

雉鸡益生菌 MCm2 的分离及鉴定

王永红, 刘长建*, 李丽婷

(大连民族大学生命科学院, 大连 116600)

摘要: **目的** 从野雉鸡肠道得到的菌株 MCm2 并测试其益生活性。**方法** 通过形态、生理生化和 16S rDNA 序列分析鉴定菌株, 通过体外试验测试其益生性。**结果** 菌株在 pH 2.0 培养 2 h 后仍能达到 2.6×10^4 CFU/mL; 6 h 内, 加胆盐(0.3%~0.4%)对菌株生长量影响很小。经 16S rDNA 系统发育和 *recA* 基因特定片段分析, 菌株 MCm2 为植物乳杆菌。菌株 MCm2 培养 36 h 后, 乳酸含量为 24.7 $\mu\text{g/mL}$, 而 pH 值下降至 3.7。**结论** 植物乳杆菌 MCm2 具有益生作用添加到食品中的潜能。

关键词: 乳酸菌; 酸耐受性; 胆盐耐受性; 16S rDNA

Isolation and identification of probiotics MCm2 from *Phasianus colchicus*

WANG Yong-Hong, LIU Chang-Jian*, LI Li-Ting

(College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

ABSTRACT: Objective To isolated strain MCm2 from *Phasianus colchicums* and test its probiotics ability. **Methods** The strains were identified by morphological, physiological, biochemical and 16S rDNA sequence analysis, and its probiotics were tested by *in vitro* tests. **Results** The strain could still reach 2.6×10^4 CFU/mL after 2 h incubation at pH 2.0. Within 6 h, bile salt (0.3%–0.4%) had little effect on the growth of the strain. The strain MCm2 was identified as *Lactobacillus plantarum* by 16S rDNA phylogeny and specific fragment analysis of *recA* gene. After 36 h incubation of strain MCm2, the lactic acid content was 24.7 $\mu\text{g/mL}$, and the pH decrease to 3.7. **Conclusion** *Lactobacillus plantarum* MCm2 has the potential to be added to foods as probiotics.

KEY WORDS: lactobacillus; acid tolerance; bile tolerance; 16S rRNA

1 引言

研究表明肠道菌群的组成可能在维持肠道内稳态中发挥关键作用^[1]。肠道中的益生菌群如乳酸菌能促进营养吸收生长, 调节胃肠道的菌群结构平衡, 降低血清的胆固醇从而减少心血管疾病的发病率^[2-5], 消除人体内的自由基从而具抗衰老、延年益寿的作用, 以及提高机体免疫力

等功能^[6,7]。乳酸菌作为益生菌能在结肠存活, 必须应对整个胃肠道特定的挑战^[8-10]。因此乳酸菌必须具有特定的防御机制来耐受胃肠道的酸和胆盐, 其中包括胃液中的低 pH 值和小肠中的胆汁盐等^[11]。

为更易从其肠道分离到具有益生功能的乳酸菌, 本研究以未经人工喂养的野生雉鸡为研究对象, 并对功能菌

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070005), 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(DC201501085), 辽宁省大学生创新创业训练计划项目(201812026420)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070005), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (DC201501085) and Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Liaoning Province (S201612026016)

***通讯作者:** 刘长建, 高级工程师, 主要研究方向为应用微生物。E-mail: lcj@dlnu.edu.cn

***Corresponding author:** LIU Chang-Jian, Senior Engineer, College of Life Science, Dalian Minzu University, No. 18 Liaohe West Road, Jinzhou New District, Dalian 116600, China. E-mail: lcj@dlnu.edu.cn

株进行了耐酸、耐胆盐测试,以期该菌株能作为益生菌应用于食品加工等行业中。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

实验材料为市场购买的野生雏鸡盲肠内容物;MRS 培养基(德国 Merck 公司);L-乳酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)。

LC-20AD 高效液相色谱仪、UV-2450 分光光度计(日本岛津公司);Freezone 4.5 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);CF15RX 高速冷冻离心机(日本日立公司);UGC-12M 氮吹仪(必和国际公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 乳酸菌的分离、筛选

现宰杀的雏鸡,取盲肠内容物。稀释平板筛选过氧化氢酶阴性、革兰氏阳性的菌株。从盲肠样品中共分离出了 20 株菌株,其中接触酶阴性的菌株 14 株,经过胆固醇降解测试,菌株 MCm2 降解率最高。

2.2.2 产酸能力的测定、耐酸试验以及胆汁耐受试验

对菌株 MCm2 液体培养进行 36 h 的连续监测,每隔 4 h 取样测菌体干重,以及发酵液 pH 值和高效液相色谱法(柱子 Aminex HPX-87H)测定乳酸的含量。液相条件:柱子为 300 mm×7.8 mm 氢型柱,流动相为 0.02 mol/L 硫酸,流量 1.0 mL/min,柱箱温度 40 °C,检测器为紫外检测器,检测波长 210 nm。

将活化菌液按体积 10%接种于 pH 2 的 MRS 培养基,37 °C 静置,每隔 0.5 h 平板计数,平行 3 次^[12]。超声 5 s 可防止细胞链状。按体积 1%接种量分别接入 MRS 培养基(含 0.3%、0.4%牛胆盐),37 °C 培养,测菌液的 620 nm OD 值,平行 3 次^[13]。

2.2.3 乳酸菌的分离及多相鉴定

观察菌株 37 °C 恒温培养 48 h 后的菌落特征和菌体的显微特征,进行多项生理生化试验。对其 16S rRNA 的 PCR 产物进行测序。利用 Blast 程序与 NCBI 数据库中的序列进行比对分析,结合 EzBioCloud 网的比对结果。并从 SPLN

查找相关种的 16S rRNA 序列,与菌株 MCm2 一起利用 MEGA5.0 软件的邻接法,采用 Kimura-2 参数模型进行系统发育树的构建。

3 结果与分析

3.1 菌株 MCm2 的 pH 值和乳酸产量随生长量变化

如图 1 所示,随着培养时间的增加,乳酸菌 MCm2 菌体干重和乳酸产量呈正相关,而与 pH 值呈负相关。4~16 h 内,随着菌体的快速增加,乳酸浓度呈迅速增加的趋势,而发酵液 pH 值迅速下降;16 h 后,菌株生长较缓慢,乳酸产量增加趋势也放缓,pH 值下降趋势也相对缓慢;36 h 乳酸含量达到 24.7 μg/mL 而 pH 值达到最低值 3.7。

3.2 菌株 MCm2 的耐胆盐测定和耐酸测定

从图 2 可以看出,乳酸菌 MCm2 在含不同浓度胆盐的培养基中均能生长。6 h 前,菌株在 MRS、0.3%胆盐和 0.4%胆盐的培养基中生长情况相差不大,只是在 0.3%胆盐和 0.4%胆盐的培养基中的菌体含量略低于 MRS,抑制作用略强,但抑制差别不明显。6 h 后,菌株在 MRS 培养基中生长迅速,而在 0.3%胆盐和 0.4%胆盐的培养基中生长缓慢,且胆盐浓度大,抑制作用稍大一些。如表 1 所示,菌株在 pH 2 液体 MRS 培养基处理 1 h 后,活细胞数量从 2.3×10^5 CFU/mL 增加到 4.9×10^5 CFU/mL。但 2 h 及以后,活菌数下降为 2.6×10^4 CFU/mL,说明该菌株对低 pH 值有一定耐受性。

3.3 乳酸菌 MCm2 的多相鉴定

3.3.1 菌株 MCm2 的形态鉴定和生理生化特性

在 MRS 液体培养基中,菌株 MCm2 大量生长在试管底部,菌液浑浊,兼性厌氧特性明显。MCm2 菌落直径小于 1 mm,表面光滑湿润,圆形边缘整齐,光滑,易挑取,菌落为白色;菌株经革兰氏染色后,菌体细胞均呈紫色,可判定菌株均为 G⁺,为杆状菌。菌株 MCm2 接触酶阴性,在 10 和 45 °C 均能生长,能耐受 6.5%和 18%的 NaCl,但不能水解淀粉、甘油,V-P 试验、精氨酸产氨试验阴性。该菌株能利用多数糖进行发酵产酸,但不能利用鼠李糖、木糖、松三糖和阿拉伯糖进行发酵产酸(见表 2)。

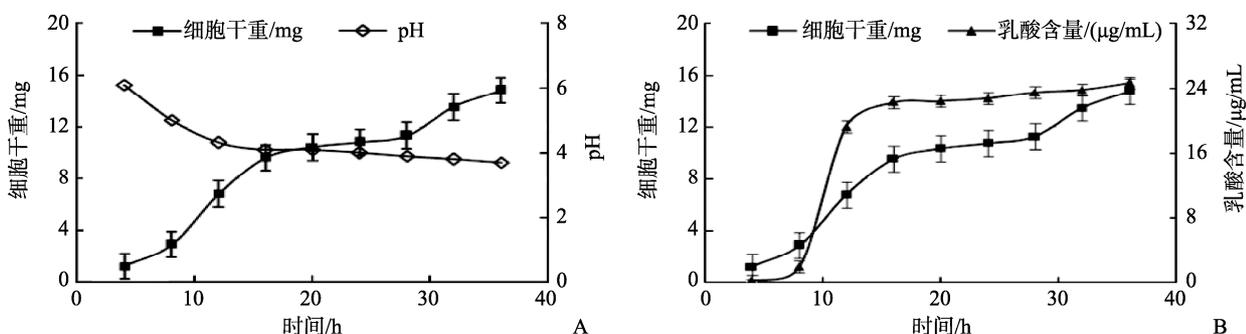


图 1 菌株 MCm2 生长量与发酵液 pH 值(A)和乳酸产量(B)的关系($n=3$)

Fig.1 The relationship of strain MCm2 growth and pH (A), lactic acid concentration (B) ($n=3$)

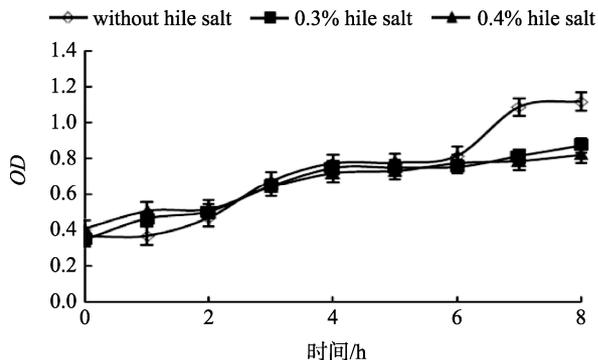


图 2 胆盐对菌株 MCm2 生长的影响(n=3)
Fig.2 Effect of bile salt on viability of strains MCm2 (n=3)

表 1 低 pH 值(2.0)对菌株 MCm2 生存的影响
Table 1 Effect of low pH (2.0) on viability of strains MCm2

	活细胞计数/(CFU/mL)				
	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
MCm2	2.3×10^5	2.9×10^5	4.9×10^5	6.0×10^4	2.6×10^4

3.3.2 乳酸菌的分子生物学鉴定

从菌株 MCm2 扩增的序列在 GenBank 的登录号为 KR078348。通过 Blast 程序与数据库中序列进行比对, 根据 16S rRNA 序列与亲缘关系近菌株的系统发育分析(图 3), 发现菌株 MCm2 与 *L. paraplantarum*、*L. plantarum*、*L. pentosus* 等菌株的 16S rDNA 同源性都大于 99.8%, 属于 *Lactobacillus plantarum* group。但其与 *L. pentosus*、*L. plantarum* 和 *L. paraplantarum* 系统发育树分析也显示这 3 个种之间很难区分。而 *recA* 对于 *L. plantarum* group 的特异性较高, 按照 Torriani 的方法, 菌株 MCm2 的 PCR 产物

约为 318 bp(电泳图未显示); 而且结合菌株的形态特征、生理生化特征, 比如不能利用阿拉伯糖、核糖、鼠李糖和木糖等碳源, 而 *L.pentosus* 均能利用这几种糖产酸, 可鉴定菌株 MCm2 是 *L. plantarum*^[14]。

表 2 菌株 MCm2 的生理生化特性
Table 2 Physiological characteristics of stain MCm2

试验项目	结果	试验项目	结果
10 °C	+	6.5%NaCl	+
45 °C	+	18%NaCl	+
过氧化氢酶	-	七叶红素的分解	+
V-P test	-	明胶分解	-
H ₂ S	-	精氨酸二水解酶	-
淀粉	-	山梨醇	+
葡萄糖	+	果糖	+
甘露糖	+	麦芽糖	+
蔗糖	+	半乳糖	+
乳糖	+	甘露醇	+
扁桃体	+	阿拉伯糖	-
苦杏仁苷	-	棉子糖	+
鼠李糖	+	蜜二糖	+
海藻糖	+	水杨苷	+
木糖	-	松三糖	-
纤维二糖	+	甘油	-

注: “+”表示细菌在该条件下能生长;“-”表示细菌在该条件下不生长。

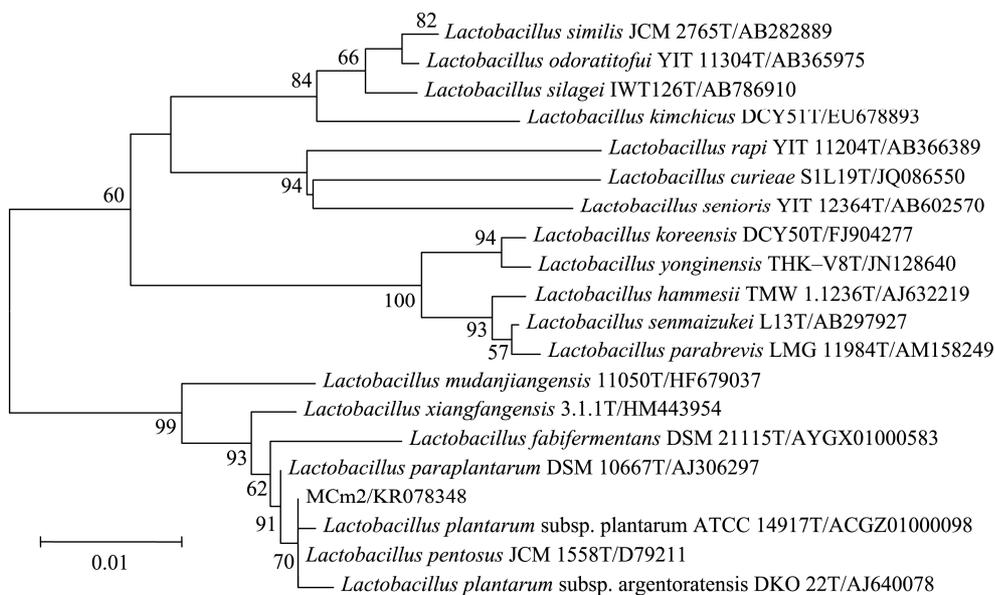


图 3 菌株 MCm2 和参比菌株的 16S rDNA 同源性的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree based 16S rRNA sequences similarity of strain MCm2 and the reference strains

4 结论与展望

乳酸菌是一类对人体有益的益生菌,本研究从动物源鸡肠道分离到1株乳酸菌MCm2,通过菌落、细胞形态、生理生化特征,以及16S rRNA的序列分析和recA片段的扩增特征,可以鉴定该菌株为*Lactobacillus plantarum*。植物乳杆菌MCm2作为微生物制剂要进入人体,就要求其能够抵御消化道的抑菌作用,比如耐受胃肠道的低pH值和小肠中的胆汁盐等。实验结果表明菌株MCm2生长时能产生大量乳酸,其含量随菌体生长量的增加而增加,而发酵液pH值不断下降;菌株MCm2在低pH值(2.0)MRS培养基中菌体数虽先增加后减少,2h活菌数仍能达到 10^4 CFU/mL以上。Ding等^[15]研究的嗜酸乳杆菌和唾液乳杆菌经同样处理,活菌数为 10^4 CFU/mL。菌株发挥主要作用的位置是小肠,而菌株MCm2具有较强的胆盐耐受能力,6h内菌株MCm2生长没受胆盐抑制。菌株MCm2为益生菌制剂的研制提供了研究基础,也可以作为益生菌和发酵剂应用于微生态制剂、保健食品以及发酵食品的工业生产中。

参考文献

- [1] Omar JM, Chan YM, Jones ML, *et al.* *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus amylovorus* as probiotics alter body adiposity and gut microflora in healthy persons [J]. *J Func Food*, 2013, 5(1): 116–123.
- [2] Scicchitano P, Cameli M, Maiello M, *et al.* Nutraceuticals and dyslipidaemia. Beyond the common therapeutics [J]. *J Func Food*, 2014, 6(1): 11–32.
- [3] Chen ZY, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(19): 8761–8773.
- [4] Brautbar A, Ballantyne CM. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(5): 253–265.
- [5] Ishimwe N, Daliri EB, Lee BH, *et al.* The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(1): 4–105.
- [6] Foley KA, Simpson RJ, Crouse JR. Effectiveness of statin titration on low-density lipoprotein cholesterol goal attainment in patients at high risk of atherogenic events [J]. *Am J Cardiol*, 2003, 92(1): 79–81.
- [7] Andrews TC, Ballantyne CM, Hsia JA. Achieving and maintaining National Cholesterol Education Program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins [J]. *Am J Med*, 2001, 111(3): 185–191.
- [8] Ruiz L, Margolles A, Sanchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [J]. *Microb Physiol Metabol*, 2013, 12(4): 396–404.
- [9] Sanchez B, Ruiz L, Gueimonde M, *et al.* Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2012, 26(1): 56–63.
- [10] Sanchez B, Ruiz L, Gueimonde M, *et al.* Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences [J]. *Pharm Res*, 2013, 69(1): 127–136.
- [11] Islam KB, Fukiya S, Hagio M, *et al.* Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1773–1781.
- [12] Fatemeh M, Mutamed A, Frank S, *et al.* Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: An *in vitro* investigation [J]. *J Funct Food*, 2014, (9): 295–305.
- [13] Pereira DI, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4689–4693.
- [14] Ni K, Wang Y, Li D, *et al.* Characterization, identification and application of lactic acid bacteria isolated from forage paddy rice silage [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121967.
- [15] Ding WK, Shah NP. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria [J]. *Food Microbiol Saf*, 2007, 72(9): 446–450.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



王永红, 主要研究方向益生菌乳酸菌的功能评价。

E-mail: 1192359480@qq.com



刘长建, 工程师高级, 博士, 主要研究方向应用微生物。

E-mail: lcj@dlnu.edu.cn