

猪源降胆固醇乳酸菌的分离鉴定

刘长建, 齐小辉, 刘秋, 蒋本国, 闫建芳, 石若瑜

(大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 乳酸菌是一种重要的益生菌,具有降解胆固醇能力。作者从猪消化道中分离出 31 株疑似菌株,在高胆固醇培养基中培养后有 18 株菌株生长。利用磷硫铁法对体外降胆固醇进行了研究,结果表明,胆固醇降解率在 0~47.26%,其中 4 株乳酸菌的胆固醇降解率大于 30%,分别是 r16、r53、r762 和 m661。通过细胞形态、生理生化试验和 16S rDNA 分子生物学鉴定,最终鉴定 r16、r53 和 r762 为植物乳杆菌, m661 为鹌鸡肠球菌。

关键词: 猪, 乳酸菌, 降胆固醇, 鉴定

中图分类号: Q 939.117 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)08-0826-05

Isolation and Identification of Cholesterol-Reducing Lactic Acid Bacteria from Pig

LIU Chang-jian, QI Xiao-hui, LIU Qiu, JIANG Ben-guo, YAN Jian-fang, SHI Ruan-yu

(College of Life Science, Dalian Nationalities University, Liaoning Dalian 116600, China)

Abstract: Lactic acid bacteria are a kind of important probiotics, which have the ability of cholesterol-reducing. Total 31 strains of Lactic acid bacteria were isolated from pig source. Among these strains, 18 strains could grow in the medium containing high cholesterol using phosphate pyrite method and the cholesterol-removal rate of those strain varified from 0 to 47.26% in vitro. Among them, four strains, namely r16, r53, r762, and m66, exhibit high cholesterol reducing ability more than 30%, . Based on the morphological, physiological, biochemistry characteristics and 16S rDNA sequencing analysis, strain r16, r53, and r762 were identified as *Lactobacillus plantarum*, and m661 as *Enterococcus gallinarum*.

Key words: pig, lactic acid bacteria, cholesterol removal, identification

随着人们生活水平的提高和膳食营养的增加,胆固醇的摄入量很容易超标,血液中胆固醇质量浓度每上升 1%,冠心病死亡率则上升 2%~3%^[1]。保持血液中胆固醇质量浓度在正常范围内对于预防动脉粥样硬化和心脑血管疾病是至关重要的。国内外实验证明乳酸菌有较强的降低胆固醇作用,其发酵食品也具有降低胆固醇的功效,适量饮用乳酸菌及乳酸菌发酵食品可有效降低血液中胆固醇

含量,从而减少心血管疾病的发病几率^[2-3]。

到目前为止,乳酸菌对胆固醇影响的大多数研究大多是从奶制品或婴儿粪便分离的物种。而乳酸菌在自然界分布广泛,可栖居于人和各种动物的消化道及其它器官内。作者通过体外试验,从猪的消化道中分离到多株降胆固醇的乳酸菌,并从中筛选出几株高效降胆固醇的乳酸菌,为降胆固醇乳酸菌的研究开发提供一定的参考依据。

收稿日期: 2011-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671398,31070005)。

作者简介: 刘长建(1975-),男,辽宁普兰店人,工学硕士,工程师,主要从事应用微生物研究。E-mail:lcj@dlnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 乳酸菌分离材料

300 日龄的生长状况良好猪(体重约 110 kg)的口腔、胃、十二指肠、小肠、大肠、肛门等 6 个部位的内容物。

1.2 仪器与试剂

液相色谱仪,UV-2450 分光光度计:日本岛津公司产品;CF15RX 高速冷冻离心机:日本日立公司产品;DNP-9052 恒温培养箱:上海精宏公司产品。

胆固醇、氢氧化钾:均为国药集团化学试剂公司分析纯产品。PCR 反应所用的相关试剂均购于大连宝生物公司。显色剂:先配制 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的磷酸溶液,质量分数为 2.5%;移液管取 8 mL 上述溶液,浓硫酸定容 100 mL,即为显色剂,冷藏备用。

1.3 培养基

MRS 培养基、M17 培养基、PY 培养基和 PYG 培养基。

另外还有含 0.12 mg/mL 胆固醇的胶束液体培养基(以 1 000 mL 计),分别取 0.12 g 胆固醇、0.24 g 牛胆盐、0.12 g 蔗糖酯、1.2 mL 吐温 80,混合后玻棒捻碎搅拌均匀,移液枪加冰乙酸(5 mL),水浴锅加热溶解。0.45 μm 膜过滤并快速加入到相应的液体培养基中,边加入边搅拌,使其形成均匀稳定的胶体溶液^[4-5]。

1.4 乳酸菌菌株的初步分离与纯化

取样品 1 g,先连续稀释 $10^5 \sim 10^9$ 倍,分别取 200 μL 稀释液涂布于 MRS、M17 固体平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置厌氧培养。挑取生长良好,溶钙圈较大的菌落,平板划线纯化,平行两次,对样品进行编号,斜面保存。

1.5 菌落形态及菌体细胞形态

筛选的菌株于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h 后,观察菌落特征,记录菌落边缘形状、大小、颜色、与培养基的结合程度等。同时显微观察菌体革兰氏染色、个体形态、大小等细胞特征。

1.6 乳酸菌的初步鉴定(高效液相色谱法)

样品处理:将活化好的菌株进行两次液体培养基培养,48 h 后离心(4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min,10 min)取上清液,0.2 μm 膜过滤。L-乳酸标准品:称取 0.050 8 g 乳酸,溶于质量分数 0.1%磷酸缓冲液

(pH 值 2.5),定容 10 mL,用 0.2 μm 膜过滤。液相色谱条件:柱子:Aminex HPX-87H;流动相:0.02 mol/L 硫酸;流量:1.0 mL/min;柱箱温度:40 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:210 nm^[4]。

1.7 降胆固醇菌株的筛选

胆固醇标准曲线测定(磷硫铁法):取 2 mL 胆固醇乙醇溶液(质量浓度分别为 0、0.008、0.016、0.024、0.032、0.04 mg/mL)分别加入具塞试管,取显色剂 2 mL 沿管壁缓慢加入,充分振荡使其完全显色。冷却至室温后,光吸收值(560 nm)对胆固醇浓度做标准曲线^[4]。

分离的乳酸菌液体培养基活化,然后按体积分数 1%接种量分别接种于相应的含胆固醇液体培养基,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养。24 h 后取出试管,摇匀后取 1 mL 培养液,加入 2 mL 无水乙醇,振荡 1 min,5 min 静置后再次振荡混匀沉淀,10 min 离心(转速为 10 000 r/min)。取上清 2 mL^[7],按上述磷硫铁法,依据标准曲线测定胆固醇质量浓度(C_1),同时测定初始的胆固醇质量浓度(C_0),平行 3 次^[4]。并按以下公式计算乳酸菌对培养基中胆固醇的降解率:

$$\text{胆固醇的降解} = ((C_0 - C_1) / C_0) \times 100\%$$

根据降解率筛选出对胆固醇具有降解能力的菌株,转接于斜面培养基 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.8 生理生化特性测定

对选定的几株乳酸菌进行了葡萄糖和葡萄糖酸盐产酸试验、淀粉水解试验、石蕊牛奶试验、明胶液化试验、乙酰甲基甲醇试验(V-P 试验)、精氨酸产氨试验、碳水化合物发酵产酸测定。

1.9 分子生物学鉴定(16S rDNA)

微波法^[7,8]提取基因组 DNA,并对其 16S rDNA 进行扩增:采用引物 F 27 (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG 3')和 R1492 (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')。PCR 产物委托宝生物公司进行测序,将该菌的 16S rDNA 序列输入 NCBI 核酸数据库中,与基因库内所有核酸序列进行比较。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌初步分离结果

从猪 7 个部位样品中,分离得到生长较好,溶

钙圈较大的 149 株乳酸菌疑似菌株,其中 H_2O_2 酶反应呈阴性、革兰氏染色呈阳性的菌株有 31 株。根据高效液相色谱出峰时间与标准样一致,培养基成分中不含乳酸,可以推断菌株产乳酸,可确定 31 株菌株均为乳酸菌。

2.2 胆固醇标准曲线

室温条件下,测定标准曲线为: $Y=6.5393X+0.0027$, R^2 值=0.9985,说明胆固醇质量浓度 X 和吸光值 Y 呈良好的线性关系,可以用磷硫铁法测定培养基中胆固醇的质量浓度。

2.3 胆固醇降解率测定

将选取的 35 株乳酸菌接种到高胆固醇培养基静置培养 24 h,其中有 13 株菌株没有生长,可能是培养基中的胆盐抑制其生长。另外 22 株乳酸菌进行胆固醇降解率测定(见表 1),其中降解率高于 30% 的有 4 株,在 20~30% 有 12 株,低于 20% 的有 6 株。r16 的降解率最高,为 47.26%。选取降解率最高的 4 株菌株:r16、r762、m661、r53 进行下一步实验。

表 1 不同分离源的降解胆固醇乳酸菌

Tab. 1 Isolated Lactic Acid Bacteria with cholesterol-reducing ability

来源	不同胆固醇降解率(E)的菌株数		
	≥30%	20%~30%	≤20%
口腔	1	4	2
胃	1	1	0
十二指肠	1	1	0
小肠	0	4	1
大肠	0	1	2
肛门	1	1	1

2.4 菌落形态及菌体细胞形态

筛选出的 4 株胆固醇降解率较高的乳酸菌,菌落边缘整齐,乳白色。革兰氏染色均为阳性,显微镜下观察,细胞的形态大多数是杆状,r16 为短杆,r53、r762 为长杆,只有 m661 为球形。

2.5 生理生化特性测定

对筛选出 4 株菌株进行生化特性测定结果见表 2。4 株乳酸菌的石蕊牛奶产酸试验呈阳性,葡萄糖产气试验、水解淀粉试验、明胶液化、V-P 试验结果均为阴性。4 株菌株能利用各种糖发酵产酸,但 r16、r53、r762、m661 均不能水解鼠李糖,r53、r762、m661 不能水解木糖,r53 不能利用阿拉伯糖,

m661 还不能利用阿拉伯糖、棉籽糖和山梨醇。

表 2 生理生化特性

Tab. 2 Physiological characteristics of the isolated strains

菌株	r16	r53	r762	m661
精氨酸产氨	-	-	-	-
淀粉水解	-	-	-	-
石蕊牛奶产酸	+	+	+	+
石蕊牛奶凝固	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-
V-P 试验	-	-	-	-
葡萄糖酸钠	+	+	+	+
苦杏仁苷	+	+	+	+
阿拉伯糖	+	-	+	-
七叶苷	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+
棉籽糖	+	+	+	-
鼠李糖	-	-	-	-
核糖	+	+	+	+
山梨醇	+	+	+	-
蔗糖	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+	+
木糖	+	-	-	-

2.6 分子生物学鉴定(16S rDNA)

以菌株 r16、r761、r53、m661 的总 DNA 为模板,以通用引物进行 PCR 扩增,获得了 4 条特异的、大小约为 1500 bp 的扩增条带。获得的特异片段纯化后进行测序,分别获得了 1441、1441、1440 和 1417 bp 的片段,提交到 GenBank 获得基因登陆号(GenBank accession number)分别为 JN819553、JN819554、JN819555 和 JN819556,并

通过 Blast 程序与 GenBank 核酸序列库中的序列进行比对,发现 r16、r762 和 r53 与植物乳杆菌或戊糖乳杆菌的相似性都超过 99%。选取相似性较高的几株植物乳杆菌的 16S rRNA 序列,经 DNAMAN 软件的 Multiple Sequence Alignment 模块做同源性比较,结果表明 r16、r762 和 r53 与菌株 *L. plantarum* IMAU10239 (GU138567.1)、*L. plantarum* KW30 (GU552552.1)、*L. plantarum*

UB9 (AB603688.1) 的同源性都大于 99%,结合生理生化的鉴定结果,将 r16、r762 和 r53 鉴定为植物乳杆菌。而菌株 m661 与多株 *Enterococcus gallinarum* 的相似性达到 100%,经同源性比较,结果表明 m661 与菌株 *E. gallinarum* W211(JF915769.1) 的同源性达到 100%,结合其细胞形态、生理生化特性,可以鉴定为鸢鸡肠球菌(见表 3)。

表 3 菌株鉴定结果

Tab. 3 Identification of Lactic Acid Bacteria

分离源	菌株	扩增的 16S rDNA	登录号	胆固醇降解率/%	鉴定结果
粪便	r16	1441	JN819553	47.26	植物乳杆菌
口腔	r762	1446	JN819554	38.34	植物乳杆菌
十二指肠	r53	1440	JN819555	32.45	植物乳杆菌
胃	m661	1417	JN819556	34.47	鸢鸡肠球菌

3 结 语

世界卫生组织预测到 2030 年,心血管疾病将是导致死亡的最主要因素,将影响全球 2.36 千万人。而当前对心血管疾病的药物治疗,因其相对成本高和相关联的副作用,不被认为是长期的最佳选择^[3]。目前,国内外报道的降胆固醇乳酸菌种类主要集中在乳杆菌属,如嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、罗伊氏乳杆菌等。相关的降胆固醇机理研究也比较多,主要集中在吸收(包埋)理论和共沉淀理论^[9]。作者筛选的菌株就是为后续的降胆固醇机理研究提供可靠的菌株。

实验从猪源乳酸菌样品中初步分离得到 H₂O₂ 酶阴性、革兰氏阳性、发酵液产乳酸的乳酸菌 31 株。通过在培养基中添加胆固醇,用磷硫铁法测定其培养基中胆固醇质量浓度的变化来评估其胆固醇的降解率。结果表明:有 18 株乳酸菌能降低培

养基中胆固醇的质量浓度,其中降解率高于 30% 的有 4 株,分别是 r16、r762、r53、m661,而乳酸菌 r16 分离自肛门中粪便,其胆固醇降解率最大,为 47.26%。根据菌落、细胞形态、生理生化特性、以及 16S RrDNA 序列比对,可鉴定 r16、r762、r53 为 *Lactobacillus plantarum* (植物乳杆菌)。从胃液中分离的乳酸菌 m661 为 *Enterococcus gallinarum* (鸢鸡肠球菌),对培养基中的胆固醇的降解率为 34.4%。

高胆固醇血症的治疗替代的发展策略是有必要的,特别是对于临界胆固醇水平的人。作者筛选出的 3 株植物乳杆菌和 1 株鸢鸡肠球菌,可经过进一步的血清学实验研究,应用于人体临床试验,测试该菌株在人体内的存活率,体内降解胆固醇的能力等方面,提供更多的菌种资源。还可以应用于食品行业,如降胆固醇功能性食品研发。尤其是鸢鸡肠球菌,目前的相关报道还很少,可能有更大的研究价值。

参考文献(References):

- [1] Manson J E, Tosteson H, Ridker P M, et al. The primary prevention of myocardial infarction[J]. *New England Journal of Medicine*, 1992, 326(21):1406-1416.
- [2] Lin SY, Ayres J W, Winkler W J, et al. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results[J]. *Journal of*

- Dairy Science**, 1989, 72(11): 2885—2899.
- [3] Ning Xie, Yi Cui¹, Ya-Ni Yin, et al. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*[EB/OL]. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/53>, 2011-11-05.
- [4] 刘长建, 姜波, 安晓雯, 等. 菠菜中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 29(6): 937—940.
LIU Chang-jian, JIANG Bo, AN Xiao-wen, et al. Isolation and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from spinach[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 29(6): 937—940.
- [5] Psomas EI, Fletouris DJ, Litopoulou-Tzanetaki E, et al. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(11): 3416—3422.
- [6] 王巍, 邹积宏, 袁杰利. 具有降胆固醇功能益生菌的筛选研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2009, 4: 297—300.
WANG Wei, ZOU Ji-hong, YUAN Jie-li. Research on screening of cholesterol-reducing *Lactobacillus*[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2009, 4: 297—300.
- [7] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33: 17—20.
- [8] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 82—84.
XU Ping, LI Wen-jun, XU Li-hua, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes [J]. *Microbiology*, 2003, 30(4): 82—84.
- [9] 汪晓辉, 于平, 励建荣. 泡菜、传统腊肠中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学报*, 49(11): 1438—1444.
Wang Xiao-hui, Yu Ping, Li Jian-rong. Isolation and identification of cholesterol-reducing lactic acid bacteria from indigenous fermented pickles and dried-sausage[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 49(11): 1438—1444.

科技信息

欧盟食品安全局公布欧洲人的铅膳食暴露情况

2012年7月11日, 欧盟食品安全局(EFSA)公布了欧盟地区人群的铅膳食暴露情况, 分析了婴儿、儿童、中年人、老年人有关铅的暴露量。

欧盟研究了144,206份与铅有关的结果, 然后将这些结果分成4个不同的等级。研究发现, 在所检测的食品中, 超过半数的铅含量低于检测限量或定量标准, 幼儿及其他儿童的暴露量最高, 报告显示婴儿的铅暴露量为0.83—0.93 g/kg b. w. /d.

据估计, 成人的暴露量为0.50 g/kg b. w. /d, 年老者和高龄老年人人群的铅暴露特征与成人相似, 而青少年膳食暴露量略高。

欧盟还研究了铅暴露风险较高的食品, 这些食品分别为自来水、小麦面包和面包卷、普通啤酒、糕点和蛋糕、碘盐、土豆。

[信息来源] EFSA. Lead dietary exposure in the European population[EB/OL]. (2012-7-11). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2831.htm>.