

绿色魏斯氏菌 ORC4 的抗氧化、降胆固醇作用

刘长建, 刘秋*, 姜波, 闫建芳, 齐小辉

(大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 从风干香肠中分离得到一株生长良好的乳酸菌 ORC4, 菌株能产乳酸、革兰氏染色阳性、接触酶阴性。经系统发育分析, 结合菌落形态、细胞形态、生化反应试验, 确定菌株 ORC4 为绿色魏斯氏菌。绿色魏斯氏菌 ORC4 的完整和破碎细胞对 O_2^- 、DPPH· 和 ·OH 的清除率都与细胞浓度呈正相关。在细胞浓度为 5×10^8 CFU/mL 时, 菌株 ORC4 破碎细胞对 O_2^- 、DPPH· 和 ·OH 的清除率都高于完整细胞, 分别为 45.17%、56.17% 和 54.01%。菌株 ORC4 还能清除培养基中最多为 35.87 μ g/mL 的胆固醇, 单位细胞干重的胆固醇清除率为 19.89 μ g/mg。

关键词: 风干香肠; 绿色魏斯氏菌; 16S rDNA; 系统发育树; 抗氧化作用; 降胆固醇作用
中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)05—0512—05

Antioxidative and Cholesterol-Reducing Ability of *Weissella viridescens* ORC4 from Dry Fermented Sausages

LIU Changjian, LIU Qiu*, JIANG Bo, YAN Jianfang, QI Xiaohui

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

Abstract: A Gram (+), non-motile, facultatively anaerobic, rod-or coccoid-shaped bacterium, designated strain ORC4, was isolated from the dry fermented sausages. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that strain ORC4 belonged to the genus *Weissella*, with highest sequence similarity to *Weissella viridescens* NRIC1536 (100%). The intact cells and intracellular extract of strain ORC4 could inhibit O_2^- , DPPH·, and ·OH. Three free radicals-scavenging ratios of intracellular extract were positively correlated with bacterial density, respectively, the intact cells could do the same. The intracellular extract had higher scavenging ratios on three free radicals than the intact cells. At a concentration of 5×10^8 CFU/mL, scavenging ratios of intracellular extract on O_2^- , DPPH· and ·OH were 45.17%, 56.17% and 54.01% respectively. In addition, strain ORC4 could reduce 35.87 μ g/mL cholesterol, and the unit cell dry weight of cholesterol removal rate was 19.89 μ g/mg.

Keywords: dry fermented sausages, *Weissella viridescens*, 16S rDNA, phylogenetic tree, antioxidative effect, cholesterol-reducing ability

收稿日期: 2014-02-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070005); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(DC12010103, DC120101034)。

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

* 通信作者: 刘秋(1969—), 女, 辽宁普兰店人, 农学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事放线菌应用方面的研究。

E-mail: liuqiu@dlnu.edu.cn

魏斯氏菌属(*Weissella*)与乳杆菌属十分相似,也是兼性厌氧、触酶阴性、革兰氏阳性,但呈链状排列的短杆形或类球形。魏斯氏菌作为乳酸菌广泛存在于肉制品、泡菜等发酵食品中,通过 16S rRNA 序列、23S rRNA 序列的研究发现,与乳杆菌属、明串珠菌属相近的这一个族群应放在属的分类位置,Collin 等提出了魏斯氏菌属(*Weissella*)^[1],并在 1994 年得到确认^[2]。当时共有 7 个种都归到该属,包括 Niven 等 1957 年从熏肉中分离到的新种,最初命名为 *Lactobacillus viridescens*^[3],而现在命名为 *Weissella viridescens*,是这个属的第一个被分离的种,并作为该属的模式菌株。2013 年分别从驼螽的消化道^[4]、发酵可可豆^[5]和发酵的谷物^[6]中又分离到 3 个新种,到现在魏斯氏菌属共有 18 个种。

食物发酵的通常乳酸菌属包括肉食杆菌属、肠球菌属、乳杆菌属、乳球菌属、明串珠菌属、酒球菌属、片球菌属、链球菌属、四链球菌属、魏斯氏菌属^[7]。而魏斯氏菌属是植物发酵初期的优势菌群,能提供了几种潜在的保健和营养作用^[8],包括食物的营养价值,控制肠道感染,改善乳糖的消化,控制胆固醇水平,以及多个癌症的发病^[9]。因为乳酸菌的发酵产品能吸收血液中的胆固醇,降低血液中的胆固醇浓度,这对于预防动脉粥样硬化和心脑血管疾病是至关重要的^[10-11]。同时乳酸菌还显示了具有非常强的清除氧自由基的能力,能在食用含有抗氧化作用的食物时,对其致癌作用的各个阶段起到预防作用^[9]。作者从传统风干香肠中分离出乳酸菌,对其抗氧化活性等益生特性进行了体外评估,为乳酸菌替代抗氧化剂的应用和进一步研究打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 发酵食品风干香肠:购自大连市场;主要试剂胆固醇、乙酸等:国药集团化学试剂公司。邻苯二甲醛(Sigma),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(Johnson Matthey);PCR 反应所用的相关试剂:购于大连宝生物。

1.1.2 主要仪器 UV-2450 分光光度计:日本岛津;DNP-9052 恒温培养箱:上海精宏;JY92-IIN 超声破碎仪:宁波新芝;TC-512 基因扩增仪:Techne。

1.2 培养基

分离用培养基:MRS 培养基(Merck)和 M17 培

养基(Oxoid)。其它培养基:PY 培养基、PYG 培养基、含 6.5、18 g/dL NaCl 的 MRS 培养基^[12]和含 0.10 mg/mL 胆固醇的胶束液体培养基^[13-14]。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌的初步分离及纯化 取 1.0 g 样品加入 9.0 mL 无菌水室温浸泡 24 h。连续稀释后涂布于含碳酸钙的两种分离固体培养基,37 ℃静置培养 24~48 h。挑取产生溶钙圈的单菌落,纯化两次。筛选过氧化氢酶阴性、革兰氏阳性、发酵产乳酸^[15]的菌株进行下一步研究。

1.3.2 菌落形态、菌体细胞形态及生理生化特性 乳酸菌接种平板后,37 ℃培养 48 h 后,记录菌落边缘形状、大小、颜色等菌落特征。同时高倍显微观察菌体革兰氏染色、个体形状、大小等细胞特征。分别测定菌株在 10 ℃和 45 ℃的生长情况、运动性、耐盐性、葡萄糖发酵产酸产气试验等生理生化特征^[12]。

1.3.3 菌株的分子生物学鉴定 将纯化得到的菌种在 37 ℃条件培养 2 d 后,离心收集菌体;提取细菌总 DNA。采用通用引物对其 16S rDNA 进行扩增,并进行测序后将序列输入 NCBI 核酸数据库中,与基因库核酸序列进行比对。并利用 MEGA5.0 软件中邻接法(Neighbor-Joining),采用 Kimura-2 参数模型进行系统发育树的构建^[15]。

1.3.4 乳酸菌的降胆固醇性能测定 邻苯二甲醛法的胆固醇标准曲线测定^[16-17],质量浓度范围为 5~25 μg/mL。乳酸菌液体培养活化后,以 5%接种体积分数接种于含胆固醇液体培养基,37 ℃分别培养 24、36、48、60 h。摇匀后取菌悬液离心,取沉淀经冷冻干燥后称量干重;另取 0.5 mL 培养液加 3 mL 的 95%乙醇,再加 2 mL 氢氧化钾乙醇溶液(12 g/dL);充分混匀后 60 ℃水浴加热 20 min;迅速冷却后,加入 5 mL 正己烷,充分混匀(20 s~1 min),加 3 mL 无菌超纯水;取上清液加正己烷 2.5 mL 于 10 mL 具塞试管中,60 ℃氮吹干,加 2 mL 冰乙酸溶解,加 2 mL 显色剂(1.0 mg/mL 邻苯二甲醛/冰乙酸溶液)、2 mL 浓硫酸迅速充分混匀;放置 10 min,550 nm 条件下测吸光度值^[16-17]。根据标准曲线测定胆固醇浓度,同时测定培养基初始的胆固醇质量浓度。

1.3.5 乳酸菌的体外抗氧化试验 取 10 mL 培养液,8 000 r/min 离心 10 min,无菌水洗涤 3 次,制成菌悬液,血球计数板计数并调整细胞浓度至 10⁹ CFU/mL^[15]。所得菌悬液分为两组,一组作为完整细

胞组;另一组超声破碎仪 280 W,间隔 5 s 处理 5 s,至显微镜下检查没有完整菌体为止,大约 10 min。采用 Fenton 体系测定乳酸菌对羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除活性^[15,18];测定乳酸菌对 DPPH 自由基的清除活性^[15,18];邻苯三酚自氧化法测定乳酸菌对超氧阴离子自由基(O_2^-)的清除活性^[15,18-19]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的初步筛选

共筛选出 13 株疑似乳酸菌,接触酶试验筛选出 8 株阴性菌株。高效液相色谱法对发酵液的检测结果表明,8 株均产乳酸。选取生长较好的一株 ORC4 进一步研究。

2.2 菌株的多相鉴定

2.2.1 菌落、细胞形态及生长特性观察 乳酸菌 ORC4 菌落呈乳白色、低凸面、表面光滑,直径小于 0.3 mm;细胞呈近球形或者短杆状,革兰氏染色为阳性,见图 1。兼性厌氧,不运动,不形成芽孢;6.5、18 g/dL NaCl 和 45 °C 条件均能生长,而在 10 °C 不能生长,发酵葡萄糖产酸不产气,见表 1。

2.2.2 16S rDNA 序列分析 以菌株 ORC4 总的 DNA 为模板,获得了 1 条长度 1 410 bp 特异的扩增条带,序列的 GenBank 登录号为 KC108670。通过 Blast 程序与数据库中序列进行比对,发现 ORC4 与 *Weissella viridescens* NRIC 1536 (T) 的相似性为 100%。将魏斯氏菌属现有 18 个种^[20]的模式菌 16S rRNA 序列,与菌株 ORC4 进行聚类分析,见图 2。菌

株 ORC4 与 *W.viridescens* NRIC 1536(T) 在同一分支上。结合菌株的形态特征、生理生化特征,可以确定菌株 ORC4 属于魏斯氏菌属(*Weissella*) 中的绿色魏斯氏菌(*W.viridescens*)。

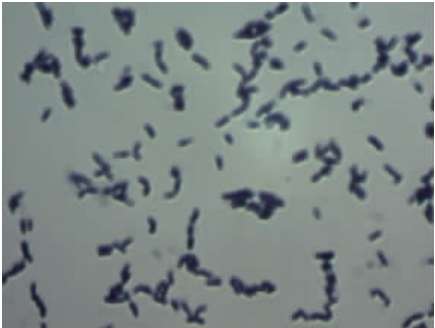


图 1 菌株细胞形态的显微观察(×100)

Fig. 1 Cells morphology of the strain(×100)

表 1 菌株的生长特性

Table 1 Growth characteristics of the strains

试验项目	结果
革兰氏染色	+
运动性	-
10 °C	-
45 °C	+
6.5 g/dL NaCl	+
18 g/dL NaCl	+
葡萄糖产酸	+
葡萄糖产气	-

注:“+”表示生长,“-”表示不生长。

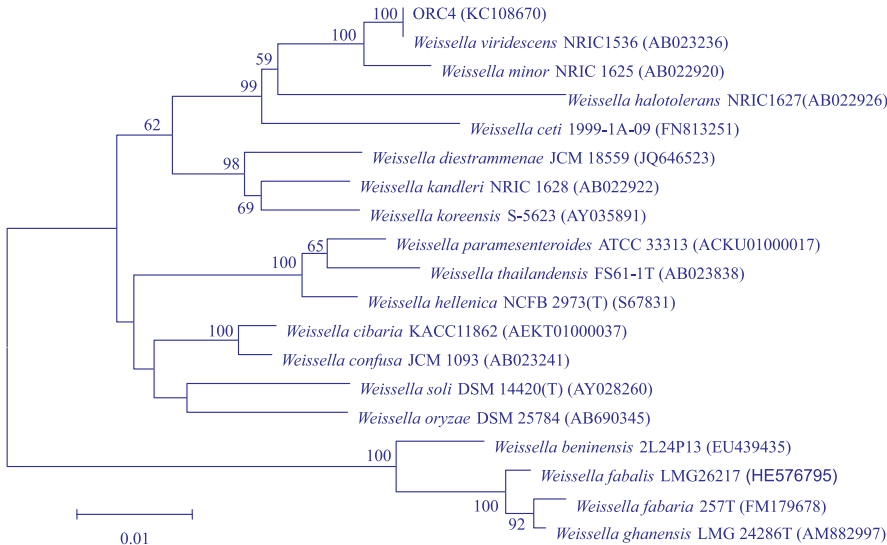


图 2 菌株 ORC4 和参比明串珠菌属菌株的 16S rDNA 同源性的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based 16S rDNA sequences similarity of strain ORC4 and the reference strains

2.3 乳酸菌的益生特性研究

2.3.1 乳酸菌降胆固醇能力测试 室温条件下,测定胆固醇的标准曲线为: $Y=6.539\ 3X+0.002\ 7$, $R^2=0.998\ 5$,说明胆固醇质量浓度(X)和吸光值(Y)呈良好的线性关系,可以用该法测定培养基中胆固醇的质量浓度。

乳酸菌 ORC4 能降低培养基中的胆固醇,见图 3。随着培养时间的增加,胆固醇降解量和单位细胞干重的降胆固醇量均升高;而在 36~48 h 之间,胆固醇降解速度和单位细胞干重的降胆固醇速度都有明显增加的趋势;但在 60 h,菌株 ORC4 能清除 35.87 $\mu\text{g/mL}$ 的胆固醇,而单位细胞干重的降胆固醇量与 48 h 时相比基本不变,为 19.87 $\mu\text{g/mg}$ 。

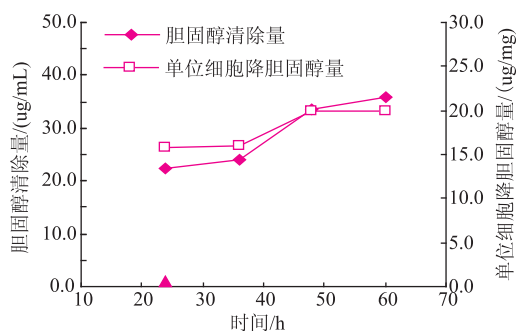


图 3 培养时间对乳酸菌降胆固醇的影响

Fig. 3 Cholesterol-lowering ratio of LAB during growth

2.3.2 乳酸菌对自由基清除活性的测定 由图 4 可以看出,乳酸菌 ORC4 的完整细胞和破碎细胞对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH $\cdot$ 均有清除能力,且清除率与细胞浓度(破碎细胞也以细胞浓度作为单位)呈正相关。当细胞浓度为 5×10^8 CFU/mL 时,破碎细胞对三个自由基的清除率都大于 45%,对 DPPH 的清除率最高,为 56.17%;均高于完整细胞对自由基的清除(完整细胞的清除率均低于 40%),完整细胞对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率最低,只有 14.73%。细胞破碎对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率影响最大,达到 54.01%。

3 结 语

乳酸菌在自然界分布广泛,作者从发酵香肠中初步分离得到 H_2O_2 酶阴性、革兰氏阳性、发酵液产乳酸的乳酸菌 13 株,从中筛选到一株生长良好的乳酸菌 ORC4。根据菌落、细胞形态、生理生化特性、以及 16S rDNA 序列比对,可鉴定 ORC4 为绿色魏斯氏菌。

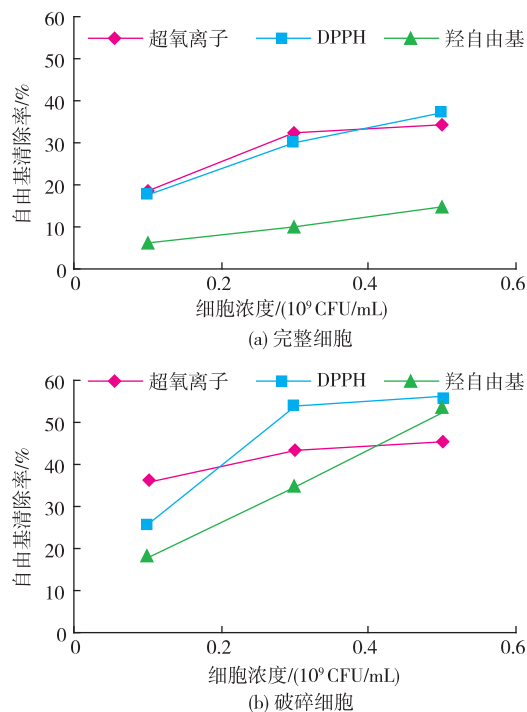


图 4 完整细胞和破碎细胞对自由基的清除作用

Fig. 4 Scavenging effects of intact cells and intracellular extract on hydroxyl radical

经过抗氧化测定试验,发现绿色魏斯氏菌 ORC4 对自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH $\cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 都有一定的清除能力,其细胞浓度(包括完整细胞和破碎细胞)与自由基的清除率均分别呈正相关。在细胞浓度为 5×10^8 CFU/mL 时,菌株 ORC4 破碎细胞对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH $\cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 的清除率都大于 45%;而完整细胞对 3 种自由基的清除率均低于 40%;破碎细胞对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率变化最大,完整细胞为 14.73%而破碎细胞为 54.01%。体外降胆固醇试验发现绿色魏斯氏菌 ORC4 具有降解培养基中胆固醇的能力,降解量随着培养时间的增加、菌体量的增长呈上升趋势,菌株 ORC4 在 36~48 h 对胆固醇的降解量增加明显;而在 48 h 后的降解趋势进入一个平稳期,单位细胞干重的降胆固醇量为 19.89 $\mu\text{g/mg}$;在 60 h 时,胆固醇降解量是 35.87 $\mu\text{g/mL}$ 。

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^[9]。乳酸菌能通过改善肠道微生态平衡清除自由基实现延缓衰老^[8]。国内外报道的相关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^[21-22]。对魏斯氏菌属的抗氧化、降胆固醇能力的研究很

少,本实验筛选出的一株绿色魏斯氏菌,并对其清除自由基、去除胆固醇的能力进行了研究,这样就

可以充分利用乳酸菌开发出功能性发酵食品、提高发酵食品的附加值。

参考文献:

- [1] Niven C F, Evans J B. *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments[J]. **J Bacteriol**, 1957, 73(6): 758-759.
- [2] Aguirre M, Collins M D. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB[J]. **International Journal of System Bacteriology**, 1994, 44(2): 370-371.
- [3] Collins M D, Samelis J, Metaxopoulos J, et al. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species [J]. **J Appl Bacteriol**, 1993, 75: 595-603.
- [4] Oh S J, Shin N R, Hyun D W, et al. *Weissella diestrammenae* sp. nov., isolated from the gut of a camel cricket (*Diestrammena coreana*)[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2013, 63: 2951-2956.
- [5] Snauwaert I, Papalexandratou Z, De Vuyst L, et al. Characterization of strains of *Weissella fabalis* sp. nov. and *Fructobacillus tropaeoli* from spontaneous cocoa bean fermentations[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2013, 63: 1709-1716.
- [6] Tohno M, Kitahara M, Inoue H, et al. *Weissella oryzae* sp. nov., isolated from fermented rice grains [J]. **Int J Syst Evol, Microbiol**, 2013, 63: 1417-1420.
- [7] Stiles M E, Holzapfel W H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy[J]. **Int J Food Microbiol**, 1997, 36: 1-29.
- [8] Lin D C. Probiotics as functional foods[J]. **Nutr Clin Pract**, 2003, 18: 497-506.
- [9] KIM JONG-EUN, KIM JI YEON, LEE KI WON. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria [J]. **J Microbiol Biotechnol**, 2007, 17(8): 1227-1235.
- [10] ZHENG Yongchen, LU Yingli, WANG Jinfeng. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains[J]. **PLOS ONE**, 2013, 8(7): e69868
- [11] Sarkar S. Potential of acidophilus milk to lower cholesterol[J]. **Nutrition and Food Science**, 2003, 33: 273-277.
- [12] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 117-128.
- [13] 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 Changjian, JIANG Bo, AN Xiaowen, 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. (in Chinese)
- [14] Psomas E I, Fletouris D J, 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.
- [15] 刘长建, 刘秋, 姜波, 等. 鸡肠球菌 m661 的抗氧化、降胆固醇作用[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 157-161.
LIU Changjian, LIU Qiu, JIANG Bo, et al. Antioxidative probiotic properties of *Enterococcus gallinarum* for pig[J]. **Food Science**, 2013, 34(7): 157-161. (in Chinese)
- [16] LIU Hanlu, YANG Chenjie, JING Yi, et al. Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. **Can J Microbiol**, 2013, 59: 563-569.
- [17] Rudel L L, Morris M D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde[J]. **J Lipid Res**, 1973, 14: 364-366.
- [18] JIANG Bo, ZHANG Hongyan, LIU Changjian, et al. Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from Ginkgo biloba leaves[J]. **Med Chem Res**, 2010, 19(3): 262-270.
- [19] Issoufou Amadou, Olasunkanmi S Gbadamosi, Yong-Hui Shi, et al. Identification of antioxidative peptides from *Lactobacillus plantarum* Lp6 fermented soybean protein meal[J]. **Research Journal of Microbiology**, 2010, 5(5): 372-380.
- [20] Euzéby J P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet [J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1997, 47(2): 590-592.
- [21] Alberto Amaretti, Mattia di Nunzio, Anna Pompei. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2013, 97: 809-817.
- [22] ZHENG Yongchen, LU Yingli, WANG Jinfeng. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan Kefir grains[J]. **Plos One**, 2013, 8(7): 698-699.