

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.01.023

高芫超, 肖爱波, 王成, 等. 水开菲尔和水开菲尔粒细菌多样性分析及乳酸菌分离鉴定[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(1): 182-189.

GAO Y C, XIAO A B, WANG C, et al. Bacterial diversity analysis of water kefir and water kefir granules and isolation and identification of lactic acid bacteria [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(1): 182-189.

水开菲尔和水开菲尔粒细菌多样性分析及乳酸菌分离鉴定

高芫超, 肖爱波, 王成, 王天琪, 于冰, 许云贺, 张莉力✉

(锦州医科大学 食品科学与工程学院, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 采用高通量测序技术结合平板菌落计数法, 检测分析水开菲尔及其发酵剂水开菲尔粒的细菌区系。以自然发酵的水开菲尔和水开菲尔粒为样品筛选益生菌, 并通过个体、群体形态观察、生理生化实验和 16S rDNA 序列分析鉴定筛选出的益生菌。结果表明: 乳酸菌是两种样品中的优势菌; 无论是水开菲尔还是水开菲尔粒, 厚壁菌门和变形菌门均为优势菌门, 乳杆菌属和醋杆菌属均为优势菌属, 水开菲尔粒的细菌多样性和丰富度均高于水开菲尔; 共筛选出 7 株耐酸耐胆盐具有潜在益生性的乳酸菌, 鉴定结果为 4 株发酵乳杆菌、1 株副干酪乳杆菌、1 株哈尔滨乳杆菌、1 株红条乳杆菌, 分别命名为 *Lactobacillus fermentum* cc4、*Lactobacillus fermentum* cc8、*Lactobacillus fermentum* cc9、*Lactobacillus fermentum* cc22、*Lactobacillus paracasei* cc1、*Lactobacillus harbinensis* cc5、*Lactobacillus satsumensis* cc12。

关键词: 水开菲尔; 水开菲尔粒; 高通量测序; 细菌多样性; 乳酸菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)01-0182-08

Bacterial Diversity Analysis of Water Kefir and Water Kefir Granules and Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria

GAO Yan-chao, XIAO Ai-bo, WANG Cheng, WANG Tian-qi, YU Bing, XU Yun-he, ZHANG Li-li✉

(College of Food Science and Engineering, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: High-throughput sequencing technology combined with plate colony counting method was used to detect and analyze the microflora of water kefir and its starter water kefir granules. Probiotics were screened from naturally fermented water kefir and water kefir granules, and the selected probiotics were identified by individual and population morphological observation, physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. The results showed that lactic acid bacteria were the dominant bacteria in the two samples; whether it is water kefir or water kefir grain, Firmicutes and Proteus are the dominant bacteria, *Lactobacillus* and *Acetobacter* are the dominant bacteria, The bacterial diversity and richness of water kefir granules were higher than those of water kefir; A total of 7 strains of lactic acid bacteria with potential

收稿日期: 2021-08-21

基金项目: 辽宁省高等学校创新人才支持计划(2020); 辽宁省自然科学基金项目(2019-ZD-0600)

Supported by: Innovative Talents Support Plan of Colleges and Universities in Liaoning Province (No.2020); Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.2019-ZD-0600)

作者简介: 高芫超, 女, 1997 年出生, 在读研究生, 研究方向为食品加工与安全。E-mail: 504121303@qq.com.

通讯作者: 张莉力, 女, 1977 年出生, 博士, 教授, 研究方向为食品微生物。E-mail: 13634967549@163.com.

probiotics of acid and bile resistant salts were screened, and the identification results were four strains of *Lactobacillus fermentum*, one strain of *Lactobacillus paracasei*, one strain of *Lactobacillus harbinensis* and one strain of *Lactobacillus rubrum* were identified and named *Lactobacillus fermentum* cc4、*Lactobacillus fermentum* cc8、*Lactobacillus fermentum* cc9、*Lactobacillus fermentum* cc22、*Lactobacillus paracasei* cc1、*Lactobacillus harbinensis* cc5、*Lactobacillus satsumensis* cc12.

Key words: water kefir; water kefir granules; high throughput sequencing; bacterial diversity; lactic acid bacteria; isolation; identification

水开菲尔粒,由胞外多糖组成,是由乳酸菌、醋酸菌等共生微生物组成的稳定菌落,被限制在多醣体和蛋白质基质中,含具有保健功能的次级代谢产物^[1]。水开菲尔,也叫作中国菌菇、缙比水晶和天山雪莲等,它是由有机糖溶液和水开菲尔粒自然发酵而成的一种发酵饮料,含多种益生菌。水开菲尔中微生物种类很多,主要含乳酸菌、醋酸菌和酵母菌,它们是由多种细菌和真菌组成的共生菌系^[1],在细菌组成中能观察到乳酸菌的显著控制^[2]。在水开菲尔发酵过程中,水开菲尔粒会“消化”掉糖,制作出富含益生性乳酸菌的水开菲尔^[3]。水开菲尔中含多种酶,能水解多糖,产生果香。其发酵剂水开菲尔粒经发酵后,会得到粗纤维等不溶性沉淀成分,这些成分可以用于制作膳食纤维^[4-5]。若经常喝水开菲尔,乳酸菌可以在人体内存活并生长繁殖,水开菲尔的保健功能包括:促进消化、增强肝脏功能、调节内分泌系统、调节血压、降低胆固醇、帮助减肥^[1-2]。益生菌若想成功定植并作用于胃肠道,需要能够适应胃肠道的低 pH 及高渗透压的胆盐环境^[6]。因此,筛选耐酸、耐胆盐的益生菌株具有重要研究意义和应用价值。目前,国内外对水开菲尔的研究包括水开菲尔粒发酵时的微生物菌落动力学和代谢组学,研究表明水开菲尔发酵过程中的优势菌是乳酸菌,但是水开菲尔形成稳定结合体的分子背景尚不清楚,细菌区系的综合组成也尚未科学界定^[7]。近年来,公众普遍开始关注食品营养及保健功效,以牛奶为基础的奶开菲尔现已被广泛研究并应用于各种发酵酸奶、益生性乳酸菌饮料中,可作为良好益生菌来源,具有许多潜在的健康益处。然而目前水开菲尔只限制于家庭小作坊式内部生产,其未得到广泛使用、未能投入工业化生产,主要是因为缺乏发酵水开菲尔的菌种。

所以,本实验利用高通量测序技术结合平板菌落计数法,分析水开菲尔和水开菲尔粒的细菌区系及优势菌属。然后以耐酸、耐胆盐能力做指标,从中筛选出具有潜在益生性的菌株。本研究为水开菲尔工业发酵提供备选菌株以及为水开菲尔产品的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水开菲尔、水开菲尔粒:湛江市非歌食品店;MRS 肉汤培养基、MRS 培养基、营养琼脂培养基:北京陆桥有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒:沈阳立信生物有限公司。

1.2 仪器与设备

压力蒸汽灭菌锅(DGL-50B)、紫外可见分光光度计(752N):常州鸿运实验仪器厂;恒温培养箱(303-4B):浙江尚诚仪器厂;超净工作台(JB-VS-1300):上海力辰仪器厂;精密 pH 计(PHS-25)、电子分析天平(M4-AL204):上海越平有限公司;生物显微镜(BM-500T):福建睿鸿光电科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 传统平板计数法测定细菌数量

对水开菲尔和水开菲尔粒中的细菌和乳酸菌计数,细菌参照 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》,乳酸菌参照 GB 4789.35—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》,每种样品做三次平行实验,记录结果。

1.3.2 高通量测序分析细菌区系

主要步骤包括:对水开菲尔、水开菲尔粒中总 DNA 提取和 16S rDNA 的 V3-V4 可变区 PCR 扩增,利用的扩增引物为正向引物 520F: 5'-

AYTGGGYDTAAAGNG-3', 反向引物 802R: 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3', 然后检测扩增序列, 将合格序列进行文库扩增并上机进行高通量测序。测序平台为 NovaSeq 6000^[8]。得到高通量测序结果后, 去除原始序列中的 Barcode 和引物序列, 再拼接各样本序列获得 Raw Tags, 对其进行质量控制和过滤处理, 去除不合格序列, 用 UCHIME 软件识别并去除嵌合序列, 最终获得有效数据^[9]。选用 Greengenes 数据库 (Release 13.8, <http://greengenes.secondgenome.com/>) 进行注释。

1.3.3 ASV 聚类及物种组成分析

用 Uparse 软件对全部 Effective Tags 做 ASVs 聚类, 参照相似性为 100%, 出现频数最高的序列作为代表序列, 利用分类数据库分析其物种注释, 得到从门至属的分类学信息, 在门和属水平上统计样品的物种组成。

1.3.4 潜在益生性乳酸菌的筛选

对水开菲尔和水开菲尔粒取样后进行梯度稀释, 取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 四个梯度各 1 mL 用 MRS 固体培养基进行倾注, 37 °C 培养 48~72 h, 挑取微白色、呈圆形或梭形的菌落, 划线接种到 MRS 固体培养基上, 37 °C 培养 48~72 h, 划线 2~3 次, 观察其个体形态, 直至确定是单菌落后编号^[10]。

1.3.4.1 初筛 编号菌株进行 H_2O_2 酶及革兰氏染色实验, 初步筛选出 H_2O_2 酶阴性及革兰氏染色阳性的菌株, 对符合上述条件的菌株进行复筛。

1.3.4.2 复筛 以菌株的耐酸性, 胆盐耐受力作为菌株的潜在益生性筛选指标^[11-13]。将初筛所得菌株接种至 MRS 肉汤培养基中, 37 °C 培养 24 h 活化菌株, 用于接种耐酸性和胆盐耐受力实验。

耐酸性: 活化初筛所得菌株, 用盐酸调节 MRS 肉汤培养基的 pH 值至 3.0, 4.0, 5.0, 以 pH 值为 6.0 的 MRS 肉汤培养基为对照组, 分装于各试管中。接种 5% (v/v) 菌种至上述试管中, 37 °C 培养 3 h。以未接种的 MRS 肉汤培养基为参比, 在波长 600 nm 处利用紫外分光光度计测定不同培养基中的 OD 值, 每种样品做三次平行实验并取其平均值。按照下列公式计算菌株的耐酸性:

菌株的耐酸性存活率 (%) = (实验组的 OD600 nm 值/对照组的 OD600 nm 值) * 100%。上述步骤中耐酸性好的菌株进行胆盐耐受力的测定。

胆盐耐受力: 参考 Dunne^[15] 的方法, 配置含 0% 和 0.3% (m/v) 牛胆盐的两种 MRS 液体培养基, 分装于各试管。接种 5% (v/v) 菌种至上述试管, 无牛胆盐为对照组, 37 °C 培养 24 h。在波长 600 nm 处利用紫外分光光度计测定不同培养基中的 OD 值, 每种样品做三次平行实验并取其平均值。按照下列公式计算菌株的胆盐耐受力: 菌株的胆盐耐受力 (%) = (实验组的 OD600 nm 值/对照组的 OD600 nm 值) * 100%

1.3.5 个体、群体形态观察

对复筛所得菌株进行革兰氏染色, 显微镜下观察菌体形态, 记录结果。

1.3.6 生理生化实验

参照《伯杰细菌鉴定手册》中相关的乳酸菌实验方法^[16]

1.3.7 菌种的 16SrDNA 鉴定

主要过程包括: 提取菌种基因组 DNA, PCR 扩增 16SrDNA 序列, 扩增引物为 27F 及 1492R 通用引物。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增及纯化后 PCR 产物的 DNA 序列。测序所得菌株的 16SrDNA 序列在 NCBI 的 GeneBank 中进行比对, 得到相似度最高的菌株序列^[17], 通过 MEGA-X 软件绘制系统发育树^[18]。

1.4 数据分析

数据采用 SPSS 22.0 版本, 包括 ANOVA 单因素方差分析、LSD 以及 SNK 检验, 结果用 $x \pm sem$ 表示。使用 Origin 绘制图形。

2 结果与分析

2.1 水开菲尔和水开菲尔粒中菌落总数

水开菲尔和水开菲尔粒细菌计数结果见表 1。水开菲尔细菌总数为 (7.32 ± 0.01 lg) cfu/mL, 乳酸菌总数为 (7.08 ± 0.02 lg) cfu/mL; 水开菲尔粒细菌总数为 (8.90 ± 0.05 lg) cfu/mL, 乳酸菌总数为 (8.69 ± 0.08 lg) cfu/mL。表明在水开菲尔和水开菲尔粒细菌区系中, 乳酸菌为两种样品的优势菌, 有利于后续乳酸菌筛选实验的进行。接下来结合高通量测序分析水开菲尔和水开菲尔粒的细菌区系。

表 1 水开菲尔和水开菲尔粒细菌计数结果

Table 1 Results of bacterial counting of water kefir and water kefir granules cfu/mL

| 项目 | 实验组 | | |
|------|-------|---------------------------|---------------------------|
| | 水开菲尔 | 水开菲尔粒 | |
| 菌落总数 | 细菌总数 | 7.32±0.01 lg ^b | 8.90±0.05 lg ^a |
| | 乳酸菌总数 | 7.08±0.02 lg ^b | 8.69±0.08 lg ^a |

注：同行不同小写字母表示显著性差异 (P<0.05)。

Note: different lowercase letters in the same line indicate significant differences (P<0.05).

2.2 高通量测序技术分析水开菲尔和水开菲尔粒细菌区系及优势菌属

2.2.1 ASVs 聚类

高通量测序分析水开菲尔和水开菲尔粒细菌区系,结果分别获得 60 151 和 64 256 条有效序列。有效序列按 100%一致性进行 ASVs 聚类,出现频次多的序列为代表性序列,并注释其物种。其花瓣图如图 1 所示,结果共得到 438 个 ASVs,水开菲尔中含 168 个 ASVs,水开菲尔粒中含 270 个 ASVs,其中两组共有的 ASVs 数为 93 个,两组特有的 ASVs 分别为 75 和 177 个。

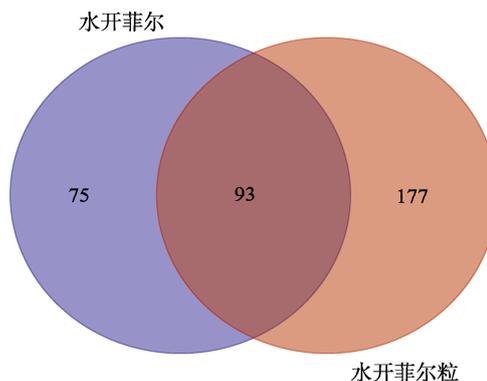


图 1 水开菲尔和水开菲尔粒的 ASVs 聚类
Fig.1 ASVs clustering of water kefir and water kefir granules

2.2.2 细菌 α 多样性分析

两种样品多样性指数分析见表 2。如表所示,水开菲尔和水开菲尔粒的覆盖率均为 0.999,表明测序深度能够代表样本的真实组成^[19]。水开菲尔粒的 Chao1、ACE、Shannon、Simpson 指数显著 (P<0.05) 高于水开菲尔粒。上述结果表明,发酵剂水开菲尔粒的细菌丰富度及多样性更高。

表 2 两种样品多样性指数分析

Table 2 Diversity index analysis of two samples

| 样品 | 有效序列 | ASVs | 多样性指数 | | | | Coverage |
|-------|--------|------|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|----------|
| | | | Chao1 | ACE | Shannon | simpson | |
| 水开菲尔 | 60 151 | 168 | 194.54±10.15 ^b | 198.67±11.77 ^b | 3.89±0.08 ^b | 0.88±0.06 ^b | 0.999 |
| 水开菲尔粒 | 64 256 | 270 | 290.52±18.63 ^a | 293.94±19.86 ^a | 5.27±0.32 ^a | 0.93±0.03 ^a | 0.999 |

注：同列不同小写字母表示显著性差异 (P<0.05)。

Note: different lowercase letters in the same line indicate significant differences (P<0.05).

2.2.3 细菌的组成分布

基于门水平的细菌结构见图 2,在门水平上,水开菲尔中厚壁菌门 (79.58%) 和变形菌门 (19.88%) 占总细菌的 99.46%;水开菲尔粒中厚

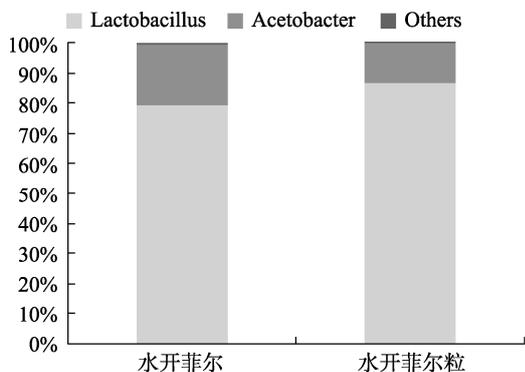


图 2 基于门水平的细菌结构

Fig.2 Bacterial structure based on gate level

壁菌门 (86.67%) 和变形菌门 (13.32%) 占总细菌的 99.99%。结果表明,水开菲尔与水开菲尔粒细菌区系相似,优势菌门均为厚壁菌门和变形菌门,其中厚壁菌门是最丰富的门,水开菲尔粒中厚壁菌门的含量高于水开菲尔。

两种样品的属水平结构组成见图 3,水开菲尔中优势菌属是乳杆菌属和醋杆菌属,相对含量分别为 79.42%、16.38%,上述两个属共占细菌群体的 95.80%;水开菲尔粒中乳杆菌属 (86.64%) 和醋杆菌属 (13.32%) 占总细菌的 99.96%。结果表明,水开菲尔与水开菲尔粒细菌区系相似,优势菌属均为乳杆菌属和醋杆菌属,其中乳杆菌属是最丰富的属,且其在水开菲尔粒中含量高于水开菲尔。有实验表明一些有害菌在 pH<4.5 环境中

很难存活,但乳杆菌属耐酸性较强,能在较低 pH 值下正常生长繁殖,抑制有害菌生长,占据优势地位^[20]。由此实验结果可知,样品中主要存在的菌为本实验后续筛选所需的乳酸菌,更进一步为本实验顺利进行奠定理论基础。

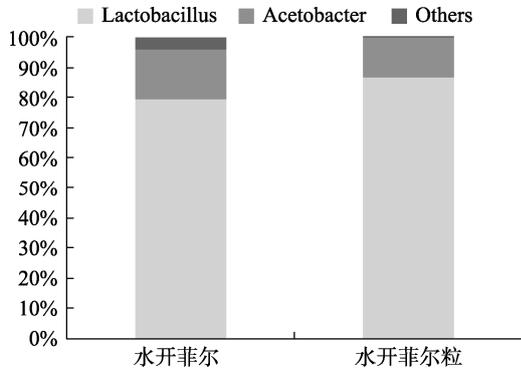


图 3 基于属水平的细菌结构

Fig.3 Bacterial structure based on genus level

2.3 水开菲尔和水开菲尔粒中潜在益生性乳酸菌的筛选

2.3.1 初筛

不同菌株的形态特征如表 3 所示,从水开菲尔和水开菲尔粒中共筛选出 30 株革兰氏染色呈阳性,过氧化氢酶实验呈阴性,不含芽孢的菌株。通过油镜观察,多数菌株为杆状,少数为球形或卵圆形。

表 3 初步筛选的不同菌株的形态特征

Table 3 Morphological characteristics of different strains preliminarily screened

| 菌株编号 | 细胞形态及分裂后排列方式 | 菌落形态 |
|---|------------------|------|
| cc1、cc5、cc6、cc10、cc11、cc12、cc13、cc14、cc15、cc16、cc17、cc18、cc19、cc20、cc21、cc22、cc23、cc24、cc25、cc26、cc27 | 呈长杆状 链状排列 | 呈棱形 |
| cc2、cc26、cc28、cc29 | 呈球形或卵圆形 链球状排列 | 呈圆形 |
| cc3、cc4、cc7、cc8、cc9、cc22、cc25、cc30 | 呈短杆状 链状排列 | 呈棱形 |

2.3.2 复筛

初筛所得 30 株菌接种到 MRS 肉汤培养基中,37 °C 培养 24 h,分别对其培养液进行耐酸性、胆盐耐受力的测定。

菌株耐酸性见表 4,30 株菌株菌体密度随 pH 值升高而不断上升,且存在差异。当 pH 值为 3.0

时,30 株菌株均可以生长,但生长情况不同。王俊国^[21]、Wang^[22]等研究乳酸菌耐酸性,测定其活菌数时得到同样结论。一般认为,正常人在进食后,胃液 pH 值在 3.0 上下波动,消化时间需 3 h,作为益生性乳酸菌需要有耐酸性而且可以在酸性环境中生长^[23],所以这 30 株菌可以随食物到达小肠。其中,cc9 菌株的耐酸性最好,cc1、cc4、cc5、cc7、cc8、cc9、cc10、cc12、cc15、cc16、cc17、cc22、cc25、cc26、cc27 的菌体密度均比较高,按大小依次排列。上述结果说明这 15 株菌株有很好的耐酸性,可以很好的存活在酸度低的环境中,对上述 15 株菌株做进一步的筛选。

表 4 不同菌株的耐酸性

Table 4 Acid tolerance of different strains

| 序号 | 菌株编号 | pH3.0 OD _{600 nm} | pH4.0 OD _{600 nm} | pH5.0 OD _{600 nm} |
|----|------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | cc1 | 52.88±0.11 ^a | 60.84±0.22 ^{ab} | 88.08±0.16 ^a |
| 2 | cc2 | 43.02±0.15 ^j | 51.26±0.12 ^f | 83.36±0.20 ^d |
| 3 | cc3 | 41.66±0.11 ^l | 56.36±0.06 ^e | 83.02±0.12 ^d |
| 4 | cc4 | 50.02±0.18 ^e | 59.85±0.10 ^b | 88.70±0.11 ^a |
| 5 | cc5 | 49.19±0.15 ^e | 59.16±0.16 ^b | 87.28±0.23 ^b |
| 6 | cc6 | 38.66±0.14 ^p | 50.13±0.21 ^g | 78.22±0.25 ^e |
| 7 | cc7 | 49.02±0.08 ^{sh} | 58.14±0.37 ^c | 87.56±0.41 ^b |
| 8 | cc8 | 50.77±0.13 ^d | 60.40±0.12 ^b | 88.63±0.22 ^a |
| 9 | cc9 | 52.95±0.11 ^a | 61.02±0.15 ^a | 88.12±0.12 ^a |
| 10 | cc10 | 52.18±0.06 ^c | 60.04±0.22 ^b | 88.39±0.17 ^a |
| 11 | cc11 | 40.06±0.13 ⁿ | 56.12±0.20 ^e | 80.24±0.18 ^e |
| 12 | cc12 | 52.12±0.12 ^c | 60.78±0.11 ^{ab} | 88.28±0.12 ^a |
| 13 | cc13 | 45.12±0.18 ⁱ | 56.32±0.29 ^e | 85.32±0.32 ^c |
| 14 | cc14 | 38.82±0.12 ^p | 50.64±0.14 ^g | 80.32±0.37 ^e |
| 15 | cc15 | 48.86±0.08 ^{sh} | 58.03±0.17 ^c | 85.33±0.29 ^c |
| 16 | cc16 | 49.08±0.10 ^{sh} | 58.02±0.19 ^c | 87.58±0.15 ^b |
| 17 | cc17 | 48.78±0.17 ^b | 57.88±0.12 ^d | 85.26±0.27 ^c |
| 18 | cc18 | 38.64±0.12 ^p | 50.18±0.10 ^g | 79.18±0.19 ^f |
| 19 | cc19 | 38.84±0.14 ^p | 50.68±0.11 ^g | 79.25±0.14 ^f |
| 20 | cc20 | 38.68±0.11 ^p | 50.52±0.15 ^g | 79.68±0.26 ^f |
| 21 | cc21 | 43.20±0.17 ^j | 56.53±0.21 ^e | 85.28±0.11 ^c |
| 22 | cc22 | 52.42±0.25 ^b | 60.68±0.27 ^{ab} | 87.89±0.21 ^b |
| 23 | cc23 | 39.88±0.17 ^o | 51.19±0.18 ^f | 80.36±0.19 ^e |
| 24 | cc24 | 40.32±0.12 ⁿ | 56.02±0.22 ^e | 83.72±0.14 ^d |
| 25 | cc25 | 49.12±0.13 ^e | 58.66±0.22 ^c | 87.24±0.28 ^b |
| 26 | cc26 | 49.55±0.12 ^f | 59.78±0.21 ^b | 88.33±0.26 ^b |
| 27 | cc27 | 50.00±0.12 ^e | 59.84±0.16 ^b | 88.06±0.12 ^b |
| 28 | cc28 | 42.24±0.11 ^k | 56.32±0.23 ^e | 83.04±0.43 ^d |
| 29 | cc29 | 39.72±0.16 ^o | 51.24±0.18 ^f | 80.25±0.11 ^e |
| 30 | cc30 | 39.62±0.12 ^o | 51.18±0.15 ^f | 80.16±0.12 ^e |

注:同列不同小写字母表示显著性差异(P<0.05)。

Note: different lowercase letters in the same line indicate significant differences (P<0.05).

菌株胆盐耐受性：不同菌株的胆盐耐受能力存在差异^[24-25]，一般情况下，体内小肠胆盐浓度范围是0.03%~0.3%^[23]。因此，作为益生性乳酸菌，必须能在0.3%胆盐浓度环境中存活并生长。菌株的胆盐耐受性见表5，同样培养24 h，15株菌的菌体密度在无胆盐培养基中很高，在含0.3%胆盐培养基中均下降。其中，cc1胆盐耐受性最强，为35.68%，高于郭均^[23]等从水开菲尔中分离出的益生性乳酸杆菌，cc1>cc9>cc5>cc22>cc12>cc4>cc8，这7株菌株胆盐耐受性好，能够耐受消化道的高胆盐环境，顺利通过小肠到达大肠。

表5 不同菌株的胆盐耐受性

Table 5 Bile salt tolerance of different strains

| 序号 | 菌株编号 | 0%胆盐浓度 /(m/V) OD _{600 nm} | 0.3%胆盐浓度 /(m/V) OD _{600 nm} | 胆盐耐受性/% |
|----|------|---------------------------------------|---|-------------------------|
| 1 | cc1 | 2.16±0.02 | 0.77±0.02 | 35.68±1.28 ^a |
| 2 | cc4 | 2.29±0.01 | 0.76±0.03 | 33.13±1.32 ^c |
| 3 | cc5 | 2.68±0.02 | 0.92±0.05 | 34.36±2.15 ^b |
| 4 | cc7 | 3.09±0.47 | 0.71±0.04 | 23.24±2.22 ^e |
| 5 | cc8 | 2.63±0.02 | 0.87±0.06 | 33.08±2.54 ^c |
| 6 | cc9 | 2.51±0.30 | 0.88±0.05 | 35.22±2.11 ^a |
| 7 | cc10 | 2.67±0.31 | 0.53±0.01 | 20.05±2.64 ^e |
| 8 | cc12 | 2.81±0.01 | 0.95±0.08 | 33.82±2.88 ^c |
| 9 | cc15 | 2.72±0.24 | 0.47±0.05 | 17.28±3.26 ⁱ |
| 10 | cc16 | 3.20±0.31 | 0.62±0.04 | 19.56±3.12 ^h |
| 11 | cc17 | 3.01±0.01 | 0.77±0.08 | 25.53±2.64 ^d |
| 12 | cc22 | 2.71±0.03 | 0.92±0.05 | 33.92±2.12 ^c |
| 13 | cc25 | 1.40±0.01 | 0.31±0.04 | 22.12±2.82 ^f |
| 14 | cc26 | 2.99±0.28 | 0.49±0.07 | 16.62±3.86 ^j |
| 15 | cc27 | 1.94±0.05 | 0.32±0.05 | 16.54±2.95 ^j |

注：同列不同小写字母表示显著性差异 ($P<0.05$)。

Note: different lowercase letters in the same line indicate significant differences ($P<0.05$).

2.4 菌株的生理生化特征

2.4.1 个体、群体形态特征

通过油镜观察，7株菌株形态一致，呈杆状，菌落大小为1~3 mm，形态呈乳白色、圆形、边缘整齐、表面光滑，细胞分裂后排列方式为链状，革兰氏染色呈阳性，不含芽孢。

2.4.2 生理生化检测

生理生化结果见表6，其结果表明，这7株菌不产吲哚、硫化氢，接触酶实验为阴性，硝酸盐实验呈阳性，不运动，具有一定耐酸耐盐性，将其初步归属为乳杆菌属。

表6 菌株生理生化特性

Table 6 Physiological and biochemical characteristics of strains

| 实验项目 | cc1 | cc4 | cc5 | cc8 | cc9 | cc12 | cc22 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| 吲哚实验 | - | - | - | - | - | - | - |
| 硫化氢实验 | - | - | - | - | - | - | - |
| 明胶液化试验 | - | - | - | - | - | - | - |
| 接触酶实验 | - | - | - | - | - | - | - |
| 运动性实验 | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 °C生长 | + | + | + | + | + | + | + |
| 45 °C生长 | + | + | + | + | + | + | + |
| 耐酸实验 (pH=4.5) | + | + | + | + | + | + | + |
| 耐盐实验 (6.5%NaCl) | + | + | + | + | + | + | + |
| 硝酸盐还原反应 | + | + | + | + | + | + | + |

注：阳性用符号“+”表示，阴性用符号“-”表示。

Note: masculine gender is represented by “+” and feminine gender by “-”.

2.5 菌株的16SrDNA鉴定

筛选出7株乳酸菌cc1, cc4, cc5, cc8, cc9, cc12, cc22, 其16SrDNA序列长度分别为1 454 bp, 1 468 bp, 1 457 bp, 1 467 bp, 1 467 bp, 1 450 bp, 1 439 bp。将其提交到Genbank经BLAST比对，系统发育树结果见图4，cc1的亲缘性与*Lactobacillus paracasei* (MT613527.1)最接近，cc4的亲缘性与*LimosiLactobacillus fermentum* (MW405853.1)最接近，cc5的亲缘性与*Lactobacillus harbinensis* (MW405854.1)最接近，cc8的亲缘性与*Lactobacillus fermentum* (EU419595.1)最接近，cc9的亲缘性与*Lactobacillus fermentum* (MT611890.1)最接近，cc12的亲缘性与*Lactobacillus satsumensis* (MW405857.1)最接近，cc22的亲缘性与*Lactobacillus fermentum* (MT641196.1)最接近，相似度均>99%。结合个体和群体形态、生理生化实验及16S rDNA的分子测序结果，初步鉴定cc4、cc8、cc9、cc22为发酵乳杆菌，cc1为副干酪乳杆菌、cc5为哈尔滨乳杆菌、cc12为红条乳杆菌，GenBank号分别为MW405853、MW405855、MW405856、MW405858、MW405852、MW405854、MW405857，分别命名为*Lactobacillus fermentum* cc4、*Lactobacillus fermentum* cc8、*Lactobacillus fermentum* cc9、*Lactobacillus fermentum* cc22、*Lactobacillus paracasei* cc1、*Lactobacillus harbinensis* cc5、*Lactobacillus satsumensis* cc12。

- probiotic characteristics of two lactic acid bacteria [J]. Journal of Zhejiang University (agriculture and Life Sciences Edition), 2017, 43 (2): 239-246.
- [12] 付永岩, 赵悦含, 刘飞, 等. 降胆固醇乳酸菌的生长特性及发酵培养基的优化[J]. 食品科技, 2019, 44(1): 1-7.
 FU Y Y, ZHAO Y H, LIU F, et al. Growth characteristics of cholesterol reducing lactic acid bacteria and optimization of fermentation medium [J]. Food science and technology, 2019, 44 (1): 1-7.
- [13] 靳志敏, 段艳, 通力嘎, 等. 天然乳酸菌对肉中胆固醇降解作用及其生长特性[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 231-234.
 JIN Z M, DUAN Y, TONG L G, et al. Degradation of cholesterol in meat by natural Lactobacillus and its growth characteristics [J]. Food and fermentation industry, 2013, 39 (1): 231-234.
- [14] 石小杰. 益生性乳酸菌的分离筛选及拮抗沙门氏菌感染功能的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016.
 SHI X J. Isolation and screening of probiotic lactic acid bacteria and Study on its antagonistic function against Salmonella infection [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2016.
- [15] DUNNE C, O'MAHONY L, MURPHY L, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2001, 73(2): 386-392.
- [16] R E 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
 R E B. Berger's Handbook of bacterial identification (eighth edition) [M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 1995.
- [17] 乌日娜. 内蒙古传统酸马奶中乳杆菌的分离鉴定及 16S rDNA 序列同源性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
 WU R N. Isolation and identification of Lactobacillus from traditional yoghurt milk and analysis of 16S rDNA sequence homology [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2005.
- [18] 卢海鹏. 传统酸马奶乳酸菌的鉴定及降胆固醇作用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- LU H P. Identification and cholesterol lowering effect of lactic acid bacteria from traditional yoghurt [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [19] XU Y, YU Y, TIAN Y, et al. Analysis of Beijing douzhi microbiota by high-throughput sequencing and isolation of acidogenic, starch-flocculating strains[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9.
- [20] NOUT M J R. Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas[J]. International Journal of Food Microbiology, 1991, 12(2-3): 217-224.
- [21] 王俊国, 孟和毕力格, 包秋华, 等. 植物乳杆菌 LIP-1 对高脂血症大鼠血脂的调节作用[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 6-12.
 WANG J G, MENG H B L G, BAO Q H, et al. The regulatory effect of Lactobacillus SP-1 on hyperlipidemia in rats [J]. Journal of Chinese food, 2013, 13 (2): 6-12.
- [22] WANG S C, CHANG C K, CHAN S C, et al. Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2014, 4(7): 523-528.
- [23] 郭均. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其体内降胆固醇作用[D]. 华南理工大学, 2016.
 GUO J. Screening of cholesterol lowering lactic acid bacteria and its cholesterol lowering effect in vivo [D]. South China University of technology, 2016.
- [24] LIONG M T, SHAH N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains [J]. J Dairy Sci, 2005, 88(1): 55-66.
- [25] 李尧, 张羽竹, 张利, 等. 分离自传统自然发酵食品中降胆固醇乳酸菌的筛选与评价[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 212-222.
 LI Y, ZHANG Y Z, ZHANG L, et al. Screening and evaluation of cholesterol lowering lactic acid bacteria isolated from traditional natural fermented foods [J]. Chinese Journal of food science, 2019, 19 (6): 212-222. 完
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。