

新疆喀什长寿老人肠道益生菌的分离鉴定及生物学特性研究

Isolation, identification and biological characteristics of intestinal probiotics from the longevity crowd in Kashi, Xinjiang

阿依米热·毛拉木 努斯热提古丽·安外尔 布沙热木·阿布力孜

AYMIHRI Mollam

NUSRATGUL Anwar

BUSARAM Abliz

海米代·吾拉木 奥斯满·依米提

HAMIDA Gulam

OSMAN Yimit

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

(School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China)

摘要:从新疆喀什长寿老人肠道中分离筛选出具有益生功能的乳酸菌,并对其进行体外降甘油三酯能力试验。结果表明,分离获得的41株乳酸菌中有14株菌的甘油三酯降解率均高于15%,其中菌株A2-1、A1-2、A3-1、A4-6、A4-1在pH为3.0的人工胃液中培养3h的存活率较高,分别为63.22%,60.01%,58.94%,56.14%,50.29%;同时这5菌株在胆盐浓度为1,3,5 g/L的MRS培养基中存活率较高,其中存活率最高的菌株为A1-2,存活率分别为46.61%,42.65%,16.32%;经16S rDNA鉴定,A1-2为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),A2-1、A3-1、A4-6为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),A4-1为干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)。

关键词:长寿老人;甘油三酯;降解率;乳酸菌

Abstract: Lactic acid bacteria with probiotic function were isolated and screened from the intestinal track of longevity crowd in Kashi, Xinjiang, and their ability to triglyceride-reducing in vitro were investigated. The results showed that the fourteen of forty-one strains of lactic acid bacteria with high triglyceride-reducing rates, were higher than 15%. Among them, strain A2-1, A1-2, A3-1, A4-6 and A4-1 with higher survival rates in artificial gastric juice at pH 3.0 were 63.22%, 60.01%, 58.94%, 56.14%, 50.29%, respectively. Moreover, the survival rates of these 5 strains in MRS broth with 1, 3 and 5 g/L bile salt were also relatively high, and the survival rates of

A1-2 were the highest, which were 46.61%, 42.65%, 16.32%, respectively. The 5 strains of lactic acid bacteria had strong properties of acid resistant, bile-salt-tolerant and degrading the triglyceride acid resistant and were biochemical identifying the 16S rDNA. Finally, A1-2 and A4-1 were confirmed to be *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* respectively. A2-1, A3-1 and A4-6 were identified to be *Enterococcus faecium*.

Keywords: Longevity; triglyceride; degradation rate; Lactic acid bacteria

人体肠道是微生物良好的栖息环境,成人肠道中的微生物数量多达 $10^{13} \sim 10^{14}$ 个、共15 000~36 000种,总重量达1.5 kg^[1]。肠道微生物是人体最庞大、最复杂的微生态系统,具有人体不具备的代谢功能。肠道微生物及其代谢产物不仅能提供营养、促进消化^[2],还能抑制病原体的侵袭^[3]、影响免疫系统发育和大脑活动^[4]。Komai等^[5]研究发现,长寿老人肠道内的双歧杆菌、乳杆菌等乳酸菌数量多于普通人群,说明肠道中的乳酸菌对人体的健康和长寿有一定的促进作用。但是肠道菌群结构失调会导致肥胖、糖尿病、冠心病等慢性疾病的发生^[6-7]。益生菌和益生元是调理肠道微生物群落结构的两大肠道活力因子。益生菌是对宿主有益的一类微生物活体,它定植于人体肠道和生殖系统,能够产生一定的功效从而改善宿主的微生态平衡,发挥有益作用。大量研究^[8-9]^[10]²³⁻²⁴发现乳酸菌在降低血清中的血脂水平方面具有显著功能,并且副作用较低。尽管乳酸菌对人体的有益作用较为突出,由于不同人的肠道菌群之间存在差异^[11],宿主与肠道微生物菌群之间存在着相互选择的关系,因此不同人群对同种菌株的适应性及不同来源菌株对人体肠道的适

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660014)

作者简介:阿依米热·毛拉木,女,新疆大学在读硕士研究生。

通信作者:奥斯满·依米提(1962—),男,新疆大学副教授,博士。

E-mail: xafkat@sina.com

收稿日期:2018-01-25

应能力不同^[12]。目前中国的益生菌产品多以非人源益生菌为主,忽略了菌株的来源与作用对象一致时,菌株对宿主益生功效的针对性和特异性才会增强^[13]。

本试验拟从世界公认的长寿地区喀什长寿老人肠道中分离筛选降甘油三酯乳酸菌,通过体外试验获得对胃酸和胆汁盐具有一定耐受性的人源益生菌,对人体肠道具有更高的适应性和安全性等优点,可以将其直接应用于人体或乳制品,为开发和利用人源益生菌提供菌种资源储备和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 样品

2016年2月从喀什地区疏勒县库木西力克乡采集长寿(80岁以上)老人粪便样品一共10份。库木西力克乡是长寿老人集中的乡村,提供样品者长期饮食结构大多以牛奶、羊肉为蛋白质的主要来源,日常食物有小麦、玉米和高粱,水果和坚果是每日必不可少的部分。样品提供者均为长期坚持农业生产劳动的农民。对照组为普通农民的粪便一共2份,并保证采样前2周内没有服用过任何菌类药物,样品信息见表1。

表1 样品信息
Table 1 The information of samples

样品来源性别	样品来源年龄/岁	样品采样地点	样品来源性别	样品来源年龄/岁	样品采样地点
女	87	新疆喀什	女	89	新疆喀什
男	86	新疆喀什	男	84	新疆喀什
男	82	新疆喀什	男	82	新疆喀什
女	91	新疆喀什	女	90	新疆喀什
女	81	新疆喀什	男	45	新疆喀什
男	83	新疆喀什	女	48	新疆喀什

1.1.2 试剂及培养基

甘油三酯试剂盒(TG)、胆盐:四川迈克生物科技股份有限公司;

细菌基因组DNA提取试剂盒、溶菌酶、Taq聚合酶:上海生工生物工程股份有限公司;

改良MRS培养基:蛋白胨10g,酵母浸出粉5g,磷酸氢二钾2g,柠檬酸二铵2g,葡萄糖20g,牛肉膏10g,无水乙酸钠5g,硫酸镁0.2g,硫酸锰0.05g,琼脂粉20g,碳酸钙20g,吐温1mL;

LB培养基:胰蛋白胨10g,酵母浸出粉5g,氯化钠10g,琼脂粉18g;

甘油三酯培养基:将2g/L的聚乙烯醇水溶液与植物油按体积比3:1混合,用超声波处理(控制参数每次超声5s,间隔时间5s,共超声70次)后,加入到MRS培养基中,调pH至6.5±0.2,121℃灭菌15min,冷却备用;

人工胃液:5g/L的NaCl溶液、3g/L的胃蛋白酶溶液,用1.0mol/L的HCl调pH至3.0,0.22L滤器过滤除菌^[10],

4℃冰箱冷藏,备用;

胆盐培养基:称取胆盐于MRS液体培养基中,配制浓度为成1,3,5g/L胆盐溶液^{[10]35},调pH至6.5±0.2,121℃灭菌15min,冷却备用。

1.1.3 主要仪器

全自动灭菌锅:JF-SX-500型,日本TOMY公司;
生化培养箱:DP-200型,上海精宏实验设备有限公司;
分光光度计:NanoDrop 2000c型,赛默飞世尔科技公司;
PCR仪:S1000 Thermal Cycler型,北京伯乐元业有限责任公司;

电子天平:JD200-3型,沈阳龙腾电子称量仪器有限公司;

凝胶成像:bioradchemidoc XRS型,美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 长寿老人与普通细菌总数的测定及比较 分别称取1.0g长寿老人和普通粪便样品,倒入9.0mL无菌水中,吸取稀释液1mL进行梯度稀释,得到10⁻²~10⁻⁵个稀释度,涂布于LB培养基,37℃倒置培养48h,观察菌株生长情况,记录菌落总数,进行比较。在改良MRS培养基上进行分离,挑选形成钙溶圈的菌落,2组进行乳酸菌数量比较。

1.2.2 乳酸菌的分离、纯化及形态学观察 将新疆喀什地区维吾尔族长寿(80岁以上)老人采集的粪便样品梯度稀释,平板涂布于改良MRS培养基上,37℃倒置培养48h,根据菌落形态将不同菌落进行编号,并挑取形态不同的菌落反复划线于LB培养基分离获得纯菌落。对分离获得的41株菌株进行革兰氏染色试验、过氧化氢酶接触试验。将革兰氏染色结果为阳性且过氧化氢酶为阴性的菌株初步判断为乳酸菌^[14]。

1.2.3 乳酸菌体外甘油三酯降解率、耐酸耐胆盐能力的测定

将乳酸菌按3%的接种量接种至甘油三酯培养基中,37℃培养24h,10 000×g离心2min,取上清液用于甘油三酯降解率的测定,以没有接菌的甘油三酯培养液作为空白对照,利用甘油三酯试剂盒测定甘油三酯的含量^[15]。甘油三酯含量和甘油三酯降解率分别按式(1)、(2)计算:

C₁ = A₁ / A₂ × C , (1)

R = (C₂ - C₁) / C₂ × 100% , (2)

式中:

- C₁——样品的甘油三酯含量,mg/mL;
- A₁——接种乳酸菌的含甘油三酯的MRS液体培养基中测得的甘油三酯OD值;
- A₂——标准液的OD值;
- C——标准液的含量,mg/mL;
- R——甘油三酯降解率,%;
- C₂——总甘油三酯含量,mg/mL。

将1.0mL乳酸菌菌液接种至9.0mL pH为3.0的人工胃液中,37℃厌氧培养,依次在0,3h时进行取样,测定活菌数,存活率按式(3)计算:

$$S = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%, \tag{3}$$

式中:

S——存活率,%;

N₁——3 h 的活菌数,CFU/mL;

N₂——0 h 的活菌数,CFU/mL。

将乳酸菌按 3% 的接种量分别接种至含 1,3,5 g/L 的胆盐培养基中,37 ℃ 厌氧培养,依次在 0,3 h 时进行取样,测定活菌数,按式(3)计算存活率。

1.2.4 16S rDNA 序列鉴定 参照 DNA 提取试剂盒方法,提取乳酸菌基因组 DNA,对乳酸菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,将扩增产物交由上海生工进行序列测定,得到的序列通过 BLAST 程序比对,鉴定菌属信息。

将提取所得的 DNA 模板进行 PCR 扩增,采用正向引物 27f: 5,-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3, 反向引物 1492R: 5,-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3。PCR 反应体系(50 mL):各引物 1 mL;mix 24 mL;模板 1 mL;超纯水补足至 50 mL。PCR 反应条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,33 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。取扩增产物 6 mL,用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,电泳液为 0.5%×TBE。

1.3 数据统计与处理

利用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行分析。每组试验至少重复 3 次,结果用均值±标准差表示。Prism 5 作图,采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 细菌总数的测定

表 2 为新疆喀什长寿老人和普通人肠道中可培养细菌和乳酸菌总数的比较。由表 2 可以看出,长寿老人肠道中的细菌总数比普通人的少,但长寿老人肠道中乳酸菌占的比例显著高于普通人的。麦热姆妮萨·艾麦尔等^[16]研究发现,

表 2 样品的细菌总数
Table 2 Total bacterial count

样品	细菌总数/ (×10 ⁷ CFU·g ⁻¹)	乳酸菌总数/ (×10 ⁴ CFU·g ⁻¹)
试验组 1	7.8±0.4	50.3±8.1
试验组 2	5.4±0.6	28.1±3.9
试验组 3	7.3±0.2	34.2±4.8
试验组 4	8.4±0.5	11.3±2.4
试验组 5	7.2±0.3	28.7±3.6
试验组 6	6.8±1.2	48.9±4.2
试验组 7	4.1±0.3	60.8±1.3
试验组 8	5.7±0.5	23.1±0.8
试验组 9	8.1±0.3	16.1±0.9
试验组 10	8.1±0.4	49.1±1.2
对照组 1	8.3±0.4	8.9±2.1
对照组 2	7.2±0.1	5.9±2.1

和田长寿老人的肠道益生菌在数量和种类上均与普通人群有差异,且长寿老人肠道内的益生菌酸菌的数量比普通人群肠道内的多,主要是肠球菌和植物乳杆菌占优势。研究^[5,17-18]显示中国巴马地区和俄罗斯高加索长寿地区人群肠道中的益生乳酸菌数量明显高于普通人。表明人的健康与长寿均与肠道中的益生乳酸菌相关,与本研究结果一致。

2.2 乳酸菌的分离、纯化及初步鉴定

利用改良 MRS 培养基从长寿老人组分离得到 41 株乳酸菌,各菌落皆为乳白色,表面光滑、整齐,形成钙溶圈,直径为 1~3 mm;皆为革兰氏阳性,形状为杆状、短杆状或球状,均为过氧化氢酶阴性。

2.3 乳酸菌的体外降甘油三酯能力的测定

由表 3 可知,不同来源的乳酸菌的甘油三酯降解率差异较大,41 株乳酸菌中,A1-2 和 A1-10 的甘油三酯降解能力最强,降解率分别为 39.38%,32.33%。其次有 12 株菌的降解率在 15%~30%,18 株菌在 5%~15%,9 株菌在 5%以下。

表 3 乳酸菌降解甘油三酯的能力
Table 3 Abilities of lowering riglycerids by lactic acid bacteria

菌株	降解率/%	菌株	降解率/%	菌株	降解率/%
A1-1	5.31	A2-3	20.22	A3-10	7.21
A1-2	39.38	A2-4	11.52	A3-11	7.15
A1-3	12.82	A2-5	12.91	A4-1	28.43
A1-4	6.91	A2-6	2.79	A4-2	19.78
A1-5	12.27	A2-7	3.55	A4-3	2.15
A1-6	8.74	A3-1	21.73	A4-4	3.40
A1-7	3.48	A3-2	12.19	A4-5	5.11
A1-8	19.25	A3-3	7.35	A4-6	17.95
A1-9	17.82	A3-4	2.60	A4-7	3.94
A1-10	32.33	A3-5	14.22	A4-8	8.12
A1-11	16.79	A3-6	8.14	A4-9	6.22
A1-12	7.10	A3-7	2.81	A4-10	21.60
A2-1	27.16	A3-8	18.32	A4-11	4.87
A2-2	18.73	A3-9	12.66		

2.4 乳酸菌耐酸耐胆盐能力的测定

将 14 株甘油三酯降解率>15%的乳酸菌接入 pH 为 3.0 的人工胃液中,37 ℃ 厌氧培养,分别在 0,3 h 时进行取样,测定活菌数并计算存活率。由图 1(a)可以看出,乳酸菌在 pH 为 3.0 的人工胃液中存活率均超过 12.00%,其中 A2-1、A1-2、A3-1、A4-6 及 A4-1 的存活率>50%,分别为 63.22%,60.01%,58.94%,56.14%,50.29%。乳酸菌能够在酸性条件下存活,可能是由于其细胞质中的 pH 值始终保持在一个适宜的水平,而 F1F0-ATP 酶在维持乳酸菌细胞内的 pH 起到至关重要的作用^[19],人体肠道中的低 pH 环境也增加了 F1F0-ATP 酶的活性^[20],因此,试验中不同乳酸菌耐酸能力有较大的差异,可能与菌体的来源,即个体肠道内环境的差异有一定的关系^[21]。

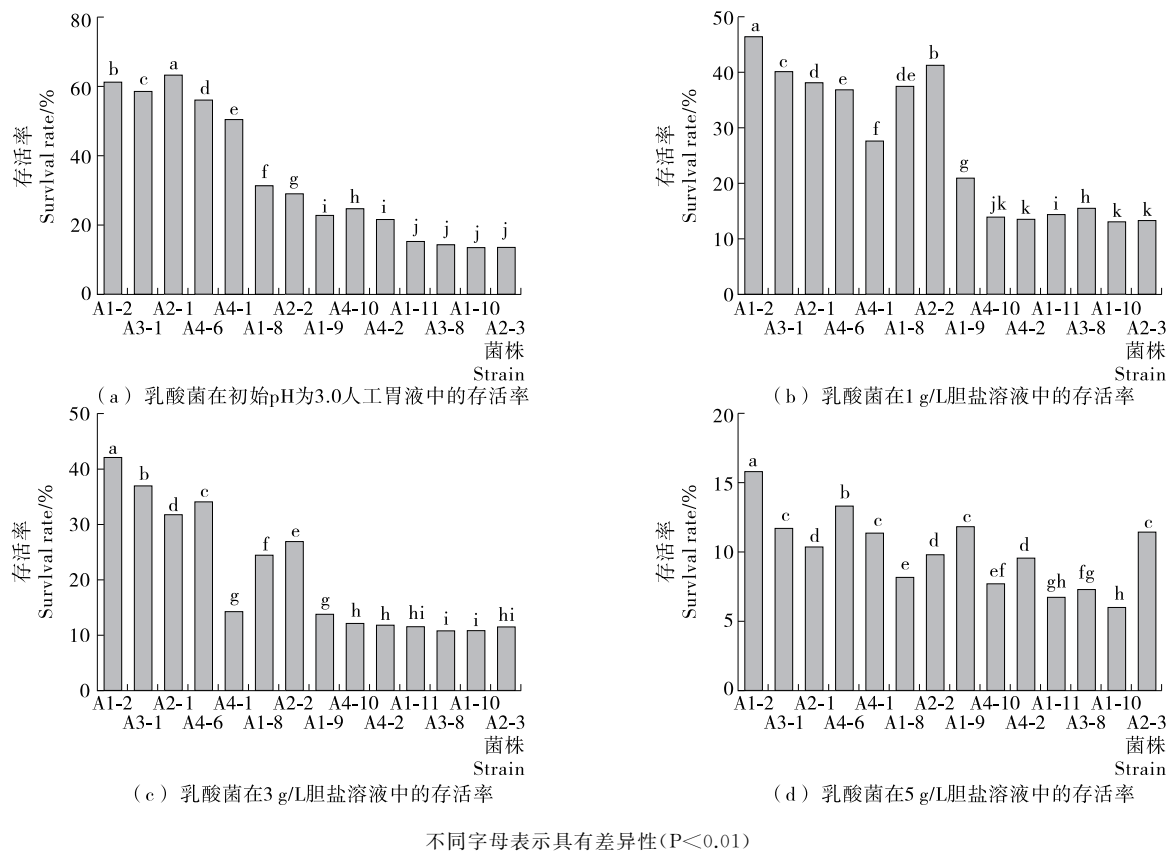


图 1 乳酸菌在初始 pH 为 3.0 及 1,3,5 g/L 胆盐溶液中的存活率

Figure 1 The survival rate of lactic acid bacteria in the initial pH of 3.0 and 1, 3, 5 g/L bile salt solution (n=3)

由图 1(b)~(d)可以看出,在 1,3,5 g/L 胆盐溶液中的存活率>10.00%的菌株共 6 株,为 A1-2、A2-2、A3-1、A2-1、A1-8 及 A4-6,这 6 株菌的耐胆盐能力显著大于其他菌株(P<0.01)。同一菌株随着胆盐浓度的升高,存活率反而降低。

2.5 菌株 16S rDNA 测序鉴定

对耐酸耐胆盐能力较强的 5 株乳酸菌基因组 DNA 进行

PCR 扩增,电泳检测扩增产物,送去上海生工测序。应用 BLAST 对得到的序列进行比对,从 GenBank 中选取相关种属菌株 16S rDNA 序列,应用 Cluxtal X 双重比对,用 MEGA 5.0 软件进行相似性分析(表 4)及系统发育树分析(图 2)。结果表明,A1-2 与植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),A2-1,A3-1,A4-6 与屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),A4-1 与干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)的同源性达到 99%。

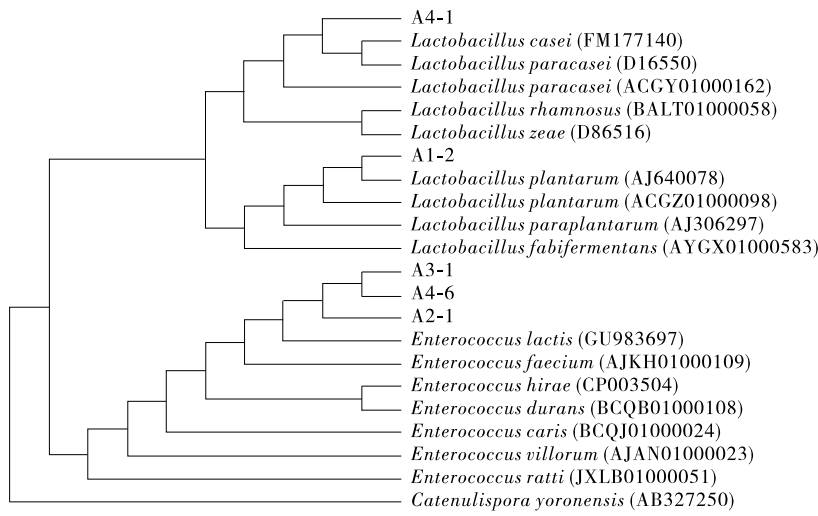


图 2 5 株分离菌根据相关 16S rDNA 序列建立的遗传进化树

Figure 2 The genetic evolutionary tree of 5 isolated bacteria strain in accordance with the 16S rDNA sequences

表 4 16S rDNA 序列比对鉴定结果

Table 4 The identification result by alignment of 16S rDNA sequences

菌株	亲缘关系最近的菌株	同源性/%
A1-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A2-1	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A3-1	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A4-6	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A4-1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99

3 结论

本研究从喀什长寿老人粪便中分离获得 41 株乳酸菌, 对其进行了降甘油三酯能力试验, 筛选出 14 株甘油三酯降解率>15% 的菌株, 进行胃酸, 胆汁盐耐受试验。研究^[22]表明, 人的胃液 pH 值为 3.0 左右, 空腹或食用酸性食品时的 pH 为 1.50, 小肠的胆汁盐含量为 0.03%~0.30%。对酸和胆盐耐受性较低的乳酸菌在此环境下无法存活, 因此从长寿老人样品中分离获得的乳酸菌具有较强的耐酸耐胆盐能力。其中 A2-1, A1-2, A3-1, A4-6, A4-1 在 pH 为 3.0 的人工胃液中有一定的耐受性, 在人工胃液培养 3 h 的存活率分别为 63.22%, 60.01%, 58.94%, 56.14%, 50.29%, 并在胆盐浓度分别为 1, 3, 5 g/L 的 MRS 培养基中存活率较高, 其中 A1-2 的耐胆盐能力最强, 在胆盐浓度为 1, 3, 5 g/L 的 MRS 培养基中的存活率分别为 46.03%, 41.81%, 15.77%。经分子鉴定可知, A1-2 为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), A2-1, A3-1, A4-6 为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*), A4-1 为干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)。

通过研究发现菌株 A1-2 具有较强的耐酸耐胆盐能力, 且该菌株为人源性, 有较高的安全性, 为以后的人源益生菌的开发提供新的菌种资源。

参考文献

[1] NICHOLSON J K, HOLMES E, WILSON I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(5): 431-438.

[2] SONNENBURG J L, XU Jian, LEIP D D, et al. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont[J]. Science, 2005, 307(5 717): 1 955-1 959.

[3] GHOSHAL U C, SHUKLA R, GHOSHAL U, et al. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? [J]. International Journal of Inflammation, 2012, 2012(3): 151 085.

[4] COLLINS S M, BERCIK P. Gut microbiota: Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2013, 10(6): 326-327.

[5] KOMAI M, NANNO M, NAKAZAWA Y, et al. Intestinal microflora and longevity[M]//Functions of Fermented Milk Challenges for the Health Sciences.[S.l.]: Elsevier Applied Science, 1992: 325-353.

[6] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al.

A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7 228): 480-484.

[7] ANDREASEN A S, LARSEN N, PEDERSENSKOVSGAARD T, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects[J]. British Journal of Nutrition, 2010, 104(12): 1 831-1 838.

[8] JONES M L, MARTONI C J, PARENT M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(10): 1 505-1 513.

[9] ATAIEJAFARI A, LARIJANI B, ALAVI M H, et al. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects[J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2009, 54(1): 22-27.

[10] 王俊国. 降胆固醇益生乳杆菌的筛选及其降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.

[11] 张素霞. 酸乳中乳酸菌的筛选及乳酸发酵研究[J]. 乳业科学与技术, 2007, 30(5): 236-238.

[12] 刘燕, 李文献, 王少武. 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, 32(1): 21-25.

[13] 陈大卫. 辅助降血脂益生乳酸菌的筛选及其对高血脂大鼠肠道菌群的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2015: 14-15.

[14] 石超. 传统发酵牦牛酸奶中降胆固醇乳酸菌的筛选及其对高脂模型大鼠的益生作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2014: 17-18.

[15] 张泽生, 王俊辉, 李健, 等. 四株益生菌对高脂血症仓鼠降血脂作用的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 365-367.

[16] 麦热姆妮萨·艾麦尔, 多力坤·买买提玉素甫, 阿布都克尤木·麦麦提, 等. 和田维吾尔族长寿老人肠道益生乳酸菌的分离鉴定[J]. 科技创新导报, 2012(7): 228-230.

[17] 何道生, 曹晋桂. 长寿老人与飞行员[J]. 中国微生态学杂志, 1995(2): 59-61.

[18] XIAO Jin-zhong, KONDO S, TAKAHASHI N, et al. Effects of milk products fermented by *bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers [J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(7): 2 452-2 461.

[19] KOBAYASHI H, SUZUKI T, KINOSHITA N, et al. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 158(3): 1 157-1 160.

[20] KOBAYASHI H, SUZUKI T, UNEMOTO T. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(2): 627-630.

[21] BUCK L M, GILLILAND S E. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth[J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77(10): 2 925-2 933.

[22] KOBAYASHI H. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm[J]. Journal of Biological Chemistry, 1985, 260(1): 72-76.