China Dairy Industry*), 2016, 44(2): 32–36.
- [18] Arisqueta L, Navarro-Imaz H, Rueda Y. *et al.* Cholesterol mobilization from hepatic lipid droplets during endotoxemia is altered in obese ob/ob mice[J]. *Journal of Biochemistry*, 2015, 158(4): 321–329.
- [19] Sasikumar K, Vaikkath D K, Devendra L, *et al.* An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 1152–1156.
- [20] Pereira D I A, Gibson G R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4689–4693.
- [21] Wu Y, Zhang Q, Ren Y, *et al.* Effect of probiotic *Lactobacillus* on lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178868.
- [22] Klaver F A, Van Der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(4): 1120–1124.
- [23] Zhang F, Qiu L, Xu X, *et al.* Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* wefa23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(3): 1618–1628.
- [24] Kubasova I, Stropfova V, Laukova A. Safety assessment of commensal *Enterococci* from dogs[J]. *Folia Microbiologica*, 2017, 62(6): 491–498.