

猪消化道中产苯乳酸乳酸菌的益生特性研究

刘长建* 闫建芳 刘秋 姜波 齐小辉

(大连民族学院 生命科学学院 辽宁 大连 116600)

摘要: 【目的】建立一种简单有效的产苯乳酸乳酸菌的筛选方法,并筛选到高产苯乳酸的乳酸菌。【方法】菌株经过添加了苯丙氨酸的培养基厌氧培养后,利用高效液相色谱法检测发酵液中苯乳酸的含量。【结果】从猪的消化道中共分离得到31株产苯乳酸的乳酸菌,其中菌株R53的苯乳酸产量最大,为321.7 mg/L。菌株R53对·OH、O₂⁻和DPPH都有清除能力,清除率分别达到11.2%、52.7%和63.2%。同时R53也能降低培养基中胆固醇的含量,清除率为32.5%。【结论】乳酸菌R53经菌落形态、细胞形态、生化反应实验、16S rDNA测序,最终确定为植物乳杆菌。植物乳杆菌R53能产生苯乳酸,具有清除胆固醇和抗氧化能力。

关键词: 猪, 乳酸菌, 苯乳酸, 抗氧化作用, 降胆固醇

Probiotic characteristics of phenyllactic acid-producing LAB from swine's digestive tract

LIU Chang-Jian YAN Jian-Fang LIU Qiu JIANG Bo QI Xiao-Hui

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

Abstract: [Objective] A simple and efficient method for screening lactic acid bacteria which would produce phenyllactic acid (PLA) would be developed. [Methods] Strain R53 was incubated in MRS (de Man , Rogosa , Sharpe) broth supplemented with phenylalanine by the anaerobic culture, and PLA in the fermentation broth was determined by HPLC. [Results] 31 strains were obtained from swine's digestive tract, of which strain R53 from duodenum showed the highest PLA-producing ability (321.7 mg/L). Strain R53 showed the ability to inhibit the on the three radicals. The results showed that the radical-scavenging ratios on ·OH, O₂⁻, and

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30671398, 31070005)

*通讯作者: Tel: 86-411-87656221; ✉: lcj@dinu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-11; 接受日期: 2011-12-05

DPPH were 11.2%, 52.7% and 63.2% respectively. In addition, strain R53 could degrade cholesterol and the degradation rate was 32.5% in vitro. **[Conclusion]** Strain R53 was identified as *Lactobacillus plantarum* through its culture characteristics, morphological observation, biochemistry experiment and combining with the phylogenetic analysis of 16S rDNA. *L. plantarum* R53 had the ability of phenyllactic acid-producing, cholesterol-reducing, and free radical-scavenging.

Keywords: Swine, Lactic acid bacteria, Phenyllactic acid, Antioxidative effect, Cholesterol removal

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)来自人类和动物的肠道或自然发酵食品中,在肠道生态系统中发挥着重要的作用,是公认的益生微生物,并已广泛应用在乳制品和其它发酵制品中。乳酸菌产生的乳酸等有机酸、细菌素都是很好的天然防腐剂。2000年, Lavermicocca^[1]分离到的植物乳杆菌 21B 能发酵产生苯乳酸,产量为 56 mg/L。苯乳酸(Phenyllactic acid, PLA),即 2-羟基-3-苯基丙酸,也称 β -苯乳酸或 3-苯基乳酸,是一种新型的抑菌物质。与细菌素相比,苯乳酸具有更广的抑菌谱,对革兰氏阳性细菌如金黄色葡萄球菌、单核增生性李斯特菌,革兰氏阴性细菌如大肠杆菌、沙门氏菌和真核微生物如曲霉属的黑曲霉、黄曲霉,青霉属的娄地青霉、团青霉等均有抑制作用^[2]。苯乳酸逐渐作为天然防腐剂被应用于食品工业,也用于医药和化妆品工业^[2-3]。

乳酸菌对人类和动物健康潜在的益生作用包括改善乳糖不耐症、预防肠道感染、降低血清胆固醇、减少刺激免疫系统、抗癌性与抗氧化作用。氧化作用对大多数生命有机体来说是必不可少的,但是其同样会破坏生物分子并对生命体带来很大的危害。人类的疾病如癌症、动脉粥样硬化、关节炎、心血管疾病等都和自由基的作用有关。许多体内外实验表明:乳酸菌在长期进化演变过程中形成了一套自身的抗氧化体系,具有显著的抗氧化活性^[4],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。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病几率^[5]。

本研究通过高效液相色谱法快速检测发酵液中苯乳酸含量的方法,从猪消化系统分离出具有高产苯乳酸的乳酸菌,并对其抗氧化活性、降胆固醇等益生特性进行了体外评估,为该菌株的应用和进一步研究打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器包括液相色谱仪,日本岛津公司;CF15RX 高速冷冻离心机,日本日立公司;DNP-9052 恒温培养箱,上海精宏公司;等。主要试剂均为天津科密欧公司分析纯产品。PCR 反应所用的相关试剂均购于大连宝生物公司。培养基包括 MRS 培养基(Merck)、M17 培养基(Oxoid)、PY 培养基和 PYG 培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 乳酸菌的初步分离及纯化: 300 日龄的体重约 110 kg 现宰杀的猪,无菌操作分别从口腔、胃、十二指肠、小肠、盲肠、大肠、肛门取内容物。取 1 g 样品加入 9 mL 生理盐水,按 10 倍梯度稀释,取 100 μ L 分别涂布于含碳酸钙的 2 种固体培养基,37 $^{\circ}$ C 静置厌氧培养 24-48 h。挑取产生溶钙圈的单菌落,转接于对应的培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。

厌氧培养方法:碳酸氢钠、柠檬酸、硼氢化钠各 2 g,分别用报纸包成小包,放到一个烧杯

中,加水刚好盖过报纸;钯,110 °C干燥至少2 h,放到另一个烧杯中;两者均迅速放入保鲜盒内,盖好盖子,硼氢化钠产生氢在钯的催化下与氧气结合从而降低氧分压。

筛选过氧化氢酶阴性、革兰氏阳性、HPLC法检测产乳酸的菌株进行下一步研究^[6]。

1.2.2 HPLC 法筛选产苯乳酸的乳酸菌:利用反相柱高效液相色谱法^[7]检测分析发酵液中的苯乳酸。色谱柱: C18 (4.6 mm×250 mm); 流动相: A 为 0.05% 三氟乙酸甲醇溶液, B 为 0.05% 三氟乙酸水溶液; 洗脱程序: 0–20 min 为 10%–90% A; 检测波长: 210 nm; 室温; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL。

苯乳酸标准曲线的绘制: 称取 0.01 g 苯乳酸标准品, 溶于磷酸缓冲液, 定容 5 mL。然后稀释苯乳酸溶液浓度分别为: 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 g/L。用 0.2 μm 膜过滤各浓度的标准品溶液后用高效液相色谱法测定, 以苯乳酸标准液浓度(g/L)对峰面积 A 作标准曲线。

将菌株以 5% 的接种量分别接种于含 2 g/L 苯丙氨酸的 MRS 和 M17 液体培养基, 37 °C 静置培养 36 h。发酵液离心后取上清, 0.2 μm 的膜过滤。由高效液相色谱测定苯乳酸的含量, 筛选出高产苯乳酸的菌株。

1.2.3 乳酸菌的生物学特征:观察菌落形态, 革兰氏染色后显微镜下观察菌体形态特征; 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。

1.2.4 乳酸菌的分子生物学鉴定:乳酸菌基因组 DNA 的提取: 取菌液 8 000 rpm、4 °C 离心 10 min, 弃上清; 取湿重 0.15 g 菌体于 1.5 mL 离心管中, 加 1 mL 洗涤液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.7, EDTA 25 mmol/L, SDS 0.1%, PVP 0.1%), 混合器上使细胞分散悬浮, 然后 7 000 r/min、4 °C 离心

1 min, 弃上清; 加入 100 μL 裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L、pH 8.0, EDTA 25 mmol/L, SDS 3%, PVP 1.2%), 振动悬浮, 微波(600–700 W)处理 60 s, 冷却后再次微波处理 30 s, 迅速加入 400 μL 65 °C 预热的抽提液(10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0, EDTA 1 mmol/L, 乙酸钠 0.3 mol/L, PVP 1.2%), 振动混匀; 加入等体积(约 500 μL)的 Tris 饱和酚/氯仿(25: 24, V/V), 混匀, 此时呈乳白色, 于 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min; 重复 2–3 次酚抽提; 等体积的冷异丙醇沉淀, 轻微颠倒两次后静置 30 min, 离心沉淀后, 70% 冰乙醇洗涤, 自然风干后加入 20 μL 的 TE 溶解^[8]。0.8% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min 检测。

以基因组 DNA 作为模板, 采用通用引物序列 F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 按文献[8]的反应条件进行 PCR 扩增。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min, 260 nm 紫外灯下观察并拍照。将扩增产物送至宝生物公司进行测序, 测得的 16S rDNA 序列在 NCBI 核酸数据库中进行 BLAST 搜索与其相似性最高的序列, 进行鉴定。

1.2.5 乳酸菌体外抗氧化活性:取菌液 8 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用无菌水洗涤 3 次, 调整细胞浓度至 10⁹ CFU/mL。

羟基自由基(·OH)体系^[9]: 利用 Eenton 体系测定菌液对亚铁离子催化过氧化氢产生·OH 的清除能力。分别加入 0.15 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液 0.75 mL, 260 mg/L 番红花红 0.1 mL。1.0 mmol/L EDTA-Na₂-Fe²⁺ 0.7 mL, 再加入菌液 0.5 mL, 最后加入 2% H₂O₂ 0.4 mL, 混匀后于 37 °C 水浴 30 min。空白以蒸馏水代替试样, 520 nm 测吸光度值。

$$\text{清除率 } E\% = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

对二苯代苦味肼基(DPPH)清除活性的测定^[9]: 0.5 mL 菌液加 1 mL DPPH (0.16 mmol/L) 于 25 °C 反应 15 min, 525 nm 下测吸光度。

清除率 $E\%=(1-A_{\text{试样}}/A_{\text{空}})\times 100\%$ 。

超氧阴离子(O_2^-)体系^[9]: 采用邻苯三酚自氧化法, 取 0.05 mol/L pH 8.25 Tris-HCl 缓冲液 2.25 mL 于试管中, 0.5 mL 菌液, 25 °C 水浴预热 25 min, 再加 3 mmol/L 邻苯三酚 0.2 mL, 混匀于 25 °C 水浴中精确反应 4 min, 立即用浓 HCl 0.25 mL 终止反应, 320 nm 处测吸光度。Tris-HCl 为空白对照。平行 3 次, 取平均值, 按下式计算清除率。

清除率 $E\%=(A_{\text{对照}}-A_{\text{样品}})/A_{\text{对照}}\times 100\%$

1.2.6 菌株的降解胆固醇能力: 分别挑取纯化菌株接种于相应的含胆固醇液体培养基, 37 °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 2 mL。测定胆固醇浓度(C_1), 同时测定培养基初始的胆固醇浓度(C_0), 平行 3 次^[10]。并按以下公式计算降解率。

胆固醇的降解率= $(C_0-C_1)/C_0\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的初步分离筛选

从猪源消化系统中分离到产生溶钙圈的疑似菌株 760 株, 其中接触酶反应为阴性、革兰氏染色为阳性的为 149 株。高效液相色谱法检测其发酵液均产乳酸。

2.2 高产苯乳酸菌株的筛选

由标准曲线($y=7E+07x+102\ 245$, $R^2=0.998\ 9$)可以看出, 测出的峰面积(y)与苯乳酸的浓度(x)成正比关系。然后将样品的发酵液滤液进行检测, 结果发现在与标准样品出峰相同时间, 部分菌株出峰, 表明可以产生苯乳酸。从猪的消化系统的 7 个部位共筛选到 31 株乳酸菌(表 1), 其中 11 株菌的苯乳酸产量大于 110 mg/L。从十二指肠筛选出的乳酸菌 R53 产苯乳酸量最高, 在液体发酵培

养基中 37 °C 培养 48 h, 苯乳酸产量可达 321.7 mg/L。苯乳酸的高效液相色谱图见图 1。

2.3 菌落形态及细胞形态的观察

乳酸菌 R53 菌落边缘整齐、乳白色; 革兰氏染色为阳性, 细胞的形态多数是短杆状, 无芽孢(见表 2)。

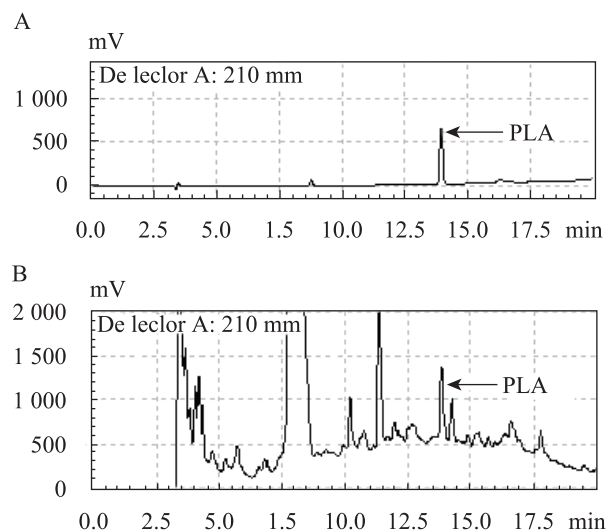


图 1 R53 发酵液的液相色谱图

Fig. 1 Chromatograms of R53 culture medium supernatant

注: A: 标样保留时间 13.907 min; B: 发酵液保留时间 13.877 min.

Note: A: The retention time of standard (13.907 min); B: The retention time of sample (13.877 min).

表 1 不同分离源的产苯乳酸乳酸菌
Table 1 The isolated lactic acid bacteria

分离源 Samples	产苯乳酸的菌株数 Number of phenyllactic acid-producing LAB	
	<0.110 g/L	≥0.110 g/L
Saliva	5	3
Gastric juice	5	0
Duodenum contents	3	1
Small intestine contents	3	3
Cecum contents	3	1
Large intestine contents	1	0
Feces	0	3

表 2 乳酸菌 R53 的形态、生理生化特性
Table 2 Morphological and physiological characteristics of R53 strain

试验项目 Tested items	结果 Results	试验项目 Tested items	结果 Results
Morphological characteristics			
Cell Shape	Short spar	Gram stain	+
Color of colony	Milk white	Catalase	-
Biochemical characteristics			
Litmus milk solidification	-	Litmus milk peptonization	+
Litmus milk test	+	Decomposition of esculin	+
V-P test	-	Decomposition of gelatin	-
H ₂ S production	-	Arginine dihydrolase production	-
Glucose aerogenesis	-		
Utilization of carbon source			
Starch	-	Sorbitol	+
Glucose	+	Fructose	+
Mannose	+	Maltose	+
Saccharose	+	Galactose	+
Lactose	+	Mannitol	+
Amygdaline	+	Arabinose	-
Rhamnose	-	Raffinose	+
Ribose	+	Melibiose	+
Trehalose	+	Salicine	+
Xylose	+		

2.4 生理生化特性

生化特性试验结果见表 2, 其中菌株 R53 不能水解淀粉, 不能使明胶液化, V-P 试验为阴性, 精氨酸产氨试验阴性; 能水解七叶苷, 石蕊牛奶产酸实验为阳性。可以利用绝大多数糖进行发酵产酸, 但不能利用阿拉伯糖、鼠李糖进行发酵产酸。

2.5 16S rDNA 鉴定

以菌株 R53 的总 DNA 为模板, 以通用引物进行 PCR 扩增, 获得了一条特异的、大小约为 1 500 bp 的扩增条带。获得的特异片段纯化后进行测序, 获得了 1 440 bp 的片段, 提交到 GenBank 获得基因登录号(GenBank accession

number)为 JN819555, 并通过 BLAST 程序与 GenBank 核酸序列库中的序列进行比对, 结果发现 R53 菌株的 16S rDNA 序列与多株 *Lactobacillus plantarum* 的 16S rDNA 序列同源性最高, 达 99% 以上, 可初步鉴定乳酸菌 R53 为 *L. plantarum*。

2.6 乳酸菌的益生特性

从图 2 可知, 乳酸菌 R53 对·OH、O₂⁻和 DPPH 都有一定的清除能力, 也能降低培养基中胆固醇的含量。菌株 RS53 对·OH 的清除率达到 11.16%, 对 O₂⁻的清除率为 52.7%, 对 DPPH 的清除率达到 63.2%。此外菌株 R53 还能清除培养基中的胆固醇, 清除率达到 32.5%。

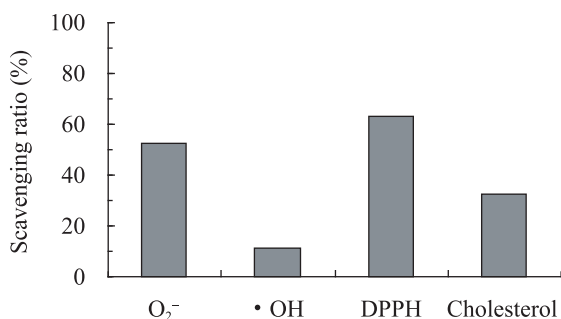


图2 乳酸菌 R53 的抗氧化、降胆固醇特性
Fig.2 The removal of three radicals and cholesterol by R53

3 结论

苯乳酸可由多种微生物产生, 如白地霉、丙酸菌^[11]和乳酸菌。作为一种新型抑菌物质, 其抑菌谱宽, 不仅能够抑制多种食源性致病细菌, 而且对真菌也具有广泛的抑制作用。加之其稳定性高、溶解性好, 是一种新型天然抑菌物质, 具有广泛的开发和利用价值。而且乳酸菌具有 GRAS 资格, 产苯乳酸的乳酸菌可广泛用于食品工业。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, 这都利于将来对乳酸菌更好的开发利用。鉴于此, 本实验从健康猪消化系统分离疑似乳酸菌菌种, 进一步筛选出接触酶反应为阴性、革兰氏染色为阳性、发酵液产乳酸的乳酸菌 149 株。

通过在培养基中添加苯丙氨酸, 利用 HPLC 测定乳酸菌发酵液中苯乳酸产量, 进一步筛选出高产苯乳酸的菌株, 共筛选出的 11 株高产苯乳酸含量大于 110 mg/L 的乳酸菌, 其中来自十二指肠的乳酸菌 R53 的发酵液的苯乳酸含量高达 321.7 mg/L。乳酸菌 R53 的苯乳酸产量很高, 李兴峰等^[12]筛选到 10 株乳酸菌产苯乳酸量超过 66.4 mg/L, 其中植物乳杆菌 SK007 显示出最高的苯乳酸合成能力, 产量可达 91 mg/L。通过菌落形态、细胞显微形态、生理生化和 16S rDNA 序列比对, 乳酸菌

R53 为 *Lactobacillus plantarum*(植物乳杆菌)。

随着研究的不断深入, 人类对植物乳杆菌生理功能的研究在不断增多。经过抗氧化测定实验, 发现菌株 R53 具有抗氧化活性, 当菌株浓度为 10⁹ 时, 对·OH、O₂^{·-}和 DPPH 的清除率分别是 11.16%、52.7%和 63.2%, 对超氧阴离子和 DPPH 的清除能力效果较好, 对·OH 的清除能力相对偏低。结果表明菌株 R53 具有很好的抗氧化活性, 能通过清除自由基改善肠道微生态平衡, 从而作为益生菌能延缓衰老。

总之, 随着人们生活水平的提高和对食品安全的日益重视, 微生物防腐剂代替化学防腐剂是必然趋势。本实验筛选出了高产苯乳酸的植物乳杆菌 R53 可作为菌株资源。随着新的分离、分析方法的建立和生物合成法研究的深入, 也将会大大拓宽苯乳酸的应用范围, 使其在食品、医药、化工等领域发挥新的作用。而且植物乳杆菌 R53 具有很好的抗氧化活性, 其菌体具有很好的清除自由基的能力。同时也能吸收胆固醇, 可以通过降低血胆固醇来减少心血管疾病的发病几率^[5]。因此植物乳杆菌 R53 可用于发酵食品的制备, 如酸奶、面包和泡菜等, 既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, 又为新型抗氧化剂的研制提供了研究基础。

参 考 文 献

- [1] Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4084-4090.
- [2] Prema P, Smila D, Palavesam A, et al. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(3): 379-386.

- [3] Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 634-640.
- [4] Songisepp E, Kullisaar T, Hüpp P, et al. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity[J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(7): 2017-2023.
- [5] Lin SY, Ayres JW, Winkler W Jr, et al. Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results[J]. *Journal of Dairy Science*, 1989, 72(11): 2885-2899.
- [6] 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.
- [7] Armaforte E, Carri S, Ferri G, et al. High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1131(1/2): 281-284.
- [8] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(1): 17-20.
- [9] 刘长建, 姜波, 刘亮, 等. 枸杞子多糖提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(3): 661-663.
- [10] 郭东起, 侯红漫, 刘阳, 等. 降胆固醇益生乳酸菌的体外筛选[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35(8): 11-14.
- [11] Lind H, Sjögren J, Gohil S, et al. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 271(2): 310-315.
- [12] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾, 等. 产苯乳酸的乳酸菌分离筛选及菌种鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(2): 1-4.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自2008年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以E-mail附件的形式发送到编辑部信箱:tongbao@im.ac.cn,并在邮件主题中注明:“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部。联系方式:Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn