



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105969680 B

(45)授权公告日 2019.07.05

(21)申请号 201610168004.X

(22)申请日 2016.03.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105969680 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M 2016001 2016.01.04

(73)专利权人 贵州大学
地址 550025 贵州省贵阳市花溪区贵州大
学(北区)科技处

(72)发明人 何腊平 宋小娟 李翠芹

(74)专利代理机构 贵阳中工知识产权代理事务
所 52106
代理人 刘安宁

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

(56)对比文件

CN 103320337 A,2013.09.25,

CN 1566322 A,2005.01.19,

温子辉等.降胆固醇能力强的耐酸耐胆盐乳
酸菌的筛选及鉴定.《黑龙江八一农垦大学学
报》.2014,第26卷(第6期),全文.

审查员 王航

权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一株降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌及
其筛选方法

(57)摘要

一株降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌,
该戊糖乳杆菌是从贵州传统食品发酵米粉中分
离得到,菌株命名为*Lactobacillus pentous*
GUFHSL-69,于2016年1月4日保藏于中国典型培
养物保藏中心,保藏单位地址:中国,武汉,武汉
大学,保藏号为:CCTCC M 2016001。戊糖乳杆菌
GUFHSL-69是一种功能性乳酸菌,具有降低胆固
醇和亚硝酸盐的良好特性,对胆固醇的去除率为
25.66%,培养24h后对亚硝酸盐降解率为94.45%。
将其开发成保健食品或药品,长期服用改善肠道
菌群,降低血清胆固醇,提高肌体免疫力;它可降
低发酵制品中亚硝酸盐残留量,缩短发酵周期,
改善产品风味。

1. 一株降胆固醇、降亚硝酸盐的耐酸和耐胆盐的戊糖乳杆菌,其特征在于该戊糖乳杆菌是从贵州传统食品发酵米粉中分离得到的戊糖乳杆菌,菌株命名为 *Lactobacillus pentosus* GUFHSL-69,于2016年1月4日保藏于中国典型培养物保藏中心,简称;CCTCC,保藏单位地址:中国,武汉,武汉大学,保藏号为:CCTCC M 2016001。

一株降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌及其筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物,进一步来说,涉及乳酸杆菌,特别涉及既具有降胆固醇能力又有降解亚硝酸盐能力的乳酸菌。

背景技术

[0002] 据医学研究,血清中胆固醇含量升高,被认为是诱发冠心病、动脉粥样硬化等心血管疾病的重要危险因素。世界卫生组织(WHO)预测心血管疾病直到2030年,仍然是死亡的主要原因,影响两千三百万人。临床研究表明,超过正常血清胆固醇水平($>5.2\text{mmol/l}$) 1mmol ,患冠心病的几率增加35%,同时,减少1%血清胆固醇水平将降低2%~3%的患病风险。

[0003] 研究发现,亚硝酸盐急性中毒导致高铁血红蛋白血症,慢性中毒有致癌和致畸风险,泡菜制品中亚硝酸盐残留量较高,但亚硝酸盐具有维持人体一氧化氮平衡,促进心血管健康的作用。如何控制泡菜中的亚硝酸盐含量是食品加工的一道难题。

[0004] 益生菌在自然界广泛分布,由于其对宿主健康有益,因而得到了广泛的应用。许多功能性食品中都含有益生菌,它们可以改善肠道微生物菌群,减少有害菌的数量,防止腹泻;提高机体免疫力;降低血清胆固醇;提高机体的抗氧化能力,延缓衰老及防癌功能等。

[0005] 因此人们不断探索和寻找能够降低胆固醇和亚硝酸盐的益生菌,尤其是乳杆菌,希望它在食品中得以广泛应用,开发各种功能性食品,这对人类的营养和健康具有重要的意义。

[0006] 目前中国专利数据库中,涉及戊糖乳杆菌的专利申请件不多,仅有ZL02820204X号《包含戊糖乳杆菌菌株组合物及其用途》、ZL031262252号《一种戊糖乳杆菌菌株和以该菌株制成的发酵剂及该发酵剂在肉食品中的应用》、ZL2005101059855号《一种戊糖乳杆菌细菌素及其专用生产菌株与应用》、ZL2008102473358号《一种戊糖乳杆菌、活性保鲜增香剂及其应用》、ZL2010800331767号《产生细菌素的戊糖乳杆菌及其在食品和药物组合物中的应用》、ZL2011100489071号《一种戊糖乳杆菌和该乳杆菌的发酵产物以及发酵产物的用途》、ZL2012104063212号《戊糖乳杆菌》、ZL2013102336309号《一株用于乳酸发酵的戊糖乳杆菌 LacticUVC-02及其应用方法》等。这些戊糖乳杆菌均有一定实际应用,但至今为止,尚无既具有降胆固醇能力又有降解亚硝酸盐能力的戊糖乳杆菌的申请件。

发明内容

[0007] 本发明旨在提供一株降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌,以期将其开发成保健食品或药品,或用于发酵制品,使之能够具有降胆固醇的功能性食品。

[0008] 本发明的又一目的是提供上述降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌的筛选方法,使其具备特定的工业用途。

[0009] 为达到上述目的,发明人提供的一株降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌是从贵州传统食品发酵米粉中分离得到的戊糖乳杆菌,菌株命名为 *Lactobacillus pentosus* GUFHSL-69,于2016年 1月4 日保藏于中国典型培养物保藏中心,简称:CCTCC,保藏单位地

址:中国,武汉,武汉大学,保藏号为:CCTCC M 2016001。

[0010] 上述菌株GUFHSL-69进行16S rRNA基因序列测定,测定结果在NCBI上比对,鉴定结果为戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)。

[0011] 发明人提供的降胆固醇、降亚硝酸盐的戊糖乳杆菌的筛选方法包括以下步骤:

[0012] (1)从贵州黔南地区少数民族传统食品发酵米粉中采集菌株,经培养、分离纯化后筛选得到乳酸菌,斜面保藏备用;

[0013] (2)通过革兰氏染色、过氧化氢酶实验、菌体形态及16S rRNA序列鉴定体系,筛选得到一株乳酸菌,对菌株编号为GUFHSL-69;

[0014] (3)通过邻苯二甲醛比色法、盐酸萘乙二胺法鉴定筛选得到的菌株具有降胆固醇能力及降解亚硝酸盐能力;

[0015] (4)通过耐酸能力、耐胆盐能力的检验进行复筛,确定菌株是否耐受胃肠道环境,达到益生作用;具有耐酸性能、同时对0.3%的胆盐具有较强耐受性的菌株为制备的戊糖乳杆菌。

[0016] 上述方法的第(1)步中,所述采集菌株,经培养、分离纯化的做法是:采集米粉制品,取10g样品放入90mL的无菌蛋白胨水中,于摇床上震荡30min,在超净工作台中取200 μ L上清液涂布于CaCO₃-MRS琼脂平板上,置于二氧化碳培养箱中37 $^{\circ}$ C下培养48h,挑选产生明显溶钙圈的单菌落进行纯化。

[0017] 上述方法的第(2)步中,所述革兰氏染色、过氧化氢酶实验的做法是:菌株于MRS平板上培养24h,观察并记录菌落形态、颜色;挑取平板上的菌落进行革兰氏染色涂片、固定、结晶紫初染、媒染、脱色、水洗、番红复染,干燥,镜检;待测菌先于空气中暴露20min,用毛细管吸取少量15% H₂O₂直接滴于平板表面所生长的菌落进行过氧化氢酶实验,如不产气泡则为过氧化氢酶阴性。

[0018] 上述方法的第(3)步中,所述邻苯二甲醛比色法的做法是:将菌株接种于含有胆固醇浓度为100 μ g/mL的MRS液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C的二氧化碳培养箱中培养24h后测定其胆固醇清除能力:准确吸取胆固醇标准溶液于洁净试管中,再加入无水乙醇使其体积为1mL,然后在各试管中加入OPA试剂4mL,室温放置10min。再向其中缓慢加入4mL浓硫酸,立即用振荡器振20s,充分混合后于室温黑暗条件下放置15min,空白对照以1mL无水乙醇代替胆固醇溶液,测其在550nm处的吸光值,以胆固醇浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标做标准曲线,进行比色;所述盐酸萘乙二胺法的做法是:将菌株接种于含有胆固醇浓度为100 μ g/mL的MRS液体培养基中,于二氧化碳培养箱中37 $^{\circ}$ C下培养24h后测定其胆固醇清除能力;所述降解亚硝酸盐能力的鉴定做法是:将培养18~20h的菌株按体积比3%接种到含有NaNO₂的MRS液体培养基中,然后测定0h、12h、24h时MRS液体培养基中NaNO₂含量来确认。

[0019] 上述方法的第(4)步中,所述耐酸能力的检验做法是:将新鲜培养的菌株接种到pH3.0的PBS缓冲溶液中,于0h、3h分别测定活菌数,以log CFU/mL记,计算活菌率;所述耐胆盐能力的检验做法是:将新鲜培养的菌株GUFHSL-69接种于0.3%的胆盐的MRS培养基中,以不加胆盐的MRS液体培养基为对照组,分别在0h、24h测定活菌数,以log CFU/mL记,计算活菌率。

[0020] 本发明的戊糖乳杆菌GUFHSL-69是一种功能性乳酸菌,特别在降低胆固醇和亚硝酸盐方面具有良好的特性。对胆固醇的去除率为25.66%,培养24h后对亚硝酸盐降解率为

94.45%。如将本发明的乳酸菌GUFHSL-69开发成保健食品或药品,长期服用改善肠道菌群,降低血清胆固醇,提高机体免疫力;或将本发明投入到发酵制品中,可降低发酵制品中亚硝酸盐残留量,缩短发酵周期,改善产品风味,开发具有降胆固醇的功能性食品。

[0021] 附图说明:

[0022] 图1 是本发明菌株GUFHSL-69的菌落形态;

[0023] 图2是本发明菌株GUFHSL-69的菌体形态;

[0024] 图3表示本发明菌株GUFHSL-69的系统发育树;

[0025] 图4是胆固醇标准曲线;

[0026] 图5是亚硝酸盐标准曲线。

具体实施方式

[0027] 实施例 筛选戊糖乳杆菌GUFHSL-69菌株:

[0028] 1.样品的采集与菌株的分离纯化

[0029] 从贵州省黔南地区采集米粉制品,取10g样品放入90mL的无菌蛋白胨水中,于摇床上震荡30min,在超净工作台中取200 μ L上清液涂布于CaCO₃-MRS琼脂平板上,置于37 $^{\circ}$ C二氧化碳培养箱中培养48h,挑选产生明显溶钙圈的单菌落进一步纯化,然后斜面保藏备用。

[0030] 2. 菌落形态鉴定、生理生化鉴定以及分子生物学鉴定

[0031] 2.1 菌株于MRS平板上培养24h,观察并记录菌落形态、颜色。

[0032] 2.2 革兰氏染色:挑取平板上的菌落进行涂片、固定、结晶紫初染、媒染、脱色、水洗、番红复染,干燥,镜检。

[0033] 2.3 过氧化氢酶实验:待测菌先于空气中暴露20min,用毛细管吸取少量15% H₂O₂直接滴于平板表面所生长的菌落。如不产气泡则为过氧化氢酶阴性。最终保藏革兰氏阳性,过氧化氢酶阴性菌株,对菌株编号为GUFHSL-69,然后进行下一步实验:

[0034] 肉眼观察菌株的菌落形态特征,观察结果,该菌株菌落颜色为淡黄色,菌落湿润边缘整齐,呈圆形突起,菌落直径1~2mm,革兰氏染色后,于光学显微镜油镜下观察细胞形态特征,其为无芽孢的革兰氏阳性杆菌,兼性厌氧。

[0035] 2.4 生理生化特征

[0036] GUFHSL-69的生理生化特征如表1所示

[0037] 表1 菌株GUFHSL-69生理生化特性--利用碳源产酸

[0038]

试剂条对应管/底物	检测结果	试剂条对应管/底物	检测结果
0 对照	-	25 七叶灵	+
1 甘油	+	26 柳醇	+
2 赤藓醇	-	27 纤维二糖	+
3 D-阿拉伯糖	-	28 麦芽糖	+
4 L-阿拉伯糖	+	29 乳糖	+
5 核糖	+	30 蜜二糖	+
6 D-木糖	+	31 蔗糖	+
7 L-木糖	-	32 海藻糖	+

8 阿东醇	-	33 菊糖	-
9 β -甲基-D-木糖甙	-	34 松叁糖	-
10 半乳糖	+	35 棉子糖	w
11 葡萄糖	+	36 淀粉	-
12 果糖	+	37 糖原	-
13 甘露糖	+	38 木糖醇	-
14 山梨糖	-	39 拢牛儿糖	+
15 鼠李糖	w	40 D-松二糖	-
16 卫茅醇	-	41 D-来苏糖	-
17 肌醇	-	42 D-塔格糖	-
18 甘露醇	+	43 D-岩糖	-
19 山梨醇	+	44 L-岩糖	-
20 α -甲基-D-甘露糖甙	-	45 D-阿拉伯糖醇	-
21 α -甲基-D-葡萄糖甙	-	46 L-阿拉伯糖醇	-
22 N-乙酰-葡糖胺	+	47 葡萄糖酸盐	w
23 苦杏仁甙	+	48 2-酮基-葡萄糖酸盐	-
24 熊果甙	w	49 5-酮基-葡萄糖酸盐	-

[0039] 备注：“+”表示阳性反应，“-”表示阴性反应，“w”表示反应较弱。

[0040] 2.5 分子生物学特征

[0041] 对菌株GUFHSL-69进行16S rRNA基因序列测定,测定结果在NCBI上比对,鉴定结果为戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*),构建了GUFHSL-69的系统发育树。

[0042] 3. 采用邻苯二甲醛比色法测定菌株降胆固醇能力

[0043] 将菌株接种于含有胆固醇浓度为100 μ g/mL的MRS液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C的二氧化碳培养箱中培养24h后测定其胆固醇清除能力。

[0044] 3.1 邻苯二甲醛法(OPA)标准曲线绘制

[0045] 准确吸取胆固醇标准溶液于洁净试管中,再加入无水乙醇使其体积为1mL,然后在各试管中加入OPA试剂4mL,室温放置10min。再向其中缓慢加入4mL浓硫酸,立即用振荡器振20s,充分混合后于室温黑暗条件下放置15min。空白对照以1mL无水乙醇代替胆固醇溶液,最后测其在550nm处的吸光值,以胆固醇浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标做标准曲线,计算出其线性回归方程为 $y=0.0051x-0.0009$,相关系数 $R^2=0.9988$ 。

[0046] 3.2 戊糖乳酸菌降胆固醇能力的测定

[0047] 将斜面保藏的菌株在MRS平板上划线传代2~3次,接种到液体MRS培养基中相同条件下进行富集培养20h后,以4000r/min,4 $^{\circ}$ C条件下离心10min,收集菌体。然后用PBS缓冲溶液稀释菌体,将待测菌液调至 3.0×10^8 CFU/mL后按体积比3%接种量接种于胆固醇含量为100 μ g/mL的MRS液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,二氧化碳培养箱中培养24h。菌液以12000r/min,4 $^{\circ}$ C条件下离心20min,保留上层清液作为待测液,用于测定胆固醇含量,以未接种的胆固醇培养基作为空白对照组。然后采用邻苯二甲醛(OPA)法测乳酸菌的胆固醇清除率。

[0048] 胆固醇清除率X按以下公式计算:

[0049] $X=(1-A/B) \times 100\%$

[0050] 注:X—胆固醇清除率;

[0051] A—实验组发酵上清液中胆固醇浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

[0052] B—空白组发酵上清液中胆固醇浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0053] 以胆固醇清除率为指标, 菌株GUFHSL-69的胆固醇清除率为25.66%。

[0054] 4. 乳酸菌降解亚硝酸盐能力的测定

[0055] 4.1 亚硝酸盐标准曲线的测定

[0056] 吸取不同浓度的亚硝酸盐标准溶液加入50mL比色管中, 再加40mL水, 混匀, 再加入2mL对氨基苯磺酸溶液, 混匀, 避光静置5min, 然后加1mL盐酸奈乙二胺, 加水至刻度, 混匀, 避光静置15min, 于波长538nm测定, 以亚硝酸盐浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 标准曲线如图5, 其线性回归方程 $y=0.0158x-0.0011$, 相关系数 $R^2=0.9995$ 。

[0057] 4.2 菌株降解亚硝酸盐能力测定

[0058] 亚硝酸盐的含量测定参照GB-50093-2010。将培养18~20h的菌株按体积比3% 接种到含有 NaNO_2 的MRS液体培养基中, 然后测定0h、12h、24h时MRS液体培养基中 NaNO_2 含量。测定结果表明菌株GUFHSL-69在24h对亚硝酸盐的降解率94.45%, 降解量88.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NaNO_2 。

[0059] 5. 菌株耐酸、耐胆盐能力

[0060] 5.1 耐酸能力

[0061] 将新鲜培养的菌株接种到pH3.0的PBS缓冲溶液中, 于0h、3h分别测定活菌数, 以 $\log \text{CFU}/\text{mL}$ 记, 计算活菌率, 菌株GUFHSL-69活菌率达102.0%。

[0062] 5.2 耐胆盐能力

[0063] 将新鲜培养的菌株GUFHSL-69接种于0.3%的胆盐的MRS培养基中, 以不加胆盐的MRS液体培养基为对照组, 分别在0h、24h测定活菌数, 以 $\log \text{CFU}/\text{mL}$ 记, 计算活菌率, 菌株GUFHSL-69在0.3%的胆盐条件下活菌率达98.25%。

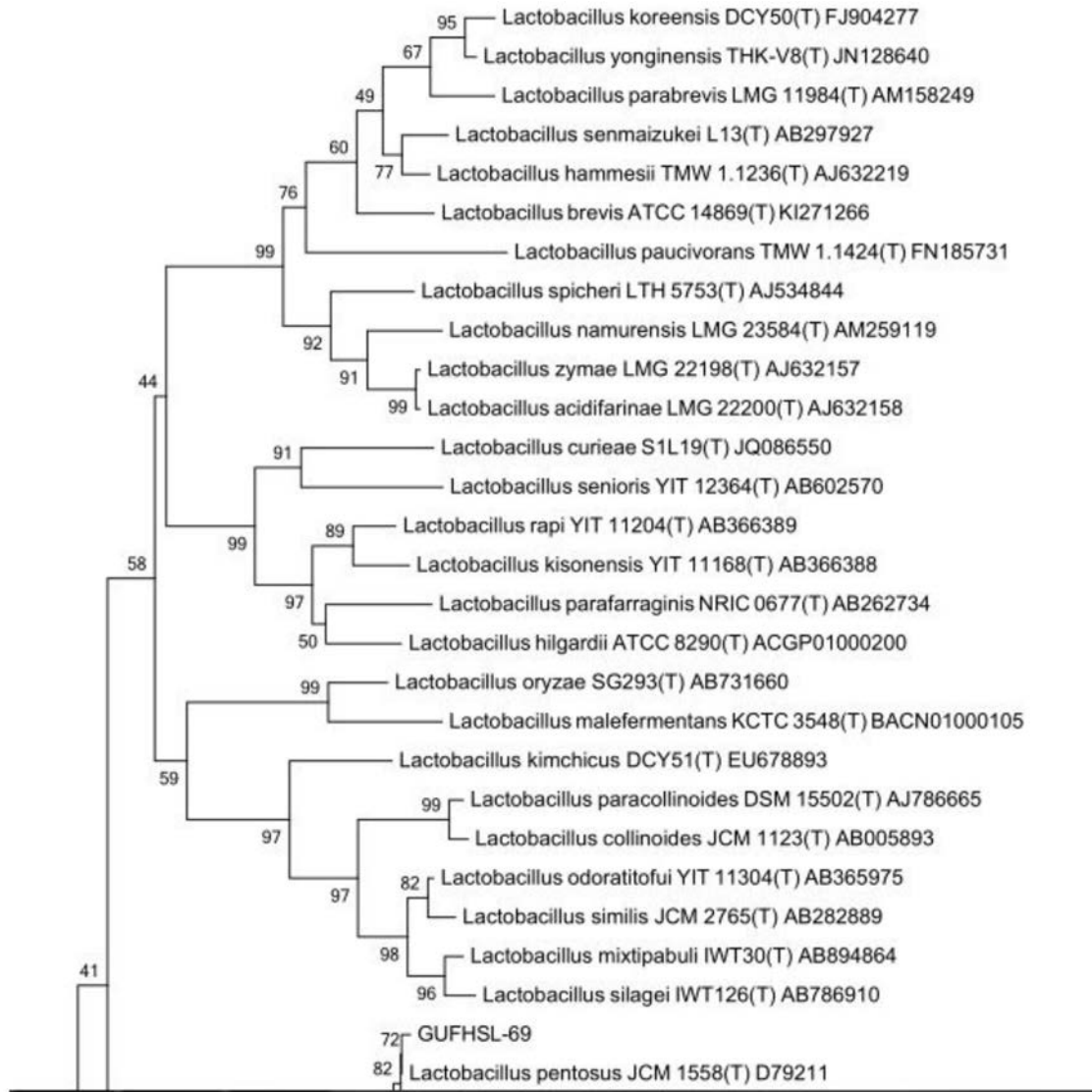
[0064] 菌株GUFHSL-69具有耐酸性能、同时对0.3%的胆盐具有较强耐受性, 为制备的目标戊糖乳杆菌。

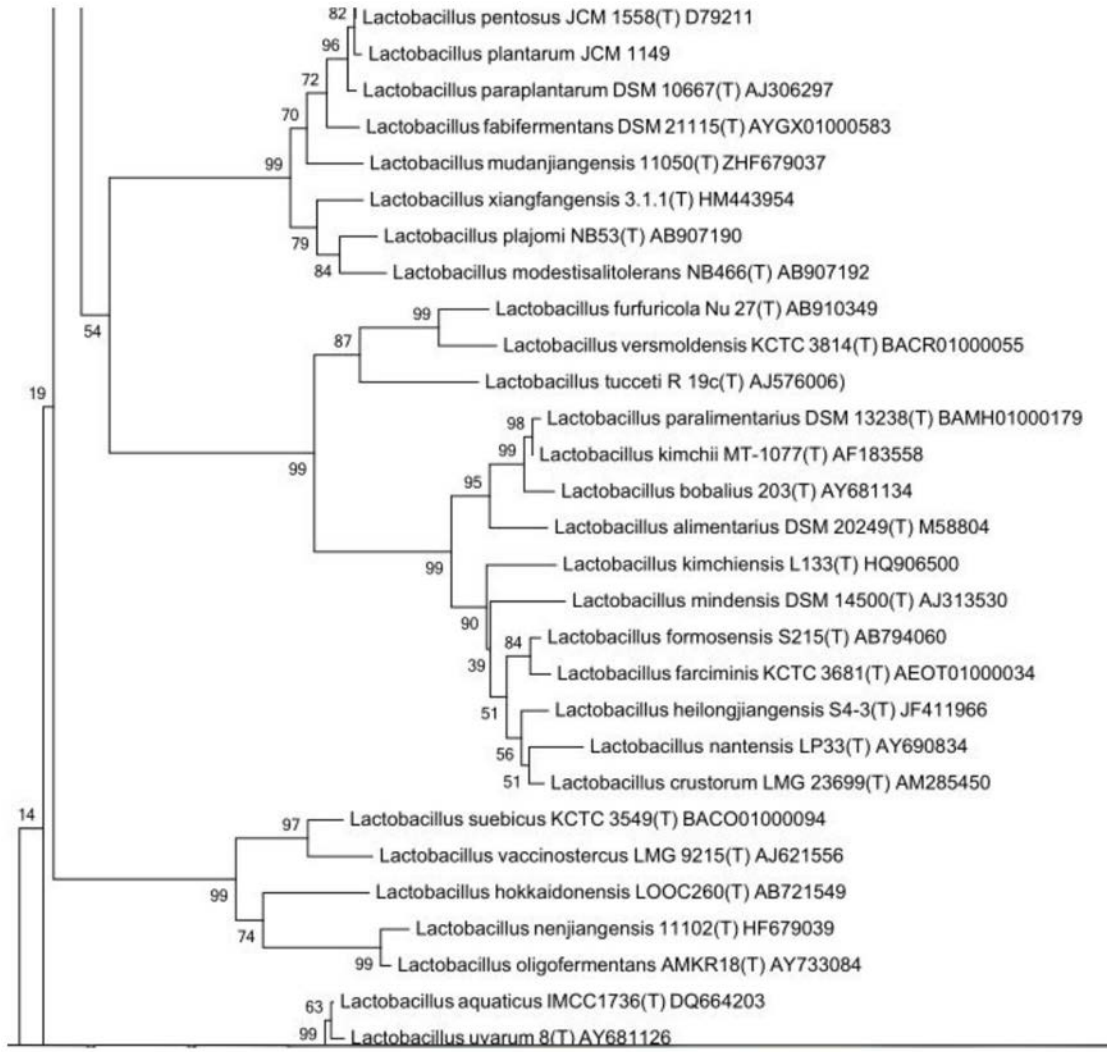


图1



图2





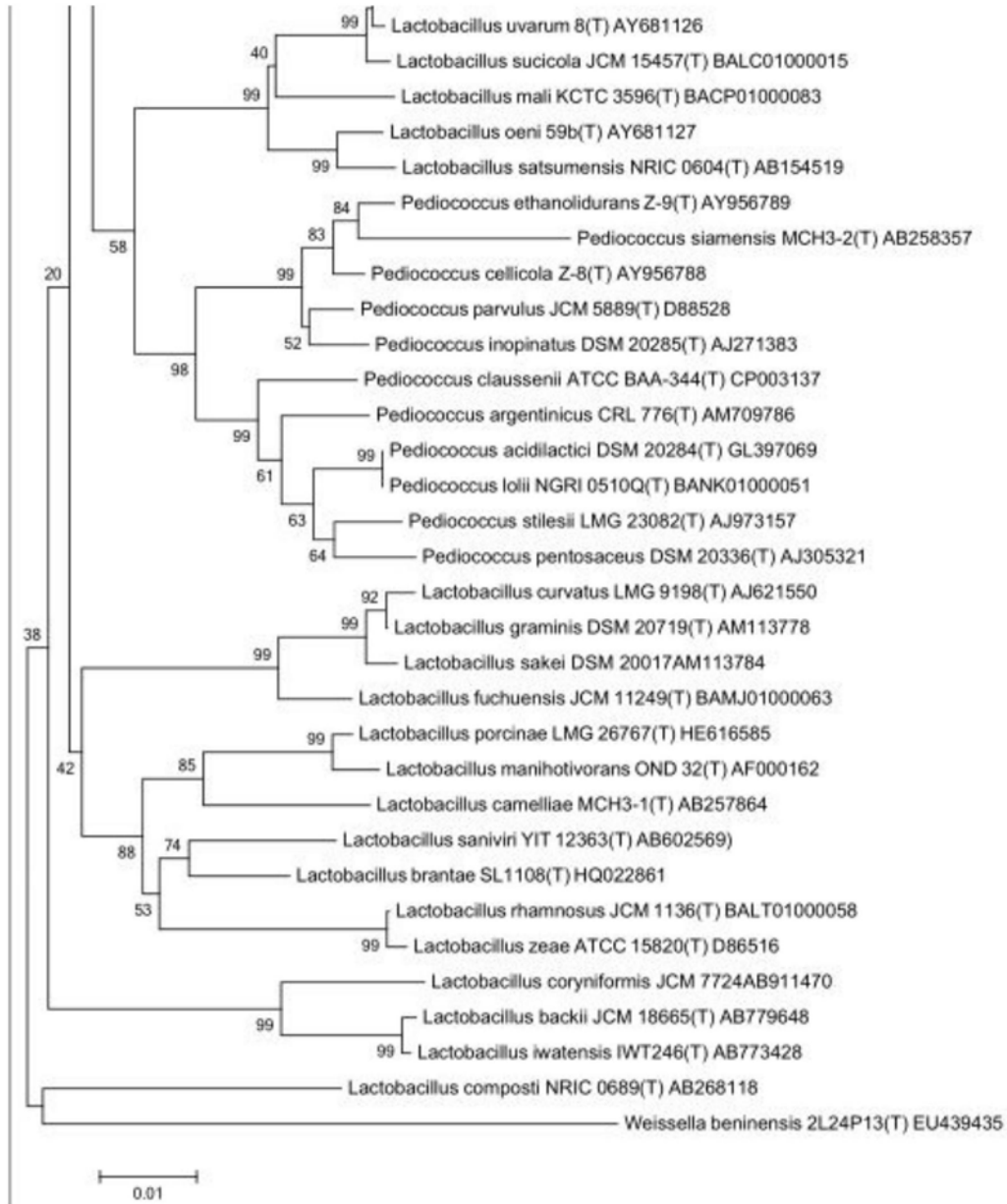


图3

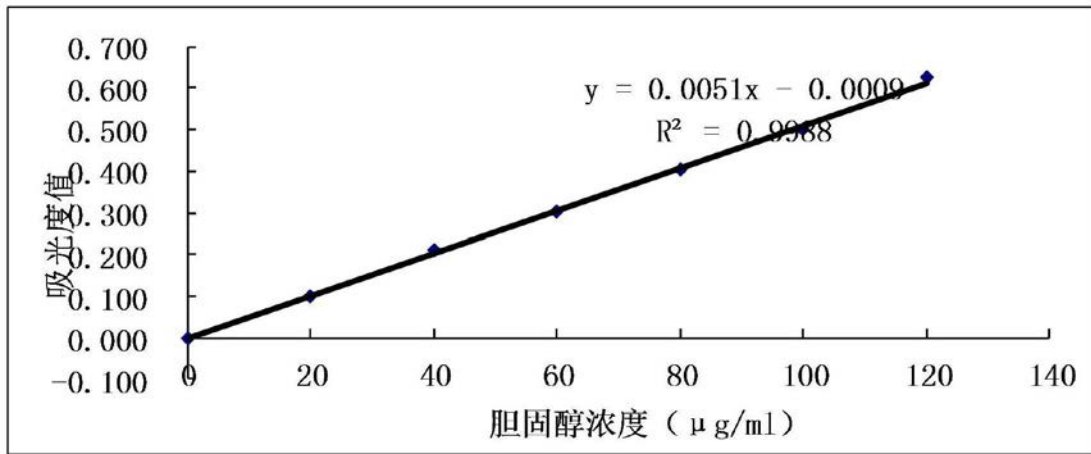


图4

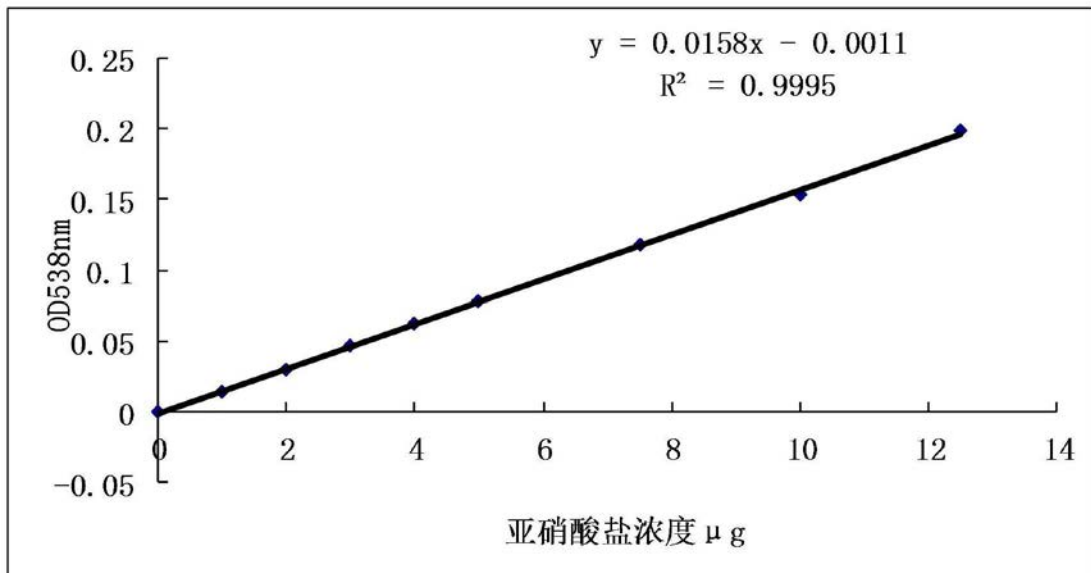


图5