

开菲尔粒中一株乳酸乳球菌的分离及性能研究

国立东, 刘倩, 江柳青, 刘晓艳, 孟丹

(黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 为了筛选益生乳酸菌, 从传统发酵乳制品之发酵剂开菲尔粒中分离到一株优势菌株, 命名为 HUCM 201, 经形态学特征、16S rDNA 基因序列及生理生化特性分析, 将其鉴定为乳酸乳球菌乳亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。该菌株对酸和胆汁均表现出了一定的耐受能力, 在模拟人工胃液的环境中培养 3 h 后, 活菌数接近于 10^5 CFU/mL 水平; 而经 1% 牛胆汁作用 4 h 后, 活菌数仅出现了微弱的减少。同时, 以 Caco-2 细胞为模型模拟肠道上皮细胞检测细菌的黏附能力, 菌株 HUCM 201 对 Caco-2 细胞表现出了一定的黏附性, 黏附率为 1.93%。通过最低抑制浓度法 (MICs) 评价了其对抗生素的敏感性, 发现其对氨苄青霉素、万古霉素、红霉素、氟康唑、青霉素 5 种常见抗生素均敏感。乳酸乳球菌乳亚种 HUCM 201 可作为一株潜在的优良候选菌株进行深入研究。

关键词: 开菲尔; 乳酸乳球菌; 分离; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2014)9-121-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.021

Isolation and Properties of *Lactococcus lactis* Strain from Kefir Grains

GUO Li-dong, LIU Qian, JIANG Liu-qing, LIU Xiao-yan, MENG Dan

(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to select probiotic, *lactic acid bacteria*, a predominant strain, named HUCM 201, was isolated from Kefir grains, which is used as a starter culture for traditional fermented dairy products. This bacterial strain was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* based on its morphologic properties, 16S rDNA sequences, as well as physiological and biochemical characteristics. The strain showed a certain degree of tolerance to acid and bile. After 3 h in a simulated gastric fluid, viable counts for the strain were maintained up to 10^5 CFU/mL. HUCM 201 strain exposed to MRS broth supplemented with 1% oxgall for 4 h showed a slight decrease in cell viability. Meanwhile, Caco-2 cells, a model for intestinal epithelial cells, were used to measure bacterial adhesive ability. HUCM 201 strain exhibited adherence to Caco-2 cells with an adhesion ratio of 1.93%. The minimum inhibitory concentration was used to evaluate antibiotic susceptibility of the isolate. This strain was found to be susceptible to ampicillin, vancomycin, erythromycin, chloramphenicol, and penicillin. Thus *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain HUCM 201 is a good candidate for further investigation.

Key words: Kefir; *Lactococcus lactis*; isolation; identification

随着人们对于营养与健康的持续关注与重视, 乳酸菌发酵产品逐渐进入市场, 并深受广大消费者的青睐, 这要归于乳酸菌具有的益生功能。乳酸菌作为益生菌 (Probiotics) 的主要来源, 已展现出了诸多保健功能, 如调节肠道菌群平衡^[1]、抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、降胆固醇^[4]、降血压^[5]等。乳酸菌在自然界分布广泛, 可栖居于人和动物肠道、口腔及其他器官内, 在土壤、植物根际、人类食品、动物饲料甚至河水、污泥、临床样品中均发现有乳酸菌的存在。乳酸菌在诸多领域均有广泛应用, 如在食品工业上, 广泛用于酸奶、干酪、乳酒、泡菜、香肠等发酵食品的生产; 在农牧业,

收稿日期: 2014-04-12

基金项目: 黑龙江中医药大学校科研基金项目 (201104); 黑龙江省教育厅面上项目 (12531631)

作者简介: 国立东 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为功能性食品与食品生物技术

用于生产青贮饲料、微生态制剂等; 在医药领域, 用于阴道炎、急慢性腹泻等疾病的治疗。乳酸菌用于生产发酵食品, 在我国具有悠久的历史。开菲尔是原产自高加索地区的一种典型发酵乳制品, 开菲尔粒是其发酵剂, 为一种微生物共生体, 主要包括乳酸菌、酵母菌以及少量的醋酸菌, 其中乳酸菌为主要优势菌群, 分离菌株大多归属于乳杆菌属、明串珠菌属以及乳球菌属^[6-7]。

为了充分发掘我国乳酸菌菌种资源, 筛选为工业生产所用的性状优良乳酸菌菌株, 从开菲尔粒 (Kefir grains) 中分离到一株优势乳酸菌, 并经形态学特征、生理生化特性以及 16S rDNA 基因序列分析, 将其鉴定为乳酸乳球菌乳亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。该菌株能发酵乳糖等碳水化合物产酸, 可耐受 4% NaCl, 对酸和胆汁胁迫作用均表现出了良好的耐受性, 对肠道上皮细胞模型 Caco-2 细胞具有一定的

黏附性,且对常用抗生素敏感,安全可靠,具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 开菲尔粒来源

开菲尔粒来自黑龙江省哈尔滨市的市民家庭,用于发酵牛奶制作开菲尔发酵乳多年。

1.1.2 培养基与试剂

10%脱脂乳和改良MRS培养基的配制方法见参考文献[8]。细菌基因组提取试剂盒(DP302),购于天根生化科技(北京)有限公司;糖发酵管,购于青岛海博生物技术有限公司;牛胆粉、抗生素,均购于Amresco公司;DNA测序由华大基因完成;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器设备

显微镜,LEICA; pH计,赛多利斯;分析天平,梅特勒-托利多;PCR仪,Bioer;电泳仪,北京六一仪器厂;生化培养箱,上海跃进医疗器械厂;超净工作台,苏州净化设备有限公司;全自动高压灭菌锅,上海博讯实业有限公司等。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

将含有开菲尔粒的发酵乳样品用无菌勺取出放入无菌离心管,并置于冰盒内立刻送到实验室放入4℃冰箱短暂保存备用。

1.2.2 乳酸菌的分离与纯化

采集的开菲尔粒当日用无菌生理盐水充分冲洗,稍沥干后接种于10%脱脂乳中,25℃培养,传代3次以上活力即可恢复。活化的开菲尔粒捣碎,无菌生理盐水重悬并适当稀释^[9],涂布于含0.75% CaCO₃的改良MRS琼脂平板上,37℃孵育48 h,选取周围形成透明圈的菌落且为革兰氏阳性菌的菌株进行纯化^[9],并记录菌落及菌体细胞的形态特征,纯化菌株重悬于10%甘油中,冻存于-20℃冰箱备用。

1.2.3 乳酸菌的鉴定

将纯化的革兰氏阳性菌株进行触酶试验,凡是革兰氏染色阳性,H₂O₂酶阴性的菌株初步确定为乳酸菌。

疑似乳酸菌分离株需进行16S rRNA序列分析加以鉴定。采用细菌基因组提取试剂盒提取分离菌株基因组DNA,以其为模板,27F和1541R分别为正向和反向引物,进行PCR扩增^[8]。PCR扩增产物由华大基因进行测序。将测得的16S rRNA序列利用BLAST进行搜索,

寻找与其同源性最高的已知分类地位的菌种,并从GenBank中获取该菌属内模式菌株的16S rRNA基因序列,利用MEGA 5.1软件对所有序列进行多序列比较校正排齐,以Neighbor Joining法构建系统发生树^[10]。

为了进一步确定16S rRNA鉴定结果的可靠性,同时进行生理生化试验,包括4% NaCl、6.5% NaCl生长试验,以及分离菌株对碳水化合物发酵产酸试验。

1.2.4 酸耐受性

乳酸菌分离株发酵培养液经12000 r/min离心10 min(4℃),获得的菌泥用相同体积MRS液体培养基(pH 3.0)重悬,37℃培养3 h,采用平板菌落计数法分别于0 h、1 h、2 h、3 h检测活菌数,从而确定菌株的酸耐受能力。

1.2.5 胆汁耐受性

采用相同体积含1%牛胆汁的MRS液体培养基重悬乳酸菌发酵液离心获得的菌体细胞,37℃培养4 h,平板菌落计数法分别检测0 h、1 h、2 h、4 h的活菌数来确定菌株的胆汁耐受能力。

1.2.6 黏附试验

以人结肠癌细胞系Caco-2细胞为体外黏附模型细胞,检测乳酸菌黏附能力之前,Caco-2细胞需传代至6孔板中,待孔中长满细胞15 d,细胞处于极化状态方可进行黏附试验。乳酸菌发酵液离心获得菌体细胞,用同体积DMEM培养液重悬,接种至6孔板,CO₂培养箱37℃培养2 h,PBS冲洗3次以去除未黏附的乳酸菌。平板菌落计数法检测培养前后活菌数的变化,以确定黏附率。乳酸菌的黏附率=培养后活菌数/培养前活菌数×100%。

1.2.7 抗生素敏感性试验

分别对氨苄青霉素、万古霉素、红霉素、氯霉素、青霉素5种抗生素进行了菌株的抗生素敏感性检测,以最低抑制浓度(MICs)进行评价。分别采用无菌蒸馏水或无水乙醇溶解抗生素配制10.24 mg/mL的母液,现用现配。采用MRS液体培养基对母液分别稀释至终浓度为1024 μg/mL、512 μg/mL、256 μg/mL、128 μg/mL、64 μg/mL、32 μg/mL、16 μg/mL、8 μg/mL、4 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL。分别按1%接种量取供试菌株发酵液至各浓度抗生素试管中,37℃培养24 h后观察生长情况,通过测定A_{620nm}值进行比较分析。不加抗生素的接种管,以37℃培养的为阳性对照,-20℃冻存的为阴性对照。细菌未生长试管中所含最低抗生素浓度即为该菌株对此种抗生素的MIC值。

1.2.8 数据分析

采用统计软件SPSS 17.0进行试验数据的统计与分析,结果以均值±标准差(Mean±SD)表示。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌的分离

从开菲尔粒中分离到一株球状的疑似乳酸菌，命名为 HUCM 201，革兰氏染色为阳性，H₂O₂酶阴性，在 MRS 琼脂平板上培养 24 h 后，菌落及菌体细胞形态见图 1。



图 1 菌株 HUCM 201 的形态学特征

Fig.1 Phenotypical characteristics of the strain HUCM 201

从图 1A 可知，菌株 HUCM 201 在 MRS 琼脂上形成的菌落为圆形，边缘完整，隆起，表面光滑，有光泽，乳白色，不透明，采用接种环挑取菌落发现其质地黏稠。图 1B 显示菌株 HUCM 201 的细胞为卵圆形，以单在、成对、成链状的方式排列。

2.2 16S rRNA 基因序列分析

从测序公司获得菌株 HUCM 201 的 16S rDNA 基因序列大小为 1439 bp，BLAST 搜索后发现，该菌株与乳球菌属内种的同源性最高。利用 MEGA 5.1 软件，参照 1.2.3 方法进行多序列比较，同时以非同属的嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 以及大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) 模式菌株为外标，绘制出系统发育树 (见图 2)。

由图 2 可知，菌株 HUCM 201 同乳酸乳球菌乳亚种 (*L. lactis* subsp. *lactis*) (GenBank no. AB100803) 和乳酸乳球菌霍氏亚种 (*L. lactis* subsp. *hordniae*) (GenBank no. AB100804) 模式菌株的亲缘关系最近，

表 1 菌株 HUCM 201 的生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical properties of the strain HUCM 201

NaCl		碳水化合物									
4%	6.5%	乳糖	蔗糖	麦芽糖	纤维二糖	甘露糖	菊糖	棉籽糖	水杨苷	山梨醇	七叶苷
+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

注：“+”为表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

生理生化试验结果同时也说明了菌株 HUCM 201 的潜在工业应用价值。一方面能够发酵乳糖产酸，可用于发酵乳制品的生产；另一方面能在 4% NaCl 条件

但供试菌株与两个亚种的 16S rRNA 基因序列同源性均为 99.72%，因此无法判定分离菌株的具体亚种。由此表明，16S rRNA 基因序列在进行同源性较高的菌种鉴定时，并不能作为金标准，需要结合其他的鉴定手段，比如生理生化特性分析、特定基因 (*pheS*、*ropA*、*recA* 等) 序列比对分析及其他分子生物学检测技术等方法^[7, 11-12]，综合考虑来确定菌株的分类地位。由 16S rRNA 序列只能将菌株 HUCM 201 初步确定为乳酸乳球菌 (*L. lactis*)。同时，将其 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库，获得国际基因序列注册号为 KJ173609。

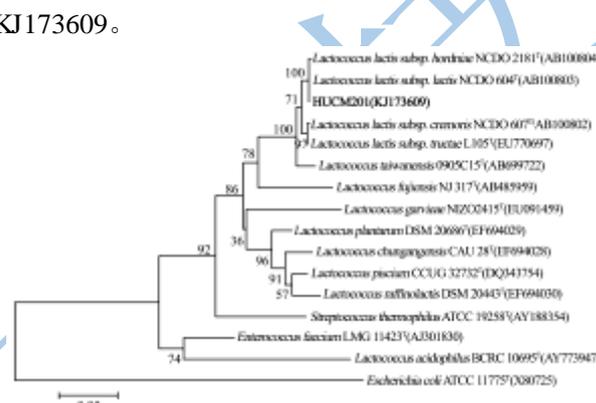


图 2 基于 16S rRNA 基因序列建立的乳球菌属系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Lactococcus* based on 16S rRNA sequences

2.3 生理生化特性分析

为了确定分离菌株的具体种属，进行了生理生化试验，具体结果见表 1。结果表明，该菌株能在 4% NaCl 中生长良好，但不能生长于含 6.5% NaCl 的 MRS 培养基中，这与乳球菌属的特征相符。同时，能发酵乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露糖、菊糖产酸，不能发酵棉籽糖、水杨苷、山梨醇产酸，不能水解七叶苷。然而，*L. lactis* subsp. *lactis* 和 *L. lactis* subsp. *hordniae* 两个亚种的主要区别在于后者不能耐受 4% NaCl，且不能利用乳糖产酸^[13]。因此，确定菌株 HUCM 201 为 *L. lactis* subsp. *lactis*。

下生长良好，可用于含盐产品的生产，比如干酪、酸性奶油等。此外，其对不同碳水化合物的发酵结果，也为深入研究其代谢通路以及作为发酵剂菌种应用提

供参考。

2.4 酸耐受结果

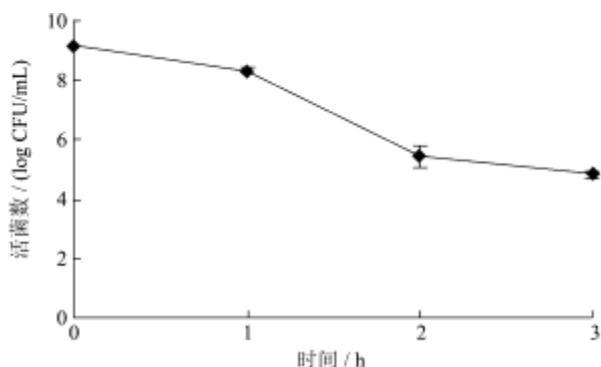


图3 pH 3.0对菌株HUCM 201存活率的影响

Fig.3 Effect of pH 3.0 on viability of the strain HUCM 201

益生菌若在体内真正发挥作用，酸胁迫是其第一道屏障。为了模拟体内胃液的酸性条件，采用HCl调至pH 3.0的MRS液体培养基检测菌株对酸的耐受能力，结果见图3。初始活菌数为1.40×10⁹ CFU/mL的供试菌株HUCM 201，在pH 3.0环境下维持1 h、2 h、3 h后活菌数分别为1.97×10⁸ CFU/mL、5.20×10⁵ CFU/mL、7.30×10⁴ CFU/mL，对酸表现出了一定的耐受能力。

2.5 胆汁耐受结果

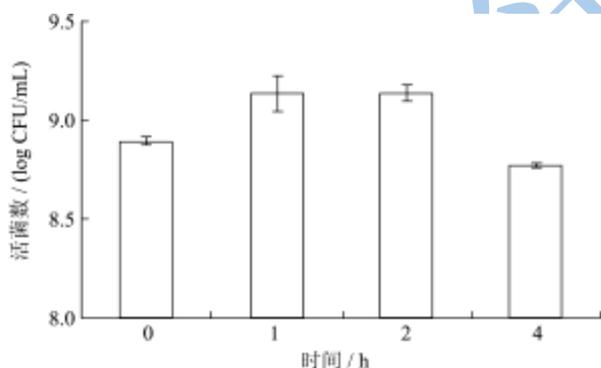


图4 1%牛胆汁对菌株HUCM 201存活率的影响

Fig.4 Effect of 1% oxgall on viability of the strain HUCM 201

胆汁胁迫是益生菌在体内发挥作用的第二道屏障。采用含1%牛胆汁的MRS液体培养基检测了供试菌株的胆汁耐受能力，结果见图4。菌株HUCM 201经含1%牛胆汁的MRS液体培养基连续处理4 h后，活菌数仍保持在10⁸ CFU/mL水平之上，而且1%牛胆汁作用1 h和2 h后，活菌数较初始菌数均有一定的提高，更进一步确定了菌株HUCM 201具有良好的胆汁耐受性。

2.6 黏附结果

益生菌在肠道内发挥作用的前提是能够在肠上皮细胞上黏附定植，供试菌株HUCM 201对Caco-2细胞的黏附性结果见表2。

表2 菌株HUCM 201对Caco-2细胞的黏附能力

Table 2 Adhesion of the strain HUCM 201 to Caco-2 cells

菌株	初始菌数 (log CFU/孔)	黏附菌数 (log CFU/孔)	黏附率 /%
HUCM 201	9.48 ± 0.04	7.94 ± 0.11	1.93 ± 0.34

菌株HUCM 201对Caco-2细胞表现出了一定的黏附能力，6孔培养板中Caco-2细胞黏附的活菌数接近10⁸ CFU/孔，菌株HUCM 201对Caco-2细胞的黏附率达1.93%，展现出了良好的黏附性能，这将有助于其潜在益生特性的发挥。

2.7 抗生素敏感性

乳酸菌具有悠久的应用与食用史，虽然属于GRAS (generally recognized as safe, 一般公认为安全) 级食品微生物，但仍存在潜在的危险性，其可能在食品或肠道环境内将抗生素抗性基因转移给致病菌。因此，用于食品生产的菌株必须首先检测其对抗生素是否存在抗性。分别选取3种抑制细胞壁合成(氨苄青霉素、青霉素和万古霉素)和2种抑制蛋白质合成(红霉素和氯霉素)的抗生素作为研究对象，通过MICs评价了菌株对抗生素的敏感性。如果MIC值高于欧洲食品安全局(EFSA)确定的MIC临界浓度，则菌株对该种抗生素表现为抗性，否则为敏感^[4]。5种抗生素对供试菌株的最低抑制浓度结果见表3。

表3 抗生素对菌株HUCM 201的MIC值结果(μg/mL)

Table 3 MIC value of the strain HUCM 201 to antibiotics

氨苄青霉素	万古霉素	红霉素	氯霉素	青霉素
<1	2	<1	8	<1

由表3可知，菌株HUCM 201对氨苄青霉素、万古霉素、青霉素和红霉素敏感，氯霉素的MIC值恰好为临界浓度，这在一定程度上说明了该菌株是较安全的，可在食品工业上应用。

3 结论

从开菲尔粒中分离到一株*L. lactis* subsp. *lactis*，并获得了其16S rRNA基因序列(Genbank no. KJ173609)。其能耐受4% NaCl的盐浓度，能发酵乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露糖、菊糖产酸，对酸和胆汁具有一定的耐受能力，同时对肠道细胞模型Caco-2细胞表现出了良好的黏附性，且对5种常用抗生素并未表现出抗性，作为益生菌应用安全可靠，具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Liu H, Zhang J, Zhang S, et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* I5007 favors intestinal development and alters the intestinal microbiota in formula-fed piglets [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(4): 860-866
- [2] Fasseas M K, Fasseas C, Mountzouris K C, et al. Effects of *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, and *Pediococcus acidilactici* on the nematode *Caenorhabditis elegans* include possible antitumor activity [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 2109-2118
- [3] Stancu C S, Sanda G M, Deleanu M, et al. Probiotics determine hypolipidemic and antioxidant effects in hyperlipidemic hamsters [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2013, 58(3): 559-568
- [4] 陈大卫,郭飞翔,顾瑞霞,等.具有降胆固醇能力的人源乳酸菌筛选[J].现代食品科技,2014,30(3):114-120
CHEN Da-wei, GUO Fei-xiang, GU Rui-xia, et al. Screening of cholesterol-reducing lactic acid bacteria from human origin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 114-120
- [5] Liu C F, Tung Y T, Wu C L, et al. Antihypertensive effects of *Lactobacillus*-fermented milk orally administered to spontaneously hypertensive rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(9): 4537-4543
- [6] Gulitz A, Stadie J, Ehrmann M A, et al. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(4): 1082-1091
- [7] Gulitz A, Stadie J, Wenning M, et al. The microbial diversity of water kefir [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 151: 284-288
- [8] 刘倩,刘爱芳,江柳青,等.开菲尔粒中一株高加索酸奶乳杆菌的分离及鉴定[J].黑龙江医药,2013,26(5):810-813
LIU Qian, LIU Ai-fang, JIANG Liu-qing, et al. Identification of a strain of *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2013, 26(5): 810-813
- [9] 国立东,王欣,杜鹏,等.传统乳制品中乳酸菌的分离及性能研究[J].食品科学,2006,27(3):60-64
GUO Li-dong, WANG Xin, DU Peng, et al. Study on characteristics of lactic acid bacteria isolated from traditional indigenous dairy products [J]. Food Science, 2006, 27(3): 60-64
- [10] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [11] Naser S M, Dawyndt P, Hoste B, et al. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses [J]. International Journal of System Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 2777-2789
- [12] Mohania D, Nagpal R, Kumar M, et al. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria [J]. Journal of Digestive Diseases, 2008, 9(4): 190-198
- [13] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册 [M].北京:科学出版社,2001
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic and determinative bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001
- [14] European Food Safety Authority. Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance [J]. EFSA Journal, 2008, 732: 1-15