

罗伊氏粘液乳杆菌K07的生物学特性及其基因分析

黄志钰, 黎旭*, 李幸, 金庭飞, 陶纯长, 刘宗争
(广东益可维生物技术有限公司, 广东广州 510630)

摘要: 从新疆昭苏县传统发酵乳酪中分离出2株罗伊氏粘液乳杆菌(编号K07、K08), 对2株菌的生长和产酸性能、耐酸耐胆盐、模拟胃肠道的耐受、产罗伊氏菌素能力和抗氧化活性进行了评估; 此外还测定了2株菌的抑菌性能并对K07菌株进行基因分析。结果表明, 2株菌均在培养12 h后进入对数生长末期, 发酵终点pH值为4.45。K07对酸、胆盐和模拟胃肠道的耐受及抗氧化能力强于K08。pH值2.50处理4 h, K07存活率为73.27%。0.15%胆盐胁迫下K07菌株OD_{600 nm}上升0.3个单位需5.50 h, 模拟胃肠道试验K07的存活率为74.13%。两株菌的无细胞提取物抗氧化活性高于完整细胞, 其中K07无细胞提取物对DPPH自由基和羟自由基的清除率为42.39%、15.69%, 还原力17.96%。K07产罗伊氏菌素量为183.05 mmol/L显著高于K08, 且K07抑菌性能较好, 对白色念珠菌和无乳链球菌的抑菌圈直径为22.20 mm、18.26 mm。K07基因组全长1 950 440 bp, 预测蛋白质编码基因2 067种, GC含量为38.69%。研究结果显示罗伊氏粘液乳杆菌K07具有良好的益生特性, 为后续产业化应用提供理论依据。

关键词: 罗伊氏粘液乳杆菌; 益生特性; 基因分析

文章编号: 1673-9078(2024)04-73-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0377

Biological Characteristics of *Limosilactobacillus reuteri* K07 and Its Genetic Analysis

HUANG Zhiyu, LI Xu*, LI Xing, JIN Tingfei, TAO Chunchang, LIU Zongzheng
(Guangdong Yikewei Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510630, China)

Abstract: Two strains of *Limosilactobacillus reuteri* (K07, K08) were isolated from traditional fermented cheese of Zhaosu County, Xinjiang Province. The growth, acid production, acid tolerance, bile salt tolerance, tolerance to simulated gastrointestinal tract, reuterin-producing capacity and antioxidant activity of the two strains were evaluated. In addition, the bacteriostatic performance of two strains was determined and genetic analysis of the K07 strain was performed. The results showed that both strains entered the late logarithmic growth phase after 12 hours of culture, and the endpoint pH of fermentation was 4.45. K07 exhibited stronger tolerance to acid, bile salt and the simulated gastrointestinal tract as well as higher antioxidant ability than K08. The survival rate of K07 was 73.27% after the treatment at pH 2.50 for 4 h. For the K07 strain, it took 5.50 hours for the OD_{600 nm} to increase by 0.3 units under the stress of 0.15% bile salt. The survival rate of K07 in the simulated gastrointestinal test was 74.13%. The antioxidant activities of the cell-free extracts of the two strains were higher than those of the intact cells, with the scavenging rates of the cell free extracts of K07 for DPPH free radicals

引文格式:

黄志钰, 黎旭, 李幸, 等. 罗伊氏粘液乳杆菌K07的生物学特性及其基因分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(4): 73-83.

HUANG Zhiyu, LI Xu, LI Xing, et al. Biological characteristics of *Limosilactobacillus reuteri* K07 and its genetic analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 73-83.

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(上海合作组织科技伙伴计划及国际科技合作计划)项目(2022E01028)

作者简介: 黄志钰(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 842427510@qq.com

通讯作者: 黎旭(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳源微生物与生物发酵, E-mail: 896397999@qq.com

and hydroxyl free radicals were 42.39% and 15.69%, respectively. with the reducing power being 17.96%. The amount of reuterin produced by K07 was 183.05 mmol/L, which was significantly higher than that of K08. Also, K07 exhibited better antimicrobial performance. The diameters of inhibition zones for *Candida albicans* and *Streptococcus agalactiae* were 22.20 mm and 18.26 mm, respectively. The full length of K07 genome was 1 950 440 bp, with 2067 predicted protein coding genes. The content of GC was 38.69%. The research results showed that *Limosilactobacillus reuteri* K07 had good probiotic properties, which provides a theoretical basis for subsequent industrial applications.

Key words: *Limosilactobacillus reuteri*; prebiotic properties; genetic analysis

世界卫生组织 (WHO) 和联合国粮农组织 (FAO) 在 2002 年将益生菌定义为以活的形式足量摄取, 对宿主健康有益的微生物。这些微生物必须无毒性、致病性, 能够耐受胃酸及胆盐, 并且在肠道中定殖^[1]。根据最新的分类学, 罗伊氏粘液乳杆菌属于粘液乳杆菌属, 是存在于人体及动物胃肠道中的常见菌株^[2], 具有优越的益生功能, 可以抑制肠道中病原菌的生长^[3], 缓解由菌群失调而引起的慢性便秘等症状^[4], 此外还能有效缓解疝气的发生^[5-7]。有研究表明, 罗伊氏粘液乳杆菌可以分解甘油产生罗伊氏菌素。罗伊氏菌素由不同形态的 3- 羟基丙醛 (3-HPA) 混合物组成, 是一类非蛋白, 具有水溶性的细菌素, 能够抑制多种致病菌, 抑菌活性不受蛋白酶的影响^[8,9]。当前在蔬菜保鲜、乳制品发酵、肉制品保藏及青贮饲料发酵等方面都有罗伊氏菌素的良好应用^[10-13]。罗伊氏粘液乳杆菌在体外能够有效清除自由基, 具有较好的抗氧化能力^[14], 在蛋雏鸡饲料中添加罗伊氏粘液乳杆菌可以提高机体抗氧化能力^[15]。当前已有公司基于罗伊氏粘液乳杆菌研发出能够改善人与动物机体健康的生物制剂。

新疆作为我国最大面积的省级行政单位, 区域内少数民族众多, 同时具有多样的地形地貌, 特别是区别于平坦的草原牧场, 新疆的高山牧场位置偏远且牧民仍保留着传统的游牧方式与制作多种发酵乳制品的传统, 为其区域内传统发酵乳制品中的微生物建立了一道物理屏障, 蕴含着宝贵且丰富的微生物资源。本文以新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县哈萨克族传统发酵乳酪中分离出的 2 株罗伊氏粘液乳杆菌 K07、K08 为研究对象, 对其生长特性、耐酸耐胆盐性能、抑菌、抗氧化及产罗伊氏菌素能力进行研究, 并对性能良好的 K07 菌株进行全基因测序与分析, 为 K07 菌株的应用产品开发提供研究支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验菌株

菌株: 2 株罗伊氏粘液乳杆菌 K07、K08 分离自新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县传统乳酪, 现分别保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心和广东益可维生物技术有限公司研发中心菌种库。其中 K07 保藏号为 CGMCC No.15703, K08 保藏号为 YKW-Lr08。

指示菌: 白色念珠菌 ATCC 10231、无乳链球菌 ATCC 12386 购买自广东微生物菌种保藏中心。

1.1.2 试剂

氢氧化钠、盐酸, 国药集团化学试剂有限公司; 抗坏血酸、铁氰化钾、甲苯、过氧化氢, 上海麦克林生化科技有限公司; 邻-菲罗琳、丙烯醛、牛胆盐、DPPH、三氯乙酸、L-色氨酸、PBS 缓冲液, 上海索莱宝生物科技有限公司; MRS 培养基, 青岛海博生物。

1.2 仪器与设备

Delta 320s 型 pH 计, 美国 Mettler-Toledo 公司; JB-FY-900 型超净台, 苏州佳宝净化工程设备有限公司; 5417R 型高速冷冻离心机, 金坛市医疗仪器厂; LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 多功能酶标仪, 美国 BioTek 仪器有限公司; SPX-150B-Z 型生化培养箱, 苏州江东精密仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基配制

按说明书称取 MRS 培养基, 定容后调节 pH 值至 6.20。固体培养基中加入 20 g/L 的琼脂粉,

121 °C 灭菌 15 min。

LB 培养基：按 NaCl 10 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L 配制，定容后调 pH 值至 7.40。固体培养基加 20 g/L 琼脂粉，121 °C 灭菌 15 min。

1.3.2 菌株的准备

取保藏于 -80 °C 的罗伊氏粘液乳杆菌 K07、K08 甘油管，用接种环取一环进行平板划线，培养 48 h 后挑取单菌落于 5 mL MRS 液体培养基中，活化 2 次后，培养菌液至 $OD_{600\text{nm}}=1$ （约 10^9 CFU/mL）作为试验种子液备用。

1.3.3 生长及产酸特性

按体积分数 2% 接种罗伊氏粘液乳杆菌种子液于 MRS 液体培养基中，37 °C 培养，每隔 2 h 测定菌液 $OD_{600\text{nm}}$ 值和 pH 值，连续测 48 h。每隔 2 h 测定两株菌液中的活菌数，24 h 后每隔 6 h 测定一次活菌数，测定至 48 h 结束。

1.3.4 耐酸能力评价

参考王腾斌等^[16]方法加以改进，配制含质量分数 0.20% 硫代乙醇酸钠的 MRS 液体培养基，用 0.1 mol/L 盐酸调节培养基 pH 值至 2.50、3.50、4.00 和 6.50。接种体积分数 2% 罗伊氏粘液乳杆菌种子液至调酸的培养基中，37 °C 静置培养 0、1、2、3 和 4 h 后进行活菌计数，计算存活率。

$$A = \frac{B}{C} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

A——处理后菌株的存活率，%；

B——处理后的活菌数，log CFU/mL；

C——处理前的活菌数，log CFU/mL。

1.3.5 胆盐耐受性评价

参考高云云等^[17]方法加以改进，取种子液以体积分数 2% 接种量接种于含质量分数 0、0.15%、0.30% 及 0.40% 牛胆盐的 MRS 液体培养基（含质量分数 0.20% 硫代乙醇酸钠）中。记录菌液 $OD_{600\text{nm}}$ 上升 0.3 个单位的时间，观察各实验组菌液生长情况与滞后时间。

1.3.6 胃肠道模拟耐受评价

参考 Guo 等^[18]的方法，配制人工胃液与肠液。根据史晓萌等方法，综合评估食物在胃肠道内停留的时间，选择在 pH 值 3.00 的人工胃液中处理 3 h 后进行活菌计数，取胃液处理后的菌液接种于 pH 值 8.00 的人工肠液中再处理 6 h 进行计数，存活率

计算同 1.3.4。

1.3.7 抑菌能力评价

1.3.7.1 指示菌悬液的制备

同方法 1.3.2 制备指示菌种子液，按 2% 体积分数接种至 LB 液体培养基中，使得初始菌液浓度为 10^7 CFU/mL，备用。

1.3.7.2 益生菌发酵上清液的制备

将罗伊氏粘液乳杆菌种子液以体积分数 2% 接种到 MRS 液体培养基中，37 °C 静置培养 24 h 后，5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液并用 0.22 μm 的滤膜过滤收集滤出液，备用。

1.3.7.3 牛津杯实验

取 100 μL 指示菌液，均匀涂布在 LB 平板上，用无菌镊子在培养基表面均匀放置牛津杯。吸取 100 μL 上清液至牛津杯中，每个样品重复三次。实验完毕后将平板放入 4 °C 冰箱内 3 h，再移入 37 °C 恒温箱内，培养 24 h 后取出，用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3.8 抗氧化能力评价

1.3.8.1 完整细胞与无细胞提取物的制备

取 1.2.2 中培养的菌液，4 °C，5 000 r/min，10 min 离去上清液，用 pH 值 7.20 的 0.02 mol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次，重悬菌体使 $OD_{600\text{nm}}$ 为 1.00。重悬菌液一组作为完整细胞进行试验，一组超声破碎处理（总功率 750 W，破碎效率 75%，工作 6 s 间歇 3 s，4 °C 处理 5 min），结束后 4 °C，10 000 r/min 离心 15 min，镜检上清液至无完整细胞，可进行抗氧化试验。

1.3.8.2 DPPH 自由基清除能力

参考黄玉军等^[19]方法，在 517 nm 处测定样品的 DPPH 自由基清除率。计算公式如下：

$$W_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中：

W_1 ——测定样品的 DPPH 自由基清除率，%；

A_0 ——1 mL 的 DPPH 溶液 + 1 mL 无水乙醇的吸光度；

A_1 ——1 mL 的 DPPH 溶液 + 1 mL 样品的吸光度；

A_2 ——1 mL 的无水乙醇 + 1 mL 样品的吸光度。

1.3.8.3 羟自由基清除能力

参考 Zhang 等^[20]的方法进行羟自由基清除率实验与计算。计算公式如下：

$$W_2 = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

W_2 —测定样品的羟自由基清除能力, %;

A_b —用 1 mL 蒸馏水替代 1 mL H_2O_2 作为空白组在 $OD_{536\text{ nm}}$ 的吸光度;

A_s —用 1 mL 待测样品替代 1 mL 蒸馏水在 $OD_{536\text{ nm}}$ 的吸光度;

A_p —用 1 mL 20 mmol/L H_2O_2 代替待测样品在 $OD_{536\text{ nm}}$ 的吸光度。

1.3.8.4 罗伊氏粘液乳杆菌的还原力

取 0.5 mL 待测样品, 参照杨静秋^[21]方法进行菌株还原力的测定。计算公式如下:

$$W_3 = \frac{A_e - A_d}{A_d} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

W_3 —测定样品的还原力, %;

A_e —处理后测定样品在 $OD_{700\text{ nm}}$ 的吸光度;

A_d —PBS 代替待测样品在 $OD_{700\text{ nm}}$ 的吸光度。

1.3.9 罗伊氏菌素的测定

1.3.9.1 细胞的制备

接种体积分数 6% 的罗伊氏粘液乳杆菌种子液至 10 mL MRS 液体培养基的试管中, 用矿物油 2 mL 封液, 37 °C 静置培养 24 h。培养后的菌液 5 000 r/min 离心 10 min, pH 值 7.00 磷酸缓冲液冲洗 1 次, 收集湿细胞 (20~140 g 湿重/L)。

1.3.9.2 罗伊氏菌素的制备

将收集的罗伊氏粘液乳杆菌湿细胞转移至装有 7 mL 无菌甘油溶液的离心管中, 37 °C 培养 2 h, 进行罗伊氏菌素转化合成。转化后的菌液 4 °C, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液在 4 °C 以下保存。

1.3.9.3 罗伊氏菌素的测定

参考 Circle 等^[22]的方法使用丙烯醛-色氨酸比色法测定罗伊氏菌素的浓度, 用丙烯醛标准品配置成 0~1 mmol/L 溶液, 绘制标准曲线, 37 °C 下避光保温 20 min 后检测 $OD_{560\text{ nm}}$ 值。得到线性回归方程为 $y=0.259\ 9x-0.022\ 4$, $R^2=0.992\ 4$ 。

1.3.9.4 基因组测序及分析

委托生工生物工程(上海)股份有限公司对 K07 菌株在 MGI DNBSEQ-T7 平台上进行全基因组二代 Illumina 测序, 并进行基因注释和分析。使

用 FastQC v0.11.2 对测序的原始数据进行质量评估, 通过 Trimmomatic v0.36 对 Illumina 测序数据进行质量剪切, 得到相对准确的有效数据。使用 SPAdes v3.5.0 拼接二代测序数据。采用 GapFiller v1.11 填补空白。利用 PrInSeS-G v1.0.0 进行序列矫正。基因蛋白序列与基因预测和注释是使用 Prokka v1.10 和 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 NR 数据库 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) 生成的。

1.3.9.5 耐药基因分析

使用 BLAST v 2.2.28 把基因蛋白序列与抗生素耐药性综合数据库 (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>) 进行比对, 把基因和其相对应的耐药功能注释信息结合起来, 得到注释结果, 预测抗生素耐药性基因。

1.3.9.6 碳水化合物活性酶分析

碳水化合物活性酶的分析使用 HMMER3 v3.1b1 软件将基因集蛋白序列与 CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Databas) 数据库 (<http://www.cazy.org>) 进行比对, 得到其对应的碳水化合物活性酶注释信息。筛选条件为 $E\text{-value} < 1e-5$ 。

1.3.10 数据处理

采用 SPSS 软件对试验数据进行统计分析, 利用 Origin 软件制图。各项指标结果以“平均值 ± 标准差” (mean ± SD) 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 视为显著性差异, 具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线

乳酸菌发挥益生作用, 需要在指定的环境中快速生长繁殖, 成为优势菌群。因此生长速度是乳酸菌益生特性的筛选条件之一。罗伊氏粘液乳杆菌 K07、K08 的生长曲线如图 1 所示。两株菌的生长趋势相近, 0~2 h 为生长延滞期, 菌体浓度变化缓慢, $OD_{600\text{ nm}}$ 值与菌液中的活菌数变化不大。3~12 h 时进入对数生长期, 菌体生长速率和新陈代谢加快, 呈快速上升趋势, 菌液中活菌数上升约 2 个数量级; 12 h 时进入菌株生长稳定期, 菌体浓度相对稳定, 菌液中活菌数维持在 9.80 lg CFU/mL。有研究表明, 猪源罗伊氏粘液乳杆菌 GL001 在生长 8 h 后进入对数期, 16 h 后进入稳定期^[23], 说明不同来源的菌株生长速率不同, 菌株 K07 相对来说能够更快达到高活菌数。

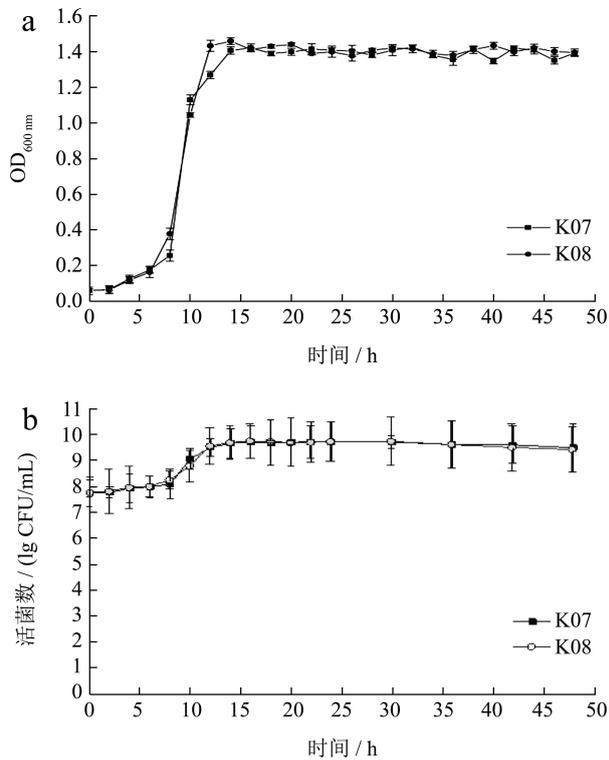


图1 罗伊氏粘液乳杆菌的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Limosilactobacillus reuteri*

注: (a) OD_{600nm} 变化; (b) 活菌数变化。

2.2 产酸性能

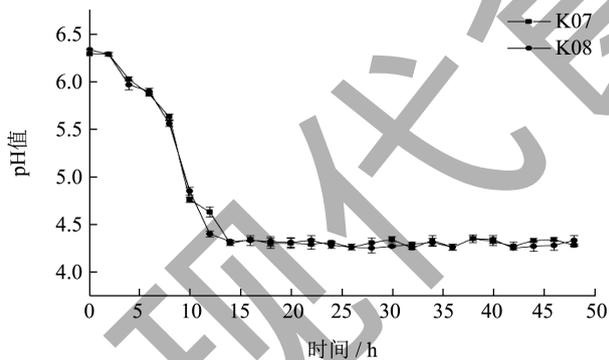


图2 罗伊氏粘液乳杆菌pH值变化

Fig.2 Change in pH of *Limosilactobacillus reuteri*

乳酸菌在生长代谢过程中会产生有机酸，可以降低胃肠道的pH，同时抑制致病菌的生长。通常来说，产酸能力强的乳酸菌具有更好的应用空间。罗伊氏粘液乳杆菌 K07、K08 在生长过程中的产酸性能与生长趋势相同。如图2所示，在菌体生长延滞期，菌液pH值变化不明显。2~12 h期间，菌液pH值快速下降，pH值从6.30降至4.45左右，菌体进入对数生长期，迅速消耗碳源并产生大量有机酸；

12~48 h期间菌液pH值无明显变化，此时菌体生长代谢速率变缓，进入稳定期。菌液pH值变化情况与菌体密度变化趋势一致。产酸性能与李婷的研究结果相似，均在对数期菌液pH值快速下降，且最终菌液pH值在4.50左右^[23]。

2.3 耐酸能力

随着食品微生物应用范围的扩大，乳酸菌的耐酸能力成为筛选理想益生菌株的条件之一。由图3可以看出，罗伊氏粘液乳杆菌 K07 较 K08 具有更优的耐酸能力。在pH值2.50条件下处理4 h，菌株K07存活率为73.27%，K08存活率为63.31%，K07菌株存活率显著高于K08 ($P < 0.05$)。有研究者从健康婴儿粪便中分离到几株罗伊氏粘液乳杆菌，pH值2.00处理4 h后，菌株GH211-4和GH319-13表现出良好的存活率^[3]，说明部分罗伊氏粘液乳杆菌对酸有较好的耐受能力，可以适应酸性食品发酵条件或在人体胃肠道中发挥益生作用。

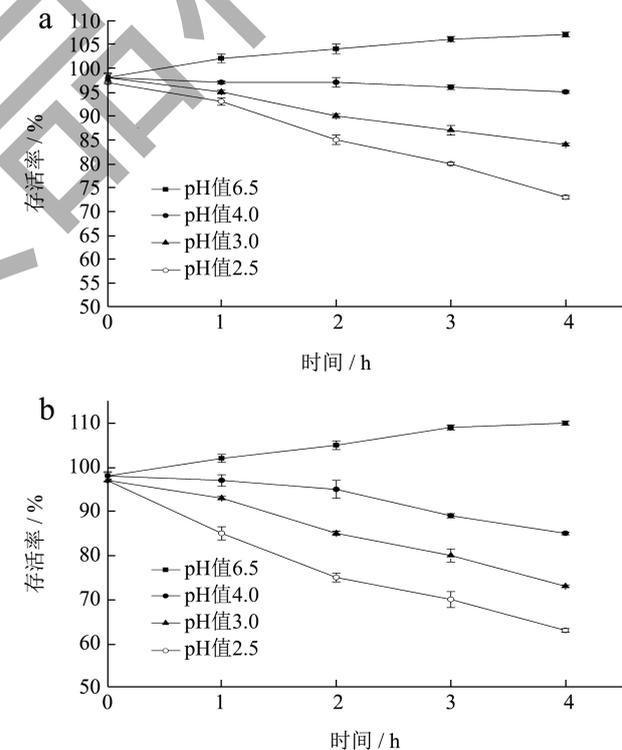


图3 罗伊氏粘液乳杆菌耐酸性能

Fig.3 Acid resistance of *Limosilactobacillus reuteri*

注: (a) K07; (b) K08。

2.4 胆盐耐受性

若想在人体中发挥益生功效，益生菌除了要有较强的耐酸性能外，还需要耐受小肠胆盐形成的高渗环境。因此对两株罗伊氏粘液乳杆菌的胆盐耐受

性进行评估。由图4可知,菌株K07对胆盐的耐受能力良好。在0.15%牛胆盐环境中,与对照组相比,K07菌液OD_{600 nm}上升0.3个单位,生长滞后约1 h。而菌株K08在0.15%牛胆盐环境中,生长受到严重抑制,与对照组相比,生长至7.5 h时,菌液OD_{600 nm}仅上升约0.15个单位,菌株K08对胆盐的耐受性较差。Popović等^[24]研究发现罗伊氏粘液乳杆菌B2在0.3%牛胆盐环境中的存活率为37%,张如春等^[25]测定了狐源罗伊氏粘液乳杆菌ZJF036在0.2%和0.4%胆盐MRS培养基中OD₆₀₀值的变化情况,与对照组相比,培养6 h的0.2%胆盐MRS培养液OD₆₀₀值显著下降约0.4个单位,与本研究结果相近,说明胆盐会影响罗伊氏粘液乳杆菌的生长,但部分菌株对胆盐的耐受性良好。

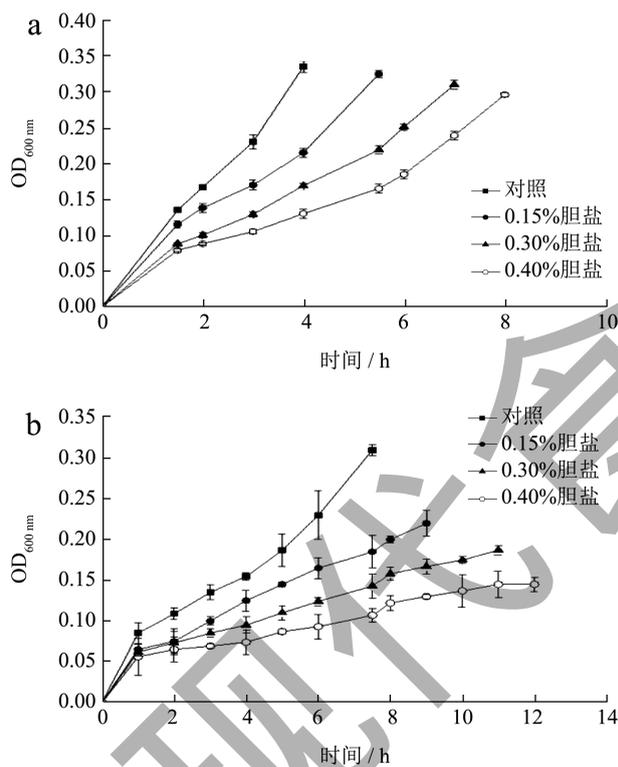


图4 罗伊氏粘液乳杆菌胆盐耐受性结果

Fig.4 Bile salt tolerance evaluation of *Limosilactobacillus reuteri*

注: (a) K07; (b) K08。

2.5 模拟人工胃肠道耐受性

由耐酸及耐胆盐结果可知,两株菌的耐受性差异较大。通过测试两株菌在人工胃肠道模拟环境中的耐受情况,进一步评估两株菌的综合耐受能力。

如图5所示,菌株K07经人工胃液处理3 h后存活率为86.13%,显著高于K08存活率81.45% ($P<0.05$)。经胃液处理3 h,肠液处理6 h后,K07存活率为74.13%,显著高于K08存活率60.85% ($P<0.05$)。史晓萌等^[26]通过对植物乳杆菌CICC 6238、嗜酸乳杆菌NCFM和鼠李糖乳杆菌HN001进行胃肠道模拟试验,发现它们的最终存活率分别约为61.50%、79.40%、77.40%。对比可知,本研究的K07菌株具有相对良好的胃肠道耐受能力。

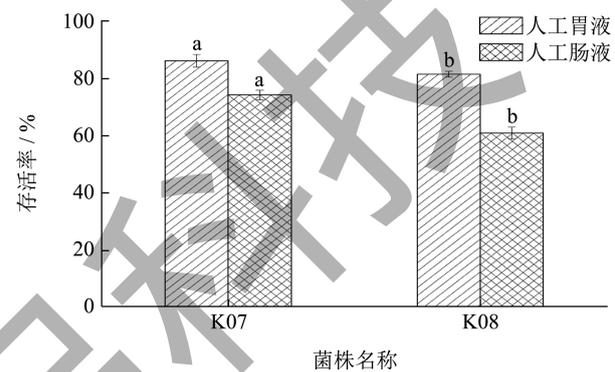


图5 罗伊氏粘液乳杆菌胃肠道模拟耐受性

Fig.5 Simulated gastrointestinal tolerance of *Limosilactobacillus reuteri*

注: 字母表示两株菌在相同处理条件下的存活率具有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.6 抑菌能力

能够在健康人体中引发妇科疾病致病菌主要为白色念珠菌和无乳链球菌。外阴阴道念珠菌病是一种常见的炎症性妇科疾病,通常是由于口服避孕药、怀孕、糖尿病或使用广谱抗生素治疗导致。约80%~90%的外阴阴道念珠菌病是由白色念珠菌引起的。由临床数据结果表明,无乳链球菌是新生儿发病和死亡的主要感染性致病菌。无乳链球菌能够引发多种妇科感染,包括绒毛膜羊膜炎、子宫内膜炎及产褥期败血症等。因此研究益生菌对这2株妇科致病菌的抑菌能力很有必要。

由牛津杯实验结果可知,菌株K07较K08对白色念珠菌和无乳链球菌的抑制效果更好,且差异显著 ($P<0.05$)。菌株K07对白色念珠菌的抑菌圈直径可达22.20 mm,对无乳链球菌的抑菌直径可达18.26 mm。苏艳君等^[27]发现海洋源长枝木霉菌ST-27的发酵产物二氯甲烷萃取物对无乳链球

菌 ATCC12386 的抑菌圈直径接近 30 mm。姜林娟等^[28]采用琼脂抑菌试验测试了植物乳植杆菌、鼠李糖乳酪杆菌和罗伊氏粘液乳杆菌对白色念珠菌的抑制情况,结果表明 3 株益生菌对白色念珠菌的抑制效果良好,均能达到 90% 以上。以上结果跟本研究结果相似,说明益生菌及其代谢产物对白色念珠菌和无乳链球菌有良好的抑制效果。

表 1 罗伊氏粘液乳杆菌对致病菌的抑菌效力

Table 1 Bacteriostatic effect of *Limosilactobacillus reuteri* pathogenic bacteria

菌株	抑菌圈直径/mm	
	白色念珠菌	无乳链球菌
K07	22.20 ± 0.65 ^b	18.26 ± 0.20 ^b
K08	19.28 ± 1.03 ^c	14.12 ± 0.98 ^c
阳性对照	30.86 ± 0.48 ^a	30.06 ± 0.22 ^a
阴性对照	×	×

注:字母表示不同实验组对同一株致病菌抑制效力具有显著性差异 ($P < 0.05$)。“×”表示抑菌圈直径 ≤ 8 mm。

2.7 抗氧化能力

乳酸菌的抗氧化能力当前已得到明确验证,但具体作用机制尚不明确^[29]。通过对 K07 与 K08 菌株抗氧化能力分析发现, K07 具有较强的 DPPH 自由基清除能力,其完整细胞与无细胞提取物对 DPPH 自由基的清除能力分别可以达到 32.51% 和 42.39%。解文利等^[30]测试了从四川传统泡菜中分离出的乳酸菌对 DPPH 自由基的清除能力,其中完整细胞组及无细胞提取物组对 DPPH 自由基的清除率均在 15% 左右。刘少敏^[31]研究发现商业菌种嗜酸乳杆菌 NCFM 及植物乳杆菌 ATCC 14917 的菌体对 DPPH 自由基的清除率分别为 22.60% 和 38.00%。对比发现, K07 具有较强的 DPPH 清除能力。

此外菌株 K07 的羟自由基清除率及还原力也强于 K08。K07 和 K08 菌株的无细胞提取物羟自由基清除率和还原力分别为 15.69%、17.96% 和 14.56%、15.35%。

有研究者对自然发酵的东北酸菜和人源乳酸菌进行了羟自由基清除能力及还原力评估,通过对比发现,无细胞提取物具有更强的羟基自由基清除能力^[32,33],与本试验结果一致。K07 与 K08 菌株的无细胞提取物整体抗氧化能力强于完整细胞组,且 K07 菌株情况整体优于 K08。

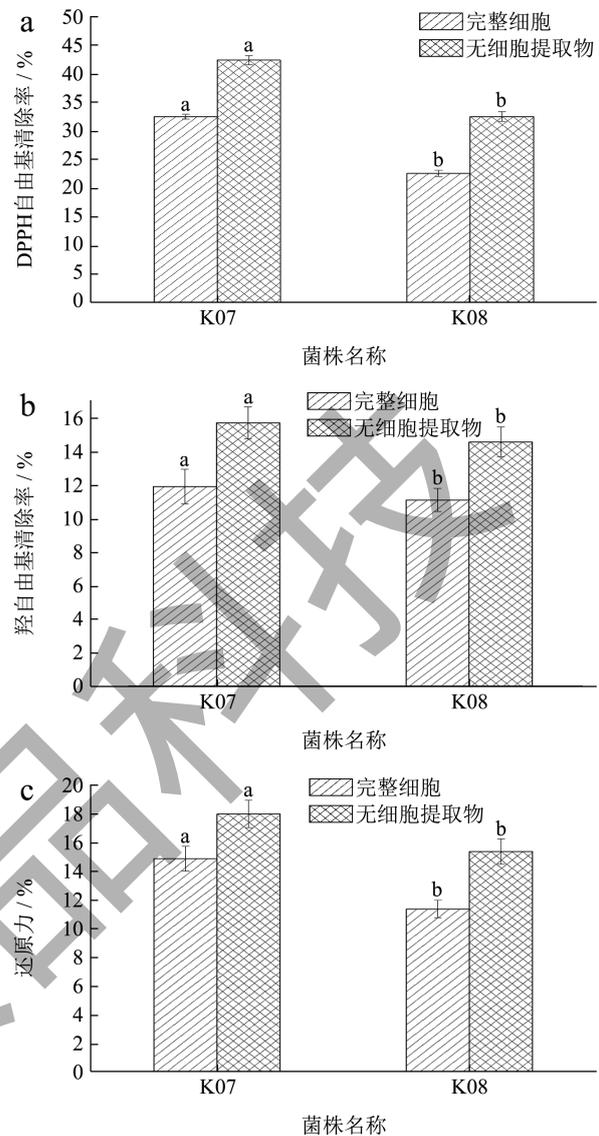


图 6 罗伊氏粘液乳杆菌抗氧化能力评价

Fig.6 Evaluation of antioxidant capacity for *Limosilactobacillus reuteri*

注:字母表示两株菌在相同状态下的抗氧化能力具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.8 罗伊氏菌素含量

部分罗伊氏粘液乳杆菌能够产生罗伊氏菌素,该物质具有良好的抗菌活性,在食品及养殖领域均有一定的应用。经测定 K07 与 K08 菌株均能产生一定的罗伊氏菌素,且含量分别为 183.05 mmol/L 和 113.05 mmol/L。有研究者发现,处于初期稳定期的罗伊氏粘液乳杆菌细胞内的甘油脱水酶活力最强,此时转化甘油生产罗伊氏菌素的产量最高^[34]。Bell 等^[35]发现罗伊氏粘液乳杆菌产生的罗伊氏菌素在肠道内能够有效降低结肠癌的发生,保障肠道健

康。Lüthi-Peng 等^[36]研究发现, 罗伊氏粘液乳杆菌 ATCC 53608 转化 200 mmol/L 的甘油, 可以生成约 170 mmol/L 的罗伊氏菌素, 与本研究的 K07 菌株产罗伊氏菌素的能力相近, 说明 K07 菌株具有产业化应用的潜质。

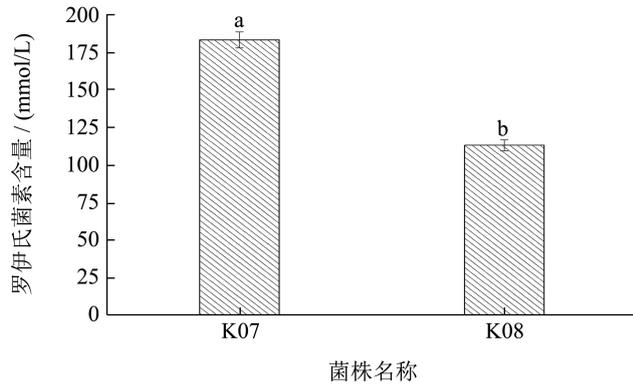


图 7 罗伊氏菌素含量

Fig.7 The content of reuterin

注: 字母表示两株菌产罗伊氏菌素的能力具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.9 全基因组分析

利用全基因组测序可以对相关菌株的遗传信息、生理功能和代谢途径有更深入的了解。因此对生长性能等各方面表现良好的罗伊氏粘液乳杆菌 K07 菌株进行全基因组测序。由表 2、3 可知, 罗伊氏粘液乳杆菌 K07 菌株的基因组全长 1 950 440 bp, 预测蛋白质编码基因 2 067 种, 可进行功能注释的基因 1 922 种, GC 含量 38.69%。K07 的基因组信息与已经报道的罗伊氏粘液乳杆菌标准菌株 DSM 20016 的基因组信息相符, 该标准株基因组全长 1 999 618 bp, 包含 1 900 种基因, GC 含量为 38.9%^[37]。赵玉杨对母乳中分离出

的罗伊氏粘液乳杆菌 B1-27 进行了全基因组测序, 发现共含有 2 024 个基因, 总长为 1 759 164 bp, 编码基因长度为 2 017 551 bp, 占全基因组的 87.19%, 结果与罗伊氏粘液乳杆菌 K07 的测序结果相近。当前已公布全基因组的罗伊氏粘液乳杆菌约有 12 株, 基因组大小在 1 900 000~2 950 000 bp 之间, GC 含量在 39% 左右^[38]。通过对比可知, K07 菌株符合罗伊氏粘液乳杆菌的特征。

2.9.1 耐药基因分析

评判一株菌是否能作为益生菌使用, 需要进行安全性评估。细菌产生耐药性, 通常是由基因突变或者通过获得耐药基因, 在表达后对相应的药物产生耐药性^[39]。使用 BLAST (v 2.2.28) 将 K07 基因蛋白序列与 CARD 数据库进行比对。从表 4 可以看到, K07 菌株预测到的抗性基因蛋白总个数为 25 个, 占基因蛋白总数的 1.30%。预测结果发现 K07 菌株主要对达托霉素、林可霉素、氨基香豆素和氟喹诺酮类抗生素有抗性。Alayande 等^[40]对罗伊氏粘液乳杆菌 PNW1 进行了耐药基因检测, 发现其具有对林可酰胺和四环素的耐药基因。Egervarn 等^[41]对罗伊氏粘液乳杆菌和植物乳杆菌中的耐药基因进行测定, 发现罗伊氏粘液乳杆菌具有四环素和红霉素的耐药基因。研究表明, 绝大多数的罗伊氏粘液乳杆菌携带有四环素类的耐药基因, 而 K07 菌株经耐药基因预测分析后, 发现其不含四环素类抗性基因。有研究者对植物乳杆菌 JDM1 的全基因组序列进行分析, 共发现 51 个抗性基因, 且这些基因大都不可转移^[42]。以上结果与本研究结果相似, 说明从自然界分离到的乳酸菌菌株, 部分会含有少量的抗性基因, 但相对稳定。

表 2 罗伊氏粘液乳杆菌K07的基因组拼接结果

Table 2 Genome splicing results of *Limosilactobacillus reuteri* K07

总测序长度/bp	拼接序列全长/bp	未知碱基数目	拼接序列平均长度/bp	N50 长度/bp	总 GC 含量/%	拼接序列总数
6 190 988	1 950 440	81	18 228.41	33 181	39	107

表 3 罗伊氏粘液乳杆菌K07的基因组预测结果

Table 3 Genomic prediction results of *Limosilactobacillus reuteri* K07

编码蛋白的基因数目	编码蛋白的基因长度/bp	编码蛋白的基因占比/%	编码蛋白平均基因长度/bp	GC 含量/%	rRNA 数目	可注释基因数目
2 067	1 713 713	87.86	829.08	38.69	5	1 922

表 4 耐药基因预测结果分析

Table 4 Analysis of drug resistance gene prediction results

耐药类别	耐药基因	耐药机制
达托霉素	<i>cls</i> (2)、 <i>pgsA</i> 、 <i>mprF</i>	改变细胞外膜 通透性
	<i>rpoC</i>	靶位结构改变
恩酰菌素、粉霉素、 莫西霉素、利福霉素	<i>EF-Tu</i>	靶位结构改变
磷霉素	<i>murA</i> (2)	靶位结构改变
氨基香豆素、 氟喹诺酮类	<i>gyrB</i> 、 <i>parE</i>	靶位结构改变
氟喹诺酮类	<i>parC</i> 、 <i>gyrA</i> 、 <i>arlR</i>	靶位结构改变
氨基香豆素	<i>alaS</i>	酶修饰
林可霉素	<i>lmrB</i> 、 <i>lsaA</i> (2)	外排泵
甲氧苄啶	<i>dfpA3</i>	靶位结构改变
多重耐药	<i>mdtG</i>	外排泵
大环内酯类	<i>macB</i> (2)	外排泵
万古霉素	<i>vanRM</i> 、 <i>vanRF</i>	靶位结构改变
链霉素	<i>rpsL</i>	靶位结构改变
利福霉素	<i>rpoB</i>	靶位结构改变

注：耐药基因括号内数字表示基因数目，未标注表示数目为1。

2.9.2 碳水化合物活性酶分析

碳水化合物活性酶 (Carbohydrate Active Enzymes, CAZymes) 参与了复杂碳水化合物和糖复合物的组装与分解^[43]，大部分来源于微生物和无脊椎动物。使用 HMMER3 将 K07 基因集蛋白序列与 CAZy 数据库进行比对，由图 8 可知，K07 菌株中糖基转移酶 (Glycosyl Transferases, GTs) 和糖苷水解酶 (Glycoside Hydrolases, GHs) 含量较多，与安晓娜对 34 株罗伊氏粘液乳杆菌的 5 大类碳水化合物活性酶分析结果一致，其中 GT 家族主要负责糖苷键的形成，GH 家族主要负责水解或重排糖苷键，且 K07 菌株与安晓娜分析的 34 株罗伊氏粘液乳杆菌均不含多糖裂解酶 (Polysaccharide Lyases, PLs)。由表 5 可知，罗伊氏粘液乳杆菌 K07 的 GT 家族中 GT2、GT4 数量相对较多，分别有 11 和 7 个。GT2 和 GT4 主要编码蔗糖合酶与纤维素合酶等酶类，跟蔗糖、脂多糖和纤维素合成有关。GH 家族中的 GH73 数量最多，有 4 个，主要负责编码溶菌酶类物质，跟细菌的抑菌能力有关^[44]。本研究的罗伊氏粘液乳杆菌 K07 与安晓娜分析的 11 株来源于发酵食品的罗伊氏粘液乳杆菌的编码碳水化合物

活性酶的基因预测结果类似，且 K07 菌株也分离自发酵产品，故推测相同环境分离的菌株为同源^[39]。

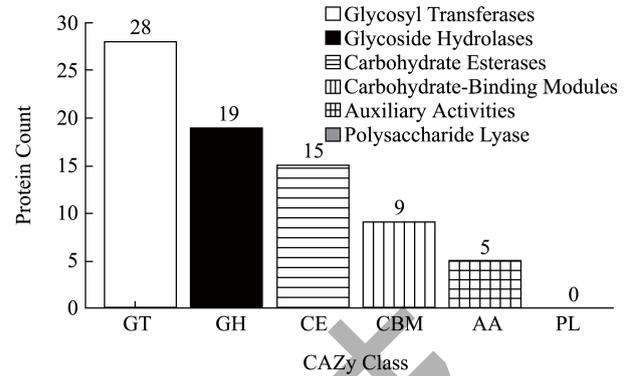


图 8 CAZy功能分类图

Fig.8 Function classification diagram of CAZy

表 5 罗伊氏粘液乳杆菌K07的GTs和GHs家族数量

Table 5 Numbers of GTs and GHs family for *Limosilactobacillus reuteri* K07

CAZy 家族	数量	类别	
GT2	11	GT	
GT4	7		
GT8	1		
GT19	2		
GT28	2		
GT32	1		
GT41	2		
GT51	2		
GH2	2		GH
GH4	1		
GH8	1		
GH13	2		
GH25	2		
GH36	2		
GH42	1		
GH43	1		
GH53	1		
GH65	1		
GH73	4		
GH109	1		

3 结论

本文从新疆昭苏县传统发酵乳酪中分离出两株罗伊氏粘液乳杆菌 K07、K08，对它们的益生特性研究发现，跟菌株 K08 相比，K07 在各方面表现优异。K07 菌株生长速度快，产酸耐酸性良好，能够耐

受模拟胃肠道环境的胁迫,存活率可达74.13%;对白色念珠菌和无乳链球菌的抑制能力强于K08菌株,K07对两株致病菌的抑菌圈直径分别为15.79 mm和19.31 mm。抗氧化活性方面,K07的无细胞提取物对DPPH自由基清除率达到42.39%,羟自由基清除率为15.69%,还原力为17.96%。基因测序显示K07基因全长1 950 440 bp,预测到的抗性基因蛋白总个数为25个,占基因蛋白总数的1.30%,对达托霉素、林可霉素等有一定的抗性;菌株中GTs和GHs含量相对丰富。综上所述,罗伊氏粘液乳杆菌K07具有优良的益生特性,为菌株应用及其产品开发提供了研究支撑。

参考文献

- [1] SEO Y, YOON Y, KIM S. Functionality and safety of probiotics [J]. Journal of Milk Science and Biotechnology, 2019, 37(2): 94-101.
- [2] 李正华. 罗伊氏乳杆菌生物学特性及功能性发酵乳的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [3] 鲁曦, 马雨哲, 李国花, 等. 健康婴儿粪便样本中罗伊氏乳杆菌的分离鉴定与体外益生特性初步研究[J]. 陕西科技大学学报, 2022, 40(3): 59-65.
- [4] 季施燕, 拾景梅, 赵虬旻, 等. 罗伊氏乳杆菌(息敏乐)辅助治疗儿童功能性便秘的多中心研究[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(2): 178-182.
- [5] SAVINO F, CORDISCO L, TARASCO V, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Pediatrics, 2010, 126(3): e526-e533.
- [6] SAVINO F, PELLE E, PALUMERI E, et al. *Lactobacillus reuteri* (American type culture collection strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study [J]. Pediatrics, 2007, 119(1): e124-e130.
- [7] 罗伊氏乳杆菌有助于消除幼儿夜啼长哭[J]. 中国食品, 2016, 18: 142.
- [8] 潘海博, 覃璐琪, 梅丽华, 等. 罗伊氏乳杆菌LTR1318的培养工艺优化[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 59-67.
- [9] 李金燕, 马新燕, 向蓉, 等. 罗伊氏菌素对产气荚膜梭菌的体外抑制作用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2023, 48(1): 29-34.
- [10] ASARE P T, GREPPI A, STETTLER M, et al. Decontamination of minimally-processed fresh lettuce using reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1421.
- [11] VIMONT A, FERNANDEZ B, AHMED G, et al. Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt [J]. Int J Food Microbiol, 2019, 289: 182-188.
- [12] LARANJO M, POTES M E, ELIAS M. Role of starter cultures on the safety of fermented meat products [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 853.
- [13] ASARE P T, ZURFLUH K, GREPPI A, et al. Reuterin demonstrates potent antimicrobial activity against a broad panel of human and poultry meat *Campylobacter* spp. Isolates [J]. Microorganisms, 2020, 8(1): 78.
- [14] HOU C, ZENG X, YANG F, et al. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2015, 6(1): 14.
- [15] 陈晓宇, 朱连勤, 陈甫, 等. 罗伊氏乳杆菌肽聚糖对蛋雏鸡生长性能、免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(9): 5741-5750.
- [16] 王腾斌, 李宝坤, 卢士玲, 等. 新疆传统发酵乳制品中产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选与益生特性研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(9): 55-63.
- [17] 高云云, 李宝坤, 卢士玲, 等. 新疆传统乳品中产胞外多糖乳酸菌的筛选及益生特性的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(5): 28-34.
- [18] GUO Z, WANG J, YAN L, et al. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains [J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(10): 1640-1646.
- [19] 黄玉军, 刘冬, 赵兰凤, 等. 6株人源乳酸菌体外抗氧化活性的比较[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1518-1522.
- [20] ZHANG S W. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(29): 5194-5201.
- [21] 杨静秋. 抗氧化乳酸菌的筛选及其对氧化损伤的CT-26细胞的保护作用[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [22] CIRCLE S J, STONE L, BORUFF C S. Acrolein determination by means of tryptophane. A colorimetric micromethod [J]. Ind Eng Chem Anal Ed, 2002, 4: 259-262.
- [23] 李婷, 汤继浪, 盛宣博, 等. 猪源罗伊氏乳杆菌GL001的分离与益生特性研究[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(7): 47-53.
- [24] POPOVIĆ M, STOJANOVIĆ M, VELIČKOVIĆ Z, et al. Characterization of potential probiotic strain, *L. reuteri* B2, and its microencapsulation using alginate-based biopolymers [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 423-434.
- [25] 张如春, 崔焕忠, 蔡熙姮, 等. 狐源罗伊氏乳杆菌ZJF036益生特性研究[J]. 动物营养学报, 2020, 32(8): 3819-3829.
- [26] 史晓萌, 陈建国, 李生有, 等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌CICC 6238的诱变选育及益生特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 71-77.
- [27] 苏艳君, 郑诗婷, 吴鹏, 等. 一株海洋源长枝木霉菌ST-27的发酵产物对无乳链球菌的抑制作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(11): 1918-1924.
- [28] 姜林娟, 郑志, 朱绍辉, 等. 益生菌植物乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、罗伊乳杆菌对医院常见致病病原菌的抑菌作用[J]. 新乡医学院学报, 2022, 39(6): 501-506.

- [29] 张悦,贺银凤,顾悦,等.高产生物膜乳酸菌抗逆性及其抗氧化特性[J].农业工程学报,2021,37(6):282-288.
- [30] 解文利,吴雨炯,白雪,等.四川传统泡菜中乳酸菌的分离鉴定及抗氧化评估[J].食品与发酵科技,2022,58(1):35-41.
- [31] 刘少敏.不同乳酸菌抗氧化能力比较及其机制的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2015.
- [32] 邹思博,赵明伟,纪超凡,等.自然发酵东北酸菜中抗氧化乳酸菌的筛选及其益生性研究[J].食品安全质量检测学报,2023,14(1):42-50.
- [33] 王小鹏,闫爽,高亚欣,等.人源乳酸菌的筛选鉴定及抗氧化活性研究[J].中国乳品工业,2022,50(6):16-21.
- [34] 万心怡,徐学明,吴凤凤.罗伊氏乳杆菌产罗伊氏细菌素的工艺优化[J].食品与生物技术学报,2019,38(11):63-69.
- [35] BELL H N, REBERNICK R J, GOYERT J, et al. Reuterin in the healthy gut microbiome suppresses colorectal cancer growth through altering redox balance [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(2): 185-200.
- [36] LÜTHIP Q, SCHÄRER S, PU H Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60: 73-80.
- [37] SMYTHE P, EFTHIMIOU G. In silico genomic and metabolic atlas of *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016: an insight into human health [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1341.
- [38] 赵玉杨.母乳益生菌筛选及发酵应用研究[D].大连:大连工业大学,2020.
- [39] 安晓娜.不同来源罗伊氏乳杆菌基因组特征研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2020.
- [40] ALAYANDE K A, AIYEGORO O A, NENGWEKHULU T M, et al. Integrated genome-based probiotic relevance and safety evaluation of *Lactobacillus reuteri* PNW1 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e235873.
- [41] EGERVARN M, ROOS S, Lindmark H. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum* [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(5): 1658-1668.
- [42] 张彦位,杨玲,路江浩,等.乳酸菌全基因组测序的应用进展[J].食品工业科技,2022,43(15):444-450.
- [43] NGUYEN S, FREUND H L, KASANJIAN J, et al. Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(4): 1629-1637.
- [44] AMBROGI V, BOTTACINI F, O'SULLIVAN J, et al. Characterization of GH2 and GH42 beta-galactosidases derived from bifidobacterial infant isolates [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 9.