

文章编号: 1673-1689(2011)04-0495-05

去除胆固醇细菌的分离、鉴定及其性能的初步研究

姜华, 吕凤霞, 别小妹, 邹晓葵, 李远宏, 陆兆新*

(南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 从金华火腿、光明酸奶、光明奶酪、味全乳酸菌饮品及泡菜等样品中分离得到 100 余株乳酸菌菌株, 利用高胆固醇 MRS-CHOL 培养基测定其体外胆固醇去除能力, 从中筛选得到一株高效去除胆固醇的菌株 JH-1, 去除率达到 48.68%。通过形态学特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列同源性分析, 鉴定菌株 JH-1 为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。研究了培养时间、接种量、培养温度、培养基初始 pH 以及基质中胆固醇胶束质量浓度对胆固醇去除率的影响, 发现短乳杆菌 JH-1 分别在时间为 48 h, 接种量体积分数为 3%, 培养温度为 37 °C, 初始 pH 值为 6, 胆固醇胶束质量浓度为 1 mg/mL 时, 胆固醇去除率达到最大。

关键词: 胆固醇; 短乳杆菌; 分离; 鉴定

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

Isolation and Identification of a Strain JH-1 Removal Cholesterol

JIANG Hua, LU Feng-xia, BIE Xiao-mei, ZOU Xiao-kui, LI Yuan-hong, LU Zhao-xin*
(College of Food and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: More than 100 bacteria were isolated from the fermented food such as ham, yogurt, and pickle in this study. With Cholesterol reducing ability in MRS-CHOL medium as index, one strain was screened and named as JH-1. The cholesterol removal rate of strain JH-1 is 48.68%. Upon chemotaxonomic characterization and phylogenetic inference based 16S rDNA analysis, the strain JH-1 was identified as *Lactobacillus brevis* strain. The removal cholesterol ability of *Lactobacillus brevis* JH-1 was studied. The result listed as follows: the cultivation time is 48h, the inoculation percentage is 3%, the temperature is 37 °C, the initial pH of the media is 6 and the cholesterol contents is 1mg/mL. *Lactobacillus brevis* JH-1 has the best removal cholesterol ability.

Key words: cholesterol, *Lactobacillus brevis* strain, isolation, identification

随着生活水平的提高,人们从日常膳食中摄入了大量的胆固醇,给人体健康带来了潜在的安全隐患。研究表明:动脉粥样硬化、冠心病、脑中风等心

血管疾病的发生率与胆固醇不正常代谢密切相关^[1]。因此,研究不限饮食、不影响食品风味、经济实用的去除食品及人体血清中胆固醇的方法已成

收稿日期: 2010-03-01

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA10Z357)。

* 通信作者: 陆兆新(1957-),男,江苏无锡人,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。

Email: fmb@njau.edu.cn

为重要的研究课题。

乳酸菌是一类可以利用葡萄糖产生乳酸的益生菌,是一种公认安全的微生物,广泛的应用于食品工业中。目前,研究表明嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)等多种乳酸菌^[2-5]均发现具有去除胆固醇特性。作者通过体外实验从常见的发酵制品中筛选出安全高效的具有去除胆固醇作用的乳酸菌,通过形态学特征、生理生化特征和16S rDNA序列同源性分析对其进行鉴定及对其去除胆固醇效果的考查,为后续研究胆固醇体外、体内去除机制提供重要的基础,并为开发新型的乳酸菌制剂或低胆固醇食品提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 主要实验材料

1.1.1 培养基 脱脂乳培养基; MRS培养基; 高胆固醇 MRS-CHOL培养基^[6]。

1.1.2 主要仪器 电子精密天平,超净工作台,电热手提式压力蒸汽灭菌锅,隔水式电热恒温培养箱,紫外分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 样品中乳酸菌菌株分离培养及纯化 将样品进行梯度稀释,涂布于MRS培养基的平板上,于37℃培养48h。挑取肉眼可见、生长较快的菌落进行分离并纯化,根据菌落特征进行初步归类,作为进一步筛选的乳酸菌疑似菌株,并编号、保存。

1.2.2 去除胆固醇乳酸菌的筛选 将保存于MRS斜面培养基中的疑似乳酸菌菌株接种于脱脂乳培养基中40℃培养至凝乳,然后按体积分数2%的接种量接种于液体MRS培养基中,转接2次后,将活化后的菌液接入MRS-CHOL培养基中,立即置于37℃培养箱中进行培养,培养24h后测定其胆固醇含量并计算其胆固醇去除率。

1.2.3 胆固醇含量及其去除率的确定 胆固醇含量的测定 采用硫酸铁铵比色法^[6]。

胆固醇的去除率 = $(A' - A) / A' \times 100\%$, 其中A为各实验菌株发酵后的培养液A_{560nm}; A'为空白对照的A_{560nm}。

1.2.4 菌株鉴定

1) 菌株JH-1的形态观察及生理生化实验按照参考文献[7,8]进行。

2) 16S rDNA分子生物学鉴定: 细菌总DNA的

提取试剂盒提取基因组DNA(上海生工生物工程技术有限公司产品)提取,采用细菌的16S rDNA通用引物进行PCR扩增。PCR产物测序由南京金思特生物技术公司完成。

将16S rDNA序列与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库中的核苷酸序列进行同源性分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。选择同源性较高的菌株及已报道具有去除胆固醇效果的细菌16S rDNA核苷酸序列,利用clustalx2.0进行多重联配,然后再利用MEGA4.0软件采用Neighbour-joining方法构建系统发育树,并进行bootstrap分析。

1.2.5 不同发酵条件对菌株JH-1去除胆固醇的影响

1) 培养时间对胆固醇去除率的影响: 将菌株JH-1按体积分数2%的接种量接种于含MRS-CHOL培养基中,于37℃恒温静止培养3d,每12h取培养液,测定胆固醇的含量。

2) 接种量对胆固醇去除率的影响: 将菌株JH-1分别以不同体积分数的接种量1%、2%、3%、4%、5%、6%的接种量(菌体浓度为10⁸个/mL)接种于含MRS-CHOL培养基中,于37℃恒温静止培养3d,取样测定胆固醇的含量。

3) 培养温度对胆固醇去除率的影响: 将菌株JH-1按体积分数2%的接种量接种于MRS-CHOL培养基中,分别于30、37、40℃恒温静止培养3d,取样测定胆固醇的含量。

4) 培养基初始pH值对胆固醇去除率的影响: 将菌株JH-1按体积分数2%的接种量接种于含初始pH值分别为2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0的MRS-CHOL培养基中,于37℃恒温静止培养3d,取样测定胆固醇的含量。

5) 不同胆固醇胶束质量浓度对胆固醇去除率的影响: 将菌株JH-1按体积分数2%的接种量接种于胆固醇含量分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL的MRS-CHOL培养基中,于37℃培养3d,取样测定胆固醇的含量。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌菌株分离纯化

从不同样品中分离出的大量菌株,经革兰氏染色、接触酶反应,对革兰氏染色阳性、接触酶阴性的疑似乳酸菌菌株的胆固醇去除能力进行了考察。

2.2 降胆固醇乳酸菌菌株的筛选

选取其中胆固醇去除效果较好的菌株,列举如

表1所示。从金华火腿中分离出的JH-1的胆甾去除率最大。

表1 胆固醇去除菌的分离筛选

Tab. 1 Isolation of the removal cholesterol strains

菌株	来源	胆固醇去除率/%
JH-1	金华火腿	48.68
P9	泡菜	37.56
P13	泡菜	15.49
NL3	光明奶酪	35.24
1	鲜奶	26.36

2.3 菌株JH-1的鉴定

2.3.1 菌落形态特征及生理生化特性 菌株JH-1在MRS固体培养基中培养48h,其菌落表面光滑、不透明、湿润、呈淡黄色。综合表2生理生化鉴定结果,并参照文献对*Lactobacillus brevis*的描述,初步鉴定菌株JH-1为*Lactobacillus brevis*。

表2 菌株JH-1生理生化鉴定结果

Tab. 2 Results of physiological and biochemistry experiments

特征	结果	特征	结果
接触酶反应	-	利用蔗糖产酸	-
淀粉水解	-	利用山梨醇产酸	+
明胶液化	-	柠檬酸产CO ₂	-
石蕊牛乳试验	+	10℃生长	+
吲哚试验	+	40℃生长	+
精氨酸产氨	+	45℃生长	+
利用葡萄糖产酸	+	4% NaCl生长	+
利用乳糖产酸	+	6.5% NaCl生长	-

注: + 阳性; - 阴性。

2.3.2 16S rDNA的扩增与测序 以菌株JH-1的总DNA为模板,利用细菌16S rDNA通用引物进行PCR扩增,扩增产物大小在1.5 kb左右。PCR产物纯化后由南京金思特生物技术公司测序,菌株JH-1的16S rDNA序列大小为1446 bp。该序列已经在Genbank上进行了登记,登录号为FJ824740.1。

2.3.3 序列比对 将菌株JH-1的16S rDNA核苷酸序列与GenBank+EMBL+DDBJ+PDB数据库中报道的16S rDNA核苷酸序列进行比对,结果表明,菌株JH-1的16S rDNA核苷酸序列与乳杆菌属中*Lactobacillus brevis*的6个菌株的核苷酸序列的相似性均为100%。

根据菌株JH-1的形态特征、生理生化特征、

16S rDNA序列比对分析,鉴定菌株JH-1为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。

2.4 不同发酵条件对菌株JH-1胆固醇去除特性的影响

2.4.1 培养时间对胆固醇去除率的影响 将短乳杆菌JH-1按体积数2%的接种量接种于含MRS-CHOL培养基中,于37℃恒温静置培养3d,每12h取培养液,测定胆固醇的去除率。从图1可见,胆固醇去除率随培养时间延长而提高,于48h处去除率达到最大,随着培养时间的延长,短乳杆菌JH-1对胆固醇的去除率趋于稳定。

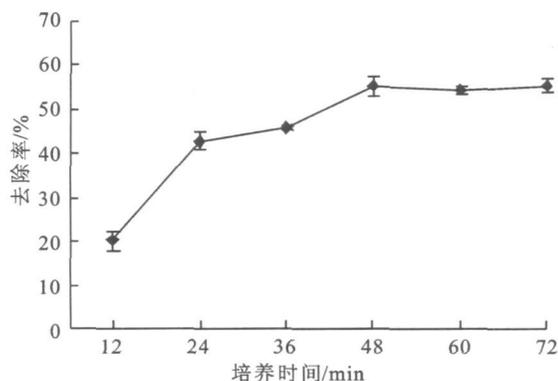


图1 培养时间对胆固醇去除的影响

Fig. 1 Effect of cultivation time on the cholesterol removal rate

2.4.2 接种量对胆固醇去除率的影响 通过不同接种量对短乳杆菌JH-1胆固醇去除率的影响进行测定,结果表明,接种量体积分数对胆固醇的去除率影响较大,随着接种量的增大,去除率也随之增大,其中以体积分数3%的接种量较好;当接种量超过体积分数3%时,随着接种量的继续提高,去除率反而呈下降趋势(图2)。这可能是JH-1在生长过程产生乳酸,使得发酵液的pH值变低。当发酵培养基的pH值较低时,从而不利于JH-1的生长,使得胆固醇去除率降低。

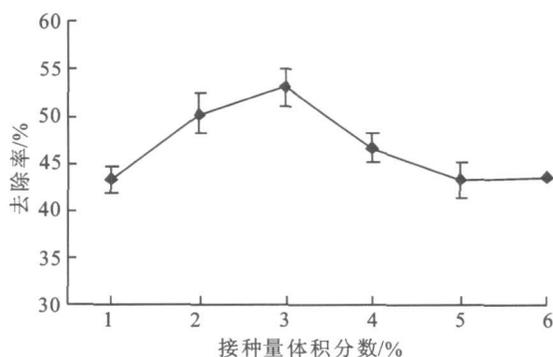


图2 接种量对胆固醇去除率的影响

Fig. 2 Effect of inoculation percentage on the cholesterol removal rate

2.4.3 培养温度对胆固醇去除率的影响 将短乳杆菌 JH-1 按体积分数 2% 的接种量接种于 MRS-CHOL 培养基中, 分别于 30 °C、37 °C 与 40 °C 恒温静止培养 24 h, 取样测定胆固醇的含量。从图 3 可见, 30 °C 时, 胆固醇去除率最小。温度为 37 °C 时, 菌株 JH-1 对胆固醇去除率最高, 但与 40 °C 时的胆固醇去除率相差不大, 这可能与菌株活化前期于 40 °C 进行脱脂乳培养, 后一直在 37 °C 进行分离培养。

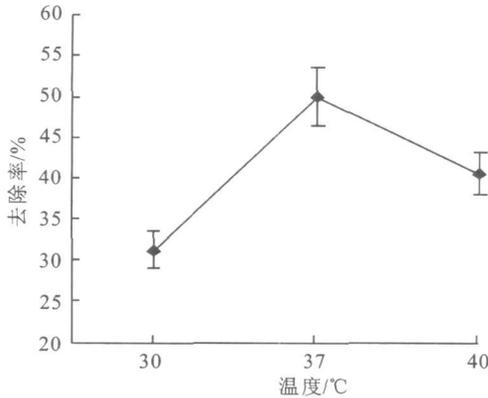


图 3 温度对胆固醇去除率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the cholesterol removal rate

2.4.4 培养基初始 pH 值对胆固醇去除率的影响 由于短乳杆菌 JH-1 具有较强的耐酸性, 故此考察 JH-1 在 pH 值较低的情况下对胆固醇去除率的影响。从图 4 可见, 培养基的初始 pH 值对短乳杆菌 JH-1 胆固醇去除率影响较大。当初始 pH 值低于 4 时, 胆固醇去除率较低, 可见初始 pH 值过低不利于 JH-1 对胆固醇的去除。随着 pH 值的上升, 去除率不断增大, 但当 pH 大于 6 时, 去除率开始逐步减少。短乳杆菌 JH-1 在初始培养基 pH 值为 2 的条件下还具有去除胆固醇作用, 去除率为 0.83%。

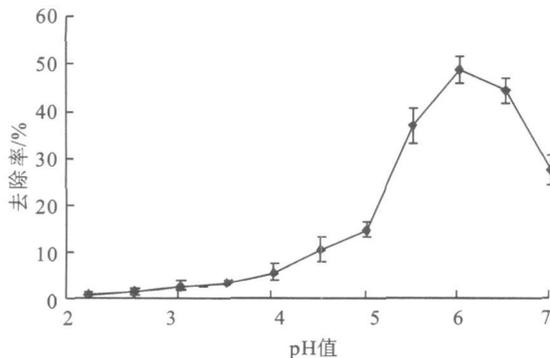


图 4 培养基初始 pH 值对胆固醇去除率的影响

Fig. 4 Effect of initial pH the cholesterol removal rate

2.4.5 不同胆固醇胶束质量浓度的去除实验 通过不同胆固醇浓度对短乳杆菌 JH-1 胆固醇去除率的影响进行测定, 如图 5 所示, JH-1 对胆固醇的去

除率随胆固醇浓度的升高先增大后减少, 当胆固醇质量浓度为 1.0 mg/mL 时, 去除率达到最大值。

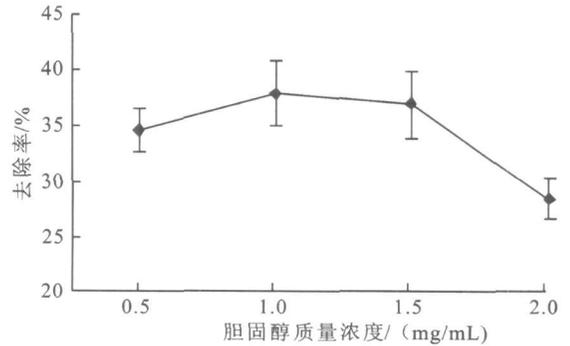


图 5 胆固醇质量浓度对胆固醇去除率的影响

Fig. 5 Effect of the cholesterol concentration on the cholesterol removal rate

3 结语

目前, 国内外已报道的具有去除胆固醇效果的乳酸菌种类较多。作者充分考虑到乳酸菌菌源的多样性, 从金华火腿、光明酸奶、光明奶酪、味全乳酸菌饮品及泡菜等多种样品中, 挑选出 100 余株乳酸菌, 筛选得到一株胆固醇去除效果显著的 JH-1, 培养 24h 后胆固醇去除率达到 48.68%。菌株 JH-1 经形态观察、生理生化指标分析、16S rDNA 核苷酸序列鉴定该菌株为短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis* strain)。与已报道植物乳杆菌^[3] (*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌 DF-4^[4] (*Lactobacillus fermentum* DF-4)、乳酸乳球菌^[5]、粪肠球菌 A30 与 A31 (*Lactobacillus acidophilus*)、嗜酸乳杆菌 A878 和 PB1^[9] (*Lactobacillus acidophilus*) 等菌株相比, 其胆固醇去除率更高。

随着培养时间的延长, 菌株 JH-1 的胆固醇去除率在 48 h 时达到最大为 55.48%, 随后趋于平缓。接种量增加, 胆固醇去除率先增大后减小, 在接种体积分量为 3% 时, 去除率可达 53.12%。菌株 JH-1 去除胆固醇最适 pH 值为 6, 并且在含有 1 mg/mL 胆固醇胶束的培养基中, 胆固醇去除率达 37.83%。由于短乳杆菌 JH-1 从金华火腿中分离得到, 因此, 该菌株具有很高的安全性, 为其在未来食品领域的有效利用提供了现实价值。

参考文献(References):

- [1] 凌关庭. 保健食品原料手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] Liong M T, Shah N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains[J]. **Dairy Science**, 2005(88): 55-66.
- [3] 于长青, 张丽娜. 发酵肉制品中降胆固醇乳酸菌的分离及鉴定[J]. 食品科技, 2007(8), 45- 48.
YU Chang-qing, ZHANG Li-na. Isolation and identification of cholesterol-degrading lactobacillus from fermented meat products[J]. **Food Science and Technology**, 2007(8), 45- 48. (in Chinese)
- [4] 曾小群, 潘道东, 杨瑶, 等. 一株高效去除胆固醇酸菌的筛选鉴定及益生潜能初探[J]. 2009(30): 241- 245.
ZENG Xiao-qun, PAN Dao-dong, YANG Yao, et al. A high cholesterol-reducing lactic acid bacterial strain: screening, identification and probiotic potential evaluation[J]. **Food Science**, 2009(30): 241- 245. (in Chinese)
- [5] 尹军霞, 沈国娟, 谢亚芳. 分离自酸菜汁的乳酸乳球菌体外去除胆固醇特性[J]. 食品与生物技术学报. 2009, 28(6): 850- 853.
YIN Jun-xia, SHEN Guo-juan, XIE Ya-fang. Study on characteristic of reducing cholesterol in vitro by *Lactococcus lactis* isolation from sauerkraut juice[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6), 850- 853. (in Chinese)
- [6] 刘丽莉, 董铁有, 杨协立. 6种乳酸菌去除胆固醇的体外试验[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2005, 26(6): 85- 88.
LIU Li-li, DONG Tie-you, YANG Xie-li. Research on lab degrading cholesterol[J]. **Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science)**, 2005, 26(6): 85- 88. (in Chinese)
- [7] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] 乳酸菌饮料中乳酸菌的微生物学检验[S]. 中华人民共和国国家标准, GB/T 16347-1996.
- [9] 李妍, 张兰威. 几株乳酸菌益生潜力及降胆固醇的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1146- 1149.
LI Yan, ZHANG Lan-wei. Study on the probiotic properties of some lactic acid bacteria strains[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2007, 34(6): 1146- 1149. (in Chinese)

《食品与生物技术学报》征稿、征订启事

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的有关食品科学与工程、生物技术与发酵工程及其相关研究的专业性学术期刊,为CSCD核心期刊、全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外10余家著名检索系统收录。主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程,农产品及水产品加工与贮藏,动物营养与饲料工程,微生物发酵,生物制药工程,环境生物技术等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述文章等,供相关领域的高等院校、科研院所、企事业单位的教学、科研等专业技术人员、专业管理人员以及有关院校师生阅读,热忱欢迎广大读者订阅。

《食品与生物技术学报》编辑部