

牦牛酸乳中耐酸耐胆盐乳酸菌的分离筛选和鉴定

Separation and screening of lactic acid bacteria from the traditional yak yogurt resistant against of acid and bile salts

李 洋¹ 赵 欣² 张 玉¹ 王洪伟¹ 索化夷¹

LI Yang¹ ZHAO Xin² ZHANG Yu¹ WANG Hong-wei¹ SUO Hua-yi¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆第二师范学院功能性食品协同创新中心, 重庆 400067)
(1. College of Food Science in Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

摘要:通过对青海地区采集的牦牛酸乳中乳酸菌的分离鉴定,共获得 48 株乳酸菌。以生长旺盛且可用于食品的 11 株乳酸菌为研究对象,进行人工胃液和胆盐耐受性评价。结果表明,有 6 株菌株在 pH 3.00 人工胃液中存活率>50.00%,2 株菌株在 0.30%胆盐中生长率>15%。其中鼠李糖乳杆菌 2016SWU.05.0601 为最佳抗性菌株,在人工胃液中存活率为 119.53%,在 0.30%胆盐中生长率为 41.64%。

关键词:牦牛酸乳;乳酸菌;人工胃液;胆盐

Abstract: There are abundant lactic acid bacteria resources in traditional yak yoghurt. 48 strains of lactic acid bacteria were isolated and identified from yak yoghurt collected from Qinghai region. Screening of acid-tolerant and bile-resistant salts for 11 strains of lactic acid bacteria that thrive and can be used in foods. The results showed that 6 strains had a survival rate of >50.00% in pH 3.00 artificial gastric fluid, and 2 strains had a growth efficiency of >15% in 0.30% bile salt. *Lactobacillus rhamnosus* 2016SWU.05.0601 was the best resistant strain. The survival rate in artificial gastric juice is 119.53%, and the growth efficiency in 0.30% bile salt is 41.64%.

Keywords: yak yoghurt; lactic acid bacteria; artificial gastric juice; bile salt

牦牛酸乳是青藏高原地区牧民沿用传统方法制作而成的Ⅳ型发酵乳。在自然发酵过程中,因受到海拔、奶源、制作工艺等多种因素影响,形成了复杂多样的微生物菌落区

系^[1]。丁武蓉^[2]通过高通量测序方法分析青藏高原地区牦牛酸乳中主要有乳酸杆菌属、乳球菌属、链球菌属、肠球菌属、片球菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属。杨俊俊^[3]从西藏地区 10 份牦牛奶渣中分离出干酪乳杆菌干酪亚种、鼠李糖乳杆菌、瑞士乳杆菌、植物乳杆菌、柠檬明串珠菌、肠膜明串珠菌、屎肠球菌、坚强肠球菌等不同种属的 113 株乳酸菌。

乳酸菌是益生菌的典型代表,研究^[4-7]表明乳酸菌具有调节肠道菌群平衡、预防胃肠道疾病、降低血清胆固醇以及增强机体免疫力等益生功能。乳酸菌经口摄入后,首先要克服消化道中物理化学因素的影响,当足够数量的活菌成功在大肠定植,乳酸菌才能发挥其益生作用^[8]。张和平等^[9-10]从酸马奶样品中分离得到的 50 株乳杆菌,通过耐酸性试验和人工胃肠消化液耐受性试验,筛选出 1 株干酪乳杆菌 *L.casei* Zhang,经后续研究表明该菌株能成功定植在小鼠肠道并起到调节肠道菌群作用。陈孝勇等^[11]从西藏羊八井地区牦牛酸乳中分离出的 38 株乳酸菌中筛选出 6 株在人工胃液中存活率>70%,在 0.30%胆盐中生长率>30%的乳酸菌。

目前多数对乳酸菌分离筛选的研究更加侧重于其加工和发酵性能,而对其进入人体后发挥的益生作用研究不多。万金敏等^[12]以牦牛奶渣中分离筛选出的 5 株乳酸菌为研究对象,通过对其产酸产香等性能的测定比较确定了最佳发酵组合。杨玉森等^[13]对云南地区乳饼及酸乳清中分离出的优势乳酸菌进行发酵特性试验筛选出 1 株产酸和产乙醛能力好,产 β -半乳糖苷酶量高的植物乳杆菌 SDC4-1。中国对乳酸菌的研究仍处于探索阶段,许多商品依赖于国外的菌种来生产,缺乏具有自主知识产权的益生乳酸菌,因此充分利用中国特色的乳酸菌资源,筛选优良菌种具有重要的现实意义^[14]。本试验以采集自青海地区的 11 份牦牛酸乳为研究对象,通过传统培养技术和 16S rDNA 序列分析对牦牛酸乳中乳酸菌进行鉴定,采用人工胃液和胆盐的耐受性试验筛

基金项目:重庆市社会民生科技创新专项(编号: cstc2015shmszx80021);中央高校基本业务费重点培育项目(编号: XDJK2016A01);国家重点研发计划(编号: 2018YFD0502404)

作者简介:李洋,女,西南大学在读硕士研究生。

通信作者:索化夷(1978—),男,西南大学副教授,博士。

E-mail: birget@swu.edu.cn

收稿日期:2018-02-26

选出消化道抗性强的潜在乳酸菌,旨在为后续益生菌益生功能的研究及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品来源

11份传统发酵牦牛酸乳:青海省海南藏族自治州不同牧民家中采集。

1.1.2 试剂

MRS肉汤培养基、脱脂奶粉:生化试剂,美国 BD Difco 公司;

琼脂、琼脂糖、胃蛋白酶(1:10 000)、革兰氏染色试剂盒、Gold View I 型核酸染色剂:北京索莱宝科技有限公司;

细菌基因组 DNA 试剂盒、2×Taq PCR MasterMix、6×DNA Loading Buffer、100 bp DNA Ladder:天根生化(北京)科技有限公司;

牛胆盐:源叶生物有限公司;

巯基乙酸钠:国药集团化学试剂有限公司;

API 试剂盒:法国生物梅里埃有限公司;

上游引物 27F、下游引物 1495R:生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台:SW-CJ-2F 型,苏州安泰空气技术有限公司;

恒温培养箱:GHP-9160 型,上海齐欣科学仪器有限公司;

立式压力蒸汽灭菌器:LDZM-60KCS-Ⅱ型,上海申安医疗器械厂;

生物显微镜:OLYMPUS-BX43 型,日本奥林巴斯公司;

高速低温离心机:5810 型,德国 Eppendorf 公司;

梯度 PCR 仪:S1000 Thermal Cycler 型,美国 Bio-Rad 公司;

水平电泳槽:Mini-Sub Cell GT 型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像系统:Gene Genius 型,英国 Syngene 公司;

全波长酶标仪:SYNERGYH1MG 型,美国基因公司。

1.3 试验方法

1.3.1 乳酸菌的分离纯化 分别将样品按 1%接种量接种到脱脂乳培养基中于 37℃培养,待其凝乳后进行 10 倍梯度稀释,依次稀释至 10⁻⁷。选择 4 个适宜稀释度取 100 μL 涂布在 MRS 固体平板上,37℃培养 48 h 后,选取形态各异的单菌落采用平板划线法分离菌株。重复上述步骤至得到纯的菌株后通过革兰氏染色进行形态学观察。

1.3.2 PCR 扩增 16S rDNA 序列 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯化菌株的 DNA。采用 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增,反应结束后,利用琼脂糖凝胶电泳进行检测。合格的样品送华大基因科技有限公司测序,测序结果通过 NCBI 中的 BLAST 程序进行同源性比对分析。

1.3.3 系统发育进化树的构建 使用 MEGA 5.0 中

Neighbor-Joining 法对分离所得乳酸菌进行 16S rDNA 系统发育树构建,采用 Bootstrap 法进行自展数据集为 1 000 的置信度检测。

1.3.4 菌株在 pH 3.00 人工胃液中存活率的测定 分离菌株在 37℃培养 18 h,于 3 000 r/min 离心 15 min,收集菌体,用无菌生理盐水洗涤菌体后重悬为菌悬液。将其与人工胃液(0.2% NaCl、0.35% 胃蛋白酶 1:10 000,用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 3.00)按 1:9(体积比)比例混合,37℃培养 3 h 后,采用平板涂布法测定 0、3 h 的活菌数,按式(1)计算菌株在 pH 3.00 人工胃液的存活率。

$$c=\frac{m_1}{m_2}\times 100\%,\tag{1}$$

式中:

c ——存活率,%;

m_1 ——3 h 活菌数,CFU/mL;

m_2 ——0 h 活菌数,CFU/mL。

1.3.5 菌株在 0.30%胆盐中生长率的测定 分离菌株在 37℃培养 18 h,以 2%的接种量分别接种于含 0.00%、0.30% 牛胆盐的 MRS-THIO 培养基中,37℃培养 4 h 后测定其生长率,按式(2)计算菌株在胆盐中的生长率。

$$c=\frac{A_2-A_0}{A_1-A_0}\times 100\%,\tag{2}$$

式中:

c ——生长率,%;

A_0 ——空白对照的 OD_{600 nm}值;

A_1 ——含 0.00%胆盐培养基的 OD_{600 nm}值;

A_2 ——含 0.30%胆盐培养基的 OD_{600 nm}值。

1.3.6 API 试剂盒鉴定 分离菌株在 37℃培养 18 h,于 3 000 r/min离心 15 min,收集菌体,用无菌生理盐水洗涤菌体后重悬为菌悬液。参考 API 试剂盒说明书和 Ozgun 等^[15]的报道进行操作。

1.3.7 统计分析 每个试验做 3 次平行试验,试验数据以“平均值±标准方差”表示,用 SPSS20 进行方差分析,以 P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的菌落形态和细胞形态

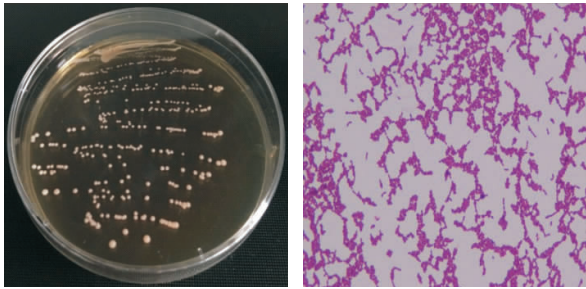
采集的 11 份传统发酵牦牛酸乳共分离出 49 株乳酸菌由图 1 可知,菌株纯化后在 MRS 培养基中形成单菌落,菌落形态几乎一致,大多数呈圆形,白色,表面光滑湿润。革兰氏染色后在显微镜下观察到紫色细胞形态,判定为革兰氏阳性菌(G⁺)。

2.2 菌株 16S rDNA 序列 PCR 扩增结果

PCR 扩增结果见图 2。各分离菌株 16S rDNA 基因扩增产物在 1 000~2 500 bp 均出现一条清晰亮带,阴性对照无条带,符合 PCR 扩增预期结果,说明 PCR 扩增产物可用于之后测序工作。

2.3 菌株 16S rDNA 序列分析和系统发育树建立

16S rDNA 同源性分析结果表明(表 1)青海地区牦牛酸



(a) 菌落形态 (b) 革兰氏染色结果

图 1 分离菌株菌落形态及革兰氏染色的结果

Figure 1 Colony morphology and gram staining results of lactic acid bacteria (1 000×)

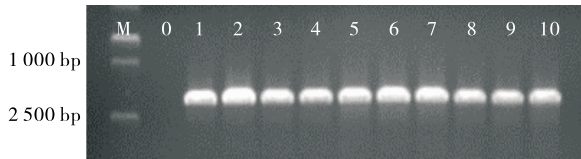


图 2 分离菌株 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of lactic acid bacteria 16S rDNA PCR products

乳中分离的乳酸菌在种属关系上具有一定的生物多样性,包括乳杆菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属和肠球菌属,具体涉及植物乳杆菌 1 株,鼠李糖乳杆菌 1 株,瑞士乳杆菌 2 株,德氏乳杆菌保加利亚亚种 37 株,短乳杆菌 2 株,柠檬明串珠菌 1 株,食蜜魏斯氏菌 2 株,融合魏斯氏菌 1 株,耐久肠球菌 1 株。由表 2 可知,在青海地区采集的牦牛酸乳中分离的大部分乳酸菌属于乳酸杆菌属,其中德氏乳杆菌保加利亚亚种占 77.08%,为优势菌群。而徐杰^[16]在青海地区牦牛酸乳中分离出的乳酸菌主要以片球菌属及明串珠菌属为优势菌,这可能与采样地区和分离培养基的不同有关。

从 GeneBank 中调取 4 株与目的基因序列同源性较高的菌株作为参比菌株,以两歧双歧杆菌模式菌株作为外群,构建可用于食品中乳酸菌菌株 16S rDNA 的系统发育树(见图 3),系统发育分析归为乳酸杆菌属,与 16S rDNA 序列分析结果一致。在德氏乳杆菌保加利亚亚种分支中 2016SWU.05.0819、2016SWU.05.0820、2016SWU.05.0885、2016SWU.05.0886、2016SWU.05.0887 5 株以自举率 84% 聚集,其他 32 株以自举率 62% 聚在一起,表明乳酸菌在同种水平内同样存在差异性。瑞士乳杆菌分支与德氏乳杆菌保加利亚亚种分支以自举率 91% 聚在一起,说明二者亲缘关系较近。

2.4 菌株对人工胃液耐受性评价

消化道是机体抵御外来物质侵扰的天然屏障,胃是人体重要消化器官,胃蛋白酶和胃液中强酸环境成为大多数微生物进入肠道的阻碍^[17]。一般情况下,进食后人胃部 pH 通常在 3.00 左右,消化时间为 1~3 h,以人工胃液 pH 3.00,作用时间 3 h 为筛选条件,根据《可用于食品的菌种名单》对初筛

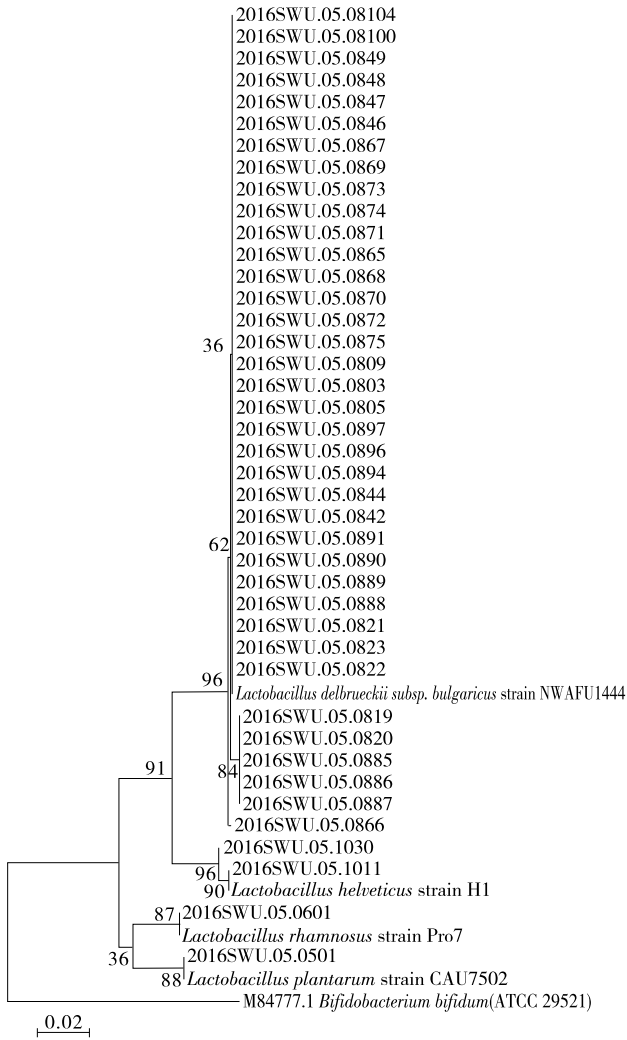


图 3 乳酸菌系统发育进化树

Figure 3 The phylogenetic tree of lactic acid bacteria

后获得的 11 株生长旺盛的乳酸菌进行人工胃液耐受性测定^[18]。

由表 3 可知,11 株乳酸菌中有 8 株乳酸菌对人工胃液有一定的耐受性,但差异明显,其中 6 株乳酸菌存活率>50.00%,尤其是鼠李糖乳杆菌 2016SWU.05.0601 和瑞士乳杆菌 2016SWU.05.1011,其存活率分别为 119.53% 和 102.30%,表明这 2 株菌在 pH 3.00 人工胃液环境中继续生长繁殖,使得其活菌数增加,出现其存活率>100% 的情况。7 株德氏乳杆菌保加利亚亚种中 2016SWU.05.0805 存活率高达 85.28%,但是有 3 株无法在 pH 3.00 人工胃液中存活,说明乳酸菌对人工胃液的耐受性存在明显的菌株差异性。

2.5 菌株对胆盐耐受性评价

菌株对小肠内胆盐耐受性是筛选乳酸菌的基本标准之一^[19]。人体中胆盐的质量浓度大约为 0.03%~0.30%^[20],选择在人工胃液存活率达到 50.00% 以上的菌株,测定其在 0.10%,0.20%,0.30% 3 种不同胆盐浓度溶液中的生长率来评价菌株对胆盐的耐受力,结果见表 4。6 株菌在胆盐中生长率随着浓度增加而降低,这可能与高胆盐浓度在细胞外产

表 1 分离菌株 16S rDNA 序列同源性分析结果

Table 1 Results of 16S rDNA sequence analysis

编号	中文名称	拉丁文名称	同源性/%
2016SWU.05.0501	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
2016SWU.05.0601	鼠李糖乳杆菌	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	100
2016SWU.05.1011	瑞士乳杆菌	<i>Lactobacillus helveticus</i>	100
2016SWU.05.1030	瑞士乳杆菌	<i>Lactobacillus helveticus</i>	100
2016SWU.05.0803	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0805	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0809	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.08100	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.08104	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0819	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0820	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0821	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0822	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0823	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0842	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0844	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0846	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0847	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0848	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0849	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0865	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0866	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0867	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0868	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0869	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0870	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0871	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0872	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0873	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0874	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0875	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0885	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0886	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0887	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0888	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0889	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0890	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0891	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0894	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	100
2016SWU.05.0896	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.0897	德氏乳杆菌保加利亚亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	99
2016SWU.05.1101	短乳杆菌	<i>Lactobacillus brevis</i>	100
2016SWU.05.1102	短乳杆菌	<i>Lactobacillus brevis</i>	99
2016SWU.07.0502	柠檬明串珠菌	<i>Leuconostoc citreum</i>	100
2016SWU.11.0101	食窦魏斯氏	<i>Weissella cibaria</i>	99
2016SWU.11.0103	食窦魏斯氏	<i>Weissella cibaria</i>	99
2016SWU.11.0301	融合魏斯氏	<i>Weissella confusa</i>	100
2016SWU.04.0116	耐久肠球菌	<i>Enterococcus durans</i>	99

生高渗透压对菌体细胞造成影响,导致菌株耐受力下降有关^[21]。瑞士乳杆菌 2016SWU.05.1011 虽然在人工胃液中存活率达到 102.30%,但是对于胆盐耐受性较差。鼠李糖乳杆菌 2016SWU.05.0601 在 0.30%胆盐中耐受能力较强达到 41.64%。同时有研究^[22]表明鼠李糖乳杆菌在发酵过程中只产生 L-乳酸,产物的单一化使得其产品安全性大大提高,婴幼儿发生不良反应几率下降。因此进一步研究鼠李糖乳杆菌 2016SWU.05.0601 的益生功能及发酵性能具有广泛的应用前景。

表 2 分离菌株种属分布

Table 2 Species distribution of isolated strains

属名	种名	数量/株	比例/%
乳杆菌属 (<i>Lactobacillus</i>)	植物乳杆菌	1	2.08
	鼠李糖乳杆菌	1	2.08
	瑞士乳杆菌	2	4.17
	德氏乳杆菌保加利亚亚种	37	77.08
明串珠菌属 (<i>Leuconostoc</i>)	短乳杆菌	2	4.17
	柠檬明串珠菌	1	2.08
魏斯氏菌属 (<i>Weissella</i>)	食蜜魏斯氏菌	2	4.17
	融合魏斯氏菌	1	2.08
肠球菌属 (<i>Enterococcus</i>)	耐久肠球菌	1	2.09
		48	100.00

表 3 乳酸菌对人工胃液耐受力评价[†]

Tabel 3 Evaluation of the tolerance of lactic acid bacteria to artificial gastric juice

菌株编号	0 h 活菌数/ (CFU · mL ⁻¹)	3 h 活菌数/ (CFU · mL ⁻¹)	存活率/%
2016SWU.05.0501	1.50×10 ⁸	7.80×10 ⁷	52.00±2.64
2016SWU.05.0601	1.83×10 ⁸	2.18×10 ⁸	119.53±1.12
2016SWU.05.0803	1.67×10 ⁸	ND	ND
2016SWU.05.0805	2.31×10 ⁷	1.97×10 ⁷	85.28±1.74
2016SWU.05.0809	1.09×10 ⁸	1.46×10 ⁷	13.40±0.31
2016SWU.05.0842	7.15×10 ⁶	3.81×10 ⁶	53.29±14.86
2016SWU.05.0849	2.81×10 ⁸	6.88×10 ⁷	24.48±0.79
2016SWU.05.0888	5.71×10 ⁶	ND	ND
2016SWU.05.08100	1.66×10 ⁸	ND	ND
2016SWU.05.1011	1.01×10 ⁸	1.03×10 ⁸	102.30±11.86
2016SWU.05.1030	5.00×10 ⁷	3.87×10 ⁷	77.85±1.22

[†] pH 3.00 的人工胃液。

2.6 最佳抗性菌株的生化特性鉴定结果

乳酸杆菌种水平的表型鉴定主要依据碳水化合物发酵试验。API50CH 试剂盒是通过菌株对 49 种不同碳水化合物的利用情况进行鉴定。由图 4 和表 5 可知,在供试的 49 种碳源中 2016SWU.05.0601 可以利用其中 25 种碳水化合物。经 API lab plus 系统最终鉴定 2016SWU.05.0601 为 *Lactobacillus rhamnosus*,其 ID 值为 99.60%,T 值为 0.76,达到鉴定要求(ID 值≥99.0%且 T 值≥0.5)。

3 结论

乳酸菌只有经过人体消化系统在肠道中达到一定数量后才能发挥其潜在的益生作用,即要求乳酸菌具有耐受人胃肠道防御机制,尤其是胃液中的低酸环境和小肠中的高胆盐环境^[23]。通过对青海地区的 11 份牦牛酸乳中乳酸菌

表 4 乳酸菌在不同浓度胆盐中的生长率

Tabel 4 The growth efficiency of lactic acid bacteria in different bile salts

菌株编号	0.10%	0.20%	0.30%
2016SWU.05.0501	27.81±0.71	13.39±0.16	5.37±0.42
2016SWU.05.0601	77.97±1.56	60.78±1.39	41.64±0.06
2016SWU.05.0805	42.15±0.53	27.86±0.80	7.60±0.20
2016SWU.05.0842	17.35±0.27	13.39±2.56	7.13±0.41
2016SWU.05.1011	23.85±1.62	14.59±0.92	3.38±0.00
2016SWU.05.1030	69.78±0.87	28.44±0.07	15.19±0.55

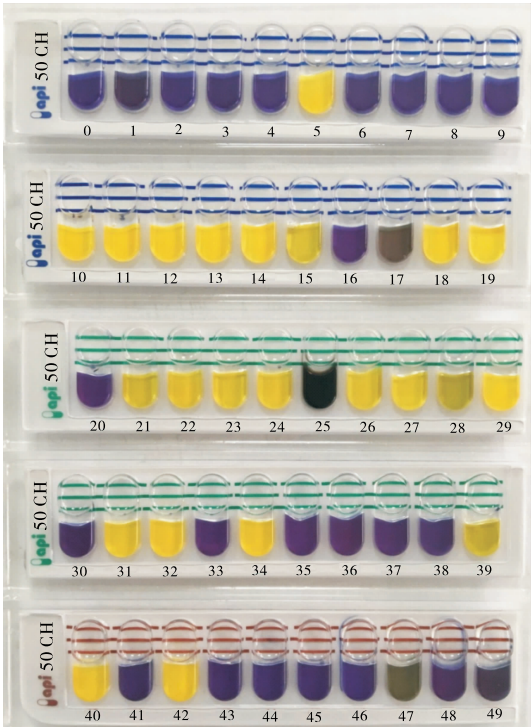


图 4 2016SWU.05.0601 的 API 50CH 反应结果

Figure 4 API 50CH fermentation results of 2016SWU.05.0601

表 5 2016SWU.05.0601 对 49 种碳水化合物发酵试验结果[†]

Table 5 The results of the fermentation experiment of 2016SWU.05.0601 on 49 medium carbohydrates

管号	碳水化合物	反应结果	管号	碳水化合物	反应结果
0	空白	—	25	七叶灵柠檬酸铁	+
1	甘油	—	26	水杨苷	+
2	赤藻糖醇	—	27	D-纤维二糖	+
3	D-阿拉伯糖	—	28	D-麦芽糖	+
4	L-阿拉伯糖	—	29	D-乳糖	+
5	D-核糖	+	30	D-蜜二糖	—
6	D-木糖	—	31	D-蔗糖	+
7	L-木糖	—	32	D-海藻糖	+
8	D-侧金盏花醇 1	—	33	菊粉	—
9	甲基-βD 吡喃木糖苷	—	34	D-松三糖	+
10	D-半乳糖	+	35	D-棉子糖	—
11	D-葡萄糖	+	36	淀粉	—
12	D-果糖	+	37	糖原	—
13	D-甘露糖	+	38	木糖醇	—
14	L-山梨糖	+	39	D-龙胆二糖	+
15	L-鼠李糖	+	40	D-土伦糖	+
16	卫茅醇	—	41	D-来苏糖	—
17	肌醇	—	42	D-塔格糖	+
18	甘露醇	+	43	D-岩藻糖	—
19	山梨醇	+	44	L-岩藻糖	—
20	甲基-αD-吡喃甘露糖苷	—	45	D-阿拉伯醇	—
21	甲基-αD-吡喃葡萄糖苷	+	46	L-阿拉伯醇	—
22	N-乙酰葡萄糖胺	+	47	葡萄糖酸钾	+
23	苦杏仁苷	+	48	2-酮基葡萄糖酸钾	—
24	ARBULIN	+	49	5-酮基葡萄糖酸钾	—

† “+”代表反应阳性;“—”代表反应阴性。

的分离纯化,共获得 48 株乳酸菌,经 16S rDNA 序列分析鉴定为 37 株德氏乳杆菌保加利亚亚种,1 株植物乳杆菌,2 株瑞士乳杆菌,1 株鼠李糖乳杆菌,2 株短乳杆菌,1 株柠檬明串珠菌,2 株食窦魏斯氏菌,1 株融合魏斯氏菌,1 株耐久肠球菌。根据《可用于食品的菌种名单》,对经过初筛后得到的 11 株生长旺盛的乳酸菌进行人工胃液和胆盐耐受性评价,筛选出 6 株耐酸菌株及 1 株耐胆盐菌株,综合比较鼠李糖乳杆菌 2016SWU.05.0601 为最佳抗性菌株,其在人工胃液存活率达到 119.53%,在 0.30%胆盐中生长率为 41.64%。

参考文献

[1] 扎木苏. 西藏地区传统牦牛奶制品中乳酸菌的多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014: 1-4.

[2] 丁武蓉. 青藏高原传统发酵牦牛奶中乳酸菌多样性及其益生功能研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2014: 26-39.

[3] 杨俊俊. 西藏牦牛奶渣中微生物的分离鉴定及优良乳酸菌的筛选[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014: 18-39.

[4] 马晨, 张和平. 益生菌、肠道菌群与人体健康[J]. 科技导报, 2017, 35(21): 14-25.

[5] GONÇALVES P, ARAÚJO J R, DI S J. A cross-talk between microbiota-derived short-chain fatty acids and the host mucosal immune system regulates intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2018, 24(3): 558-559.

[6] HORÁCKOVÁ Š, PLOCKOVÁ M, DEMNEROVÁ K. Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction [J]. Biotechnology Advances, 2017, 36(3): 682-690.

[7] WANCHAI K, PONGCHAIDECHA A, CHATSUDTHIPONG V, et al. Role of gastrointestinal microbiota on kidney injury and the obese condition [J]. American Journal of the Medical Sciences, 2017, 353(1): 59.

[8] 徐品雪, 邹积宏, 袁杰利. 一株功能性乳酸菌对胃肠道环境耐受能力的测定[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(9): 778-780.

[9] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 分离自内蒙古传统发酵马奶中 *L.casei* Zhang 潜在益生特性的研究[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(4): 4-10.

[10] 张和平, 张七斤, 任贵强, 等. 乳酸杆菌对攻毒小鼠的保护作用和对肠道菌群的影响[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 447-450.

[11] 陈孝勇, 李键, 赵欣, 等. 传统发酵牦牛酸乳中益生性乳酸菌的体外筛选[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 85-90.

[12] 万金敏, 葛武鹏, 杨丽娜, 等. 西藏牦牛奶渣优良乳酸菌筛选及混合发酵优化[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(6): 4-8.

[13] 杨玉森, 潘红梅, 殷建忠, 等. 云南撒尼地区饼饵及酸乳清中优良乳酸菌的筛选和发酵性能研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(11): 107-112.

(下转第 33 页)

76.69%；其中,亚油酸(C_{18:2})含量最高,亚麻酸(C_{18:3,n3})次之。当温度不超过 100 ℃时,烘焙处理虽然会对小球藻的色素产生一定影响,但对脂肪酸成分及乙醇提取物抗氧化能力影响不大。当温度达到 150 ℃时,小球藻乙醇提取物的抗氧化活性明显降低;温度进一步提高至 200 ℃时,多不饱和脂肪酸也受到严重破坏。烘焙处理可以有效去除小球藻的藻腥味,有助于提高小球藻在食品市场中的应用。本试验仅研究了小球藻单独烘焙时营养成分的变化,如将其添加到面包、饼干等食品中其营养成分在烘焙过程中的变化可能不同,后续将对此作进一步研究。

参考文献

[1] POSTEN C, CHEN Feng. Microalgae Biotechnology[M]. New York: Springer International Publishing, 2016: 1-35.

[2] CHA K H, LEE H J, KOO S Y, et al. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(2): 793-797.

[3] GOJKOVIC Z, GARBAY-NORES I, GOMEZ-JACINTO V, et al. Continuous production of selenomethionine-enriched *Chlorella sorokiniana* biomass in a photobioreactor[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(8): 1 235-1 241.

[4] PANASHI Y, DARVISHI B, JOWZI N, et al. *Chlorella vulgaris*: A multifunctional dietary supplement with diverse medicinal properties[J]. Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(2): 164-173.

[5] CHEN Yi-xuan, LIU Xiao-yan, XIAO Zheng, et al. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 505-509.

[6] CHAMPENOIS J, MARFAING Hélène, PIERRE R. Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe[J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 27(5): 1 845-1 851.

[7] SAFI C, ZEBIB B, MERAH O, et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2014, 35(1): 265-278.

[8] 王宝贝, 蔡舒琳, 李丽婷, 等. 小球藻在食品中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 341-346.

[9] LIN Jau-tien, LIU Shih-chun, HU Chao-chin, et al. Effects of roasting temperature and duration on fatty acid composition, phenolic composition, Maillard reaction degree and antioxidant attribute of almond (*Prunus dulcis*) kernel [J]. Food Chemistry, 2016, 190: 520-528.

[10] PUMILIA G, CICHON M J, COOPERSTONE J L, et al. Changes in chlorophylls, chlorophyll degradation products and lutein in pistachio kernels (*Pistacia vera* L.) during roasting[J]. Food Research International, 2014, 65: 193-198.

[11] TENG S-s, CHEN Bing-huei. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating[J]. Food Chemistry, 1999, 65(3): 367-373.

[12] GWAK Y, HWANG Y S, Wang B, et al. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(15): 4 317-4 334.

[13] LING Xue-ping, GUO Jin, LIU Xiao-ting, et al. Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium* sp. LU310[J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 139-147.

[14] LING Xue-ping, GUO Jing, ZHENG Chu-qiang, et al. Simple, effective protein extraction method and proteomics analysis from polyunsaturated fatty acids-producing micro-organisms[J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2015, 38(12): 2 331-2 341.

[15] WANG Bao-bei, ZHANG Zhen, HU Qiang, et al. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. PLOS One, 2014, 9(9): e106 679.

[16] 张玲. 小球藻(*Chlorella sorokiniana* C74)的培养及活性物质的研究[D]. 海口: 海南大学, 2015: 13.

[17] 马杰, 孙勃, 薛生玲, 等. 豌豆尖主要营养成分、生物活性物质及抗氧化能力分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 47-51.

[18] 曲云卿, 张同刚, 刘敦华. 不同产地枸杞中主要类胡萝卜素的聚类分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 76-79.

[19] VOLDEN J, BENGTSSON U B, WICKLUND T. Ulucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*) effects of long-term freezer storage[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 967-976.

(上接第 28 页)

[14] 刘思雨, 肖菁, 索化夷. 传统泡菜中抗性乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 26-30.

[15] OZGUN D, VURAL H C. Identification of Lactobacillus strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system[J]. Journal of Medical Genetics & Genomics, 2011, 3(3): 46-49.

[16] 徐杰. 青海部分地区自然发酵牦牛奶的化学与微生物组成分析及乳酸菌的分离鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006: 17-33.

[17] MACORI G, COTTER P D. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods[J]. Curr Opin Biotechnol, 2017, 49: 172-178.

[18] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 等. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380-383.

[19] 王玉华, 高晶, 冯印, 等. 鼠李糖乳杆菌耐酸及胆盐能力研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 449-451.

[20] 周先容, 兰凌霞, 汤艳燕, 等. 泡菜中乳酸菌的分离鉴定及体外抗性筛选[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 7-9.

[21] 崔美岩. 青藏高原不同材料来源乳酸菌极端环境耐受性及优良菌株益生性的初步研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017: 19-32.

[22] COTTER P D, HILL C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews Mmbr, 2003, 67(3): 429-435.

[23] 包秋华. 甘肃和四川省牦牛奶制品中乳酸菌的多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012: 55-59.