

# 潜在益生作用乳酸菌的筛选鉴定及其生物学特性

何宇星<sup>1</sup>, 其其日力格<sup>1</sup>, 刘玮<sup>1</sup>, 段晓霞<sup>2</sup>, 邱崇顺<sup>3</sup>, 乌云达来<sup>1\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018) (2. 蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 011599) (3. 联邦制药有限公司, 内蒙古巴彦淖尔 015000)

**摘要:** 该研究对酸马奶中分离的 197 株乳酸菌进行潜在益生作用菌株的筛选鉴定及生物学特性研究。通过耐酸性试验和耐胆盐能力试验初步筛选出 10 株耐受能力较好的菌株, 经过模拟人工胃液处理 3 h 后 10 株菌的存活率在 46.48%~95.86% 之间, 选取存活率大于 80% 的 3 株菌进行模拟人工肠液试验 (处理 4 h 和 8 h 后), 活菌数均保持在  $1.65 \times 10^9 \sim 1.81 \times 10^{10}$  CFU/mL 之间, 并且 3 株菌均有一定的疏水能力。其中, 菌株 2-33 在模拟人工胃液中存活率达 95.86%、模拟人工肠液中存活率达 80.80%、细胞表面疏水性为 42.61%, 因此将菌株 2-33 确定为目的菌株。从抗生素药敏试验可知, 菌株 2-33 对诺氟沙星、头孢拉定、庆大霉素、万古霉素以及链霉素有耐药性, 不敏感; 对克林霉素中度敏感; 对四环素、氯霉素、红霉素、氨苄西林敏感。最后, 经分子生物学确定菌株 2-33 的 16S rDNA 基因序列长度为 1432 bp, 在 NCBI 中基因登录号为 MN611708, 与 *L. plantarum* JCM1149 同源性达 100%, 并且菌株 2-33 的糖类发酵试验结果与 GB 4789.35-2016 一致, 所以将菌株 2-33 鉴定为植物乳杆菌。该研究结果对今后益生菌的深入研究和功能性食品的开发提供材料。

**关键词:** 乳酸菌; 益生作用; 筛选; 鉴定; 生物学特性

文章编号: 1673-9078(2021)11-50-57

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0140

## Screening, Identification, and Biological Characteristics of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria

HE Yuxing<sup>1</sup>, Qiqirilige<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, DUAN Xiaoxia<sup>2</sup>, QIU Chongshun<sup>3</sup>, Wuyundalai<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China) (2. Mengniu Dairy (Group) Co. Ltd., Hohhot 011599, China) (3. United Pharmaceutical Limited Company, Bayannur 015000, China)

**Abstract:** 197 strains of lactic acid bacteria isolated from sour horse milk were screened and identified, and their biological characteristics were studied. In acid tolerance assays and bile salt tolerance assays, ten strains with relatively high tolerance were preliminarily selected. The survival rates of the ten strains after three hours of treatment with artificial gastric juice were between 46.48% and 95.86%. Among them, three strains with survival rates higher than 80% were selected and subjected to artificial intestinal fluid treatment for four and eight hours. After that, the numbers of live bacteria were determined:  $1.65 \times 10^9$  to  $1.81 \times 10^{10}$  colony-forming units per milliliter. Furthermore, the three strains all exhibited certain hydrophobicity. Among them, the survival rates of strain 2-33 in artificial gastric juice and artificial intestinal fluid reached 95.86% and 80.80%, respectively, with cell surface hydrophobicity of 42.61%. Thus, strain 2-33 was identified as the target strain (a potential probiotic). An antibiotic sensitivity assay showed that strain 2-33 is resistant to norfloxacin, cefradine, gentamicin, vancomycin, and streptomycin; moderately sensitive to clindamycin; and sensitive to tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and ampicillin. Finally, the 16S ribosomal DNA gene sequence of strain 2-33 was determined by a molecular biological method; this gene's length was found to be 1432 bp. The accession number in NCBI is MN611708. Strain 2-33 showed 100% homology with

引文格式:

何宇星, 其其日力格, 刘玮, 等. 潜在益生作用乳酸菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(11): 50-57, +67

HE Yuxing, Qiqirilige, LIU Wei, et al. Screening, identification, and biological characteristics of potentially probiotic lactic acid bacteria [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 50-57, +67

收稿日期: 2021-02-06

基金项目: 内蒙古自治区科技计划重大专项项目 (2020CG0012); 政府间国际科技创新合作重点专项 (2017YFE0108700); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY19054)

作者简介: 何宇星 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1784051899@qq.com

通讯作者: 乌云达来 (1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物及其生物技术, E-mail: wydl@imau.edu.cn

*Lactobacillus plantarum* JCM1149, and sugar fermentation assay results on this strain are consistent with those of GB 4789.35-2016; therefore, the strain was identified as *L. plantarum*. The results of this study provide data for further research on probiotics and the development of functional foods in the future.

**Key words:** lactic acid bacteria; probiotics; screening, identification; biological characteristics

“益生菌”是一类通过合理、足量的摄入后,对宿主产生有益作用的活性微生物<sup>[1,2]</sup>。其能改善机体肠道微生物菌群的平衡<sup>[3]</sup>、增强机体免疫力<sup>[4]</sup>、发挥抗氧化作用<sup>[5]</sup>、降低胆固醇水平<sup>[6]</sup>、缓解乳糖不耐症<sup>[7]</sup>等益生作用。而发挥益生作用的主要场所是肠道,例如与有害微生物竞争营养物质从而抑制其生长<sup>[8]</sup>,通过调节消化道微生态平衡,防止或减少机会致病菌的黏附,降低炎症反应、释放免疫因子等提高机体免疫力等<sup>[9,10]</sup>。但是只有耐酸、耐胆盐、通过胃肠道后能存活的益生菌,才能发挥在机体中的益生作用,因为强酸性的胃液环境,会杀死或抑制其活性<sup>[11]</sup>。为保证菌株的活性,须具有很强的耐酸能力,进而顺利抵达人体肠道,黏附并定殖在肠道内且发挥益生作用<sup>[12]</sup>。

酸马奶是益生菌来源的宝库,开发利用这种特定生态环境中的益生菌,具有重要的意义。因为其富含有益微生物、维生素和多种功能活性物质,蒙古族传统医学在此基础上创立了“酸马奶疗法”<sup>[13]</sup>,其营养物质含量及比例适宜人体消化吸收,因其具有辅助治疗冠状动脉硬化、贫血,提高免疫力,降血压、血脂等功效,享有很高的知名度和市场占有率<sup>[14]</sup>。而且酸马奶在世界各地已有很久的食用历史,经过长期的自然选择作用,优质的乳酸菌菌种逐渐流传下来,是获得优质乳酸菌的良好来源<sup>[15,16]</sup>。因此,分离酸马奶中的益生菌,具有重要的意义和前景。

本文对蒙古国牧区酸马奶样品中分离的乳酸菌通过耐酸、耐胆盐、耐模拟人工胃肠液、抗生素药敏试验以及细胞表面疏水性等试验进行潜在益生菌的筛选研究,最终选定一株优势菌株进行菌种鉴定,该研究结果为开发优良的潜在益生菌菌株提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与主要试剂

197株供试乳酸菌菌株均分离于蒙古国酸马奶样品<sup>[17]</sup>;HBI乳酸菌生化鉴定条,青岛海博生物技术有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;抗菌药物药敏纸片,常德比克曼生物科技有限公司。

### 1.2 试验菌株的准备

#### 1.2.1 活化菌株

将-80℃甘油保藏的菌株按2%(V/V)的接种量接种到MRS液体培养基,37℃培养16~18h,连续活化3代后用于后续试验。

#### 1.2.2 供试菌液的制备

第三代活化的菌株离心后(5000 r/min, 8 min),用灭菌PBS缓冲溶液清洗3次,调至菌悬液浓度为 $1.0 \times 10^9$  CFU/mL,备用。

### 1.3 活菌数的测定

参照GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》<sup>[18]</sup>的方法,取1.0 mL供试菌液与9.0 mL的0.9%的生理盐水混匀,依次梯度稀释至 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ ,取稀释液1.0 mL,用 $46 \pm 1$ ℃的MRS琼脂培养基,倾注法测定乳酸菌活菌数,每个稀释梯度做2个平皿。

### 1.4 潜在益生作用乳酸菌的筛选

#### 1.4.1 耐酸性试验<sup>[19]</sup>

将197株乳酸菌按照1.2.2中方法制备供试菌液,分别接种于pH值为2.0、2.5、3.0的MRS液体培养基中,37℃恒温培养16~18h,以未接种的MRS液体培养基为空白对照,测量OD<sub>595 nm</sub>值,挑选耐酸性较好的菌株进行后续试验。

#### 1.4.2 耐胆盐能力试验<sup>[20]</sup>

在1.4.1中筛选耐pH 2.0的乳酸菌,按照1.2.2的方法制备供试菌液,将菌液按2%(V/V)的接种量接入到胆盐添加浓度为0.3%(m/V)的MRS液体培养基中37℃培养16~18h,测定其在OD<sub>630 nm</sub>值,同时划线培养于胆盐浓度为0.3%(m/V)的MRS固体培养基,37℃培养16~18h,并观察菌落生长情况。

#### 1.4.3 耐模拟人工胃液试验

将耐酸性和耐胆盐能力良好的菌株连续培养三代,按照文献<sup>[21]</sup>的方法微调整,将菌液离心(3000 r/min、10 min)后收集菌泥,用灭菌生理盐水离心洗涤2次,将5.0 mL生理盐水加入到菌泥中,混匀制成菌悬液,各取1.0 mL菌悬液分别接种于9.0 mL经0.22 μm滤菌膜处理后pH 2.0的模拟人工胃液试管中,充分混匀后37℃下厌氧培养。在实验开始0 h和3 h后分别取样,测定其活菌数(CFU/mL)。选择大于80%

的菌株进行后续试验。

#### 1.4.4 耐模拟人工肠液试验

根据文献<sup>[22]</sup>中的方法微调整,将模拟人工胃液试验中处理 3 h 后的菌液,接种于经过滤除菌的模拟人工肠液 (pH 8.0) 中,37 °C 下培养,并分别于 0 h、4 h、8 h 时测定其活菌数 (CFU/mL)。

人工肠液:将下述 a 液和 b 液以 2:1 比例混合。

a、胰液:NaHCO<sub>3</sub> 1.1%、NaCl 0.2%、胰蛋白酶 0.1%,调整 pH 值为 8.0 后,过滤除菌备用。

b、胆汁:牛胆盐 1.2%,调整 pH 值为 8.0 后,过滤除菌备用。

### 1.5 潜在益生菌的益生特性研究

#### 1.5.1 细胞表面疏水性的测定<sup>[23]</sup>

将 1.4.4 中筛选的潜在益生作用菌株活化 2 代后,接种于无菌 MRS 培养基中 37 °C 培养 16~18 h,离心 (9500 r/min, 4 °C, 10 min) 收集菌体,用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液离心洗涤 2 次,将沉淀用缓冲液悬浮。以缓冲液为空白对照,调整菌体浓度,使其初始浓度在 600 nm 波长处吸光度约为 1.0。取 4.0 mL 调整浊度后的菌液,加入 0.8 mL 二甲苯,高速涡旋 2 min,静置 10 min 分层,取下层水相在 600 nm 波长处测其吸光度。按如下公式计算乳酸菌细胞表面疏水性:

$$\text{疏水性}\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

式中:

A<sub>0</sub>、A——与二甲苯混匀前、后菌液在 600 nm 处的吸光度。

#### 1.5.2 抗生素药敏试验

表 1 抗生素的种类、药敏纸片含药量及抑菌圈直径判断标准

Table 1 Types of antibiotics, drug content of drug sensitive discs and criteria for determining the diameter of inhibition zone

抗生素种类	药物质量/μg	抑菌圈直径判断标准/mm		
		R	I	S
诺氟沙星	10	≤12	13~16	≥17
头孢拉定	30	≤14	15~17	≥18
庆大霉素	10	≤12	13~14	≥15
万古霉素	30	-	-	≥15
链霉素	10	≤11	12~14	≥15
克林霉素	2	≤14	15~19	≥20
四环素	30	≤11	12~14	≥15
氯霉素	30	≤12	13~17	≥18
红霉素	15	≤13	14~22	≥23
氨苄西林	10	≤13	14~16	≥17

注: R: 低敏; I: 中敏; S: 高敏; “-”: 无抑菌圈; 药敏片直径 6 mm。

采用 K-B 纸片琼脂扩散法<sup>[24]</sup>,取 200 μL 潜在益生菌菌液在 MRS 固体培养基中进行涂布,待平板表面稍干,将抗生素纸片均匀间隔放置于表面上,共 10 种抗生素 (氨苄西林、头孢拉定、红霉素、四环素、庆大霉素、万古霉素、链霉素、氯霉素、诺氟沙星、克林霉素),置于 37 °C 恒温培养 24 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径 (mm)。

### 1.6 潜在益生菌的菌种鉴定

#### 1.6.1 菌落形态观察

将活化三代的潜在益生菌划线接种于 MRS 固体培养基上,37 °C 恒温培养 48 h,挑取单个菌落进行革兰氏染色观察菌株和菌落形态<sup>[25]</sup>。

#### 1.6.2 糖类发酵试验

根据 HBI 乳酸菌生化鉴定条的使用说明书,将潜在益生菌进行生理生化鉴定。37 °C 培养 24~48 h,培养结束后观察并做记录。

#### 1.6.3 分子生物学鉴定

将潜在益生菌接种于 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 12 h 后,8000 r/min 离心 1 min 收集菌泥,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取乳酸菌基因组 DNA。提取的基因组 DNA 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

16S rDNA 基因的 PCR 扩增<sup>[26]</sup>:提取的乳酸菌基因组 DNA 做模板,选择 16S rDNA 基因通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增。扩增条件:95 °C,5 min→95 °C,30 s→55 °C,30 s→72 °C,90 s,34 个循环;72 °C,5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析并送至上海生工生物工程有限公司进行测序,将测序结果在 GenBank 数据库进行 Blast 分析,并用 MEGA 7.0 绘制系统发育树。

### 1.7 数据处理

每组试验重复三次,用 SPSS 23.0 对试验数据进行统计分析处理,所有数值用平均值±标准误差表示,用 Excel 及 Origin 8.5 进行做图。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐酸性试验

将 197 株乳酸菌分别接种于 pH 值为 2.0、2.5、3.0 的 MRS 液体培养基中,37 °C 恒温培养 16~18 h,筛选出 10 株存活较好的菌株,试验结果见表 2。

人体胃液中胃酸的主要成分为盐酸,其 pH 值通常为 3.0 左右,在空腹情况下 pH 值可达 1.5,只有少数具有良好耐酸能力的乳酸菌以活菌形式通过胃酸屏障并到达胃肠道发挥作用,而食物在胃中停留时间低于 3 h,液体则更短<sup>[27]</sup>。虽然在 pH 值为 3.0 的条件下,菌株在胃液环境中可保持活性,但是本试验为筛选出性能更加优异的菌株,因此选定耐 pH 值为 2.0 并保持很高活性的 10 株优势乳酸菌,进行后续的试验。

表 2 10 株乳酸菌在不同 pH 环境中生长情况

Table 2 Growth of 10 strains of lactic acid bacteria in different

菌株代号	pH environments		
	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0
49	++	++	+++
2-2	++	+++	++++
2-7	++	+++	++++
2-8	++	+++	+++
2-13	++	+++	++++
2-18	++	+++	++++
2-20	++	+++	++++
2-21	++	+++	++++
2-32	+	++	++++
2-33	++	++	+++

注:“+”代表  $OD_{595\text{nm}} < 0.05$ ;“++”代表  $0.05 \leq OD_{595\text{nm}} < 0.10$ ;“+++”代表  $0.10 \leq OD_{595\text{nm}} < 0.20$ ;“++++”代表  $OD_{595\text{nm}} \geq 0.20$ 。

## 2.2 耐胆盐能力试验

将 10 株耐酸性较好的乳酸菌,接种于胆盐添加浓度为 0.3% (m/V) 的 MRS 液体培养基,37 °C 培养 16~18 h 后测定其在  $OD_{630\text{nm}}$  值,同时划线于胆盐浓度为 0.3% (m/V) 的 MRS 固体培养基上,试验结果见表 3。

表 3 乳酸菌在 0.3% 胆盐环境中生存情况

Table 3 Survival of lactic acid bacteria in 0.3% bile salt

菌株代号	environment	
	$OD_{630\text{nm}}$ 值	MRS 固体培养基
49	0.20±0.08	+
2-2	0.31±0.09	+
2-7	0.15±0.07	+
2-8	0.20±0.05	+
2-13	0.24±0.08	+
2-18	0.54±0.05	+
2-20	0.12±0.04	+
2-21	0.33±0.04	+
2-32	0.40±0.03	+
2-33	0.51±0.04	+

注:“+”表示 MRS 固体培养基上可生长。

$OD_{630\text{nm}}$  值大于 0.5,说明菌株在添加 0.3% 的胆盐环境中长势良好,具有很好的胆盐耐受性<sup>[28]</sup>。由表中数据可知,10 株菌均有不同的耐胆盐能力,其中菌株 49、菌株 2-7、菌株 2-8、菌株 2-20 耐受能力较低,菌株 2-2、菌株 2-13、菌株 2-21 和菌株 2-32 耐受能力较好,菌株 2-18 和 2-33 耐受能力最好。而正常人体肠道中胆盐质量分数在 0.03%~0.3% 之间波动<sup>[29]</sup>,这与熊荣园<sup>[30]</sup>筛选的一株降解铅的乳酸菌对胆盐耐受能力结果相似。发挥益生作用的乳酸菌,不仅需要具有良好的耐酸性能、耐胆盐能力,还需具备通过胃液这样强酸性的生物屏障,这样才能顺利到达小肠而发挥益生作用,因此对筛选出的 10 株乳酸菌进行模拟人工胃液试验。

## 2.3 耐模拟人工胃液试验

将 2.2 中筛选的 10 株乳酸菌接种于 pH 值 2.0 的模拟人工胃液中,于 0 h 和 3 h 进行活菌计数 (CFU/mL),结果见表 4。

表 4 乳酸菌耐模拟人工胃液耐受性

Table 4 Lactic acid bacteria tolerance simulated artificial gastric juice tolerance

菌株代号	0 h/(CFU/mL)	3 h/(CFU/mL)	存活率/%
49	$(2.81 \pm 0.15) \times 10^9$	$(1.39 \pm 0.13) \times 10^9$	49.46
2-2	$(3.19 \pm 0.13) \times 10^9$	$(1.67 \pm 0.24) \times 10^9$	52.35
2-7	$(2.98 \pm 0.27) \times 10^{10}$	$(1.94 \pm 0.43) \times 10^{10}$	65.28
2-8	$(3.27 \pm 0.09) \times 10^9$	$(1.52 \pm 0.14) \times 10^9$	46.48
2-13	$(1.80 \pm 0.21) \times 10^{10}$	$(1.52 \pm 0.22) \times 10^{10}$	84.44
2-18	$(3.46 \pm 0.24) \times 10^9$	$(1.98 \pm 0.22) \times 10^9$	57.27
2-20	$(1.05 \pm 0.15) \times 10^{10}$	$(8.90 \pm 0.27) \times 10^9$	84.76
2-21	$(9.60 \pm 0.22) \times 10^9$	$(5.70 \pm 0.12) \times 10^9$	59.37
2-32	$(2.79 \pm 0.20) \times 10^{10}$	$(2.25 \pm 0.15) \times 10^{10}$	80.64
2-33	$(1.45 \pm 0.07) \times 10^{10}$	$(1.39 \pm 0.15) \times 10^{10}$	95.86

注:数据以  $\bar{X} \pm SD$  表示。

由表 4 可知,10 株菌在胃液中的存活率均不一样,存活率在 80% 以上的有 3 株菌,分别为菌株 2-13,菌株 2-32,菌株 2-33,因此选取这 3 株菌进行下一阶段试验,其中菌株 2-33 存活率最高,可达 95.86%。据研究报道,陈明<sup>[31]</sup>在乳酸菌耐模拟人工胃液试验中,筛选出的 11 株具有高抗氧化能力的乳酸菌,模拟胃液中存活率均在 80% 以上。

## 2.4 耐模拟人工肠液试验

通过耐模拟人工胃液筛选的 3 株菌在模拟人工肠液试验结果如表 5。

表 5 菌株耐模拟人工肠液耐受性

**Table 5 Resistance of strain to simulated artificial intestinal fluid**

菌株代号	0 h/(CFU/mL)	4 h/(CFU/mL)	8 h/(CFU/mL)	存活率/%
2-13	$(2.24 \pm 0.09) \times 10^{10}$	$(1.86 \pm 0.07) \times 10^{10}$	$(1.65 \pm 0.07) \times 10^9$	73.66
2-32	$(2.15 \pm 0.08) \times 10^{10}$	$(1.78 \pm 0.25) \times 10^{10}$	$(1.43 \pm 0.17) \times 10^{10}$	66.51
2-33	$(2.24 \pm 0.04) \times 10^{10}$	$(1.92 \pm 0.12) \times 10^{10}$	$(1.81 \pm 0.07) \times 10^{10}$	80.80

注：数据以  $\bar{X} \pm SD$  表示。

由表 5 可知，将 3 株菌先在模拟人工胃液里消化 3 h 再转到 pH 8.0 的人工肠液，在前 4 h 内 3 株菌的活菌数下降不明显，培养至 8 h 菌株 2-13 的活菌数下降了一个数量级，其余 2 株菌的活菌数下降不明显。通过模拟人工肠液中培养 8 h 可知，3 株菌均保持着较高的存活率，最低为 66.51%，最高可达 80.80%，说明 3 株菌对模拟人工肠液有一定的适应能力，这一结果与于海静<sup>[32]</sup>、鲍雅静<sup>[33]</sup>等人的结果相似。

### 2.5 细胞表面疏水性的测定

对通过模拟人工肠液筛选的 3 株菌，进行细胞表面疏水性的测定，结果如图 1。

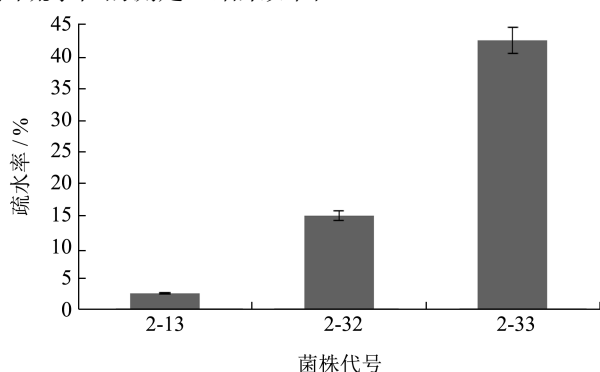


图 1 3 株乳酸菌细胞表面疏水率测定

Fig.1 3 strains of lactic acid bacteria cell surface hydrophobicity rate

细菌在烃-水两相分离过程中发生了疏水分配，因而可根据水相中细菌细胞数量的变化来了解细胞表面的疏水性<sup>[34]</sup>。由图 1 可知，3 株菌的细胞表面疏水性范围在 2.80%~42.61% 之间，其中菌株 2-33 的疏水率最高，可达 42.61%，其余两株菌的疏水率均低于 20%。不同菌株的疏水性差别较大，这与大多数文献报道的一致，由此可见菌株 2-33 对二甲苯的吸附能力比较强，其次是菌株 2-32，再次是菌株 2-13。细胞表面疏水性是决定乳酸菌非特异性粘附的重要动力<sup>[35]</sup>，疏水性好代表着粘附能力较强，因此，选定菌株 2-33 为目的菌株。

### 2.6 抗生素药敏试验

目的菌株对抗生素越敏感，在药敏纸片周围的活

性越弱，形成的透明圈即抑菌圈越大<sup>[36]</sup>，菌株 2-33 对 10 种抗生素药敏的结果如表 6。

从表 6 可知，菌株 2-33 对诺氟沙星、头孢拉定、庆大霉素、万古霉素以及链霉素有耐药性，不敏感；对克林霉素中度敏感；对四环素、氯霉素、红霉素、氨苄西林敏感。

表 6 抗生素敏感试验

**Table 6 Antibiotic sensitivity test**

抗菌药物	药敏圈直径/mm	敏感度
诺氟沙星	-	R
头孢拉定	-	R
庆大霉素	-	R
万古霉素	-	R
链霉素	-	R
克林霉素	15.6±0.13	I
四环素	25.6±0.01	S
氯霉素	26.1±0.06	S
红霉素	27.8±0.31	S
氨苄西林	30.0±0.15	S

注：R：低敏；I：中敏；S：敏感；“-”：无抑菌圈；药敏片直径 6 mm。

### 2.7 菌落形态观察

将活化好的菌株 2-33 划线于 MRS 固体培养基上，恒温培养（37 °C，48 h），挑取单个菌落进行革兰氏染色并观察菌株形态，菌种在 MRS 固体培养基上菌落呈圆形、边缘整齐、表面光泽、不透明且颜色为乳白色；经革兰氏染色，显微镜观察结果为杆状革兰氏阳性菌，结果如图 2 所示。

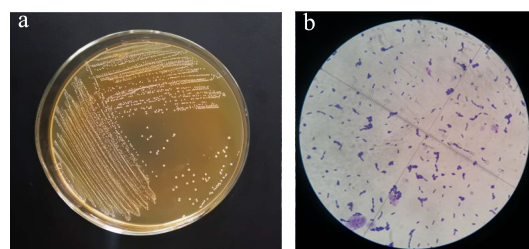


图 2 菌株 2-33 菌落形态及菌体形态

Fig.2 Bacterial colony morphology and bacterial body morphology of strain 2-33

表 7 糖类发酵实验

Table 7 Sugar fermentation experiment

糖种类	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	蔗糖	棉子糖
结果	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性。

### 2.8 糖类发酵实验<sup>[37]</sup>

将菌株 2-33 的单菌落混悬于 2 mL 生理盐水中制成菌悬液,将其加入到糖类培养基中,37 °C 培养 24~48 h 后观察的结果如表 7。

由表 7 可知,菌株 2-33 可利用七叶苷(由紫色变黑色)及其他糖类(均变成黄色),结果判断均为阳性。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[38]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[39]</sup>菌株 2-33 利用所选糖类的特性与植物乳杆菌的特性相同,因此初步鉴定菌株 2-33 为植物乳杆菌。

### 2.9 潜在益生菌株的 16S rDNA 基因序列分子

#### 鉴定

根据细菌基因组 DNA 试剂盒提取方法进行了菌株 2-33 的基因组 DNA 提取,并进行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增。送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定,结果见图 3。

```

GGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCCGACTTTGGGTGTACAACTCTCATGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAAGGCCGGGAACGTAATTCACCGCGGCATGCTGATCCCGGATTACTAGCA
TTCCGACTTCATGTAGCGGAGTTCGACGCTACAAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAG
CTTACTCTCGCGAGTTCGCACTCGTTGACCATCCATTTGTAGCACGCTGTGTAGCCAGGTCATA
AGGGGATGATGATTTGACGTCAATCCCACTTCCTCCGGTTTGTACCGGGAGCTCCACCGA
GTGCCAACTAATAGTGTGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTCGGGGACTTAACCAACA
TCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGACACACCTGTATCCATGTCCCGAAGGGAACGTC
TAATCTCTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGGCTAGCTTCAAGTAA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGGCGCGTAC
TCCCGAGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGACGACTGAAGGGCGGAAACCCCTCAACACTT
AGCAATTCATGTTACGGTATGGACTACCGAGGTATCTAATCTGTTTGTACCCATACTTTCGA
GCCTCAGCGTCAAGTTCAGACACGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATATCTACG
CATTTACCGCTACACATGGAGTTCACCTGTCTCTTCGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGC
ACTTCTTCGGTGAGCGGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCTCGCCTCGCTTAAAGC
CCAAATAAATCCGGACAACCGTTCACACTACGTAATTCACCGCGGTGCTGGCAGATGTTAGCCG
TGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCAGATATGTTCTTTTAAACAA
AGAGTTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTCACTACCGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCTT
GTGGAAGAATCCCTAC1GCGCC1CCCG1AGGAG1TGGGCGG1G1C1CAG1CCCAA1G1GGCC
GATTACCCTCTCAGGTGGCTACGTAATATGCGATGGTGAGCGTTACCCCACTATAGCTAA
TACGCCGGGGACCATCAAAAAGTATAGCGGAAGCCATTTTAAAGCTCGGACCATGCGGATC
CAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCGCTTCTGGCAGGTTTCC
ACGTGAATCTCACCAGTTCGCACTCACTCAAAATGATAATCATGATGCAAGCAACCAATCAATC
CAGAGTTCGTTGACT
    
```

图 3 菌株 2-33 的 16S rDNA 基因序列

Fig.3 16S rDNA gene sequence of strain 2-33

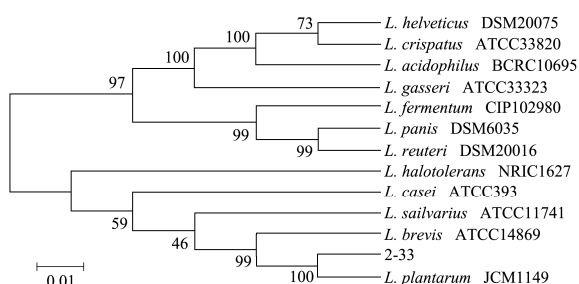


图 4 菌株 2-33 的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain 2-33

将菌株 2-33 的 16S rDNA 基因测序结果在

GenBank 数据库进行 Blast 分析,用 MEGA 7 绘制系统发育树,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,2-33 与 *L. plantarum* 聚类,且与 *L. plantarum* JCM1149 具有最高的同源性且达到 100%。菌株 2-33 的 16S rDNA 分子鉴定结果与糖类发酵实验结果一致,因此,鉴定菌株 2-33 为植物乳杆菌。

### 3 结论

益生菌在体内发挥益生作用的前提条件是能够顺利通过胃酸和胆盐所构成的生物屏障,保证有足够数量的活菌稳定黏附于肠道上皮细胞从而实现定植,进而可以充分发挥益生作用。本文通过耐酸性试验、耐胆盐能力试验、耐模拟人工胃肠液试验以及细菌表面疏水性测定后,选取在模拟人工胃液中存活率达 95.86%、模拟人工肠液中存活率达 80.80%、疏水性为 42.61% 的菌株 2-33 为目的菌株。经抗生素药敏试验可知,菌株 2-33 对诺氟沙星、头孢拉定、庆大霉素、万古霉素以及链霉素有耐药性,不敏感;对克林霉素中度敏感;对四环素、氯霉素、红霉素、氨基西林敏感,该项试验的进行,对评价菌株的安全性具有重要意义。最后经分子生物学确定的菌株 2-33 为植物乳杆菌,与 *L. plantarum* JCM1149 同源性达 100%,且菌株 2-33 的糖类发酵试验结果与 GB 4789.35-2016 一致。本研究结果对可定植胃肠环境的功能性乳酸菌资源开发提供了参考和理论数据。

### 参考文献

- [1] Azad Md Abul Kalam, Sarker Manobendro, Li Tiejun, et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview [J]. BioMed Research International, 2018, (2): 1-8
- [2] 阿热爱·巴合提,武瑞赞,肖梦圆,等.益生菌的生理功能及作用机理研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(22):270-275  
Areai Bahati, WU Ruiyun, XIAO Mengyuan, et al. Research progress on physiological function and action mechanism of probiotics [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(22): 270-275
- [3] 陆文伟,陆静,杨震南,等.发酵乳杆菌 PCC 及干酪乳杆菌 431 对免疫低下型小鼠的免疫调节作用研究[J].中国乳品工业,2017,45(12):9-14  
LU Wenwei, LU Jing, YANG Zhenan, et al. Study on the

- immunomodulatory effects of *Lactobacillus fermentum* PCC and *Lactobacillus casei* 431 on immunocompromised mice [J]. China Dairy Industry, 2017, 45(12): 9-14
- [4] Aoyun Li, Yaping Wang, Zhixing, et al. Probiotics isolated from yaks improves the growth performance, antioxidant activity, and cytokines related to immunity and inflammation in mice [J]. BioMed Central, 2019, 18(1): 112
- [5] LIU Yufang, ZHAO Fengchun, LIU Jiye, et al. Selection of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and its effects on rats fed with high-cholesterol diet [J]. Current Microbiology, 2017, 74(5): 623-631
- [6] Rosaura Leis, María-José de Castro, Carmela de Lamas, et al. Effects of prebiotic and probiotic supplementation on lactase deficiency and lactose intolerance: a systematic review of controlled trials [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1487
- [7] Hadi Maleki Kakelar, Abolfazl Barzegari, Shahram Hanifian, et al. Isolation and molecular identification of *Lactobacillus* with probiotic potential from abomasums driven rennet [J]. Food Chemistry, 2019, 272: 709-714
- [8] 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  
MA Chen, ZHANG Heping. Probiotics, intestinal flora and human health [J]. Science and Technology Guide, 2017, 35(21): 14-25
- [9] Kübra Cinar Topçu, Mükerrerem Kaya, Güzin Kaban. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma [J]. LWT, 2020, 134: 110216
- [10] Dayong Ren, Chang Li, Yanqing Qin, et al. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine [J]. Anaerobe, 2014, 30: 1-10
- [11] 中国食品科学技术学会益生菌分会.益生菌科学研究十大热点及行业发展建议[J].中国食品报, 2020,20(9):337-344  
Probiotics Society of the Chinese Institute of Food Science and Technology. Top ten hot spots of probiotics scientific research and suggestions for industry development [J]. China Journal of Food, 2020, 20(9): 337-344
- [12] 王楠,田晗,张文晓,等.两株具有潜在益生作用的人源链球菌的安全性评价[J].食品与发酵工业,2021,47(5):12-16  
WANG Nan, TIAN Han, ZHANG Wenxiao, et al. Safety evaluation of two human *Streptococcus* strains with potential probiotics [J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(5): 12-16
- [13] 王卉,洋洋,乌有娜,等.酸马奶片的营养成分分析与评价[J].食品与发酵工业,2020,46(15):224-230  
WANG Hui, YANG Yang, WU Youna, et al. Analysis and evaluation of nutritional components of sour horse milk tablets [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(15): 224-230
- [14] 孙春玲,郝苗苗,王东玉,等.锡林郭勒酸马奶卫生学评价[J].中国乳品工业,2020,48(3):27-30  
SUN Chunling, HAO Miaomiao, WANG Dongyu, et al. Hygienic evaluation of Xilingol yoghurt [J]. China Dairy Industry, 2020, 48(3): 27-30
- [15] 于佳琦,夏亚男,乔晓宏,等.锡林郭勒牧区酸马奶天然发酵剂中风味物质及微生物多样性[J].食品工业科技,2021, 42(10):112-121  
YU Jiaqi, XIA Yanan, QIAO Xiaohong, et al. Flavor substances and microbial diversity in natural starter of sour horse milk in Xilingol pastoral area [J]. Food Industry Science and Technology, 2021, 42(10): 112-121
- [16] 刘文俊,多拉娜,刘亚华,等.基于纯培养方法和 PacBio 三代测序技术研究蒙古国传统酸马奶中乳酸菌多样性[J].中国食品学报,2019,19(4):27-37  
LIU Wenjun, Duolana, LIU Yahua, et al. Study on the diversity of lactic acid bacteria in Mongolian traditional sour horse milk based on pure culture method and PacBio third generation sequencing technique [J]. Chinese Journal of Food, 2019, 19(4): 27-37
- [17] 其其日力格.潜在益生作用乳酸菌的筛选及其在发酵乳中的应用研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2020  
Qiqirilige. Screening of lactic acid bacteria with potential probiotic effect and its application in fermented milk [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020
- [18] GB 4789.2-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]  
GB 4789.2-2016, National Standard for Food Safety-determination of the Total Number of Microbiological Colonies in Food [S]
- [19] Stavros Plessas, Chrysanthi Nouska, Athanasios Karapetsas, et al. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese [J]. Food Chemistry, 2017, 226: 102-108
- [20] 柳青.具有潜在益生特性乳酸菌的筛选鉴定及其特性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018  
LIU Qing. Screening, identification and characterization of lactic acid bacteria with potential probiotic characteristics [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [21] 马文思,刘发山.大肠埃希氏菌在模拟胃肠道环境下耐受性

- 的研究[J].昆明学院学报,2019,41(3):113-116
- MA Wensi, LIU Fashan. Study on the tolerance of *Escherichia coli* in simulated gastrointestinal environment [J]. Journal of Kunming University, 2019, 41(3): 113-116
- [22] 李艳.具有ACE抑制活性乳酸菌的筛选及其发酵特性的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2011
- LI Yan. Screening of lactic acid bacteria with ACE inhibitory activity and study on its fermentation characteristics [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2011
- [23] 黄燕燕,郭均,黎恒希,等.降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J].食品科学,2018,39(6):88-94
- HUANG Yanyan, GUO Jun, LI Hengxi, et al. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria *in vitro* and its cholesterol-lowering mechanism [J]. Food Science, 2018, 39(6): 88-94
- [24] 谭才邓,朱美娟,杜淑霞,等.抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J].食品工业,2016,37(11):122-125
- TAN Caideng, ZHU Meijuan, DU Shuxia, et al. Comparative study on bacteriostatic zone method in bacteriostatic test [J]. Food Industry, 2016, 37(11): 122-125
- [25] 萨如拉.广谱抗菌活性乳酸杆菌的生物学特性及其应用研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2018
- Sarula. Study on biological characteristics and application of *Lactobacillus* with broad-spectrum antibacterial activity [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [26] 陈仪婷,张红星,谢远红,等.降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其耐酸耐胆盐性能研究[J].食品与发酵工业,2018,44(5):29-33
- CHEN Yiting, ZHANG Hongxing, XIE Yuanhong, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and their acid and bile salt tolerance [J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(5): 29-33
- [27] 王祎然,韦明明,张涵,等.酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性[J].食品工业科技,2020,41(16):121-126, 139
- WANG Yiran, WEI Mingming, ZHANG Han, et al. Identification of lactic acid bacteria in sour soup and its acid tolerance, bile salt tolerance and antioxidant activity [J]. Food Industry Science and Technology, 2020, 41(16): 121-126, 139
- [28] 李仁芳,蒙晓明,黄福卫,等.广西生榨米粉中益生乳酸菌的筛选及鉴定[J].中国酿造,2020,39(8):59-64
- LI Renfang, MENG Xiaoming, HUANG Fuwei, et al. Screening and identification of probiotic lactic acid bacteria from Guangxi raw rice flour [J]. Brewed in China, 2020, 39(8): 59-64
- [29] 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):380-383,389
- HU Aihua, AO Xiaolin, CHEN Cen, et al. Research progress on the mechanism of acid and bile salt tolerance of lactic acid bacteria [J]. Food Industry Science Technology, 2015, 36(8):380-383, 389
- [30] 熊荣园.泡菜中降解重金属铅的乳酸菌筛选及鉴定[J].食品研究与开发,2020,41(22):157-161
- XIONG Rongyuan. Screening and identification of lactic acid bacteria degrading heavy metal lead in kimchi [J]. Food Research and Development, 2020, 41(22): 157-161
- [31] 陈明.青藏高原高抗氧化活性乳酸菌的筛选及其抗氧化特性研究[D].兰州:兰州大学,2017
- CHEN Ming. Screening and antioxidant properties of lactic acid bacteria with high antioxidant activity in Qinghai-Xizang plateau [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2017
- [32] 于海静.具有潜在抑制食源性肠道致病菌的植物乳杆菌的筛选[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2015
- YU Haijing. Screening of *Lactobacillus plantarum* with potential inhibition of foodborne intestinal pathogens [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015
- [33] 鲍雅静,王水泉,何秋雯,等.具有潜在益生特性发酵乳杆菌的筛选[J].中国食品学报,2013,13(5):17-23
- BAO Yajing, WANG Shuiquan, HE Qiuwen, et al. Screening of *Lactobacillus* with potential probiotic characteristics [J]. Chinese Journal of Food, 2013, 13(5): 17-23
- [34] 郭均.降胆固醇乳酸菌的筛选及其体内降胆固醇作用[D].广州:华南理工大学,2016
- GUO Jun. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and its cholesterol-lowering effect *in vivo* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [35] 孙世鑫,李科,骆鹏飞,等.制备富含 $\gamma$ -氨基丁酸奶的乳酸菌筛选及相关特性分析[J].现代食品科技,2021,37(3):106-114,285
- SUN Shixin, LI Ke, LUO Pengfei, et al. Screening and characteristics of lactic acid bacteria for preparing  $\gamma$ -aminobutyric acid-rich yogurt [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 106-114, 285