

# 巴马长寿老人源乳酸杆菌的筛选及其益生特性

喻婷<sup>1</sup>, 黄国宏<sup>1,2</sup>, 梁爱红<sup>3</sup>, 朱振军<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 蔡达<sup>1</sup>, 李全阳<sup>1</sup>

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004) (2. 广西职业技术学院食品与生物技术系, 广西南宁 530226) (3. 山东省泰安市岱岳区疾控中心, 山东泰安 271000)

**摘要:** 为获得巴马长寿老人肠道乳酸杆菌并研究其益生特性, 采用改良 MRS+CaCO<sub>3</sub> 固体培养基与改良 MRS+X-gal 固体培养基从 10 位广西巴马百岁老人粪便中筛选出 19 株乳酸杆菌, 再通过生理生化实验、糖发酵实验、模拟胃肠转运实验、疏水性实验和自凝集实验, 筛选出消化道逆环境耐受性强和粘附力好的菌株 3 株 (GU-L3、GU-P132 和 GU-G23), 进一步对三菌株进行了 16S rDNA 序列鉴定, 结果发现 GU-L3 为干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*); GU-P132 为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*); GU-G23 为格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)。三个菌株经模拟胃肠液转运实验后, 存活率皆达到 10<sup>7</sup> CFU/mL 以上, 自凝集率分别为 12.43±0.03%、78.88±0.01%和 35.92±0.02%, 疏水率分别为 6.38±0.02%、81.77±0.02%和 10.58±0.05%, 粘附性也高于其他菌株。经与国内外有关报道相比, 综合认为这三株来自巴马老人肠道的乳酸杆菌益生特性明显, 具有较好的开发潜力。

**关键词:** 百岁老人; 肠道乳酸杆菌分离鉴定; 生理生化; 益生特性

文章编号: 1673-9078(2017)1-39-47

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.007

## Screening of Intestinal *Lactobacillus* from Bama Centenarians and Their Probiotic Characteristics

YU Ting<sup>1</sup>, HUANG Guo-hong<sup>1,2</sup>, LIANG Ai-hong<sup>3</sup>, ZHU Zhen-jun<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, CAI Da<sup>1</sup>, LI Quan-yang<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2. College of Food and Biotechnology, Guangxi Polytechnic, Nanning 530226, China)

(3. Daiyue District Center for Disease Prevention and Control, Tai'an 271000, China)

**Abstract:** In order to study the probiotic characteristics of *Lactobacillus* obtained from Bama centenarians, improved MRS+CaCO<sub>3</sub> and MRS+X-gal solid culture media were used to isolate and culture the *Lactobacillus* from the feces of 10 Guangxi centenarians. After culturing, 19 strains of *Lactobacillus* were selected. Three of these strains (GU-L3, GU-P132, and GU-G23) with high tolerance to adverse gastrointestinal environments and good adhesiveness were obtained through physiological and biochemical experiments, sugar fermentation experiments, simulated gastrointestinal transit experiments, and auto-aggregation and hydrophobicity screening. Sequencing of 16S rDNA revealed that GU-L3 was *Lactobacillus casei*, GU-P132 was *Lactobacillus fermentum*, and GU-G23 was *Lactobacillus gasseri*. After the simulated gastrointestinal transit experiment, the survival rates of the *L. casei*, *L. fermentum*, and *L. gasseri* were found to be above 10<sup>7</sup> cfu/mL, while the auto-aggregation rates were 12.43±0.03%, 78.88±0.01%, and 35.92±0.02%, respectively, and the hydrophobicity rates were 6.38±0.02%, 81.77±0.02%, and 10.58±0.05%, respectively. The adhesiveness of these strains was already known to be higher than that of the other strains. Compared with the reports of related domestic and international probiotic strains, the GU-L3, GU-P132, and GU-G22 intestinal *Lactobacillus* strains from Bama centenarians had better probiotic characteristics and development potential.

**Key words:** centenarians; intestinal *Lactobacillus* isolation and identification; physiological and biochemical; probiotic characteristics

巴马是世界公认的长寿之乡。2010年第六次全国

收稿日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371762); 乳业生物技术国家重点实验室开放基金项目 (SKLDB2013-07)

作者简介: 喻婷 (1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品与健康长寿

通讯作者: 李全阳 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与抗衰老机制

人口普查统计结果显示, 巴马百岁老人所占比率为 36.5位/10万人口, 对比2000年30.98位/10万人口的统计数据, 说明该县的长寿老人比例还在继续增加。现有科学知识认为长寿的原因归功于遗传因素、饮食习惯、肠道菌群结构和基因等方面<sup>[1-3]</sup>。其中, 肠道益生菌群对人体的健康具有重要影响作用。

健康人体肠道中栖息着大约1000多种共生微生物<sup>[4]</sup>, 包括对人有益的益生菌群, 最常见的益生菌包括

乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)<sup>[5]</sup>, 但是随着年龄增加, 其数量逐渐变少, 而这时还能够存在肠道的菌则应该具有更好的益生潜力, 这样长寿人群肠道内所含的双歧杆菌和乳杆菌则愈发显得珍贵了, 因此, 开展长寿老人肠道乳杆菌的筛选, 对发现及开发益生菌资源, 探索健康长寿的奥妙具有重要意义。

肠道乳杆菌属于乳酸菌, 是人体肠道内重要的生理性益生菌, 它能抑制病原菌的黏附与定植<sup>[6]</sup>, 调节肠道上皮细胞免疫反应阻止肠炎的发生<sup>[7,8]</sup>, 提高乳糖利用率以缓解乳糖不耐症, 还具有抗氧化、延缓机体衰老、降低胆固醇等作用<sup>[9,10]</sup>。Drago等<sup>[11]</sup>研究了意大利米兰百岁老人肠道乳酸菌群落结构, 发现罗伊氏乳杆菌(*L.reuteri*)、约氏乳杆菌(*L.johnsonii*)、鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus*)、清酒乳杆菌(*L.sakei*)和干酪乳杆菌(*L.casei*), 为百岁老人肠道乳酸菌种, 且罗伊氏乳杆菌(*L.reuteri*)、约氏乳杆菌(*L.johnsonii*)、鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus*)是百岁老人肠道特有乳酸菌。麦热姆妮萨·艾麦尔<sup>[12]</sup>利用微生物分离技术和分子鉴定技术对新疆和田长寿老人肠道乳酸菌进行分离鉴定并对其益生特性进行研究, 发现长寿老人的戊糖乳杆菌、植物乳杆菌等菌的耐受胃肠道恶劣环境的能力、抑菌能力和降胆固醇能力比普通老人粪便中的乳酸菌更强。李平兰<sup>[13]</sup>对广西巴马百岁以上长寿老人肠道长双歧杆菌的粘附能力、生物学特性和生理功能进行了探究。王芳等<sup>[14]</sup>研究发现唾液乳杆菌(*L.salivarius*)是广西巴马百岁老人肠道重要的益生菌, 对4-NQO基因毒性有抑制作用。由此可知, 目前人们对长寿老人肠道微生物的研究多集中于用分子生物学手段探究肠道菌落组成或者是对长寿老人肠道长双歧杆菌、唾液乳杆菌和罗伊氏乳杆菌的研究, 而对长寿老人肠道乳杆菌的筛选与益生功能探讨研究还鲜有深入探讨。

本研究以我国广西巴马瑶族自治县100岁以上长寿老人粪便为实验材料, 按形态学观察、生理生化试验和糖发酵试验分离乳杆菌, 再通过模拟胃肠转运实验、疏水性实验和自凝集实验, 筛选出消化道逆环境耐受性强和粘附力好的菌株, 进一步通过16S rDNA序列分析方法准确地对该菌株进行种属归类, 力图发现特性优良的益生菌菌株, 为我国益生菌资源及长寿食品水平的提升提供高质量的素材。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 样品来源

广西巴马瑶族自治县13名100岁以上长寿老人粪便为实验材料。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

MRS固体培养基; MRS液体培养基<sup>[15]</sup>; MRS固体培养基; 明胶培养基<sup>[16]</sup>; 硝酸盐还原培养基<sup>[17]</sup>; 碳水化合物发酵培养基<sup>[16]</sup>; 石蕊牛奶培养基<sup>[18]</sup>; 胃蛋白酶(1:10000 pepsin), sigma公司; 胰蛋白酶(1:250 Trypsin), sigma公司; BD牛胆盐; 二甲苯, 富宇; 2×Es TaqMasterMix, 康为世纪; Gold view, 北京博迈德科技发展有限公司; 1 kb marker, 100 bp marker, 北京天根生物有限责任公司等, 其他试剂均为市售分析纯。

立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 超净工作台, 苏州集团安泰公司; DH5000B II 恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 冷冻离心机, HETTICH; Shineso显微细胞分析/菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪, Biotek Instruments; 微孔板分光光度计, Biotek Instruments; 超声破碎机: HETTIH(750 W); JM A20002电子天平, 余姚纪铭称重校验设备有限公司; DELTA 320 pH计(±0.01), 梅特勒 托利多仪器有限公司; PCR仪, 美国应用生物系统中国公司; 水平电泳仪, 北京百晶生物技术有限公司; Alpha Innotech凝胶成像系统, 美国ALPHA等。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 乳杆菌的分离

新鲜粪便样品10倍梯度稀释, 得到 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 和 $10^{-8}$  3个稀释度。用经灭菌并冷却到45~50 °C的改良MRS固体培养基(0.8% CaCO<sub>3</sub>或200 μL/200 mL培养基2% X-gal) 倾倒平板, 将样品稀释液涂布于改良MRS固体培养基平板(各平行实验三次), 37 °C培养56 h<sup>[19]</sup>, 挑取有溶钙圈的或浅蓝色的单菌落, 划线转移到MRS平板上, 划线纯化3代, 为疑似乳杆菌菌株。

### 1.2.2 乳杆菌的鉴定<sup>[16-18]</sup>

#### 1.2.2.1 形态学鉴定

对分离得到的疑似菌株进行菌落形态观察、革兰氏染色和细胞形态观察, 参阅《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>乳杆菌特征部分, 初筛得到疑似乳杆菌。

#### 1.2.2.2 生理生化鉴定

对筛选的菌株分别进行过氧化氢酶实验、明胶液化实验、硝酸盐还原试验、石蕊牛奶实验、葡萄糖产酸产气实验、碳水化合物发酵产酸试验, 参阅《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>乳杆菌属部分, 对比实验结果进行鉴定。检测菌株在接种于pH 4.5、pH 7.0和pH 9.0的改良MRS液体培养

基培养的生长情况,并检测菌株在改良MRS液体培养基于温度15℃和45℃下培养的生长情况。并对初步鉴定得到已纯化的19株乳杆菌单菌落接种于液态MRS培养基培养24 h,用40%甘油于-20℃和-80℃下分别保存,备用。

### 1.2.3 模拟胃肠转运实验

模拟胃肠转运实验<sup>[22]</sup>,按参考文献略有修改,将待测菌液过夜培养液离心(4000 r/min, 20 min)收集菌体,用灭菌生理盐水洗涤2次,将菌体重悬于10 mL pH值为2.5的人工胃液(NaCl 0.002 g/mL、胃蛋白酶0.0032 g/mL,用浓度为1 mol/L的HCl调整pH值为2.5,过滤除菌备用)中。37℃、200 r/min摇床震荡培养120 min,离心(4000 r/min, 20 min)收集菌体,将菌体重悬于10 mL pH值为8.0的人工肠液(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0068 g/mL、胰蛋白酶(Trypsin) 0.01 g/mL、胆盐0.003 g/mL, pH值为8.0)中,37℃、200 r/min摇床震荡培养120 min。检测处理前后样品的活菌数目(3个平行),活菌数表达单位是CFU/mL。

### 1.2.4 自聚集能力测定

自聚集能力测定<sup>[23]</sup>,按参考文献略有修改,将待测菌液过夜培养液离心(4000 r/min, 20 min),生理盐水洗涤两次,重悬菌体到PBS缓冲液中,使活菌数为10<sup>8</sup> CFU/mL。细菌悬液(5 mL)涡旋振荡10 s,室温静置5 h,测定自聚集能力。期间每隔1 h取上清液,600 nm测定吸光值。自聚集值(%)用以下公式表示:

$$\text{自聚集值}(\%)=1-(A_t/A_0)\times 100$$

式中A<sub>t</sub>表示分别在时间t为1 h、2 h、3 h、4 h和5 h的吸光值,A<sub>0</sub>表示时间为0时的吸光值。

以上实验各平行三次。

### 1.2.5 表面疏水性检测

表面疏水性检测<sup>[14]</sup>,按参考文献略有修改,将待测菌液过夜培养液离心(4000 r/min, 20 min),生理盐水洗涤两次,重悬在0.1 mol/L KNO<sub>3</sub>(pH值为6.2)中,使其活菌数浓度10<sup>8</sup> CFU/mL,600 nm下测定样品吸光度A<sub>0</sub>。1 mL二甲苯溶剂加到3 mL菌液中,室温放置10 min,涡旋振荡两相体系2 min,室温放置20 min,取水相,测定600 nm(A<sub>1</sub>)的吸光度。细菌对溶剂的粘附百分比(%)用以下公式表示:

$$\text{粘附百分比}(\%)=1-(A_1/A_0)\times 100$$

### 1.2.6 16S rDNA序列鉴定

菌株样品的DNA提取方法参照参考文献<sup>[29]</sup>。将提取所得的DNA模板进行PCR扩增<sup>[29,30]</sup>,采用正向引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),反向引物1492R(5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3')。

PCR反应体系(25 μL): 2×Es TaqMasterMix 12.5

μL; 引物(10 μmol/L): 各引物0.5 μL; 模板: 2 μL; 超纯水补足至25 μL。

PCR反应条件为: 95℃、5 min, 94℃、30 s, 55℃、30 min, 72℃、1 min, 32个循环,最后72℃延伸10 min。取扩增产物3 μL,用1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,80 V、120 mA电泳30 min,电泳液为0.5×TBE,Marker采用1 kb DNAMarker,260 nm紫外灯下观察并拍照。

### 1.2.7 数据统计分析

数据统计分析采用Origin 8和SPSS 14.0分析软件进行处理。每组数据重复三次,结果表达式为平均值±标准方差。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳杆菌的分离

根据《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>乳杆菌特征部分,通过采用改良的MRS+CaCO<sub>3</sub>固体培养基与改良的MRS+X-gal固体培养基筛选乳杆菌,乳杆菌能分解乳糖产生乳酸,形成溶钙圈,并且多数乳酸菌在生长中能产生半乳糖苷酶使改良的MRS+X-gal培养基中X-Gal分解,释放出吡啶,从而使菌落显蓝色,依此挑选形成溶钙圈或者菌落显蓝色的菌落,进行划线分离纯化,从10位广西巴马百岁老人粪便样品中筛选出19株乳杆菌,进行后续试验。

### 2.2 乳酸菌的鉴定

#### 2.2.1 形态学鉴定

根据《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>乳杆菌属部分,我们选择了细菌鉴别所需观测的多项指标。首先,观察并记录了改良MRS固体培养基平板上菌落的边缘、颜色、大小和表面等,进行革兰氏染色并观察细胞形态,结果如下。

#### (a) 菌落观察:

GU-P编号菌株菌落为圆形、在MRS+X-gal固体培养基上显蓝色、不透明、表面光滑、边缘圆整、凸起直径<1 mm。

GU-L编号菌株菌落为圆形、乳白色、在MRS+CaCO<sub>3</sub>固体培养基上形成钙溶圈、不透明、表面光滑、边缘圆整、凸起直径<1.5 mm。

GU-G编号菌株菌落为圆形、在MRS+X-gal固体培养基上显蓝色、不透明、表面皱缩、边缘波浪、低凸直径<2 mm。

(b)然后对样品进行革兰氏染色:19株菌是杆菌,革兰氏阳性菌,或丛生、或对生。

根据《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>乳杆菌属部分菌落形态及细胞形态特征,分离的19株菌株具体观察的实验结果符合乳杆菌形态学鉴定特征,并且菌落能产生溶钙圈,在MRS+X-gal固体培养基上显蓝色,符合乳杆菌特征,为疑似乳杆菌,进入下一步生理生化实验鉴定。

对样品进行革兰氏染色后,不同乳杆菌的细胞形态见图1。

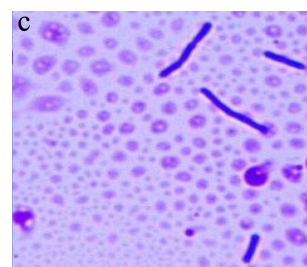


图1 不同乳杆菌的细胞形态

Fig.1 Cell morphologies of three *Lactobacillus* strains

注:图中a、b和c分别为GU-L3、GU-P132和GU-G23菌株。

### 2.2.2 生理生化鉴定

对19株乳杆菌进行生理生化鉴定的结果见表1和表2。

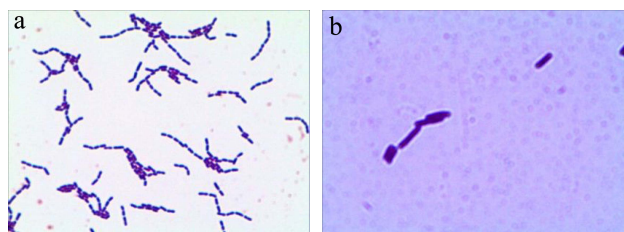


表1 19个菌株的生理生化实验鉴定结果

Table 1 Results of the physiological and biochemical tests of the 19 strains

菌号	革兰氏染色	接触酶	明胶液化	硝酸盐还原	石蕊牛奶	10 °C	45 °C	pH 4.5	pH 7.0	pH 9.0
空白	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GU-P131	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P132	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P133	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P134	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P135	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P136	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P137	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-P138	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-L3	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-L69	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-L612	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-L613	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-L614	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-L616	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-G21	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-G22	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-G23	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-G24	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
GU-G25	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示90%的菌株阳性;“-”表示90%的菌株阴性。

表2 19个菌株的糖发酵实验鉴定结果

Table 2 Results of carbohydrate fermentation tests of the 19 strains

菌号	葡萄糖产酸	葡萄糖产气	蔗糖	麦芽糖	山梨醇	半乳糖	甘露醇	葡萄糖酸钠	阿拉伯糖	乳糖
空白	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GU-P131	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-P132	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+

转下页

接上页

GU-P133	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-P134	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-P135	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-P136	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-P137	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-P138	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+
GU-L3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d
GU-L69	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d
GU-L612	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d
GU-L613	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d
GU-L614	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d
GU-L616	+	-	+	+	+	+	+	+	-	d
GU-G21	+	-	+	d	-	+	-	-	-	d
GU-G22	+	-	+	d	-	+	-	-	-	d
GU-G23	+	-	+	d	-	+	-	-	-	d
GU-G24	+	-	+	d	-	+	-	-	-	d
GU-G25	+	-	+	d	-	+	-	-	-	d

注：“+”表示90%的菌株阳性；“-”表示90%的菌株阴性；“d”表示11%~89%的菌株阳性。

由表1和表2可以看出,分离的19株乳杆菌均为革兰氏阳性,它们在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>触酶实验、明胶液化实验、硝酸盐还原实验中呈阴性,石蕊牛奶试验呈阳性,都能在15℃和45℃,pH 4.5、pH 7.0和pH 9.0条件下生长良好,对不同温度和pH值的生长环境有较好的适应性。依据上述生理生化、糖发酵实验结果,参阅《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>乳杆菌属部分糖发酵和生理生化特征,初步鉴定菌株GU-P131、GU-P132、GU-P133、GU-P134、GU-P135、GU-P136、GU-P137和GU-P138为发酵乳杆菌;菌株GU-L3、GU-L69、GU-L612、GU-L613、GU-L614和GU-L616为干酪乳杆菌;菌株GU-G21、GU-G22、GU-G23、GU-G24和GU-G25为格氏乳杆菌。

### 2.3 模拟胃肠转运耐受性实验结果

19株发酵乳杆菌在模拟胃肠液转运耐受性试验结果见表3。

表3 19个菌株对模拟消化道240 min耐受性结果

Table 3 Tolerance of the 19 strains to artificial gastrointestinal fluids for 240 min

菌号	模拟胃肠液转运 (×10 <sup>8</sup> cfu/mL)		存活率/%
	0 min	240 min	
GU-P131	15.5±1.39 <sup>c</sup>	3.30±0.85 <sup>a</sup>	21.29±3.99 <sup>b</sup>
GU-P132	9.73±1.36 <sup>b</sup>	1.06±0.37 <sup>a</sup>	10.89±2.54 <sup>ab</sup>
GU-P133	12.2±1.48 <sup>bc</sup>	0.38±0.20 <sup>a</sup>	3.11±1.47 <sup>a</sup>
GU-P134	14.8±2.45 <sup>c</sup>	2.80±0.10 <sup>a</sup>	18.92±2.85 <sup>b</sup>

GU-P135	13.3±1.25 <sup>bc</sup>	1.01±0.19 <sup>a</sup>	7.59±0.73 <sup>ab</sup>
GU-P136	9.57±1.07 <sup>b</sup>	0.46±0.13 <sup>a</sup>	4.78±0.82 <sup>a</sup>
GU-P137	13.0±1.87 <sup>bc</sup>	0.16±0.05 <sup>a</sup>	1.21±0.24 <sup>a</sup>
GU-P138	12.0±0.62 <sup>bc</sup>	1.29±0.19 <sup>a</sup>	10.75±1.02 <sup>ab</sup>
GU-L3	15.7±2.14 <sup>c</sup>	1.14±1.31 <sup>b</sup>	72.61±3.67 <sup>e</sup>
GU-L69	15.6±1.76 <sup>c</sup>	10.20±2.80 <sup>b</sup>	65.38±9.89 <sup>de</sup>
GU-L612	31.0±2.31 <sup>f</sup>	20.7±3.17 <sup>cd</sup>	66.77±6.24 <sup>e</sup>
GU-L613	24.1±1.30 <sup>de</sup>	11.7±0.99 <sup>b</sup>	48.55±3.33 <sup>c</sup>
GU-L614	21.1±1.35 <sup>d</sup>	19.5±2.12 <sup>c</sup>	92.42±5.90 <sup>f</sup>
GU-L616	26.3±1.42 <sup>e</sup>	24.4±3.20 <sup>d</sup>	92.78±7.37 <sup>f</sup>
GU-G21	2.28±0.98 <sup>a</sup>	1.15±0.20 <sup>a</sup>	50.44±7.08 <sup>cd</sup>
GU-G22	1.23±0.15 <sup>a</sup>	0.48±0.11 <sup>a</sup>	38.78±5.72 <sup>c</sup>
GU-G23	1.23±0.15 <sup>a</sup>	0.49±0.06 <sup>a</sup>	39.84±2.39 <sup>c</sup>
GU-G24	2.33±0.35 <sup>a</sup>	1.72±0.11 <sup>a</sup>	73.82±6.18 <sup>e</sup>
GU-G25	2.63±0.58 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>	12.43±2.09 <sup>ab</sup>

注:角标含有不同字母的数据之间差异显著(p<0.05)。

益生菌经口服方式进入体内,必须经受住肠胃液自然消化环境的考验,并且随后能够定植到肠道后才有机会发挥其生理功效<sup>[26]</sup>。乳酸菌发挥生理功能特性的活菌数临界值为10<sup>6</sup> CFU/mL<sup>[31]</sup>。王芳<sup>[14]</sup>等筛得巴马长寿老人肠道唾液乳杆菌,模拟胃肠转运处理后,活菌数保持在10<sup>6</sup>左右,存活率最高为1.9%。而研究巴马长寿老人源其他乳杆菌的类似报道不多,尤其是针对本研究中三种乳杆菌的相关报道更为少见。本实验结果如表3所示,初始菌数调整到10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> CFU/mL,经模拟胃肠环境中培养4h,各菌株活菌数皆达到10<sup>7</sup>

CFU/mL 以上,显示模拟消化道逆环境耐受性皆良好,认为可以作为潜在的益生菌使用。其中干酪乳杆菌最优, GU-L616 存活率最高达  $92.78 \pm 7.37\%$ 。GU-P131、GU-P132、GU-P134; GU-L3、GU-L614、GU-L616; GU-G21、GU-G23 和 GU-G24 分别为不同菌种中存活率最高的 9 株乳杆菌。这说明本研究筛选的菌株与现有报道相比经模拟胃肠逆环境处理后存活率更高,耐受性更好。

## 2.4 菌株自聚集能力的测定

菌株的自聚集是指同一种菌株间相互凝集形成多细胞簇的现象。益生菌菌株通过自凝集作用相互凝集到一定的数量时粘附才牢固,进而达到菌株发挥益生功效所需要的数量<sup>[23]</sup>。很多研究证明,微生物的自聚集能力是益生菌的一个重要特征<sup>[25,26]</sup>。9株乳杆菌自凝集试验结果见图2。

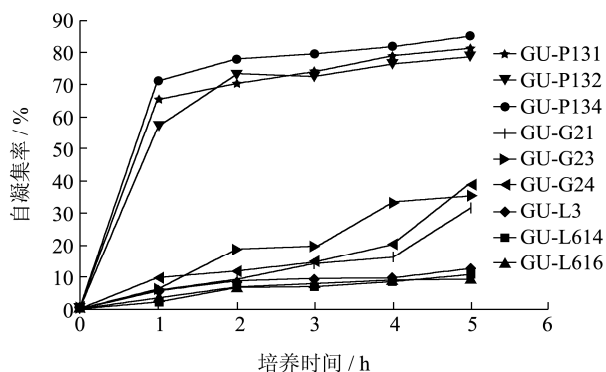


图2 乳杆菌自凝集实验

Fig.2 Auto-aggregation results for the different strains

由图 2 可知,自凝集性种间差异显著,种内差异较小。受试的 9 株发酵乳杆菌在 5 h 的实验过程中,随培养时间的延长自凝集率均呈上升趋势, GU-P 发酵乳杆菌自凝集能力最强达到 50%~80%, GU-G 格氏乳杆菌居中为 20%~40%, GU-L 干酪乳杆菌较弱在 10%左右。发酵乳杆菌在培养时间 1 h 时,自凝集率显著增高,干酪乳杆菌自凝集率显著增高的时间段在 3~5 h,格氏乳杆菌自凝集率随时间增幅较缓。Del 等研究发现菌株自凝聚能力与其粘附能力密切相关,自聚集能力太高(大于 80%)或太低(小于 10%)其菌株粘附性都不好,但在 10%~80%范围内高凝聚力的菌株一般具有较高的粘附能力<sup>[26]</sup>。Kos 等发现嗜酸乳杆菌 M92 对肠上皮细胞具有很强的粘附能力,疏水性强,同时其自凝聚率达到 71.30%<sup>[24]</sup>,表明粘附能力较高的菌株同时表现出了高疏水性、高自凝聚力等特性。本研究中,5 h 后菌体自凝集率结果见表 4, GU-P 发酵乳杆菌自凝集率达  $78.88 \pm 0.01\%$  以上,高于其他菌株,表现出较高的自凝集性。各菌株自凝集率 GU-P134

最高达  $85.44 \pm 0.01\%$ , GU-L3 为  $12.43 \pm 0.03\%$ , GU-G24 为  $39.13 \pm 0.02\%$ 。

## 2.5 疏水特性试验结果

菌体表面特性影响着菌体的存在和粘附<sup>[24]</sup>。细菌细胞表面的附着器,如 SpaA、抗原 I/II、脂磷壁酸等,均有疏水特性,宿主组织表面各种受体/接受器也具有疏水性。这些也被认为与细菌的特异性粘附相关<sup>[32,33]</sup>。9株乳杆菌疏水性试验结果见表4。

表4 乳杆菌的自凝集率和疏水率

Table 4 Ratio of auto-aggregation and hydrophobicity of the different strains

编号	自凝集率(5 h) / %	疏水率 / %
GU-P131	$81.50 \pm 0.02^d$	$87.06 \pm 0.02^c$
GU-P132	$78.88 \pm 0.01^{de}$	$81.77 \pm 0.02^c$
GU-P134	$85.44 \pm 0.01^e$	$88.08 \pm 0.01^c$
GU-L3	$12.43 \pm 0.03^a$	$6.38 \pm 0.02^{ab}$
GU-L614	$10.92 \pm 0.02^a$	$3.58 \pm 0.02^{ab}$
GU-L616	$9.21 \pm 0.01^a$	$2.62 \pm 0.03^a$
GU-G21	$31.88 \pm 0.02^b$	$6.32 \pm 0.01^{ab}$
GU-G23	$35.92 \pm 0.02^{bc}$	$10.21 \pm 0.05^b$
GU-G24	$39.13 \pm 0.02^c$	$9.14 \pm 0.02^{ab}$

注:角标含有不同字母的数据之间差异显著( $p < 0.05$ )。

表4结果显示,菌株疏水性种间差异显著,种内差异较小。GU-P发酵乳杆菌疏水率显著高于其他菌株,达 $81.77 \pm 0.02\%$ 以上,表现出高疏水性, GU-G格氏乳杆菌疏水率在10%左右,高于GU-L干酪乳杆菌。Wadstrom等对猪小肠中分离的野生型乳酸菌菌株测定了其表面疏水性与对肠上皮细胞的粘附力,结果发现,疏水性强的乳酸菌对肠上皮细胞的粘附力也较强,这一结果验证了利用疏水性来筛选高粘附菌株的可行性<sup>[27]</sup>。Kos和Gusils等人对发酵乳杆菌、嗜酸乳杆菌进行了分离并测定了其表面疏水性,发现具有较高的疏水性,分别高达75.4%和70.96%<sup>[24,28]</sup>,粘附力也较强,而本研究中GU-P发酵乳杆菌疏水率达 $81.77 \pm 0.02\%$ 以上。因此, GU-P发酵乳杆菌较高的疏水率( $>81.77 \pm 0.02\%$ ),表明其具有较高粘附性。

自凝聚能力与表面疏水性通常结合起来评价乳杆菌的粘附能力。Del和Perez等对双歧杆菌的粘附性与疏水性和凝聚力进行了研究,证实菌株的粘附力与其表面疏水性和自凝聚能力高度相关,具有较强疏水性以及自凝聚能力( $>10\%$ ,  $<80\%$ )的双歧杆菌具有更高的粘附能力,反之菌株的粘附力则较低,自聚集能力太高(大于80%)或太低(小于10%)其菌株粘附性不好<sup>[26,34]</sup>。本研究结合乳杆菌的自凝集率与疏水率,

建立了有效、方便及快捷的粘附性检测方法，筛得肠道乳杆菌种类较多，且这三种菌株类似报道较为少见，其中GU-P132、GU-L3与GU-G23分别为同种乳杆菌中粘附力较强的菌株，并且GU-P132自凝集率78.88±0.01%、疏水率81.77±0.02%，高于同菌种其他报道菌株，对应粘附性也较强。这些结果说明本研究筛选的三个菌株皆具有在肠道粘附、驻留和繁殖的良好潜力，同时也具有更好的发挥其益生特性的潜力。

### 2.6 16S rDNA序列鉴定

16S rDNA PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图3，图中显示在约1500 bp处出现荧光条带，且无明显拖尾现象，说明PCR扩增成功，能满足后续16S

rDNA 序列测定的需要。

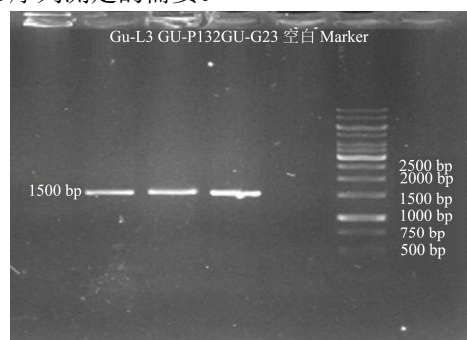


图3 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Results of the agarose gel electrophoresis

菌株16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中标准菌株的基因序列同源性比对结果见表5。

表5 疑似菌株与 GenBank 数据库中标准菌株的基因序列同源性比对结果

Table 5 Comparison of the homology of gene sequences of suspected strains and those of standard strains from GenBank

菌株	同源菌株	鉴定结果	相似度/%
GU-L3	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 strain ATCC 334	<i>Lactobacillus casei</i>	100
GU-P132	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956 strain IFO 3956	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99
GU-G23	<i>Lactobacillus gasseri</i> strain ATCC 33323	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99

由表5可知，通过测序反应，将3株菌株的16S rDNA序列与GenBank数据库中已知的乳杆菌标准菌株的16S rDNA基因序列所得到的同源性比对结果(表5)，GU-L3为 *Lactobacillus casei*，GU-P132为 *Lactobacillus fermentum*，GU-G23为 *Lactobacillus gasseri*同源百分比高于99%。16S rDNA鉴定结果与生理生化、糖发酵实验，参阅《伯杰士细菌学手册》<sup>[20]</sup>及《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》<sup>[21]</sup>鉴定结果一致。这样就对三个具有良好开发潜力的乳酸菌菌株从分子生物学的角度进行了准确的分类归属。

经查阅文献，目前人们对巴马长寿老人肠道乳杆菌的研究较少，尤其是针对本文中三种乳杆菌的筛选与益生功能探讨更少，本文立足于资源保护，发掘、收集和保存巴马长寿老人肠道乳杆菌资源，建立起快速筛选、鉴定具有较优益生功能的肠道乳杆菌体系，为保存与开发益生及长寿食品中丰富乳杆菌资源提供依据。

### 3 结论

通过体外模拟胃肠液转运、凝集和疏水特性试验，对初步筛选得到的19株乳杆菌进行益生特性检测和筛选，得到3株乳杆菌(GU-L3; GU-P132; GU-G23)。再对其进行模拟胃肠液转运实验得知，GU-L3; GU-P132; GU-G23在模拟消化道逆环境中的存活率较高，活菌数皆都达到10<sup>7</sup> CFU/mL以上，并且粘附性高于同菌属其他报道菌株。通过数据分析表明，乳杆菌

耐消化道逆环境、凝集和疏水特性种间差异显著，种内差异较小，但具有特异性。通过生理生化、糖发酵和16S rDNA测序分析对其进行种属归类鉴定，发现GU-L3为干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)；GU-P132为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)；GU-G23为格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)，综合各项检测结果总体认为上述三个菌株益生特性优良。

### 参考文献

[1] 蒋世承.世界长寿之乡-广西巴马瑶族自治县[J].中老年保健,2013,7:58-59  
JIANG Shi-cheng. The longevity township of the world-bama yao nationality autonomous county in Guangxi [J]. Elderly Health, 2013, 7: 58-59

[2] 秦俊法.中国的百岁老人研究III.百岁老人聚居区-中国长寿之乡的成因和评定[J].广东微量元素科学,2007,14(11): 23-37  
QIN Jun-fa. China's centenarian study III. colony of centenarians-the cause and assess of China's longevity township [J]. Guangdong Trace Elements Science, 2007, 14(11): 23-37

[3] 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,2012,7:227-210  
Maramnisa Amar, Duolikun Mai-Maitiyusupu, Abudukeyoumu Mai-Maiti, et al. Isolation and identification

- of gut lactic acid bacteria from hetian uygur longevity [J]. Science and Technology Innovation Herald, 2012, 7: 227-210
- [4] Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, et al. The active human gut microbiota differs from the total microbiota [J]. Public Library of Science One, 2011, 6(7): 1-10
- [5] 高侃,汪海峰,章文明,等.益生菌调节肠道上皮屏障功能及作用机制[J].动物营养学报,2013,25(9):1936-1945  
GAO Kan, WANG Hai-feng, ZHANG Wen-ming, et al. Probiotics regulating intestinal epithelial barrier function and action mechanism [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2013, 25(9): 1936-1945
- [6] 陈德龙,许光勇,朱宏亮,等.乳杆菌竞争性抑制两种病原菌粘附上皮细胞的研究[J].中国农业科学,2012,45(14):2991-2998  
CHEN De-long, XU Guang-yong, ZHU Hong-liang, et al. Study of the *Lactobacillus* competitive inhibition of two kinds of pathogenic bacteria adhesion to jejunum epithelial cells [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(14): 2991-2998
- [7] Mazmanian S K, Round J L, Kasper D L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease [J]. Nature, 2008, 453(195): 620-625
- [8] 高权新,吴天星,王进波.肠道微生物与宿主的共生关系研究进展[J].动物营养学报,2010,22(3):519-526  
GAO Quan-xin, WU Tian-Xing, WANG Jin-bo. Advance in research on symbiotic relationship between gut microbiota and host [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2010, 22(3): 519-526
- [9] Mikelsaar M, Zilmer M. *Lactobacillus fermentum* ME-3-an antimicrobial and antioxidative probiotic [J]. Microbial Ecology Health Disease, 2009, 21(1): 1-27
- [10] Nguyen T D T, Kang J H, Lee M S. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH 4, a potential probiotic bacterium with cholesterol lowering effects [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 358-361
- [11] Drago L, Toscano M, Rodighiero V, et al. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects [J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2012, 46(9): S81-S84
- [12] 麦热姆妮萨 艾麦尔.长寿老人肠道益生菌(probiotics)的分离鉴定及长寿机理的研究[D].新疆:新疆大学,2012  
MARAMNISA Amar. Identification and research the longevity mechanism of intestinal probiotics from the longevity people gut [D]. Xingjiang: Xinjiang University, 2012
- [13] 李平兰.长寿老人源双歧杆菌优良菌株的筛选及生理功能研究[D].北京:中国农业大学,2004  
LI Ping-lan. Screening and physiological function of bifidobacteria from macrobian [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004
- [14] 王芳,刘爱萍,任发政,等.利用SOS显色反应评价长寿老人源乳酸菌对4-NQO基因毒性的抑制作用[J].食品科学,2007,28(10):425-429  
WANG Fang, LIU Ai-ping, REN Fa-zheng, et al. Lactic acid bacteria isolated from elderly people inhibit genotoxic effect of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-chromotest [J]. Food Science, 2007, 28(10): 425-429
- [15] 宁豫昌,郭宏伟.鸡源乳杆菌的分离鉴定与培养条件优化[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2010,30(1):12-13  
NING Yu-chang, GUO Hong-wei. Isolation, identification of *Lactobacillus* from chicken and optimization of the culture conditions [J]. Journal of Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, 2010, 30(1): 12-13
- [16] 沈萍,陈向东.微生物学实验(第四版)[M].北京:高等教育出版社,2007  
SHEN Ping, CHEN Xiang-dong. Experiment of microbiology (the fourth edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007
- [17] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,2000  
QIAN Cun-rou, HUANG Yi-xiu. microbiology experiment course [M]. Beijing: Peking University Press, 2000
- [18] 李妍.益生菌的筛选及功能特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2002  
LI Yan. Study on the determination of *Probiotic bacteria* and its functional properties [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2002
- [19] Argyri A A, Zoumpopoulou G, Karatzas K A, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests [J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 282-283
- [20] R E布坎南, N E吉本斯.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984  
Buehanan R E, Gibbons N E. Bergey' manual of determinative baeteriology (eihgth edition) [M]. Beijing: Science Press, 1984
- [21] 凌代文.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  
LING Dai-wen. The taxonomic identification and experimental method of lactic acid bacteria [M]. Beijing:



- China Light Industry Press, 1999
- [22] Fernánde z M F, Bori s, Barbe's C. Probiotic properties of human *lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract [J]. Appl. Micro., 2003, 94(3): 449-455
- [23] Del Re B, Busetto A, Vigola G, et al. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain [J]. Lett. Appl. Micro., 1998, 27(5): 307-310
- [24] Kos B, Suskovic J, Vukovic S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 981-987
- [25] Castagliuolo I, Galeazzi F, Ferrari S, et al. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice [J]. Fems Immunology and Medical Microbiology, 2005, 43(2): 197-204
- [26] Del B Re, Sgorbati B, Mignolioli M, et al. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum* [J]. Lett. Appl. Micro., 2000, 31(6): 438-442
- [27] Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, et al. Surface properties of *Lactobacilli* isolated from the small intestine of pigs [J]. Applied Microbiology, 1987, 62(6): 513-520
- [28] Gusils C, Cuozzo S, Sesma F, et al. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(1): 34-42
- [29] 往天虹. 分子生物学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 2009
- WANG Tian-hong. Experiment of molecular biology [M]. Beijing: Peking University Press, 2009
- [30] 张洁, 徐桂花, 尤丽琴. 16S rDNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J]. 农产品加工, 2009, 4(4): 11-15
- ZHANG Jie, XU Gui-hua, YOU Li-qin. Identification of lactic acid bacteria by 16S rDNA sequencing [J]. Innovational Edition of Farm Products Processing, 2009, 4(4): 11-15
- [31] Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan [J]. Food Technology, 1993, 47: 126-135
- [32] 文梅, 许丽, 王秋菊, 等. 乳酸菌对动物肠道的粘附作用研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(12): 120-124
- WEN Mei, XU Li, WANG Qiu-ju, et al. Progress in adhesion of lactic acid bacteria to animal intestines [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(12): 120-124
- [33] 彭珍, 魏华, 程波, 等. 益生菌和致病菌对肠道的粘附及其相互作用研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(10): 944-948
- PENG Zhen, WEI Hua, CHENG Bo, et al. Progress on the study of adherence of probiotics and pathogens as well as their mutual interaction in intestinal tract [J]. Chinese Journal of Microecology, 2009, 21(10): 944-948
- [34] Perez P F, Minnaard Y, Disalvo E A, et al. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 21-26

(上接第 73 页)

- [22] 汪志慧, 孙智达, 谢笔钧. 莲房原花青素的稳定性及热降解动力学研究[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 77-82
- WANG Zhi-hui, SUN Zhi-da, XIE Bi-jun. Optimization of the double-enzymatic extraction of procyanidins from lotus seed pods using response surface methodology [J]. Food Science, 2011, 32(7): 77-82
- [23] 高羽, 董志. 原花青素的药理学研究现状[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 651-655
- GAO Yu, DONG Zhi. Progress on study of pharmacological effects of procyanidins [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(6): 651-655
- [24] Damodaran S, Kinsella J E. Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982, 30(5): 812-817
- [25] Liu G, Zhong Q. Glycation of whey protein to provide steric hindrance against thermal aggregation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(38): 9754-9762
- [26] Liu G, Zhong Q. Thermal aggregation properties of whey protein glycated with various saccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 87-96