

文章编号:1673-1689(2010)06-0937-04

菠菜中降胆固醇乳酸菌的筛选及鉴定

刘长建, 姜波, 安晓雯, 赵轶男, 刘秋

(大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 作者使用4种培养基从菠菜中共分离到乳酸菌33株。通过硫磷铁比色法,测定每株乳酸菌对培养基中胆固醇的清除能力在4.82%~47.58%,清除率在40%以上的有9株,而乳酸菌MB65的胆固醇清除率最高(47.58%)。通过对乳酸菌MB65的形态观察、生理生化试验、糖发酵试验及16S rDNA序列分析等研究,鉴定MB65为干酪乳杆菌。

关键词: 菠菜;乳酸菌;分离鉴定;胆固醇清除

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Isolation and Identification of Cholesterol-Lowering Lactic Acid Bacteria from Spinach

LIU Chang-jian, JIANG Bo, AN Xiao-wen, ZHAO Yi-nan, LIU Qiu

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

Abstract: Total 33 strains of Lactic acid bacteria were isolated from spinach, using four different kinds of media. All strains could reduce cholesterol from media by sulfate-phosphate-ferric methods, and the percentage of cholesterol-removal rate ranged from 4.82% to 47.58%. There are 9 strains exhibited the percentage of cholesterol-removal above 40%, among them, the cholesterol-removal percentage of strain MB65 achieved at 47.58%. Based on morphological, physiological, biochemistry test and 16S rDNA sequencing analysis, strain MB65 was identified as *Lactobacillus casei*.

Key words: spinach; lactic acid bacteria; isolation; identification; cholesterol removal

自19世纪30年代有研究认为“血管壁增厚即动脉粥样硬化症是不正常胆固醇代谢的结果”,已有越来越多的实验和研究表明:胆固醇与冠心病、高血脂等心血管疾病间有关联^[1]。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。一般来说,血胆固醇质量浓度每上升1 g/dL,冠心病死亡率则上升2%。因而,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。

因此研究不影响食品风味、经济实用的降低人体血清胆固醇的方法已成为当前重要的研究课题。近年来国内外的研究表明,乳酸菌具有较强的降胆固醇作用,适量饮用乳酸菌及乳酸菌发酵食品可有效降低血液胆固醇含量,从而减少心血管疾病的发

收稿日期: 2009-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671398); NSFC-KOSEF 国际合作项目(30711140389)。

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方面的研究。

Email: lcj@dlnu.edu.cn

病几率^[2-4]。作者通过体外试验,从菠菜中分离到多株降胆固醇的乳酸菌,并从中筛选出一株高效降胆固醇的乳酸菌。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

液相色谱仪 LC-20AD;日本岛津公司制造;冷冻干燥机 Freezone4.5;美国 Labconco 公司制造;分光光度计 UV-2450;日本岛津公司制造;高速冷冻离心机 CF15RX;日本日立公司制造;恒温培养箱 DNP-9052;上海精宏实验设备有限公司制造。胆固醇、正己烷、氢氧化钾等:均为国药集团化学试剂公司分析纯产品。

1.2 培养基

分离用培养基为 MRS 培养基^[5]和 APT 培养基、改良的同型腐酒培养基、SL 培养基^[6]。

高胆固醇 MRS,即胆固醇胶束液体培养基(0.12 mg/mL,以 1000 mL 计):0.12 g 胆固醇、0.24 g 牛胆盐、0.12 g 蔗糖酯、1.2 mL 吐温 80 搅拌均匀,再加 5 mL 冰乙酸加热溶解。超声 15 min 后,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^[7]。

1.3 磷钼铁法测定胆固醇的标准工作曲线

取 8 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的浓磷酸溶液(2.5 g/dL),浓硫酸定容至 100 mL,即为显色剂。

0~0.04 mg/mL 胆固醇乙醇溶液 2 mL,分别加入 10 mL 具塞试管,取 2 mL 显色剂沿管壁缓慢加入,充分振荡使显色完全。待冷却至室温,反应液分别于 450~650 nm 范围内进行波长扫描。记录选定波长的光吸收值,做标准曲线。

1.4 乳酸菌的初步分离

1 g 菠菜加入 10 mL 无菌生理盐水,35 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 24 h。按 10 倍梯度稀释,取 100 μL 分别涂布于含碳酸钙的 4 种固体分离培养基,35 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24~48 h。挑取产生溶钙圈的单菌落,转接于对应的培养基中,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

将试验菌接种于 PYG 斜面上,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。取一接种环培养物涂于载玻片上,加一滴 10% H_2O_2 ,观察有无气泡产生,选取阴性反应的菌株。

1.5 降解胆固醇菌株的筛选及分离纯化

分别挑取纯化菌株接种于相应的含胆固醇液体培养基,35 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h。摇匀后取 1 mL 培养液,加入 2 mL 无水乙醇,振荡 1 min,静置 5 min,再次振荡混匀沉淀,10 000 r/min 离心 10 min。取

上清液 2 mL^[8]。按上述方法,根据标准曲线测定胆固醇质量浓度(c_1),同时测定培养基初始的胆固醇质量浓度(c_0),平行实验 3 次。并按以下公式计算降解率:

$$\text{胆固醇的降解} = (c_0 - c_1) / c_0 \times 100\%$$

筛选出对胆固醇具有降解能力的菌株,斜面 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6 菌落形态、菌体观察

观察菌落的边缘、大小、颜色,菌体革兰氏染色并观察个体形态。

1.7 生化特性测定

菌株做以下生理生化试验:葡萄糖酸盐产酸、淀粉水解、石蕊牛奶、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、七叶苷水解试验、碳水化合物发酵产酸测定等^[6]。

1.8 乳酸菌的鉴定

1.8.1 发酵液中乳酸的定性分析 采用日本岛津公司的 LC-210AD 高效液相色谱仪做定性分析。色谱柱: Aminex HPX287H,流动相: 0.02 mol/L H_2SO_4 ,具体方法见文献^[5]。

1.8.2 16S rDNA 同源性比较鉴定 将扩增、纯化的 16S rDNA 委托 TAKARA 公司测序,并将该菌的 16S rDNA 序列与 NCBI 核酸数据库进行比对^[5]。

2 实验结果

2.1 胆固醇标准曲线

从图 1 可看出,对不同质量浓度胆固醇的显色反应液在 450~650 nm 进行波长扫描,分别在约 560 nm 处得到最大吸收峰,故选择测定波长为 560 nm。

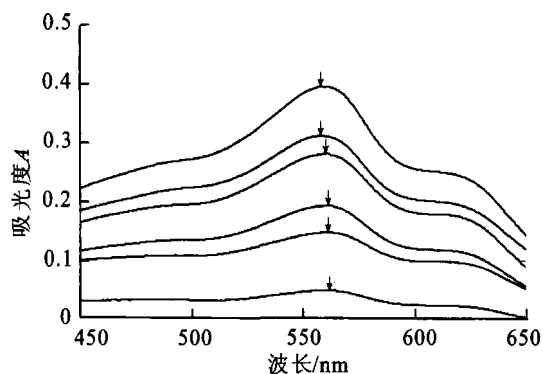


图 1 不同质量浓度胆固醇的波长扫描

Fig. 1 Wave length of the different cholesterol concentrations

胆固醇的标准曲线见图 2。此法测定结果呈现了较好的线性关系,用此种方法测定菌液胆固醇质

量浓度的变化是切实可行的。

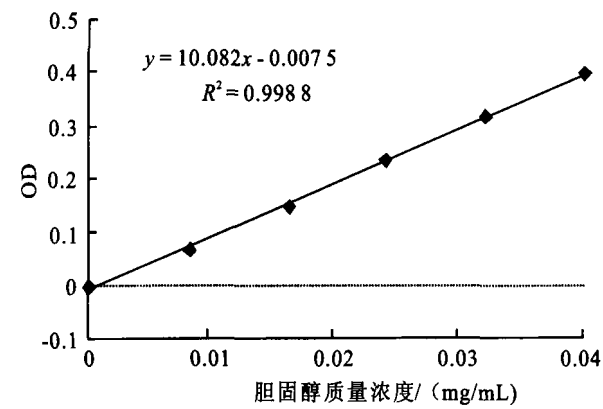


图 2 胆固醇的标准工作曲线
Fig. 2 Standard curve of cholesterol

2.2 乳酸菌的初步分离

共筛选到具有溶钙圈的乳酸菌 135 株,其中 H₂O₂酶阴性菌有 33 株,其余菌株为 H₂O₂酶阳性,见表 1。这些乳酸菌都能降解培养基中的胆固醇,降解率在 4.82%~47.58%之间。其中菌株 MB65 的胆固醇降解率最高,达 47.58%,故选取该菌株做下一步试验。

表 1 分离乳酸菌的统计
Tab. 1 Statistical data of lactic acid bacterial

分离的 菌株数	H ₂ O ₂ 酶阴 性菌株数	胆固醇降解率的菌株数		
		≤20%	20%~40%	≥40%
135	33	15	9	9

2.3 菌落形态及菌体细胞形态观察

乳酸菌 MB65 菌落较小、圆形、淡乳白色、边缘整齐光滑、中央扁平,菌落直径 9~11 mm。革兰氏阳性,细胞的形态多数是杆状或球形的,而球形的多以四联球为主,见图 3。兼性厌氧。经高效液相检测,MB65 菌发酵菌液与乳酸标准品的相对出峰时间一致,而培养基不含乳酸,说明 MB65 产乳酸,可确定该菌株为乳酸菌。

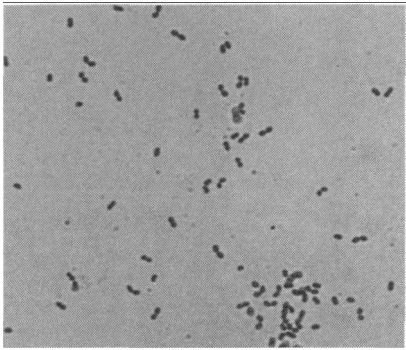


图 3 革兰氏染色后的菌体形态
Fig. 3 Morphological of lactic acid bacterial

2.4 生化特性测定、碳水化合物发酵产酸测定

生化特性试验结果见表 2。乳酸菌 MB65 不能使明胶液化,且 V-P 试验结果也均为阴性;不能水

解淀粉,不能利用肌醇发酵产酸,但可以利用其他各种糖进行发酵产酸。

表 2 乳酸菌 MB65 的形态和生理生化特性
Tab. 2 Morphological and physiological characteristics of strain MB65

试验项目	结果	试验项目	结果
菌体形态	短杆	革兰氏染色	+
菌落	乳白色	H ₂ O ₂ 酶	-
石蕊牛奶凝固	-	石蕊牛奶胨化	+
石蕊牛奶产酸	+	精氨酸产氨	-
V-P 试验	-	七叶苷水解	-
H ₂ S 产生	-	明胶液化	-
葡萄糖产气	-		
淀粉水解	-	甘油	+
葡萄糖	+	果糖	+
甘露糖	+	麦芽糖	+
蔗糖	+	半乳糖	+
乳糖	+	甘露醇	+
山梨醇	+	肌醇	-

2.5 16S rDNA 同源性的鉴定

通过测序反应,得到该菌 16S rDNA 的部分序列(1 467 bp),详见NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) DNA 数据库,序列号为 GQ867048。使用 BLAST 软件(Basic Local Alignment Search Tool, Ver21216)将 MB65 的 16S rDNA 序列与 DNA 数据库中已注册的核酸序列进行同源性比较,从中可发现该菌株的 16S rDNA 与 *Lactobacillus casei* 的 16S rDNA (FJ749428.1, strain IMAU60108) 的同源性最高,为 100%,确定菌株为干酪乳杆菌。

3 结 语

随着高血脂人群的增加,筛选安全高效的降胆固醇乳酸菌对提高人们生活质量、开发功能性食品具有重要意义。近几年的研究已从蔬菜及其制品中分离鉴定出具有不同程度降胆固醇作用的嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌^[9]等多个菌株。作者利用 4 种培养基从菠菜中分离得到了 33 株乳酸菌,都能降低培养基中的胆固醇。其中对胆固醇的降解率在 0-20%的有 15 株;降解率在 20%~40%的有 9 株;降解率大于 40%的有 9 株。从中筛选出了 1 株降解能力最好的菌株 MR65,降胆固醇达到 47.58%,并对其生长特性和生化特性等进行了研究。根据

生理生化特性试验和 16SrDNA 分析等对其进行鉴定,初步确定 MB65 为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)。

作者选育的乳酸菌 MB65 具有很强的降解胆固醇能力,这对于乳酸菌降解胆固醇的研究具有一

定的理论意义。由于筛选的菌株来源于蔬菜中,所以菌种具有很高的安全性,为其在未来食品领域的有效利用提供了现实的价值,具有进一步降胆固醇功能食品的益生菌开发潜力。

参考文献(References):

- [1] Park Y H, Kim J G, Shin Y W, et al. Effect of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats[J]. **Journal Microbiology and Biotechnology**, 2007, 17(4): 655—662.
- [2] Lin S Y, 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] 刘长建,刘秋,姜波. 类植物乳杆菌的耐酸、耐胆盐及降胆固醇特性[J]. 微生物学报,2009,49(9):1176—1179.
LIU Chang-jian, LIU Qiu, JIANG Bo. Acid and bile tolerance and cholesterol reduction ability of *Lactobacillus paraplantarum*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2009, 49(9): 1176—1179. (in Chinese)
- [4] 赵文静,李妍,高鹏飞,等. 实时荧光定量 PCR 技术在乳酸菌定量检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(4):433—437.
ZHAO Wen-jing, LI Yan, GAO Peng-fei, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR in quantitative detection of lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 433—437. (in Chinese)
- [5] 刘长建,徐洪涛,权春善,等. 乳酸菌素生产菌的分离与鉴定[J]. 食品与发酵工业,2005,31(7):26—30.
LIU Chang-jian, XU Hong-tao, QUAN Chun-shan, et al. Isolation and identification of bacteriocin producing lactic acid bacteria[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2005, 31(7): 26—30. (in Chinese)
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 刘丽莉,夏延斌,唐青春. 降胆固醇的乳酸菌筛选研究[J]. 食品科学,2004, 25(7):59—62.
LIU Li-li, XIA Yan-bin, TANG Qing-chun. The LAB culturirs screening study on cholesterol-degradation[J]. **Food Science**, 2004, 25(7): 59—62. (in Chinese)
- [9] 杨颖,田丰伟,陈卫,等. 两株乳杆菌益生特性的体外研究[J]. 中国乳品工业,2006,34(6):16—19.
YANG Ying, TIAN Feng-wei, CHEN Wei. In vitro study of two *Lactobacillus* strains as potential probiotics[J]. **China Dairy Industry**, 2006, 34(6): 16—19. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)