

解脂亚罗酵母菌体外降甘油三酯降胆固醇效果研究

吴慧昊¹, 牛 锋², 徐红伟¹, 钟 琦³

(1. 西北民族大学 实验中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030;
3. 湖北省当阳市动物疫病预防控制中心, 湖北 当阳 444100)

摘 要 筛选出高效降三酰甘油降胆固醇菌株, 为新型药物、食品的制备提供优良菌株。从样品中筛选分离出酵母菌株, 并测定菌株降三酰甘油能力, 采用磷硫铁比色法测定菌株降胆固醇能力, 通过耐酸、耐胆盐及毒性实验研究菌株各项性能, 通过生理生化及 26S rDNA 法对菌株进行鉴定。结果显示, 试验筛选出 1 株高效降脂降胆固醇酵母菌 EAM-ZT003T, 降三酰甘油能力高达 80.2%, 菌株具有很好的耐酸、耐胆盐能力, 为期 42 d 的小鼠毒性试验发现, 小鼠未出现异常体征, 未发现异常死亡, 且解剖观察各器官一切正常, 菌株经 26S rDNA 鉴定为解脂亚罗酵母菌 (*Yarrowia lipolytica*)。

关键词 酵母菌; 甘油三酯; 胆固醇; 毒性试验; 26S rDNA

中图分类号 Q939.97; TQ926.4 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2019)04-0058-07
doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2019.04.010

Effect of *Yarrowia lipolytica* on Triglyceride and Cholesterol-Reduction *in vitro*

WU Hui-hao¹, NIU Feng², XU Hong-wei¹, ZHONG Qi³

(1. Ctr. of Experimentation, 2. Coll. of Life Sci. & Engin., NW Minzu Uni., Lanzhou 730030;
3. Animal Dis. Prevent. & Ctrl. Ctr., Dangyang 444100)

Abstract Triglyceride and cholesterol-lowering excellent strains was screened in order to prepare new drugs and food. Isolation and purification of yeast strains from samples and test for its triglyceride degradation ability of the target strains, and the cholesterol lowering ability was determined adopted phosphorus-sulfur-iron colorimetry. The screened strains were further investigated for their tolerance to acid and bile salt, and toxicity test and other performances. Physiological, biochemical tests, and 26S rDNA method were used to identify the strains. The results showed that the experiment had screened a triglyceride and cholesterol degradable strain EAM-ZT003, particularly the triglyceride degradation ability was as high as 80.2%. And the results showed the strain had fine tolerance to acid and bile salt. And it was found that in 42 d of toxicity test in mice and revealed no abnormal pathological sign and exceptional death, and all the dissected organs of mice were observed to be normal. The strain EAM-ZT003T was identified as *Yarrowia lipolytica* adopting 26S rDNA.

Keywords yeast strain; triglyceride; cholesterol; toxicity test; 26S rDNA

血脂是血浆中三酰甘油、胆固醇等中性脂肪和磷脂、糖脂、固醇、类固醇等类脂的总称^[1]。三酰甘油 (Triglyceride, TG) 是长链脂肪酸和甘油形成的脂肪分子, 是人体内含量最多的脂类, 大部

分组织均可以利用三酰甘油分解产物供给能量。三酰甘油来自食物中脂肪的分解, 肝脏也能将血液中的某些糖类转化为三酰甘油。如果三酰甘油过量, 囤积于皮下会使身体肥胖, 囤积于血管壁则

基金项目: 中央高校基本科研专项资金项目 (31920170034); 国家民委科研项目 (14XBZ015); 甘肃省农牧厅攻关项目 (GNSW-2007-09)

作者简介: 吴慧昊 女, 实验师, 硕士。主要从事食品微生物研究。Tel: 0931-4512925, E-mail: 408652874@qq.com

收稿日期: 2018-11-10

造成动脉硬化,囤积于心脏可引起冠心病、心梗;在大脑,可发生脑卒中、中风;发生在眼底,会导致视力下降、失明;如在肾脏,可引起肾衰;发生在下肢,则出现肢体血流不畅导致坏死^[2-3]。此外,三酰甘油高的危害还包括引发高血压、胆结石、胰腺炎;还能够加重肝炎、致使男性性功能障碍、导致老年痴呆等。目前我国有近 1/3 的成年人血脂偏高,高脂血症已成为人类健康的第一隐形杀手。胆固醇(Cholesterol)在人体内有着广泛的生理作用,但当其过量时便会导致高胆固醇血症,对机体产生不利的影响^[4-6]。现代研究已发现,动脉粥样硬化、静脉血栓形成与高胆固醇血症有密切的相关性^[7-8]。随着人们健康意识的增强,减肥降脂迫在眉睫。因此,开发和利用具有减肥降脂作用,且无毒无害的保健药品,对保护人体健康具有重要的现实意义。有关乳酸菌在降胆固醇、降三酰甘油方面的研究,国内外有大量的文献报道和专利成果。如专利 CN101864375A 植物乳杆菌(C88)、CN102604851A 乳酸乳球菌、CN101559082A 乳杆菌(MA2)、CN101724589A 乳酸菌、CN1186855A 屎链球菌(DM891129)及鼠李糖乳杆菌(grx10),但酵母菌在降胆固醇方面的研究鲜见报道,在降三酰甘油方面未见报道^[9-13]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品 采自兰州黄河啤酒酿造渣,取得样品后,贮存于无菌容器,低温运至实验室,立即分离。

1.1.2 培养基 麦氏固/液体培养基,油脂培养基,配方参见文献[14]。高胆固醇 MeclaryO-CHOL 培养基:准确称量胆固醇 0.1 g 放入小烧杯中,加入 0.2 g 牛胆盐、0.1 g 蔗糖酯、1 mL 吐温-80 搅拌均匀,再移取 5 mL 冰乙酸加热溶解,把溶解液用超声波处理 15 min 后,快速加入到配制好的麦氏液体培养基中,边加入边搅拌,使其形成均匀稳定的胶体溶液。

1.1.3 试剂与仪器 硫磷铁显色剂(三氯化铁溶液)的配制:称取 5.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 200 mL 浓磷酸中;磷硫铁试剂(P-S-Fe 试剂):取 40 mL 三氯化铁溶液用浓硫酸定容至 500 mL。MLS-3750 全自动高压灭菌器(JAPAN SANYO),TU-

1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),GL-21M 高速冷冻离心机(赛特湘离心机仪器有限公司),BX51T-32P01 数码光学显微镜(OLYMPUS CORPORATION, JAPAN),PB-10 pH 仪(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司),1285 生物安全柜(Thermo Electron Corporation),HH. B11. 600-BS-II 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 方 法

1.2.1 菌种的分离、纯化 称取 0.5 g 啤酒渣样品,加入到装有 4.5 mL 无菌水试管中,逐次稀释至 10^{-6} ,取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三管稀释液各 0.1 mL,采用涂布法,涂布于麦氏培养基上进行分离,35 °C 恒温培养 48 h。挑取菌落,连续划线分离纯化,最后选择单菌落,经镜检确认为纯种后,接种到斜面培养基培养 24 h,置 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 菌株产脂肪酶效果测定 将分离纯化后的菌株在油脂培养基平板上划线培养 48 h,观察划线部分菌落周围颜色是否变红,若变红,则证明菌株可以产脂肪酶分解油脂。

1.2.3 菌株降蛋黄中胆固醇的效果 无菌条件下,于灭菌的培养基中加入一定量鸡蛋黄作为胆固醇源,无菌均匀分装到试管中。以 2% (菌体浓度为 10^8 cfu/mL) 的接种量加入菌液,35 °C 恒温培养 24 h,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照磷硫铁比色法,测定上清液中胆固醇含量^[15]。每组实验设定 5 个重复。胆固醇降低率计算公式:

$$\text{胆固醇降低率}(\%) = ((C - A) / C) \times 100\%$$

A: 菌株发酵后培养液在 560 nm 处的 OD 值, C: 对照在 560 nm 处的 OD 值。

1.2.4 菌株降高纯度胆固醇的效果 将菌株以 2% (菌体浓度为 10^8 cfu/mL) 的接种量接种于高胆固醇 MeclaryO-CHOL 培养基中,35 °C 恒温培养 24 h,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照磷硫铁比色法,测定上清液中胆固醇含量。以未接种的高胆固醇 MeclaryO-CHOL 培养基作对照,计算方法同 1.2.3。

1.2.5 菌株对三酰甘油的降解效果 无菌条件下,于灭菌培养基中加入一定量的三酰甘油标准品,无菌分装到试管中。以 2% (菌体浓度为 10^8 cfu/mL) 接种量加入菌液(未接菌的试管作为空白对照),35 °C 恒温培养 24 h,于 420 nm 处测定

三酰甘油降解率^[16]。

$$\text{三酰甘油降低率}(\%) = ((C - A) / C) \times 100\%$$

A: 菌株发酵后培养液在 420 nm 处的 OD 值, C: 空白对照在 420 nm 处的 OD 值。

1.2.6 菌株耐酸性能测定 将菌株活化后制成菌悬液, 采用稀释涂板法测定菌株的浓度。将活化菌株分别接种于 pH 6.8、3.0、2.0 的麦氏液体培养基中, 35 °C 恒温培养 10 h, 利用梯度稀释平板法测定活菌数, 做 5 个平行求平均值。以菌株名称为横坐标, 单位菌落总数对数值为纵坐标绘图。

1.2.7 菌株对 0.3% 胆盐环境的耐受力测定 将菌株活化后制成菌悬液(菌体浓度为 10^8 cfu/mL), 按 2% 的接种量分别接种于含 0.0% 牛胆盐(即空白)、0.3% 牛胆盐的复合液体培养基中。35 °C 培养 24 h 后, 分别测定其 OD 值, 做 5 个平行求平均值, 按下述公式计算菌株对胆盐的耐受力。

$$\text{胆盐耐受力}(\%) = (\text{含胆盐培养基的 OD} / \text{空白培养基的 OD}) \times 100\%$$

1.2.8 小鼠体内毒性试验 将 20 只 SPF 级昆明雌性小白鼠(8 周龄), 随机分成 2 组, A 组灌胃生理盐水, B 组灌胃解脂亚罗酵母菌悬液。A 组小鼠每只每天灌胃生理盐水 0.5 mL, B 组小鼠每只每天灌胃含 1×10^8 个酵母菌的悬浮液 0.5 mL。为了保证菌体溶液中一定的活菌数, 每次灌胃都采用新鲜处理的菌株。自由进水, 每周记录体重。在给药 42 d 后, 处死解剖, 将心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏取出用生理盐水冲洗并擦拭干净后称重, 进行器官指数的测定^[17]。此外, 观察器官是否发生病变。

$$\text{器官指数}(\%) = (\text{器官重量} / \text{体重}) \times 100\%$$

1.2.9 菌株生理生化及分子鉴定 分离菌株主要通过繁殖方式观察、碳源同化试验、氮源同化试验、产酸试验、运动性检查等生理生化特征进行鉴定。采用 26S rDNA 法对所分离纯化的菌株进行分子鉴定。26S rDNA 扩增及序列测定方法参照文献[18]。聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)产物测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。测序完成提交菌株 EAM-ZT003T 的 26S rDNA 序列在 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 美国国立生物技术信息中

心)数据库中进行比对, 选取与之相似性最高的 10 株菌的 26S rDNA 序列, 进行 Clustal X 比对, MEGA 软件分析, 采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次进行稳定性验证。

2 结果与分析

2.1 菌株分离及纯化结果

分离纯化菌株菌落为乳白色, 直径约 2 mm, 边缘整齐, 容易挑起, 镜检形态为卵圆形, 出芽生殖, 革兰染色阳性, 大小为 $(1.5 \sim 3) \mu\text{m} \times (4 \sim 5.5) \mu\text{m}$ 。将该菌株命名为 EAM-ZT003T(图 1、图 2)。

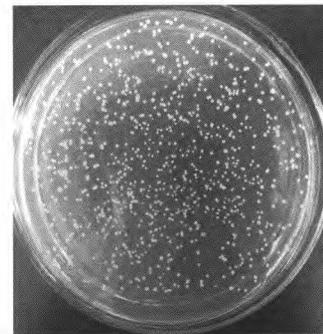


图 1 酵母菌菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of yeast strains

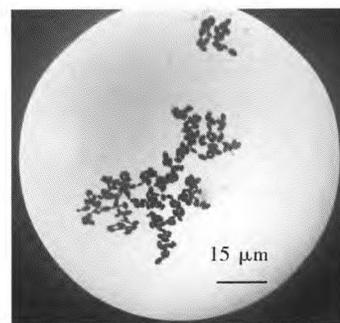


图 2 菌株 EAM-ZT003T 革兰染色结果

Fig. 2 Gram's staining results of EAM-ZT003T

2.2 菌株 EAM-ZT003T 产脂肪酶效果测定

将分离纯化后的菌株 EAM-ZT003T 在油脂培养基平板上划线培养 48 h, 发现划线菌株生长区域培养基颜色由最初的淡黄色变为红色, 由此说明菌株 EAM-ZT003T 可以产脂肪酶分解油脂(图 3), 活化菌株进行后续实验。

2.3 菌株 EAM-ZT003T 降蛋黄中胆固醇和高纯度胆固醇的效果

由图 4 可以看出, 胆固醇标准曲线拟合后相

关性很好($R^2 = 0.9989$),可用于待测菌株的降胆固醇能力评价。经试验测得菌株 EAM-ZT003T 降蛋黄中胆固醇能力为 32.8%, 降高纯度胆固醇能力为 12%(图 5)。

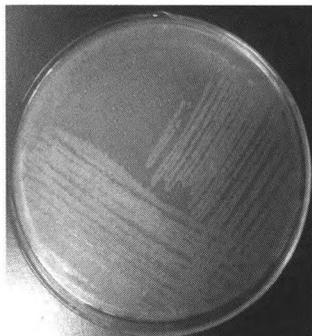


图 3 菌株 EAM-ZT003T 在油脂培养基上生长情况

Fig. 3 The growth of the strain EAM-ZT003T on the fat medium

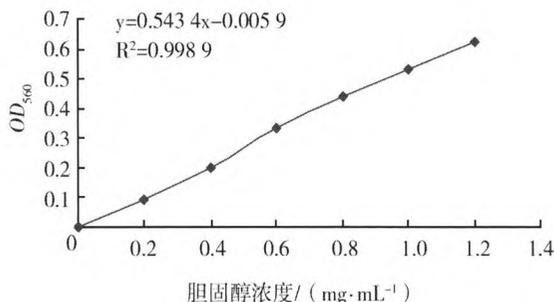


图 4 胆固醇标准曲线

Fig. 4 Standard curve of cholesterol

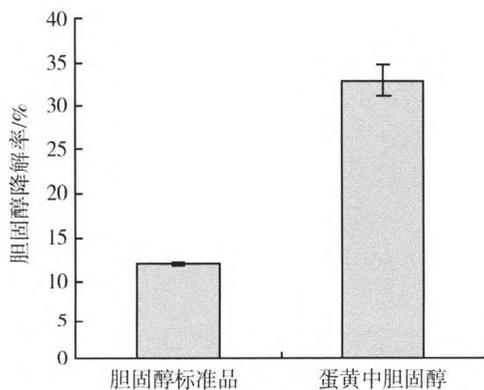


图 5 菌株 EAM-ZT003T 降胆固醇效果

Fig. 5 Strains by Cholesterol-lowering ability

2.4 菌株 EAM-ZT003T 对三酰甘油的降解

三酰甘油(TG)是人体内含量最多的脂类,三酰甘油高的危害最直接体现在动脉粥样硬化上。经试验测得菌株 EAM-ZT003T 对高纯度三酰甘油

具有非常高的降解能力,其三酰甘油降解率为 80.2%,而 ZC001、ZC002 为实验室保存的具有降解三酰甘油效果的酵母菌,由图 6 可知,菌株 EAM-ZT003T 对三酰甘油降解效果显著高于菌株 ZC001、ZC002。

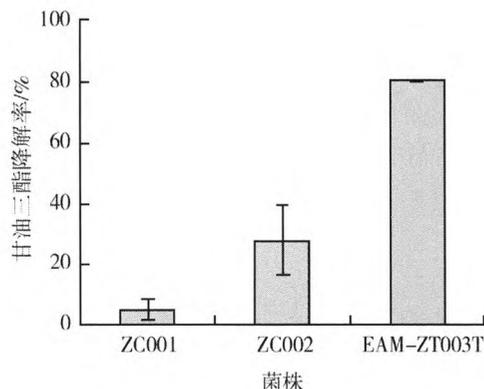


图 6 菌株 EAM-ZT003T 对三酰甘油的降解能力

Fig. 6 Strains by Triglyceride-lowering ability

2.5 菌株 EAM-ZT003T 耐酸结果

菌株应用于食品或药品制备,必须具有较好的耐酸性和在酸性环境中生长发育的特性,才能在胃和小肠前段存活。菌株 EAM-ZT003T 在 pH 6.8(正常培养基 pH 值)的培养基中培养 10 h,菌株活菌数为 10^7 cfu/mL,在 pH 3.0 的条件下活菌数也可达 10^7 cfu/mL,在 pH 2.0 时,培养 10 h,菌株的存活率有所下降,但仍能达到 10^5 cfu/mL(图 7)。耐酸实验表明,菌株 EAM-ZT003T 具有较强的耐酸性,对酸性环境的适应性都比较好,若进入人体肠道后,还能存活较多,不会影响降胆固醇降三酰甘油活性。

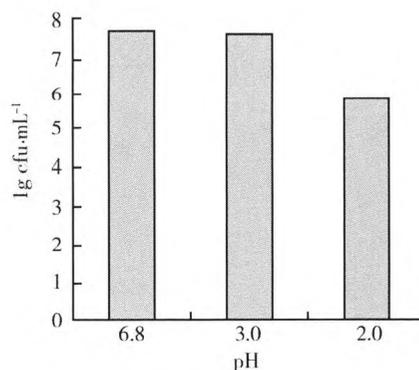


图 7 菌株 EAM-ZT003T 耐酸试验

Fig. 7 Effects of different acidity on the growth of strains

2.6 菌株 EAM-ZT003T 对 0.3%胆盐环境耐受力

当菌株进入口腔,经过胃和小肠,最终到达小肠末端,人体小肠中胆盐含量在 0.03% ~0.3% 范围内波动,因此要求益生菌株不仅能耐受一定的酸度还能有一定的胆盐耐受力。实验选取人体小肠中胆盐最大浓度进行测定。经试验测得菌株 EAM-ZT003T 在含 0.3% 牛胆盐的液体培养基中培养 24 h 后,胆盐耐受能力为 91.7%;菌株 ZC001、ZC002 胆盐耐受力分别为 78.0%、42.7%,由图 8 可知,菌株 EAM-ZT003T 胆盐耐受力强于菌株 ZC001、ZC002,具有很强的耐胆盐能力。

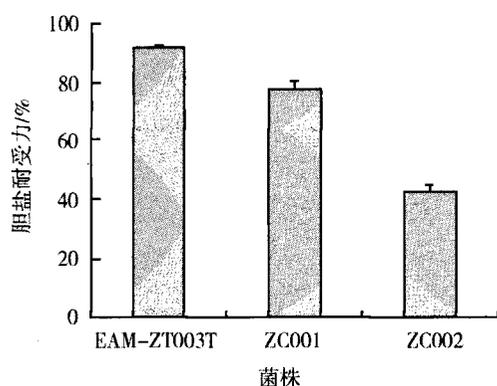


图 8 胆盐耐受试验

Fig.8 Tolerance of the strains to bile salts

2.7 毒性试验结果

毒性试验各组小鼠毛色光洁,食欲正常,灌胃 42 d 未出现异常体征,未发现异常死亡,小鼠体重增长前 14 d 较快,14 d 后趋于平稳,但试验过程中未出现消瘦、异常死亡现象(图 9)。小鼠解剖后内脏正常,颜色红润、光滑,小鼠器官无气质性改变,喂菌小鼠与对照组小鼠器官指数差异不显著($P < 0.05$),说明不同实验处理对小鼠肝脏、肾脏、心脏、脾脏和肺脏并未产生影响(见表 1)。结果表明饲喂菌株 EAM-ZT003T 对小鼠没有毒副作用。

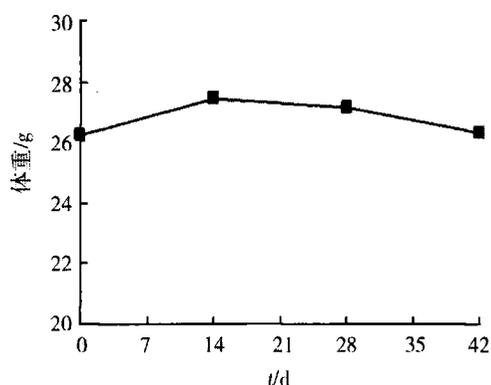


图 9 毒性试验小鼠体重变化

Fig.9 The body weight of mice

表 1 毒性试验小鼠器官指数比较

Table 1 The viscera indices of mice

组别	心脏/体重(%)	肝脏/体重(%)	脾脏/体重(%)	肺脏/体重(%)	肾脏/体重(%)
CK	0.498 ± 0.036	4.375 ± 0.092	0.237 ± 0.028	1.031 ± 0.001	1.219 ± 0.103
EAM-ZT003T	0.518 ± 0.096	4.589 ± 0.105	0.257 ± 0.095	1.261 ± 0.339	1.265 ± 0.147

2.8 菌株 EAM-ZT003T 生理生化及分子鉴定结果

菌株经半固体培养基穿刺培养发现,菌株沿

穿刺线生长,边缘清晰,无运动性。菌株不能液化明胶,不还原硝酸盐,具体生理生化鉴定结果见表 2。

表 2 菌株 EAM-ZT003T 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological identification results

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
利用葡萄糖	+	利用山梨醇	+	利用鼠李糖	-	利用山梨糖	-
利用棉子糖	-	利用核糖	-	利用乳糖	-	利用 D-木糖	+
利用果糖	-	利用松三糖	-	利用半乳糖	-	硝酸盐(还原)	-
水解淀粉	-	利用蔗糖	-	明胶液化	-	利用尿素	+

续表 2

检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果	检测项目	结果
产生硫化氢	-	利用纤维二糖	-	利用阿拉伯醇	-	利用蜜二糖	-
枸橼酸盐	-	利用卫矛醇	-	β -半乳糖苷	-	利用蕈糖	-
45 °C 生长	-	15 °C 生长	+	6.5% NaCl 生长	-	10% NaCl 生长	-

注:“+”代表阳性反应;“-”代表阴性反应

2.9 菌株 EAM-ZT003T 分子鉴定结果

测序完成提交菌株 EAM-ZT003T 的 26S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对,结果发现菌株 EAM-ZT003T 的基因序列,在所有相似的序列中,与解脂亚罗酵母菌株 (*Yarrowia lipolytica*) 的同源性为 100%,使用 Neighbor-Joining 构建系统发

育树(图 10)。结果显示,系统发育树上菌株 EAM-ZT003T 与 *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 在发育树上聚为一簇,具有较近的进化距离。因此结合生理生化特征,将分离的菌株 EAM-ZT003T 鉴定为解脂亚罗酵母菌,命名为 *Y. lipolytica* ZT003T。

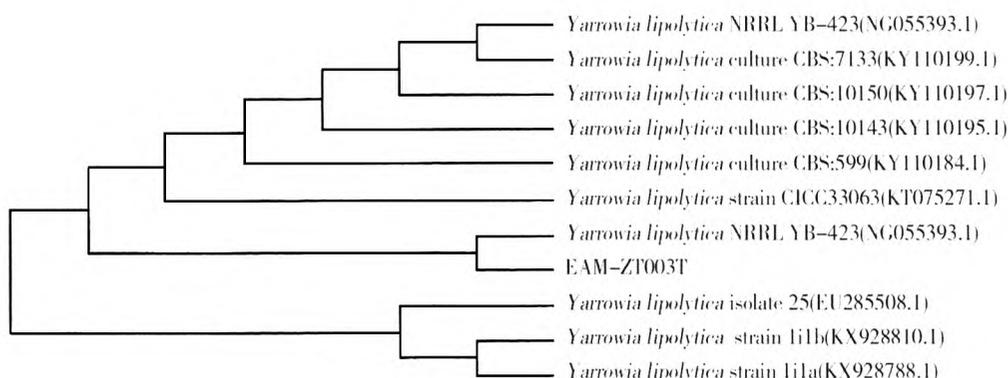


图 10 依据 26S rDNA 序列构建的菌株 EAM-ZT003T 与相关菌株的系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree of strain EAM-ZT003T and related strains based on 26S rDNA

3 讨论

本研究从啤酒渣中分离纯化出 1 株酵母菌,经生理生化及 26S rDNA 鉴定为解脂亚罗酵母菌 (*Y. lipolytica*)。该菌株具有极好的降胆固醇 (TC)、降三酰甘油 (TG) 的功效,尤其降三酰甘油 (TG) 能力高达 80.2%,如此高的降三酰甘油能力在中外文献中还未见报道,有关菌株在降胆固醇降三酰甘油方面的研究,基本集中于乳酸菌的研究,而酵母菌在此方面的研究鲜见报道。

菌株要在宿主胃肠道中生存并发挥作用必须具备抗酸和耐胆盐的能力^[19]。胃中的酸环境随饮食结构不同而发生较大的变化^[20]。一般来说,空腹时胃液的 pH 为 0.9~1.8,进食过程中 pH 为 1.8~5.0,通常维持在 3.0 左右^[21]。一般认为,菌株能在 pH 3.0 的条件下存活 2 h 并能耐受

0.1% 胆盐的益生菌就能顺利通过胃和上段肠管而到达下段肠管放大其生物学功效^[22]。菌株 EAM-ZT003T 具有非常好的耐酸、耐胆盐性能,进入人体胃肠道后,有较多的活菌存在,可确保菌株的降胆固醇降三酰甘油活性,经动物体内毒性实验发现,菌株无毒副作用。因此,菌株 EAM-ZT003T 可用于新型降脂降胆固醇保健品及功能食品的制备。菌株降脂降胆固醇作用机制,具体是由菌株自体吸收,还是产生相关酶类分解脂类物质,或是通过调节脂类在肝脏和肠道的关键机制来调控脂类物质的合成吸收和代谢^[23-26],以及菌株的动物体内降脂试验将在后期研究中完成。

参考文献:

[1] 陈继承,卢晓凤,何国庆.降血脂功效成分体外筛选方法研

- 究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 287-291.
- [2] Anderson F, Mbatha SZ, Thomson SR. The early management of pancreatitis associated with hyper-triglyceridaemia [J]. South African Journal of Surgery, 2011, 49(2): 82-84.
- [3] Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies[J]. Journal of Cardiovascular Risk, 1996, 3(2): 213-219.
- [4] 任衍钢, 宋玉奇. 胆固醇的发现与认识历程[J]. 生物学通报, 2012, 47(10): 59-62.
- [5] 于志会. 益生性降胆固醇植物乳杆菌的筛选、发酵特性及体内功效研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [6] 陈伟伟, 王文, 隋辉, 等. 《中国心血管病报告 2016》要点解读[J]. 中华高血压杂志, 2017, 25(7): 605-608.
- [7] Anila k, Kunzes A, Bhalla TC. *In vitro* cholesterol assimilation and functional enzymatic activities of putative probiotic *Lactobacillus* sp. isolated from Fermented Foods /Beverages of North West India[J]. Journal of Nutrition and Food Sciences, 2016, 6(467): 1-2.
- [8] Ziaeian B, Dinkler J, Watson K. Implementation of the 2013 American college of cardiology/American heart association blood cholesterol guideline including data from the improved reduction of outcomes: Vytorin Efficacy International Trial[J]. Reviews in cardiovascular medicine, 2015, 16(2): 125-126.
- [9] 杨贞耐, 李盛钰, 张雪, 等. 一株具有降胆固醇功能的植物乳杆菌及其应用; 201010034128. 1 [P]. 2010-10-20.
- [10] 王艳萍, 王菁蕊, 冯武. 一株具有降胆固醇及产胞外多糖能力的乳酸乳球菌: 201110025200. 9 [P]. 2012-07-25.
- [11] 王艳萍, 许女. 一种降血脂及调节肠道菌群的益生菌制剂的制备方法; 200910069088. 1 [P]. 2009-10-21.
- [12] 康白. 一种在肠道降低人体胆固醇的菌株及制剂: 97101304. 7 [P]. 1998-07-08.
- [13] 顾瑞霞, 朱小红, 杨振泉, 等. 具有降胆固醇及抑菌能力的鼠李糖乳杆菌 grx10 及其用途: 200810023014. X [P]. 2010-06-09.
- [14] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验(第4版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 243-244.
- [15] 吴慧昊, 段龙飞, 张园园, 等. 熊猫粪便中乳酸菌的分离鉴定与降胆固醇作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, 6(383): 14-17.
- [16] 臧荣鑫, 杨具田. 生物化学实验教程 [M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2010: 159-161.
- [17] Jeun J, Kim S, Cho S, et al. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL /6 mice [J]. Nutrition, 2010, 26(3): 321-330.
- [18] 乔传丽, 蒋彩虹, 金丹, 等. 新疆传统发酵酸奶中酵母菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 67-71.
- [19] 王辑, 顾芸佳, 马文慧, 等. 内蒙古奶豆腐中潜在益生性乳酸菌的筛选[J]. 食品科学, 2014, 35(13): 171-177.
- [20] 王今雨, 满朝新, 杨相宜, 等. 植物乳杆菌 NDC 75017 的降胆固醇作用[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 243-247.
- [21] Qian C, Liu N, Yan X, et al. Engineering a high-performance, metagenomic - derived novel xylanase with improved soluble protein yield and thermostability [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 70(5): 35-41.
- [22] Liong MT, Shah NP. Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of *Lactobacilli* strains [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(1): 55-66.
- [23] Kumar M, Nagpal R, Kumar R, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases [J]. Experimental Diabetes Research, 2014, 2012(3): 902-917.
- [24] Gorenjak M, Gradisnik L, Trapecar M, et al. Improvement of lipid profile by probiotic/protective cultures: study in a non-carcinogenic small intestinal cell model. [J]. New microbiologica, 2014, 37(1): 51-52.
- [25] Huang Y, Wu F, Wang X, et al. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects [J]. J Dairy Sci, 2013, 96(5): 2816-2825.
- [26] Alonso L, Fontecha J, Cuesta P. Combined effect of *Lactobacillus acidophilus* and beta-cyclodextrin on serum cholesterol in pigs [J]. British Journal of Nutrition, 2016, 115(1): 1-5.