

耐酸耐胆盐益生乳酸菌的筛选与鉴定

Screening and identification of *Lactic Acid Bacteria* with acid and bile tolerance

吕源玲

LU Yuan-ling

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:为了筛选出人意性的耐酸、耐胆盐的益生菌,利用含胆盐(0.2%)的5种选择性培养基(TPY、BHI、MRS、SL、乳酸杆菌选择性琼脂培养基),以溴甲酚紫为酸性指示剂,从婴儿粪便中初步筛选出42株耐胆盐的乳酸菌。根据菌株在pH 5.0, 4.0, 3.5的MRS液体培养基中培养时OD值的变化情况,筛选出3株具有较好耐酸耐性的菌株。然后通过平板菌落计数方法测定筛选出的3株菌在pH 3.0条件下0~3 h存活率的变化情况,筛选出对酸和胆盐耐受能力最强且最稳定的菌株经16S rDNA分子生物学鉴定为*Lactobacillus plantarum*。该菌能够作为潜在的益生菌菌株用于后期深入地挖掘其益生功能。

关键词:乳酸菌;耐胆盐;耐酸;筛选;鉴定

Abstract: In order to screen human probiotics with the acid and bile resistant abilities, infant stool diluents were spread on five different selective agar plates including TPY, BHI, MRS and SL in this study. 42 strains of lactic acid bacteria with certain bile-tolerance were isolated by selective agar media for lactobacilli, supplemented with bile salt (0.2%) and bromocresol purple as an acid indicator. 3 strains of lactic acid bacteria with high acid tolerance were further selected from 42 strains according to biomass of their cultured in the MRS liquid medium with pH 5.0, pH 4.0 and pH 3.5 respectively. Then the viability of these 3 strains in MRS medium with pH 3.0 was measured by plate colony count technique, resulting in one of them with the highest acid- and bile salt-tolerance. Then this strain was subsequently identified using 16S rRNA-based molecular biological approaches. The strain was molecularly identified to be *Lactobacillus plantarum*. The strain could be used as a potential probiotic strain for late digging its probiotic function.

基金项目: 国家科技部 863 计划(编号:2007AA10Z353); 江苏高校哲学社会科学重点基金项目(编号:2017ZDIXM035)

作者简介: 吕源玲(1974—),女,江南大学工程师,硕士。

E-mail: 383274108@qq.com

收稿日期: 2017—03—02

Keywords: lactic acid bacteria; bile-tolerance; acid-tolerance; screening; identification

作为人和动物肠道的正常菌群的益生乳酸菌,具有许多益生功效^[1]。益生乳酸菌可以抑制腐败菌生长,提高人体免疫功能,延缓机体衰老,预防心血管疾病,还具有防癌、抗癌等功能^[2]。

尽管益生乳酸菌具有很多有利于机体健康的功效,但是摄入益生菌制品并不意味着就可以获得这些功效。有报道^[3]显示,不同人种的肠道菌群具有较大差异。而目前中国许多企业多以国外的菌种或非人类肠道来源的乳酸菌生产益生菌产品,没有考虑到不同人群对相同菌株的适应性的差异以及不同来源菌株对人体环境适应性的差异^[4]。因此,在产品的开发和菌株的使用上可能存在一些盲点。

本试验旨在通过体外筛选出适合于亚洲人群的人源性的、对胃酸和胆汁具有一定耐受性的益生乳酸菌。从婴儿粪便分离获得大量的乳酸菌,并模拟胃肠道环境筛选出人源性耐酸、耐盐的益生乳酸菌,具有更加适应亚洲人群肠道环境、安全性高等优点,可以将其制成益生制剂直接应用于人体或应用于乳制品、禽畜饲养、水产养殖等领域,为进一步的乳酸菌生理功能的开发提供菌种资源储备。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

筛选来源: 4名健康的婴儿,年龄为4~7个月,采样前1周内未服用过任何抗菌类药物;

石蕊、溴甲酚紫: 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

MRS培养基、乳酸杆菌选择性培养基: 生化试剂,青岛科园海博生物技术有限公司;

脑心浸液琼脂培养基: 生化试剂,杭州天和微生物试剂有限公司;

TPY琼脂培养基: 生化试剂,国药集团化学试剂有限公司。

酶标仪:imrk型,美国伯乐公司;

隔水式恒温培养箱:GHP-9160型,上海一恒科技有限公司;

基因扩增仪:Bio-rad S1000型,美国Bio-Rad公司;

电子显微镜:Quanta200型,美国FEI公司;

厌氧罐:3.380 102 AN AEROBIC型,德国Schutt Labortechnik GmbH公司;

凝胶成像仪:Gel Doc EZ型,美国伯乐公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离纯化 取5g左右样品加入有玻璃珠的三角瓶中,加入90mL 0.9g/mL胰蛋白胍水进行稀释预处理,以300r/min的速度振荡10min。吸取1mL粪便原液加入一支装有9mL胰蛋白胍水的试管中,振荡混匀,作为 10^{-1} 的稀释液,同样方法稀释至 10^{-8} 。

采用稀释涂布平板法,将粪便原液及 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 稀释度的稀释液各取200 μ L,均匀涂布于已含0.2%牛胆盐的TPY、BHI、MRS、SL、乳酸杆菌选择性琼脂培养基上。将平板倒置于厌氧罐(厌氧罐中放入含有10g焦性没食子酸、25gNaHCO₃、250mL蒸馏水的烧杯,并经过3次抽真空至-0.08MPa、充氮气至0.02MPa过程中),放入37℃恒温培养箱中培养48h。取出平板观察其生长情况,并挑出变红或变黄的菌落,制片并进行革兰氏染色,将油镜观察为紫色的革兰氏阳性菌在MRS平板上进行反复划线分离,倒置于厌氧罐中于37℃环境培养48h。取出后挑取单菌落进行制片镜检,直至确定其纯化^[5]。

1.2.2 石蕊牛奶试验 将纯化后的菌进行编号并挑取单菌落将其接种至MRS液体培养基中,37℃厌氧培养24~48h制成菌液。将脱脂乳粉以1:10(g/mL)的比例与水混合溶解后,调pH值至7.2,以40:1(体积比)的比例加入石蕊试剂,此时牛奶呈蓝紫色,分装后于115℃,20min灭菌。以1%体积分数接种供试菌液于石蕊牛奶中,置于厌氧罐中于37℃环境培养48h。取出观察,将产生凝乳现象并且能使牛奶变为粉红色的菌株初步确定为乳酸菌^[6]。

1.2.3 耐酸试验 将保存的菌株接入MRS液体培养基中进行活化,并以一定顺序将菌液注入96孔板,每孔20 μ L,再注入200 μ L pH分别为5.0,4.0,3.5的MRS液体培养基,以250r/min振荡5min。置于37℃恒温箱进行厌氧培养,于0,4,6,8h用酶标仪测量OD值。每个菌株至少做3个平行。使用OD值计算菌株在不同pH值培养基中的增长率:

$$K = \frac{OD_x - OD_0}{OD_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

K——菌株增长率,%;

OD_x——乳酸菌生长x h在600nm下OD值;

OD₀——乳酸菌生长0 h在600nm下OD值。

1.2.4 菌株存活率计算 将得到的6株菌接种至MRS液体培养基,于37℃环境厌氧培养48h,得到菌液。按5%体积分数将菌液接种至pH值为3.0的MRS液体培养基(MRS液体培养基经过115℃,20min灭菌后,用浓度为0.1mol/L

的HCl调pH为3.0,分装试管),振荡。在0,1,2,3h分别取出50 μ L菌液至EP管中,加入450 μ L 0.9g/mL胰蛋白胍水进行稀释,以此类推制成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 稀释度的菌液,每个稀释度分别取20 μ L菌液在MRS平板上进行点种,倒置于厌氧罐中,放入37℃恒温培养箱中培养48h,使用平板计数法测定活菌数并计算存活率,平行3次^[7]。

$$R = \frac{\lg N_1}{\lg N_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R——菌株存活率,%;

N₁——菌株处理后活菌数,CFU/mL;

N₀——菌株初始活菌数,CFU/mL。

1.2.5 16S rDNA 扩增方法 乳酸菌DNA的提取按照BIO BASIC INC.生产的基因组DNA提取试剂盒说明书的方法提取染色体DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测片段大小是否正确,通过凝胶成像仪确定为乳酸菌后对其基因模块进行PCR扩增。PCR扩增采用50 μ L体系,其中DNA模板1 μ L,dNTP 5 μ L,Taq酶1 μ L,10 \times buffer 5 μ L及基因模板2 μ L,采用16S rDNA通用引物P1、P2,即R518(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')和F357GC(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GGC GCA CGG GGC TAC GGG AGG CAG CAG-3')各1 μ L,超纯水35 μ L。反应条件为:94℃ 2min,95℃ 20s \rightarrow 56℃ 30s \rightarrow 72℃ 100s进行30个循环,72℃延伸5min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物的片段大小是否正确^[8-9]。将检验正确的样品4℃冰箱保存备用。

1.2.6 16S rDNA 的序列测定及与标准株序列的比较 将PCR样品寄至上海华大生物工程有限公司测序,并通过登陆National Center for Biotechnology Information,运用Basic Local Alignment Search Tool软件将测序结果与Gene Bank中的标准菌株16S rDNA序列进行对比^[10]。

2 结果与分析

2.1 耐胆盐菌株的分离

分离培养基MRS、SL、TPY、乳酸杆菌选择性琼脂培养基、脑心浸液琼脂培养基(BHI)均为以溴甲酚紫为酸性指示剂(pH 5.2~6.8,黄—紫)并且含胆盐的选择性培养基。因为乳酸菌分解代谢糖并且产酸,所以当菌落产酸时,培养基上就有颜色由紫色变为红色或黄色的菌落。挑取较大直径的红色或黄色的单菌落,对其进行革兰氏染色并镜检,筛选出G⁺。将在石蕊牛奶试验中能够凝乳并使蓝紫色牛奶变为粉红色的革兰氏阳性菌初步确认为乳酸菌^[11]。

以下为几种典型的镜检结果,见图1。由镜检图片可观察出图1(b)、(i)及(g)的菌体为细长杆状。图1(d)显示的菌体与前者比较稍短且部分呈“Y”字形。而图1(a)中菌体为稍粗的杆状。从图1(c)、(e)、(f)及(h)中可观察到菌体为短杆状甚至接近球状。

2.2 耐胆盐菌在pH 5.0条件下的耐酸筛选结果

将分离出来的42株耐胆盐菌株接种到pH 5.0的MRS

液体培养基,分别在 0, 4, 6, 8 h 取样,用酶标仪检测在 600 nm 下的 OD 值,其中有 10 株菌的 OD 值增加。OD 值变化的情况见图 2。结果显示,10 株待选菌株均能在 pH 5.0 环境下生长,OD 值变化范围集中在 6.71%~34.55%,其中 EM5 的增长率最大,达 34.55%。由于菌株 4-5、5-2 的增长率较低,因此认为此 2 株菌其酸耐受能力不明显。最终选择 8 株菌进行 pH 4.0 的耐酸能力筛选。

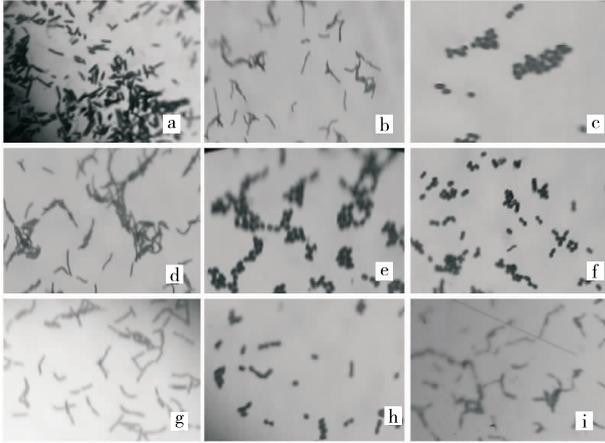


图 1 革兰氏染色结果(1 000×)

Figure 1 Result of gram staining (1 000×)

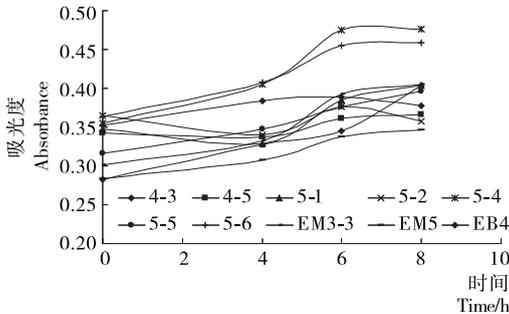


图 2 pH 5.0 环境下菌株生长情况

Figure 2 Growth status of strains in pH 5.0

2.3 8 株菌在 pH 4.0 条件下的耐酸筛选结果

从 pH 5.0 环境下筛选出的 8 株菌进行 pH 4.0 环境下的耐酸筛选。将 8 株菌接种至 pH 值已调至 4.0 的 MRS 液体培养基上,放入酶标仪测定其 600 nm 下 0, 4, 6, 8 h 的 OD 值。筛选出在上述环境中能够生长的菌株共 8 株,OD 值见图 3。结果显示,8 株菌在 pH 4.0 环境下均有生长。OD 值变化范围集中在 5.88%~54.58%,因此最终选择 8 株菌进行 pH 3.5 的耐酸能力筛选。同时,将此环境下菌株生长情况与 pH 5.0 培养基中试验菌株的生长情况进行比较,总体来说大部分菌株的 OD 值增长率呈减小趋势。

2.4 3 株菌在 pH 3.5 条件下的耐酸筛选结果

由图 4 可知,在 0~8 h 在 pH 3.5 的 MRS 培养基中,筛选出在 pH 3.5 酸性环境下均能生长的 3 株菌,即 5-5、EM5、EB4。其中 EM5 在 0~8 h 内所增长的 OD 值幅度最大,达 116.04%,说明它在 pH 3.5 条件下生长情况良好。以上 3 株菌对 pH 3.5 酸性具有一定耐受能力,有必要在 pH 3.0 的环

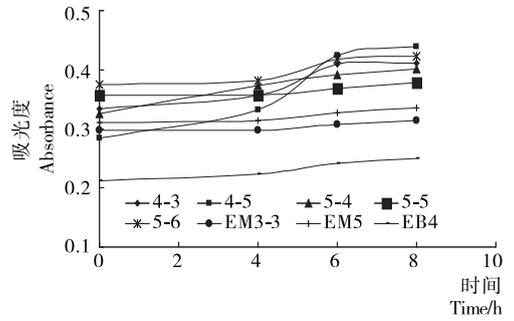


图 3 pH 4.0 环境下菌株生长情况

Figure 3 Growth status of strains in pH 4.0

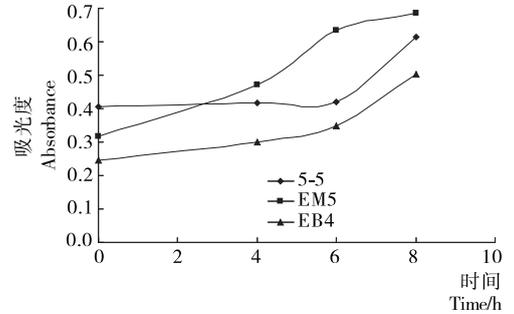


图 4 pH 3.5 环境下菌株生长情况

Figure 4 Growth status of strains in pH 3.5

境中继续培养,并作平板计数以测定 0~3 h 的活菌数和存活率,便于进一步作酸耐受性的评价。

2.5 3 株乳酸菌的 pH3.0 MRS 培养液耐受性筛选试验结果

pH 3.0 为耐受试验计划的最高酸度,不同菌株对酸的耐受性差异较大。经过 pH 5.0, 4.0, 3.5 的耐酸筛选后,筛选出的 5-5、EM5、EB4。将供试菌株接入 pH 3.0 的 MRS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养,分别于 1, 2, 3 h 取出部分菌液进行活菌计数并计算存活率。

由表 1 可知,不同菌株在 pH 3.0 环境中耐受性有较大差异,菌株对酸性环境耐受性随培养时间的延长而降低。在 pH 3.0 环境中生长 1 h 后,菌数下降都很明显,但是 5-5 菌株下降了 5 个数量级,而且在培养 2 h 后 5-5 菌株便不再存活,表明在较低酸性的环境不利于 5-5 的存活。EM5 对酸的耐受性最强,在 pH 3.0 MRS 液体培养基中 37 °C 厌氧保温 3 h 后存活率达到 46%,EB4 在 2~3 h 的存活率几乎为 0,根据之前不同酸度下菌株的生长情况,选择对酸耐受性最强、最稳定的 EM5 作为分子生物学 16S rDNA 鉴定的对象。

表 1 pH 3.0 条件下存活菌数

Table 1 Viable number of viable bacteria in pH 3.0 ×10⁵ CFU/mL

时间/h	5-5	EM5	EB4
0	146.700±2.510	96.60±2.53	71.600±1.150
1	0.002±0.580	1.62±0.58	0.220±0.080
2	0.000±0.000	0.30±0.03	0.050±0.020
3	0.000±0.000	0.02±0.01	0.005±0.001

2.6 扩增产物测序及分析

回收的扩增产物由上海华大生物工程有限公司测序。采用 BLAST 将菌株 EM5 的 16S rRNA 序列进行比对, 经比对后发现, 与 EM5 16S rDNA 序列同源性最高者为 *Lactobacillus plantarum*, 相似性为 99%, 因此初步鉴定菌株 EM5 为一株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)^[12]。

3 结论

本研究从婴儿粪便中分离出 42 株耐胆盐的乳酸菌, 对其进行了石蕊牛奶试验鉴定。以菌株的耐酸受性、OD 值、存活率、活菌变化数等稳定性指标对菌株进行筛选, 共筛选出在 pH 3.5 环境下能够生长的 3 株菌 5-5、EM5、EB4。其中对酸和胆盐的耐受能力最强最稳定的是 EM5, 它在 pH 3.0 条件下培养 1, 2, 3 h 后的存活率分别为 75%, 64%, 46%。对菌株进行 16S rDNA 鉴定, 结果表明 EM5 与 *Lactobacillus plantarum* 同源性达到了 99%^[13-14]。

本研究发现 EM5 菌株对酸和胆盐的耐受性较高, 具有进一步研究的可行性。由于该株乳酸菌是人源性的, 具有公认的安全性, 可以将其应用于乳制品、功能性益生菌制剂直接应用于人体, 也可以制成其它市场所需的产品, 为以后的乳酸菌生理功能的开发研究提供了新的菌种资源。

参考文献

- [1] SHIH F. Probiotics and prebiotics as functional food ingredients [J]. *Nahrung Food*, 2003, 47(5): 285-287.
- [2] SEPPOS E Probiotics. An overview of beneficial effects[J]. *Antonievan Leeuwenhoek*, 2002, 82: 279-289.
- [3] 张素霞. 酸乳中乳酸菌的筛选及乳酸发酵研究[J]. *乳业科学技术*, 2007(5): 236-238.
- [4] 刘燕. 高产胞外多糖乳酸菌菌株筛选与鉴定[J]. *乳业科学与技术*, 2009(1): 21-25.
- [5] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 84-100.
- [6] 周雨霞, 王志峰, 柳翰凌, 等. 传统乳制品中潜在益生植物乳杆菌的体外筛选[J]. *中国乳品工业*, 2006(2): 19-21.
- [7] 高鹏飞, 孙志宏, 麻士卫, 等. 蒙古族儿童源益生特性双歧杆菌的筛选及鉴定[J]. *微生物学报*, 2009, 49(2): 210-216.
- [8] 汪川, 张朝武, 陈会超, 等. 两株耐酸耐胆盐人肠源菌株的鉴定及系统发育分析[J]. *四川大学学报*, 2008, 39(2): 263-266.
- [9] 张瑞强, 王红宁, 黄勇, 等. 牦牛肠道与粪便乳酸菌的分离鉴定及 PCR-16S rDNA 鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2006, 36(5): 381-385.
- [10] CHEN Xia, SUN Zhi-hong, MENG He, et al. The acid tolerance association with expression of H⁺-ATPase in lactobacillus casei[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2009, 62(2): 272-279.
- [11] 王兴洁, 魏超廖, 光敏, 等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. *食品与机械*, 2016, 32(7): 40-44.
- [12] 尹乐斌, 张臣飞, 孙菁, 等. 一株产细菌素乳酸菌的分离、鉴定及生物学特性研究[J]. *食品与机械*, 2016, 32(3): 12-15.
- [13] 许学伟, 吴敏, 阮红, 等. 嗜盐古生菌 AJ4 中 BR 蛋白基因部分片段和 16S rRNA 基因序列研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(1): 55-60.
- [14] 李丙超, 胡卫东, 唐文才, 等. 传统发酵香肠中菌种的分子生物学鉴定[J]. *食品与机械*, 2015, 31(3): 20-22, 107.
- [15] 赵延伟, 王雨生, 陈海华. 豆制品的质构与感官评定相关性的研究[J]. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2012, 29(2): 126-131, 135.
- [16] 张志清, 熊善波, 李远志, 等. 工程重组米质构测定(TPA)与感官评价相关分析[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(10): 1-5.
- [17] 刘朝龙, 王雨生, 陈海华, 等. 果冻质构与感官评定相关性的研究[J]. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2012, 29(2): 115-120.
- [18] EMIRA Mehinagic, GAËLLE Royer, RONAN Symoneaux, et al. Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004(34): 257-269.
- [19] HARKER F R, MAINDONALD J, MURRAY S H, et al. Sensory interpretation of instrumental measurements I: texture of apple fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 24(3): 225-239.
- [20] COSTA F, CAPPELLIN L, LONGHI S, et al. Assessment of apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit texture by a combined acoustic-mechanical profiling strategy[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(1): 21-28.
- [21] 杨玲, 肖龙, 王强, 等. 质地多面分析(TPA)法测定苹果果肉质地特性[J]. *果树学报*, 2014, 31(5): 977-985.

(上接第 41 页)

- [4] COROLLARO M A, APREA E, ENDRIZZI I, et al. A combined sensory-instrumental tool for apple quality evaluation [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014(96): 135-144.
- [5] 楚炎沛. 物性测试仪在食品品质评价中的应用研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2003(7): 40-42.
- [6] 纪宗亚. 质构仪及其在食品品质检测方面的应用[J]. *食品工程*, 2011(3): 22-25.
- [7] NAULSKI R, GROCHOWICZ J. The influence of the measurement conditions on the TPA test of selected fruit[J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 562(1): 213-219.
- [8] KADAN R, SROBINSON M G, THIBODEAUX D P, et al. Texture and other physicochemical properties of whole rice bread [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(7): 940-944.
- [9] ZDUNEK A, BEDNARCZYK J. Effect of mannitol treatment on ultrasound emission during texture profile analysis of potato and apple tissue [J]. *Journal of Texture Studies*, 2006, 37(3): 339-359.
- [10] 徐坤华, 赵巧灵, 廖明涛, 等. 金枪鱼质构特性与感官评价相关性研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(12): 190-197.
- [11] 赵延伟, 吕振磊, 王坤, 等. 面条的质构与感官评价的相关性研究[J]. *食品与机械*, 2011, 27(4): 25-28, 39.