

牛乳中肠膜明串珠菌AR66的 降胆固醇抗氧化特性

马英¹, 訾占超¹, 刘长建^{2,*}

(1. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 102618;

2. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连 116600)

摘要:使用MRS培养基,从新鲜牛乳中分离得到1株生长良好的乳酸菌(AR66),经菌落形态、细胞形态、生化反应实验,发现菌株能产乳酸、革兰氏染色阳性、接触酶阴性。经系统发育分析,确定菌株AR66为肠膜明串珠菌。肠膜明串珠菌AR66具有抗氧化活性,对羟自由基、DPPH和超氧阴离子的清除率与细胞浓度呈正相关。在细胞浓度为 5×10^8 CFU/mL时,未破碎细胞对羟自由基、超氧阴离子的清除率高于已破碎细胞的清除率,分别是49.76%和83.33%;已破碎细胞对DPPH自由基的清除率高于未破碎细胞的清除率,为77.09%。菌株AR66还具有清除培养基中44.73%的胆固醇。菌株AR66对我国未来益生菌功能食品的开发具有重要价值。

关键词:牛奶,明串珠菌属,16S rDNA,系统发育树,抗氧化作用

Antioxidative and cholesterol-reducing properties of *Leuconostoc mesenteroides* from milk

MA Ying¹, ZI Zhan-chao¹, LIU Chang-jian^{2,*}

(1. Chinese Animal Disease Prevention and Control Center, Beijing 102618, China;

2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: Using MRS media, one strain of lactic acid bacteria was isolated from milk. The strain could present Gram-positive, catalase-negative, non-spore, and produce lactic acid. The 16S rDNA gene similarities (99.7%) between strain AR66 and its closest phylogenetic neighbor, *Leuconostoc mesenteroides*, were higher than those previously reported within the leuconostoc. So strain AR66 was identified as *L. mesenteroides*. Strain AR66 had the free radical-scavenging ability. Three free radicals-scavenging ratios of strain AR66 were positively correlated with bacterial density, respectively. At a concentration of 5×10^8 CFU/mL, the scavenging ratios of intact cells on hydroxyl radical and superoxide radical were 49.76%, and 83.33% respectively, which demonstrated obvious higher than intracellular extract. However, at the same concentration, intracellular extract had better DPPH-scavenging effect (scavenging ratios 77.09%) than the intact cells. In addition, strain AR66 for 60h had the ability of cholesterol-reducing (removal rate, 44.73%). The study had important meaning to the exploitation of probiotic health.

Key words: milk; *Leuconostoc*; 16S rDNA; phylogenetic tree; antioxidative effect

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)04-0154-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.04.025

明串珠菌(*Leuconostoc*)属于芽孢杆菌纲(*Bacilli*)乳杆菌目明串球菌属,常存在于蔬菜、甘蔗、饲料和多种发酵食品等各种植物材料中,还作为益生菌广泛应用于风味酸奶、发酵奶油、干酪、Kefir乳等各种乳制品和功能性食品中,也在保持产品的质量中起着重要作用^[1]。同时明串珠菌的定植能影响宿主肠道相关淋巴组织、淋巴细胞功能和全身免疫系统,增强

机体的免疫功能;还能降低血液中的胆固醇,起到调节血脂的作用^[2]。氧化作用是人体正常存在的,但是同时也带来很大的危害^[3],癌症、动脉粥样硬化、关节炎、心血管等疾病都和自由基的作用有关^[4-5]。目前食品中预防氧化主要是通过添加如BHA、BHT、PG等抗氧化剂,但是这些抗氧化剂存在成本高、抗氧化性弱等问题,甚至还存在一些食品安全问题^[5-6]。研究开

收稿日期: 2014-04-28

作者简介: 马英(1963-),女,本科学士,工程师,研究方向:分子生物学。

* 通讯作者: 刘长建(1975-),男,硕士,高工,研究方向:应用微生物。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070005)。

发低廉、安全的天然抗氧化物已成为研究热点。许多体内外实验表明,乳酸菌在长期进化演变过程中具有显著的抗氧化活性^[5-7]。且动物源乳酸菌具有在胃肠道上更好的粘附性,能够通过清除自由基和抑制脂质氧化起到治疗疾病的目的^[7]。本研究从新采集牛乳中分离出一株明串珠菌,对其抗氧化活性等益生特性进行了体外评估,为明串珠菌属在这一方面的益生作用研究开发打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛奶 取自奶牛场3年龄奶牛,由无菌管带回实验室;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 英国Johnson Matthey公司;胆固醇 国药集团公司;PCR反应所用的相关试剂 均购于宝生物工程(大连)有限公司;分离用培养基 MRS培养基(Merck);其他培养基 PY培养基、PYG培养基、含6.5%、18% NaCl的MRS培养基^[8]和含0.10mg/mL高胆固醇液体培养基^[9-10]。

CF15RX型高速冷冻离心机 日本日立公司;LC-20A型液相色谱仪、UV-2450型分光光度计 日本岛津公司;MD200-2型氮吹仪 杭州奥盛科技有限公司;DNP-9052型恒温培养箱 上海精宏仪器设备有限公司;JY92-IIIN型超声破碎仪 宁波新芝生物有限公司;TC-512型基因扩增仪 英国Techne公司。

1.2 乳酸菌的初步筛选

取1.0mL样品连续稀释后涂布于含碳酸钙的分离固体培养基,37℃静置培养24~48h。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、高效液相检测发酵产乳酸^[9]、生长较好的菌株进行下一步研究。

1.3 菌落形态、菌体细胞形态及生理生化特性

活化菌株接种MRS平板后,37℃恒温培养48h,观察菌落大小、颜色、边缘形状等菌落特征。菌体进行革兰氏染色后高倍显微观察菌体、细胞形状、大小等特征。测定菌株在10℃和45℃的生长情况、耐盐性、运动性、精氨酸产氨实验、碳水化合物发酵产酸实验等测试其生理生化特征^[9]。

1.4 菌株的分子生物学鉴定

将纯化得到的菌种在37℃条件培养2d后,离心收集菌体;提取总DNA。采用通用引物F27和R1525对其16S rDNA进行扩增,测序后将序列输入NCBI核酸数据库中,与基因库内所有相关核酸序列进行比较,并进行系统发育分析^[9]。

1.5 乳酸菌抗氧化特性的测定

取培养36h的菌液8000r/min离心10min,无菌水洗涂3次,血球计数板计数并调整细胞浓度至10⁹CFU/mL,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280W,间隔5s处理5s,显微镜下检查没有完整菌体为止。

1.5.1 乳酸菌对羟自由基的清除活性测定^[7,11] 试管中加入0.15mol/L磷酸缓冲液(pH7.4) 0.75mL,260μg/mL

番红花红0.1mL,1.0mmol/L EDTA-Na₂-Fe²⁺ 0.7mL,再加入0.5mL不同浓度菌液,最后加入2% H₂O₂ 0.4mL,振荡混匀后于37℃水浴30min。空白以蒸馏水代替试样,对照管以3% H₂O₂代替样品溶液与EDTA-Na₂-Fe²⁺溶液,520nm波长处测吸光度。A_{试样}表示样品的吸光值,A_{对照}表示对照的吸光值,A_{空白}表示空白的吸光值。清除率E(%)=(A_{对照}-A_{空白})/(A_{试样}-A_{空白})×100。

1.5.2 乳酸菌对DPPH自由基的清除活性测定^[7,11] 试管中加0.5mL不同浓度菌液,分别加1mL DPPH(0.16mmol/L)溶液,于25℃反应15min,在最大波长525nm下测吸光度。清除率E(%)=(1-A_{试样}/A_空)×100。

1.5.3 乳酸菌对超氧阴离子自由基的清除活性测定^[7,11] 取0.05mol/L pH=8.25 Tris-HCl缓冲液2.25mL于试管中,在25℃水浴锅中预热25min,加0.5mL不同浓度菌液,3mmol/L邻苯三酚0.2mL,以Tris-HCl为空白管,混匀于25℃精确反应4min,立即用0.25mL浓盐酸终止反应,在最大波长320nm下测吸光度。清除率E(%)=(1-A_{试样}/A_空)×100。

1.6 乳酸菌的降胆固醇特性测定

将纯化的菌株按接种量5%分别接种到4管高胆固醇液体培养基中,在37℃静置培养。分别培养24、36、48、60h后,邻苯二甲醛法测定胆固醇浓度^[12-13]。取0.5mL菌液,加氢氧化钾乙醇溶液皂化反应,正己烷萃取;氮气吹干后冰乙酸重新溶解;邻苯二甲醛冰乙酸溶液显色反应,550nm条件下测吸光度值。胆固醇冰乙酸溶液(5、10、15、20、25μg/mL)与显色液反应后,与吸光度值做标准曲线。根据标准曲线测定胆固醇浓度(C_t),同时测定培养初始的胆固醇浓度(C₀),并按以下公式计算降解率:降解率(%)=(C₀-C_t)/C₀×100。

1.7 数据处理

数据分析图采用Excel 2007,采用SPSS 19.0进行方差分析及Duncan's多重检验(p<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的初步筛选

从牛奶中共分离得到25个疑似菌株,接触酶反应为阴性的有10株,高效液相色谱法对发酵液的检测结果表明10株均产乳酸。选取生长较好的一株AR66进一步研究。

2.2 菌落形态及菌体细胞形态

如图1、表1所示,菌株AR66在MRS固体培养基上37℃生长48h,形成的菌落直径小于1mm,光滑圆形,乳白产黏,兼性厌氧。菌体染色后经光学显微镜

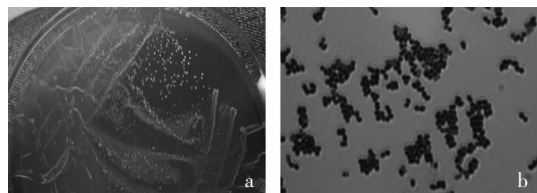


图1 AR66菌落形态(a)、菌体的革兰氏染色显微观察(b)(100×)
Fig.1 Colonies(a) and Cells(b) morphology of Strain AR66(100×)

观察,细胞均呈现紫色,判定菌株AR66为G⁺。菌体呈近球形、不产芽孢、没有鞭毛。

2.3 乳酸菌生理生化特性测定

由表1可知,菌株AR66接触酶实验为阴性,不能水解淀粉,V-P、精氨酸产氨实验阴性;能水解七叶苷,能耐受6.5%和18% NaCl。菌株AR66不能利用阿拉伯糖、木糖、甘露醇、肌醇、纤维二糖、蜜二糖、核糖进行发酵产酸。

表1 乳酸菌AR66的形态和生理生化特性

Table 1 Morphological and biochemical characteristics of strain AR66

实验项目	结果	实验项目	结果
菌落颜色	乳白色	菌落直径	小于1mm
菌体形态	近球形	革兰氏染色	+
生化特性:			
H ₂ S产生	-	精氨酸产氨	-
V-P试验	-	七叶苷水解	+
葡萄糖产气	-	H ₂ O ₂ 酶	-
10℃	-	45℃	-
6.5% NaCl	+	18% NaCl	+
利用碳源:			
淀粉水解	-	果糖	+
葡萄糖	+	麦芽糖	+
甘露糖	+	半乳糖	+
蔗糖	+	甘露醇	-
乳糖	+	肌醇	-
山梨醇	+	纤维二糖	-
L-阿拉伯糖	-	蜜二糖	-
松三糖	+	鼠李糖	+
D(+)棉籽糖	+	D(-)核糖	-
木糖	-	水杨苷	+
海藻糖	+		

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

2.4 16S rDNA系统发育分析

以菌株AR66总的DNA为模板,获得了1条长度为1395bp的特异条带。将序列提交到GenBank获得登

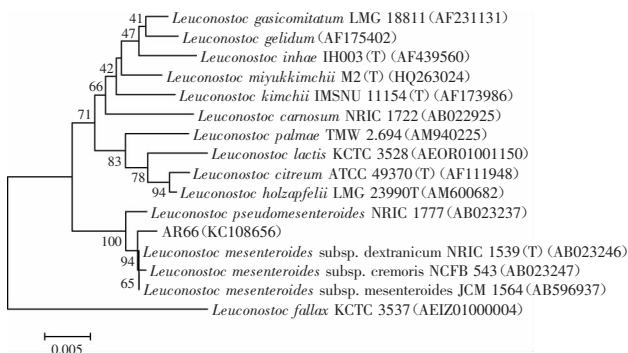


图2 菌株AR66和参比明串珠菌属菌株的16S rDNA同源性的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based 16S rDNA sequences similarity of strain AR66 and the reference strains

陆号为KC108656。通过Blast程序与核酸序列库中的序列进行比对,发现AR66与多株肠膜明串珠菌的相似性都超过99%。将明串珠菌属13个种的eztaxon网站的16S rRNA序列,与菌株AR66进行聚类分析(图2),菌株AR66与*Leuconostoc mesenteroides*的3个亚种在同一分支上,与菌株*Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293的相似性达到99.713%。结合菌株的形态特征、生理生化特征,可以确定菌株AR66属于明串珠菌属中的肠膜明串珠菌(*L.mesenteroides*)。图2中分枝上的数值为自举(No. of Bootstrap Replicaion)1000次的结果,括号内为16S rDNA的登陆号。

2.5 乳酸菌AR66的益生活性测定

2.5.1 对羟自由基清除活性的测定 由图3可以看出,当细胞浓度在 $1.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$ CFU/mL范围内,菌株AR66未破碎细胞和已破碎细胞对羟自由基的清除率的总体趋势与菌浓度均呈正相关。不同细胞浓度时,未破碎细胞对羟自由基的清除率均稍高于已破碎细胞,当细胞浓度为 5.0×10^8 CFU/mL时,未破碎细胞的清除率为49.76%,高于已破碎细胞的清除率44.22%。

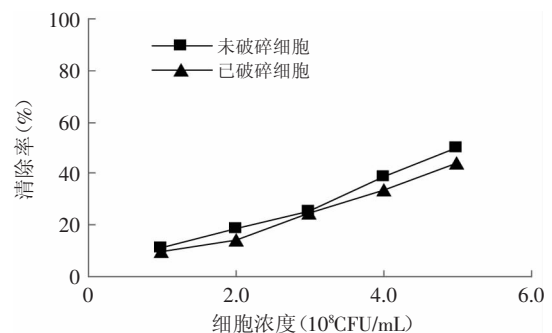


图3 乳酸菌对羟自由基清除作用

Fig.3 Scavenging effects of LAB on hydroxyl radical

2.5.2 对DPPH自由基清除活性的测定 由图4可以看出菌株AR66未破碎细胞和已破碎细胞对DPPH自由基的清除率的总体趋势与菌体浓度均呈正相关。不同于菌株对羟自由基的清除,已破碎细胞对DPPH自由基的清除率在各个浓度下,都高于未破碎细胞的清除率。当细胞浓度为 5.0×10^8 CFU/mL时,未破碎细胞的清除率为66.68%,已破碎细胞的清除率则达到了77.09%。

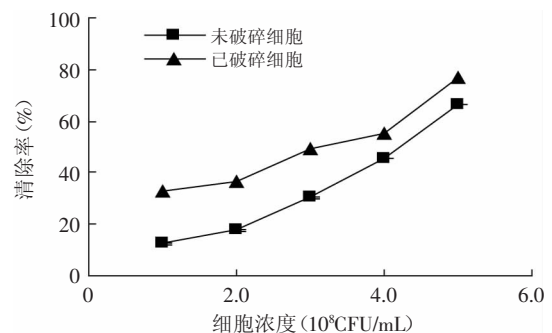


图4 乳酸菌对DPPH自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effects of LAB on DPPH·

2.5.3 对超氧阴离子清除活性的测定 由图5可以看出,菌株AR66未破碎细胞对超氧阴离子的清除率大于已破碎细胞的清除率。未破碎细胞和已破碎细胞对超氧阴离子的清除率的总体趋势与菌液体积菌均呈正相关。与菌株对羟自由基的清除一样,未破碎细胞对超氧阴离子的清除率在各个浓度下,都远高于已破碎细胞的清除率。当细胞浓度为 5.0×10^8 CFU/mL时,未破碎细胞的清除率达到了83.33%,已破碎细胞的清除率则仅为59.19%。

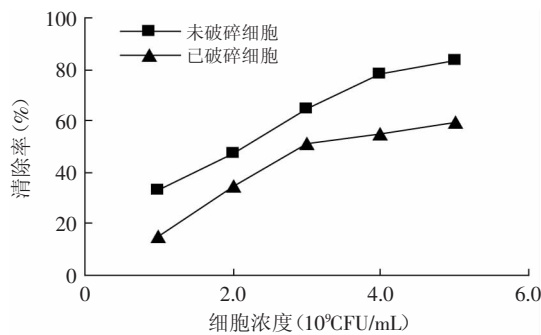


图5 乳酸菌对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.5 Scavenging effects of LAB on superoxide radical

2.5.4 降胆固醇活性的测定 胆固醇标准曲线如图6所示,测出的吸光值(y)与胆固醇含量(x)成正比关系,用此种方法测定菌液中胆固醇含量是切实可行的。菌株AR66对胆固醇的降解率随着时间的增加而逐渐增大(见图7);48h后,降解率增长趋势开始平缓;在60h时,对胆固醇的降解率达最大值为44.73%。

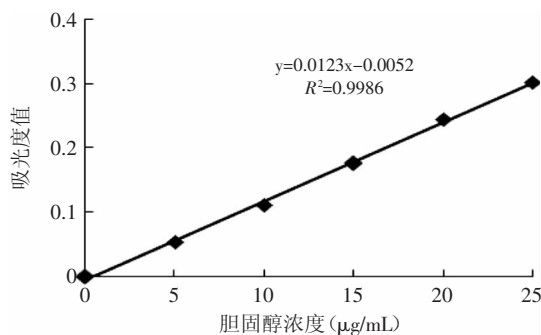


图6 胆固醇标准曲线

Fig.6 Standard curve of cholesterol

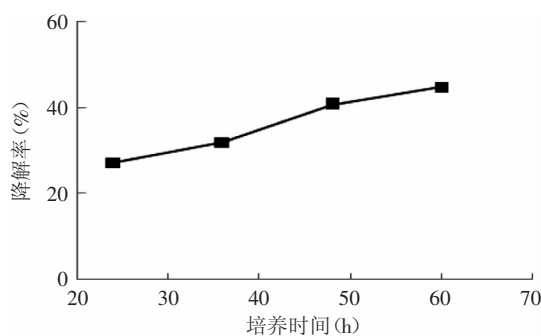


图7 培养时间对乳酸菌降胆固醇的影响

Fig.7 The effect of time on cholesterol-lowering ratio of LAB during growth

3 结论与讨论

乳酸菌在自然界分布广泛,实验从鲜牛奶中初步分离得到 H_2O_2 酶阴性、革兰氏阳性、发酵液产乳酸的乳酸菌10株,对生长较好的菌株AR66进行深入的研究。根据菌落、细胞形态、生理生化特性、以及16S RrDNA序列比对、系统发育分析,可鉴定菌株AR66为肠膜明串珠菌。

经过抗氧化测定实验,发现肠膜明串珠菌AR66对羟自由基、DPPH自由基和超氧阴离子自由基都有一定的清除能力,其细胞浓度与自由基的清除率呈正相关。其中未破碎细胞对羟自由基、超氧阴离子自由基的清除率高于已破碎细胞的清除率,在细胞浓度为 5×10^8 CFU/mL时,菌株AR66对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除率分别是49.76%和83.33%;而菌株AR66未破碎细胞对DPPH自由基的清除率低于已破碎细胞的清除率,在细胞浓度为 5×10^8 CFU/mL时,菌株AR66已破碎细胞的清除率最高,达到77.09%。菌株AR66经体外降胆固醇实验发现具有降解培养基中胆固醇的能力,降解率随着培养时间的增加而增加,菌株在48h后对胆固醇的降解率增加趋缓;在60h时,菌株对胆固醇降解率是44.73%。

乳酸菌的抗氧化能力与菌体表面的某些成分及细胞本身抗氧化机制有关^[15]。目前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^[14-15]。而对明串珠菌属的抗氧化、降胆固醇能力的研究很少,本实验筛选出的1株明串珠菌,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] Eunjong Baek, Hyojin Kim, Hyejung Choi. Antifungal activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in rice cakes[J]. The Journal of Microbiology, 2012, 50(5): 842-848.
- [2] Wei Zhang, Mingqi Liu, Xianjun Dai. Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish[J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(3): 685-691.
- [3] HALLIWELL B, CHIRICO S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance[J]. Am J Clin Nutr, 1993, 57(S5): 715-725.
- [4] KIM JE, KIM JY, LEE KW, et al. Cancer chemopreventive effects of lactic acid bacteria[J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(8): 1227-1235.
- [5] LIN MY, YEN CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(4): 1460-1466.
- [6] 王曦, 罗霞, 许晓燕, 等. 不同乳酸菌菌株抗氧化能力的比较研究[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 197-201.
- [7] Zineb Benmechemene, Hanane Fatma Chentouf, Bellil Yahia. Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from algerian raw camel milk[J]. Biomed Res Int, 2013(11): 1-14.

- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Hanlu Liu, Chenjie Yang, Yi Jing, 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.
- [13] Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde[J]. J Lipid Res, 1973, 14: 364-366.
- [14] Zheng Yongchen, Lu Yingli, Wang Jinfeng. Probiotic properties of lactobacillus strains isolated from Tibetan Kefir grains[J]. Plos One, 2013, 8(7): e69868.
- [15] 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.

(上接第153页)

与抗氧化活性研究[J]. 作物研究, 2011(1): 56-60.

[7] 陈薇, 王恒山, 黄世稳, 等. 大叶苦丁茶抗氧化成分及抗氧化性能研究(I)[J]. 广西植物, 2002(5): 463-466, 443.

[8] Yafei Deng, Kai He, Xiaoli Ye, et al. Saponin rich fractions from Polygonatum odoratum (Mill.) Druce with more potential hypoglycemic effects[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012(141): 228-233.

[9] 王曦. 鼠妇提取物镇痛片剂的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.

[10] 孙文基, 谢世昌. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国

医药科技出版社, 2002: 513-544.

[11] Hu M, Skibsted L H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. Food Chemistry, 2002, 76(3): 327-333.

[12] 钟灵, 王振富, 文德鉴. 黄芪多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2013(4): 350-352.

[13] Wang B-S, Lee C P, Chen Z-T, et al. Comparison of the hepatoprotective activity between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(2): 489-495.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。