

# 内蒙古传统乳制品中乳酸菌的分离鉴定及耐酸性能研究

邢良英, 陈琳, 侯保朝, 李言郡\*

(杭州娃哈哈集团有限公司, 浙江省食品生物工程重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** **目的** 筛选耐酸能力强、能耐受人体胃肠环境在肠道中存活的乳酸菌菌株。**方法** 对采集自内蒙古地区牧民家庭中45份传统乳制品中的乳酸菌进行分离和纯化, 共分离出104株乳酸菌, 并进行形态观察、碳水化合物代谢分析、16S rDNA序列分析、高通量耐酸性优良菌株的筛选和人工胃液耐受性分析等的研究。**结果** 本研究共筛选到8株耐人工胃液极佳的乳酸菌, 经鉴定这些菌株为4株 *Lactobacillus plantarum*(WHH727、WHH730、WHH777和WHH1118)、3株 *Lactobacillum fermentum*(WHH734、WHH778和WHH868)和1株 *Lactobacillus acidophilus*(WHH729)。其中, 耐人工胃液最佳的是 *L. fermentum* WHH734, 经pH为1.5的人工胃液处理2h, 存活率在86.32%, 经pH为2.5的人工胃液处理2h后, 存活率为96.85%。**结论** 菌株的分离鉴定以及高耐酸性菌株的筛选, 对我国益生菌资源的保藏和开发有重要的意义。

**关键词:** 乳酸菌; 鉴定; 16S rDNA序列分析; 高通量; 耐酸性; 人工胃液

## Isolation, identification and acid tolerance of acid-tolerant lactic acid bacteria from traditional milk product in Inner Mongolia

XING Liang-Ying, CHEN Lin, HOU Bao-Chao, LI Yan-Jun\*

(Key Laboratory of Food and Biological Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

**ABSTRACT: Objective** To screen acid-tolerant lactic acid bacteria strains, which can tolerate gastroenteric environment and survive in human intestine. **Methods** A total of 104 strains of lactic acid bacteria were isolated and purified from 45 samples of traditional milk products in Inner Mongolia, which were conducted morphological, physiological, biochemistry test, 16S rDNA sequencing analysis, acid-tolerant test and artificial gastric juice resistance test. **Results** Totally 8 strains of lactic acid bacteria were screened to have excellent resistance in artificial gastric juice, in which 4 strains were identified as *Lactobacillus plantarum* (WHH727, WHH730, WHH777 and WHH1118), 3 strains were identified as *Lactobacillum fermentum* (WHH734, WHH778 and WHH868) and one strain was identified as *Lactobacillus acidophilus* (WHH729). Among that, *L. fermentum* WHH734 was the best strain for tolerance of artificial gastric juice. The survival rates were 86.32% in the screening experiment of resistance to the artificial gastric juice (pH 1.5, 2 h), and 96.85% at pH 2.5. **Conclusion** The isolation and identification of strains and screening of high acid-tolerant strains have very important significance to the preservation and exploitation of probiotic resource.

基金项目: 浙江省科技厅重点研发项目(2015C02SA100006)

**Fund:** Supported by the Key Research Projects of Science and Technology Department of Zhejiang Province (2015C02SA100006)

\*通讯作者: 李言郡, 高级工程师, 主要研究方向为食品饮料科学的研究。E-mail: lyj@wahaha.com.cn

\*Corresponding author: LI Yan-Jun, Senior Engineer, Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China. E-mail: lyj@wahaha.com.cn

**KEY WORDS:** lactic acid bacteria; identification; 16s rDNA sequence analysis; high-throughput; acid tolerance; artificial gastric juice

## 1 引言

益生菌对人类健康的作用最早是由俄罗斯科学家 Metchnikoff 提出的, 他认为肠道乳酸菌能够通过防止腐败菌的生长、调节肠道菌群平衡, 起到延年益寿的作用。益生菌具有调节肠道菌群平衡<sup>[1,2]</sup>, 预防胃肠道感染、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、预防食物过敏<sup>[4]</sup>、调节机体免疫、降胆固醇<sup>[5]</sup>及保护肝脏等功能。它对人体健康的作用越来越被大家认可, 但是只有当益生菌能够耐受胃酸和胆汁活着到达小肠, 才能起到抑制有害菌在肠内繁殖、促进肠道运动, 从而提高肠道机能、提高免疫力等作用<sup>[6]</sup>。然而, 益生菌在自然界中的存活率较低, 在经过消化道时, 由于胃液和胆汁的作用, 大多数益生菌的活性几乎丧失殆尽, 只有少部分能够活着达到小肠能起到很好的保健功能。因此, 能否顺利通过胃肠环境并定植于肠道是益生菌的重要筛选标准之一<sup>[7]</sup>。

本研究从内蒙古地区采集的 45 份传统发酵乳制品中, 分离纯化得到 104 株乳酸菌, 通过快速耐酸性能的筛选和人工胃液耐受性的研究, 筛选出耐酸性能优良的乳酸菌, 并通过形态观察、碳水化合物代谢分析和 16S rDNA 序列分析等方法, 对筛选到的优良菌株进行种属归类, 以期为今后益生菌的筛选及其在乳制品中的应用奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

样品来源于内蒙古 7 个地区牧民家庭中自然发酵的 45 份奶制品, 其中包括 20 份酸奶、10 份酸奶固体制品、6 份鲜奶、4 份发酵山羊奶和 2 份发酵骆驼奶。将牧民自然发酵的酸奶从其发酵容器中充分搅拌后, 用灭菌移液器吸取 1 mL 于事先装有 1 mL 50%甘油的 2 mL 采样管中, 拧紧螺旋帽; 或带上无菌手套, 用无菌镊子夹取 10 g 左右的固体奶制品于无菌袋中, 采样后, 立即装入含冰袋的保温袋中冷却, 带回实验室前确保暂存在较低的温度下, 回到实验室立即进行乳酸菌的分离和纯化, 剩余固体样品取 1 g 置于装有 1 mL 50%甘油的 2 mL 冻存管中, 与添加甘油的剩余样品保存在 -80 °C 超低温冰箱。

### 2.2 仪器与试剂

MRS 培养基(Oxoid); Elliker 培养基(Oxoid); PCR 引物由上海英俊生物科技有限公司合成; API 50 CHL 试剂盒(法国生物梅里埃有限公司); 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工); Premix Taq(大连宝生物有限公司); 胃蛋白酶(酶活力 1:10000, 美国 Sigma 公司)。

SG403A-HE-INT 生物安全柜(美国 Baker 公司); Binder kb400 恒温恒湿箱(德国 Binder 公司); Forma702 超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司); OLYMPUS BX41 显微镜(日本 OLYMPUS 公司); Bio-Rad 680 酶标仪(美国伯乐); Eppendorf 5417R 离心机(德国艾本德); HIRAYMA HV-110 高压灭菌锅(日本 HIRAYMA 公司); Eppendorf Masfercy cler PROS PCR 仪(德国艾本德); BIO-RAD GELDOC XR<sup>+</sup>凝胶成像系统(美国伯乐)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 乳酸菌的分离与纯化

将乳制品样品用 0.85%灭菌生理盐水做 10 倍系列逐级稀释, 选择  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  3 个稀释度, 分别吸取 100  $\mu$ L 稀释液于 1.5%碳酸钙的 MRS 平板和 1.5%碳酸钙的 Elliker 平板上涂布, 于 37 °C 培养箱中培养 36~48 h。根据菌落的颜色、大小、光泽度和透明程度, 挑取含溶钙圈的单菌落, 分别在 MRS 或 Elliker 固体培养基上反复划线分离, 直到分离到纯的单一菌落。进行革兰氏染色时, 镜检观察菌体颜色、大小、形状和排列方式, 同时进行过氧化氢酶实验, 将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的菌株初步认定为乳酸菌。同时用终浓度为 25%甘油冻存管进行菌株的保藏, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

#### 2.3.2 高通量耐酸性优良菌株筛选试验<sup>[9-11,15,16]</sup>

将分离纯化的 104 株乳酸菌和实验室耐酸性较好的 WHH544 接种到 MRS 液体培养基中, 接种量为 2%, 于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 连续活化 2 代后, 以 6000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀菌体用灭菌生理盐水洗涤、离心 2 次后, 通过麦氏比浊法调整菌悬液浓度为  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL。分别移取 1 mL 菌悬液于无菌的 1.5 mL 离心管中, 平行移取 3 份, 以 6000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 其中, 第一份离心管添加 1 mL pH 2 的 MRS 液体培养基, 第二份添加 pH 3 的 MRS 液体培养基, 第三份添加 pH 6.5 的 MRS 液体培养基做对照, 37 °C 培养箱中培养 2 h; 培养结束后立即以 10000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 沉淀菌体用灭菌生理盐水洗涤、离心 2 次, 最后各添加 1 mL pH 6.5 的 MRS 液体培养基, 37 °C 培养箱中培养 16 h, 分别取 100  $\mu$ L 培养液于 96 孔板中, 于 600 nm 处进行 OD 值的测定。

$$\text{pH2存活率}\% = \frac{\text{OD}_{(\text{pH}2.2\text{h}+16\text{h})} - \text{OD}_0}{\text{OD}_{(\text{pH}6.5\text{MRS}2\text{h}+16\text{h})} - \text{OD}_0} \times 100\%$$

$\text{OD}_0$ : 空白对照 MRS 培养液的 OD 值;

$\text{OD}_{(\text{pH}2.2\text{h}+16\text{h})}$ : pH 2 的 MRS 培养液处理 2 h 后的菌体添加 pH 6.5 的 MRS 培养液培养 16 h 后的 OD 值(第一份);

$OD_{(pH\ 6.5MRS,2\ h+16\ h)}$ : pH 6.5 的 MRS 培养液处理 2 h 后的菌体添加 pH 6.5 的 MRS 培养液培养 16 h 后的 OD 值(第三份)。

### 2.3.3 模拟人工胃液试验

人工胃液的配制依照中华人民共和国药典 2010 年版附录<sup>[8]</sup>。将耐酸性最佳的 8 株菌接种到 MRS 液体培养基中,接种量为 2%,于 37 °C 培养箱中培养 24 h,连续活化 2 代后,于 4 °C、6000 r/min 下离心 10 min,收集菌体,生理盐水洗涤 2 次后重悬于无菌水中,再以 2% 的接种量接种于 pH 1.5 和 pH 2.5 的模拟人工胃液中<sup>[9-11]</sup>,于 37 °C 培养 0、0.5、1 和 2 h 后取样,采用平板计数法进行活菌数的分析,计算各个菌株的存活率<sup>[12]</sup>。

$$\text{存活率}\% = \frac{\text{人工胃液处理}n\text{h后活菌数(CFU/mL)}}{\text{人工胃液处理}0\text{h后活菌数(CFU/mL)}} \times 100\%$$

### 2.3.4 碳水化合物代谢分析

将分离纯化得到且耐酸性极佳的 8 株乳酸菌接种于 MRS 液体培养基中,接种量为 2%,于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后,采用梅特勒 API 50 CHL 试剂盒对不同种类的碳水化合物进行生化反应,分别在发酵后 24 h 和 48 h 观察颜色的变化,由紫色变为黄色时,结果为阳性。

### 2.3.5 16S rDNA 序列分析

将耐酸性最佳的 8 株乳酸菌接种于 10 mL MRS 液体培养基中,于 37 °C 培养箱中培养 16 h,连续活化 2 代后进行 DNA 的提取,采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取乳酸菌总的 DNA。并利用细菌通用引物对<sup>[13]</sup>27f/1492r (27f, 5'-AGA GTT TGATCCTGGCTCAG-3'; 1492r, 5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3'),进行乳酸菌 16S rDNA 扩增,获得约 1.5 kb 的片段。PCR 标准反应体系(50 μL),其中包括:正反引物各 1 μL (10 μmol/L),模板 DNA 1 μL,预混液 25 μL,超纯水 22 μL,PCR 扩增程序为:95 °C,5 min;98 °C,30 s,55 °C,30 s,72 °C,100 s,30 次循环;72 °C,10 min,4 °C 保温。将 PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段长度约 1500 bp 后的阳性产物直接送上海英俊生物技术有限公司进行序列测定。

## 3 结果与分析

### 3.1 乳酸菌的分离纯化

本研究从内蒙古地区采集的 45 份样品中,总共分离纯化得到 104 株菌,其中杆菌 74 株,球菌 30 株。该 104 株菌均无芽孢、革兰染色阳性、过氧化氢酶试验阴性、且都具有溶钙圈,活力强,单菌落转接到液体培养液中培养 24 h,活菌数大于 10<sup>8</sup> CFU/mL,部分大于 10<sup>9</sup> CFU/mL。

### 3.2 高通量耐酸性优良菌株筛选试验

Berrada 等<sup>[14]</sup>报道食物在胃中的排空时间约为 1~2 h,胃液 pH 的大小根据饮食结构不同而波动很大,空腹或食用酸性食品可达 1.5,最低可达 1.5,刚用餐完时胃内 pH 约

为 3.0。因 pH 1.5 酸性很强,很多乳酸菌都耐受不住,所以为了更好地筛选到耐酸性较好的乳酸菌,且使菌株耐酸性呈现一定的梯度,本实验选取 pH 2 和 pH 3 两个梯度进行菌株耐酸性的筛选。

传统耐酸性筛选,都是选择平板稀释计数法进行活菌数分析和存活率计算,该方法工作量大,费时费力,不利于大批量的筛选。本研究结合现有文献<sup>[9-11,15,16]</sup>进行了方法的改良,首次建立了高通量耐酸性优良菌株的筛选,不直接使用平板计数法进行活菌数的分析,而将处理好的样品转接到 MRS 培养液中,培养 16 h 后进行培养液 OD 值测定,从而间接测得原处理样品中的活菌数。改良后的方法工作量小,操作方便,简短实验时间,省时省力,适合大批量的筛选。

本研究 104 株乳酸菌耐酸性筛选结果见表 1。由表 1 可知,在 pH 2 的 MRS 培养液中处理 2 h,存活率高于本实验保存的耐酸性较好的 WHH544 菌株的有 27 株,占筛选总数的 25.96%;在 pH 3 的 MRS 培养液中处理 2 h,存活率高于 WHH544 菌株有 17 株,占筛选总数的 16.34%;其中,在 pH 2 的条件下处理 2 h,存活率高于 90%,且在 pH 3 的条件下处理 2 h,存活率高于 100% 的菌株有 8 株,该 8 株乳酸菌耐酸性极佳,将做进一步的耐人工胃液的研究。另外耐酸性较好的乳酸菌,在 pH 2 的条件下处理 2 h,存活率高于 70%,且在 pH 3 的条件下处理 2 h,存活率高于 80% 的菌株都值得做进一步的研究。

### 3.3 模拟人工胃液试验

益生菌必须以活菌的形式到达肠道并达到一定浓度才能发挥其益生功能<sup>[17]</sup>。从口腔到肠道过程中,益生菌首先必须以活菌状态通过胃才有可能进入肠道<sup>[18]</sup>。由表 2 可知,8 株菌在人工胃液中的耐受性都较好,在 pH 1.5 人工胃酸处理后,除 WHH729 外其他菌株活菌数下降均小于 3 lg 值,即存活率大于 0.1%(10<sup>-3</sup>);在 pH 2.5 人工胃酸处理后,除 WHH729 和 WHH778 外其他菌株活菌数下降均小于 2 lg 值,即存活率大于 1%(10<sup>-2</sup>);该 8 株菌株耐人工胃液最好的是 WHH734, pH 1.5 的存活率为 86.32%, pH 2.5 的存活率为 96.85%。

### 3.4 乳酸菌的碳水化合物代谢分析

乳酸菌的碳水化合物代谢分析中,采用 API 50 CHL 试剂盒对 8 株乳酸菌进行了分析,由表 3 可知,6 株菌为乳杆菌,其中 WHH727、WHH730、WHH734 和 WHH778 为植物乳杆菌,WHH729 为嗜酸乳杆菌,WHH868 为类干酪乳杆菌;另外,WHH777 和 WHH1118 未能鉴定出结果。碳水化合物代谢分析结果,不仅可结合分子技术在种甚至亚种水平上进行菌株鉴定,也可为高密度培养培养基优化中碳源研究做参考,如 WHH1118 不利用乳糖,在高密度碳源研究时就不需要考虑。

表 1 乳酸菌耐酸性实验结果( $n=3$ )  
Table 1 Screening experiment of lactic acid bacteria for acid tolerance ( $n=3$ )

菌株 编号	存活率		菌株 编号	存活率		菌株 编号	存活率	
	pH 2, 2 h	pH 3, 2 h		pH 2, 2 h	pH 3, 2 h		pH 2-2 h	pH 3-2 h
WHH544	74.86±5.23	101.72±8.25	WHH782	18.32±1.25	79.72±2.25	WHH956	80.13±3.25	90.16±5.25
WHH675	25.14±1.52	95.38±5.45	WHH784	15.13±1.02	88.23±5.33	WHH994	8.23±0.56	82.79±4.25
WHH676	18.21±1.79	38.95±2.25	WHH785	4.21±0.38	80.12±2.23	WHH997	84.63±2.24	97.91±5.86
WHH678	5.12±0.50	25.98±1.55	WHH786	21.23±1.25	78.51±2.58	WHH998	20.07±1.25	75.22±3.25
WHH679	45.26±2.29	90.26±4.58	WHH787	25.12±1.25	54.21±5.04	WHH1000	83.45±3.29	83.05±4.12
WHH680	28.37±1.57	85.76±6.28	WHH788	88.12±5.58	95.13±4.21	WHH1002	87.82±3.28	88.83±4.44
WHH681	10.28±0.98	15.67±1.05	WHH789	2.58±0.15	23.12±1.23	WHH1003	14.63±1.02	19.41±1.02
WHH682	20.12±1.96	49.98±3.55	WHH791	12.15±0.88	24.58±1.24	WHH1004	19.06±1.03	77.10±3.55
WHH684	50.31±3.97	90.23±7.88	WHH792	33.69±0.98	87.21±2.58	WHH1005	16.83±1.22	71.50±3.22
WHH685	22.78±1.24	85.76±6.55	WHH795	88.15±3.22	98.13±5.55	WHH1006	64.04±3.25	82.42±4.12
WHH686	50.23±4.05	100.23±8.89	WHH824	28.37±2.02	56.23±3.59	WHH1007	83.30±2.44	98.51±4.55
WHH688	58.67±5.21	88.59±7.22	WHH825	25.12±1.59	88.17±5.12	WHH1034	13.20±1.02	15.61±1.02
WHH689	23.94±2.02	84.39±3.55	WHH827	23.15±1.23	70.23±2.25	WHH1035	80.15±2.25	89.62±5.22
WHH690	77.38±6.42	98.12±6.22	WHH828	5.23±0.42	10.90±0.55	WHH1036	88.26±5.89	91.39±4.33
WHH692	28.61±1.55	78.25±3.24	WHH841	12.59±1.09	38.12±1.55	WHH1037	10.40±0.56	27.12±1.85
WHH694	33.41±3.02	69.24±5.25	WHH860	27.79±2.05	28.70±1.02	WHH1039	23.42±1.23	28.46±1.45
WHH727	103.24±7.86	102.49±7.88	WHH861	61.46±3.58	107.75±5.89	WHH1040	19.46±1.88	101.29±8.78
WHH728	51.34±4.51	97.50±3.22	WHH863	26.19±1.28	97.36±6.23	WHH1100	19.65±1.02	91.40±5.22
WHH729	100.68±7.68	104.25±5.56	WHH864	26.07±1.55	26.98±1.88	WHH1101	22.17±1.22	86.36±3.66
WHH730	100.23±5.58	102.39±6.25	WHH866	19.98±1.02	62.66±3.58	WHH1106	34.14±2.55	73.61±4.21
WHH731	40.38±3.22	100.65±7.23	WHH867	21.48±2.00	77.14±1.25	WHH1107	13.78±1.04	23.35±1.56
WHH734	99.38±6.58	101.80±8.25	WHH868	95.06±8.25	103.24±8.99	WHH1108	31.36±2.33	100.81±7.88
WHH735	14.62±1.22	120.75±8.99	WHH869	92.97±6.33	92.98±4.78	WHH1112	81.55±4.51	94.43±5.66
WHH736	22.18±2.02	84.93±7.86	WHH871	25.60±1.22	100.27±5.98	WHH1114	84.05±2.89	88.97±4.56
WHH737	19.46±1.77	104.30±5.89	WHH890	89.12±2.88	91.50±4.32	WHH1115	83.85±5.33	85.82±4.25
WHH738	43.24±2.22	95.11±8.56	WHH891	45.29±3.22	95.23±8.27	WHH1116	15.79±1.22	80.42±3.85
WHH739	16.10±1.06	102.20±7.88	WHH892	25.13±1.23	88.23±6.22	WHH1117	21.83±2.01	70.66±2.55
WHH740	11.87±1.09	102.16±6.88	WHH923	24.82±2.05	103.78±8.99	WHH1118	93.25±3.88	107.19±5.98
WHH742	16.18±1.33	98.83±6.25	WHH924	33.53±2.33	34.81±2.33	WHH1119	89.23±5.61	106.05±5.12
WHH745	10.23±0.88	104.26±5.86	WHH926	88.23±5.66	98.83±5.25	WHH1120	23.75±1.22	89.75±3.58
WHH746	53.97±3.22	103.60±5.66	WHH927	80.16±2.33	90.83±5.23	WHH1125	15.97±1.25	82.25±2.55
WHH776	27.85±1.78	34.58±2.55	WHH929	24.56±0.98	80.12±2.22	WHH1145	8.23±0.25	25.13±1.22
WHH777	99.21±8.44	99.03±8.99	WHH931	20.13±1.25	50.32±3.25	WHH1147	12.75±0.78	98.32±4.33
WHH778	98.65±6.59	106.87±7.88	WHH933	8.24±0.25	18.92±1.09	WHH1154	27.12±1.45	90.87±4.22
WHH780	22.08±1.25	91.62±8.21	WHH945	18.55±1.23	44.33±3.15	WHH1155	48.86±2.15	95.72±3.56



续表 3

理化特性	WHH 727	WHH 729	WHH 730	WHH 734	WHH 777	WHH 778	WHH 868	WHH 1118
菊粉	-	-	-	-	-	+	+	-
D-松三糖	+	-	+	+	+	+	+	+
D-棉子糖	+	+	+	+	-	+	+	+
D-龙胆二糖	-	-	-	-	-	+	+	-
D-土伦糖	+	-	-	-	+	+	+	+
D-来苏糖	-	-	-	-	-	-	-	-
D-塔格糖	+	-	+	+	-	+	+	+
L-岩藻糖	-	-	-	-	-	-	-	-
L-阿拉伯醇	-	-	-	-	-	-	+	-
鉴定结果	植物 乳杆菌	嗜酸 乳杆菌	植物 乳杆菌	植物 乳杆菌	/	植物 乳杆菌	类干酪 乳杆菌	/
	99.10%	99.90%	99.90%	99.80%	/	99.90%	97.50%	/

-表示菌株不利用该碳水化合物; +表示菌株可利用该碳水化合物

### 3.5 乳酸菌的分子鉴定

采用细菌通用引物对 27f/1492r 对 8 株耐酸性最佳的乳酸菌进行 DNA 提取、PCR 扩增和测序, 将测得的 16S rDNA/rRNA 序列与 GenBank 数据中已知细菌的相应序列进行比较, 结果见表 4, 结合表 3 可知, 除 WHH730 和 WHH868 生化鉴定分别为植物乳杆菌和类干酪乳杆菌, 而分子鉴定分别为植物乳杆菌和发酵乳杆菌, 其余菌株两种鉴定结果均一致, 这表明生化分析结合分子技术可以很好地在种甚至亚种水平上进行菌株鉴定。本实验筛选到的耐胃酸特佳的都为乳杆菌, 分别为 4 株植物乳杆菌、3 株发酵乳杆菌和 1 株嗜酸乳杆菌, 这与文献报道的乳酸杆菌的耐酸性要强于乳酸球菌的耐酸性的结果相同。

表 4 乳酸菌同源性分析

菌株编号	同源性分析(%相似性)
WHH727	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (100%)
WHH729	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> (100%)
WHH730	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (100%)
WHH734	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> (100%)
WHH777	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (100%)
WHH778	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> (100%)
WHH868	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> (100%)
WHH1118	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (99%)

### 4 结 论

传统耐酸性菌株的筛选, 都是选择平板稀释计数法进行活菌数分析和存活率计算, 该方法工作量大, 费时费力, 不利于大批量的筛选。本研究结合现有文献<sup>[9-11,15,16]</sup>进行了方法改良, 首次建立了高通量优良耐酸菌的筛选方法, 该方法操作简便, 缩短了实验时间, 减少了工作量, 省时省力, 适合大批量的耐酸性菌株筛选。

本研究使用高通量耐酸性优良菌株的筛选方法, 从内蒙古传统乳制品样品分离的 104 株乳酸菌中, 筛选到耐酸性极佳的乳酸菌 8 株, 经过进一步的人工胃液耐受性验证, 7 株乳酸菌耐受 pH 1.5 人工胃液 2 h 的存活率大于 0.1%。该 8 株菌株耐受人工胃液最好的是 *Lactobacillus fermentum* WHH734, 耐受 pH 1.5 人工胃液的存活率为 86.32%, 耐受 pH 2.5 人工胃液的存活率为 96.85%, 是一株具有良好的益生菌开发潜力乳酸菌。

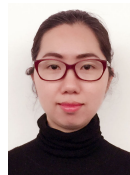
#### 参考文献

- [1] Yu J, Wang M, Zha SM, et al. Molecular identification and quantification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy foods of Russia [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(8): 5143-5154.
- [2] Huang RH, Tao XY, Wan CX, et al. In vitro probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 and its modulatory effect on gut microbiota of mice [J]. J Dairy Sci, 2015, 98(9): 5850-5861.
- [3] 董珂, 刘晶星, 郭晓奎. 益生菌增强机体免疫和抗肿瘤作用的分子机制[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(1): 80-82.  
Dong K, Liu JX, Guo XK. The molecular mechanism of probiotics to

- enhance immune function and anti-tumor effect [J]. *Chin J Microecol*, 2005, 17(1): 80–82.
- [4] Yu XM, Li SG, Yang D, *et al.* A novel strain of *Lactobacillus mucosae* isolated from a Gaotian villager improves in vitro and in vivo antioxidant as well as biological properties in d-galactose-induced aging mice [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 99(2), 903–914.
- [5] 江晓辉. 降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及降解机制的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2010.
- Jiang XH. Screening and characterization of cholesterol lowering lactic acid bacteria and research into the mechanism of degradation [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2010.
- [6] Daruo M. Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and antritions properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [J]. FAO/WHO, 2001: 903–920.
- [7] Hove H, Norgaard H, Mortensen PB. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract [J]. *Eur J Clin Nure*, 1999, 53(5): 339–350.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版(二部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 S.
- The state pharmacopoeia committee. The pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2010(2)[S]. BeiJing: China Medical Science Press, 2010: Appendix S.
- [9] 赵瑞香, 李元瑞, 孙俊良. 嗜酸乳杆菌在模拟胃肠环境中抗性的研究[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(2): 35–38.
- Zhao RX, Li YR, Sun JL. Studies on the antagonistic properties of *lactobacillus acidophilus* in the imitative gastroenteric enviroment microbiology [J]. *Microbiology*, 2002, 29(2): 35–38.
- [10] 辛玲, 郭本恒, 吴正钧. 3 株乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究[J]. *中国乳品工业*, 2005(5): 23–25.
- Xin L, Guo BH, Wu ZJ. Studies on the survival properties of three *lactobacillus* strains in imitative gastroenteric Environments [J]. *China Dairy Ind*, 2005, (5): 23–25.
- [11] 徐义刚, 催丽春, 赵丽丽. 重组鼠李糖乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2006, (6): 34–37.
- Xu YG, Cui LC, Zhao LL. Studies on the survival properties of recombinant *Lactobacillus rhamnosus* in imitative gastrointestinal environments [J]. *Chin J Microecol*, 2006, (6): 34–37.
- [12] Liang MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* stains [J]. *Dairy Sci*, 2005, 88: 55–66.
- [13] Mart F, Philippot L, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(5): 2354–2359.
- [14] Bernard M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126(3): 278–285.
- [15] 张颖, 周雨露, 柳翰凌, 等. 内蒙古牧区传统乳制品中耐酸及耐胆盐植物乳杆菌的筛选[J]. *乳业科学与技术*. 2007, 122(1): 21–22.
- Zhang Y, Zhou YX, Liu HL, *et al.* Screening of *Lactobacillus* tolerant to acid and bile salt in traditional milk product from pastur e of inner mongolia [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2007, 122(1): 21–22.
- [16] Jiang ML, Zhang F, Wan CX, *et al.* Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(3): 1736–1746.
- [17] 崔琴, 贡建民, 张丽, 等. 甘南州牧区优良乳酸菌耐受特性的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(3): 216–219.
- Cui Q, Yun JM, Hang L, *et al.* Study on the tolerance property of super LAB strains in pastoral area of Gannan Prefecture [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(3): 216–219.
- [18] 杨桂梅, 张永红, 苏娜, 等. 2 株猪源益生性肠球菌对酸和胆盐及热的耐受性研究[J]. *北京农学院学报*, 2008, 23(4): 29–32.
- Yang GM, Zhang YH, Su N, *et al.* Studies on acid bile salt and heat tolerance of two strains of *Enterococcus faecium* from swine [J]. *J Beijing Univ Agric*, 2008, 23(4): 29–32.

(责任编辑: 姚菲)

## 作者简介



邢良英, 工程师, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: liangyingxing@wahaha.com.cn, alicexingly@126.com

李言郡, 高级工程师, 主要研究方向为食品饮料科学研究。

E-mail: lyj@wahaha.com.cn