



# 长寿老人肠道乳酸菌的分离鉴定及其在发酵乳中的应用

董蕴<sup>1</sup>, 崔梦君<sup>1</sup>, 单春会<sup>2</sup>, 蔡文超<sup>2</sup>, 张振东<sup>1</sup>, 郭壮<sup>1</sup>

(1.湖北文理学院 食品科学技术学院,湖北 襄阳 441053;2.石河子大学 食品学院,新疆 石河子 832003)

**摘要:**对襄阳地区6名长寿老人粪便中的乳酸菌进行了分离,总共分离出了23株疑似乳酸菌菌株,经16S rDNA序列分析法鉴定发现其分别为*Lactobacillus fermentum*(发酵乳杆菌)、*L. mucosae*(粘膜乳杆菌)、*L. salivarius*(唾液乳杆菌)、*L. garvieae*(格氏乳杆菌)和*Enterococcus faecium*(屎肠球菌),且*L. salivarius*和*L. fermentum*为襄阳地区长寿老人肠道中的优势乳酸菌类群。在选取*L. salivarius*和*L. fermentum*进行发酵乳制备的基础上,使用电子鼻和电子舌技术对其品质进行了评价,结果发现两类乳酸菌菌种制备发酵乳的品质存在明显差异,且本研究分离的*L. salivarius*牛乳发酵特性要优于*L. fermentum*。

**关键词:**长寿老人;乳酸菌;发酵乳;电子鼻;电子舌

**中图分类号:**Q93-331, TS252.54

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-2230(2019)06-0018-04

## Isolation and identification of *Lactic acid bacteria* from longevity elderly' feces and its application in fermented milk

DONG Yun<sup>1</sup>, CUI Mengjun<sup>1</sup>, SHAN Chunhui<sup>2</sup>, CAI Wenchao<sup>2</sup>, ZHANG Zhendong<sup>1</sup>, GUO Zhuang<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hu Bei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China;2. Food College, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** In this study, 6 fecal samples of longevity elderly volunteers recruited from Xiangyang area were collected and used for the isolation of lactic acid bacterial strains by culture method, and preliminary identification by 16S rDNA. The results indicated that 23 potential lactic acid bacteria strains, were identified as *Lactobacillus fermentum*, *L. mucosae*, *L. salivarius*, *L. garvieae*, and *Enterococcus faecium*, respectively. Meanwhile, *L. salivarius* and *L. fermentum* were domain lactic acid bacterial species in longevity elderly volunteers recruited from Xiangyang. The product quality of fermented milk samples fermented by *L. salivarius* and *L. fermentum* were evaluated by electronic nose and electronic tongue. The results also indicated that the product qualities fermented by two species with significant difference, and the product fermented by *L. salivarius* with better product quality.

**Key words:** Longevity elderly; *Lactic acid bacteria*; Fermented milk; Electronic nose; Electronic tongue

## 0 引言

近年来,越来越多的研究表明膳食<sup>[1]</sup>、健康状况<sup>[2]</sup>、食用益生菌<sup>[3]</sup>和地域<sup>[4]</sup>等因素均显著影响宿主肠道菌群的构成,同时乳酸菌作为健康长寿老人肠道中的优势细菌之一,对宿主的营养代谢具有积极的作用<sup>[1-2]</sup>,因而开展长寿老人肠道源乳酸菌的分离鉴定具有一定意义。在赋予产品益生特性的同时<sup>[5]</sup>,乳酸菌发酵亦赋予了乳制品独特的风味和滋味,研究人员常采用电子鼻<sup>[6]</sup>和电子舌<sup>[8]</sup>技术对食品的风味和滋味品质进

行评价,两种技术相结合更是广泛的应用于发酵乳品质的综合评价中<sup>[9]</sup>。

本研究对长寿老人粪便样品中的乳酸菌进行了分离鉴定,同时采用电子鼻和电子舌技术对其分离株制备发酵乳风味和滋味品质进行了评价,以期为后续相关产品的产业化生产提供借鉴。

## 1 实验

### 1.1 试剂及仪器设备

#### 1.1.1 材料

脱脂牛乳粉,蔗糖。

生化试剂:MRS培养基、Luria-Bertani培养基和石蕊牛乳培养基;dNTP Mix、2×PCR mix,pMD18-T克隆载体,DNA聚合酶,溶菌酶和蛋白酶K;引物27F/1495R;AxyPrep PCR 清洁试剂盒。

普通化学试剂:三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、氯仿、异戊醇、甘油、氯化钠、阴离子溶液、阳离

**收稿日期:**2018-09-22

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金项目(31501455);湖北省自然科学基金计划项目(2016CFB527);新疆生产建设兵团重点领域创新团队建设计划项目(2017CB012);湖北文理学院学科开放基金项目(XK2018012)。

**作者简介:**董蕴(1997-),女,本科,研究方向为食品生物技术。

**通讯作者:**郭壮

子溶液、参比溶液、内部液和十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethylammonium bromide, CTAB)。

### 1.1.2 设备

HP-01 无油真空泵, ECLIPSE Ci 生物显微镜, DG250 厌氧工作站, 英国 Don Whitley 公司 UVP CDS8000 凝胶成像分析系统, DYCP-31D 型水平式电泳槽, vetiri 梯度基因扩增仪, 美国 AB 公司; TDL-40B 低速大容量离心机, PEN3 电子鼻, 德国 Airsense 公司 SA-402B 电子舌, 日本 Insent 公司 LRH-150 生化培养箱。

### 1.2 样品的采集

从襄阳市襄城区庞公雪美养老公寓和汉丹社区招募 6 名健康老人志愿者, 其中 4 女 2 男, 年龄在 90~94 岁之间, 身体相对健康, 无药物依赖史, 使用行走辅助器可行走, 近两周未服用药物且未接受过肠道手术。于老人用便桶内放置经紫外线照射过的食品专用袋, 用无菌采样勺将样品采集于无菌离心管中, 放入装有冰袋的样品采集箱中快速运回实验室进行样品处理。

### 1.3 乳酸菌的分离与鉴定

按照以下步骤进行乳酸菌菌株的分离和基因组提取: (1) 将采集好的样品每份称取 10 g 后加 40 mL 质量浓度为 0.85% 的生理盐水震荡均匀, 400 rpm 离心 10 min; (2) 取上清液 1 mL 于石蕊牛乳中富集 24 h 后进行样品梯度稀释; (3) 取 -5 和 -6 梯度的稀释液在含有 CaCO<sub>3</sub> 的 MRS 培养基中涂布, 放置于 37 °C 厌氧工作站 (质量分数 85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 及 10% H<sub>2</sub>) 培养 48 h 后; (4) 挑选有透明圈的单个菌落在 MRS 培养基中纯化 3 代后用 30% 的甘油冻存于 -80 °C 备用; (5) 选取过氧化物酶阴性, 革兰氏染色为阳性的菌株暂定为疑似乳酸菌杆菌; (6) 采用 CTAB 法提取分离株的基因组 DNA<sup>[10]</sup>, 将提取的基因组 DNA 在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳上跑胶检测。

按照以下步骤进行 16S rDNA PCR 扩增和菌株鉴定: (1) 检测合格后的基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 扩增体系为: 正向引物 27F 为 0.5 μL, 反向引物 1495R 为 0.5 μL, 10×PCR Buffer 为 2.5 μL, dNTP Mix 为 2 μL, DNA 聚合酶为 0.2 μL, DNA 模板为 1 μL, 加超纯水至 25 μL; 扩增条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温<sup>[11]</sup>; (2) 将 PCR 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳槽跑胶, 染色 15 min 后在凝胶成像系统中观察; (3) 将扩增的 PCR 产物回收清洁后进行连接、转化和鉴定, 挑出阳性克隆送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序; (4) 将测序所得的序列整理后在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性分析比对, 并应用 Mega7.0 软件中的邻接法 (Neighbour-Joining method, NJ) 构建构建系统发育树, 步长值设为 1000, 进而判定分离菌株的分类地位。

### 1.4 乳酸菌分离株发酵乳的制备

菌液的制备: 将制备发酵乳的菌株在 MRS 培养基中活化 3 代后, 3 000 rpm 离心 10 min 后弃上清, 加入 5 mL 脱脂乳混匀。

发酵乳的制备: 将脱脂牛乳粉、蔗糖和水 (质量分数分别为 11.5%, 6.5% 和 82.0%) 混合均匀, 65 °C 水合 30 min 后, 95 °C 5 min 水浴杀菌并冷却至常温。按照 5×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> 复原乳的比例接入菌液, 42 °C 发酵 24 h 后 4 °C 后熟 24 h, 备用。

### 1.5 乳酸菌分离株制备发酵乳风味和滋味品质的评价

将 15 g 发酵乳样品置于样品瓶中, 55 °C 水浴 10 min 后冷却至室温备用。参照杨成聪的方法使用电子鼻进行发酵乳风味品质的评价<sup>[12]</sup>。

将 50 g 发酵乳样品加入 100 mL 的去离子水后, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液过中速滤纸抽滤后备用。参照文献[13]中方法使用电子舌进行发酵乳滋味品质的评价。

### 1.6 数据分析

使用曼-惠特尼 (Mann-Whiney) 检验对 *L. fermentum* 和 *L. salivarius* 制备发酵乳各风味和滋味指标进行显著性分析, 使用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和多元方差分析 (multivariate analysis of variance, MANOVA) 对 *L. fermentum* 和 *L. salivarius* 制备发酵乳品质的差异性进行评价。使用 Mega7.0 构建系统发育树, 使用 SAS9.0 软件进行数据分析, 使用 Origin2017 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 长寿老人肠道乳酸菌的分离与鉴定

从襄阳长寿老人的肠道中总共分离出了 23 株疑似乳酸菌菌株, 菌落的形态在质量分数为 1.0% CaCO<sub>3</sub> 的 MRS 固体培养基上呈现乳白色、表面光滑且有透明圈。菌落的直径集中在 0.5~1.5 mm。菌株在革兰氏染色后均呈现为革兰氏阳性, 过氧化氢实验均为阴性, 菌株形态有杆状和球状两种类型。在对乳酸菌菌株进行分离的基础上, 本研究进一步使用 CTAB 法对其 DNA 进行了提取, 23 株疑似乳酸菌基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图如图 1 所示。

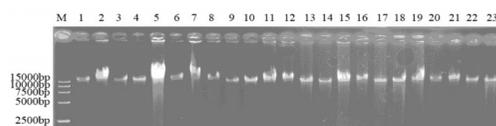


图1 疑似乳酸菌基因组DNA的电泳结果

图1中, M 为 DL15000 DNA Marker; 泳道 1~8 为菌株 HBUAS54075-菌株 HBUAS54082; 泳道 9~16 为菌株 HBUAS54084-菌株 HBUAS54091; 泳道 17~22 为菌株 HBUAS54099-菌株 HBUAS54104; 泳道 23 为菌株 HBUAS54106。下同。

由图1可观察到各菌株在 15 000 bp 上方出现一条荧光条带, 而条带的亮度不同则显示出了所提 DNA 的浓度的不同。经观察可发现所有菌株的亮度都能够满足后续 PCR 扩增的需要。疑似乳酸菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。

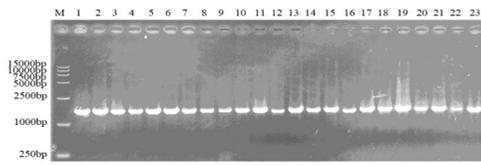


图2 乳酸菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

由图2可观察到所有泳道均出现荧光条带,且大小均在1500 bp左右的位置,亮带并无拖尾现象。由此可见,疑似乳酸菌 16S rDNA 的 PCR 扩增较为成功,扩增产物可进行后续的研究。经清洁、连接、建克隆和测序后,本研究将23株疑似乳酸菌的16S rDNA 序列进行了同源性分析,并与模式菌株一起进行了系统发育树的构建,结果如图3所示。

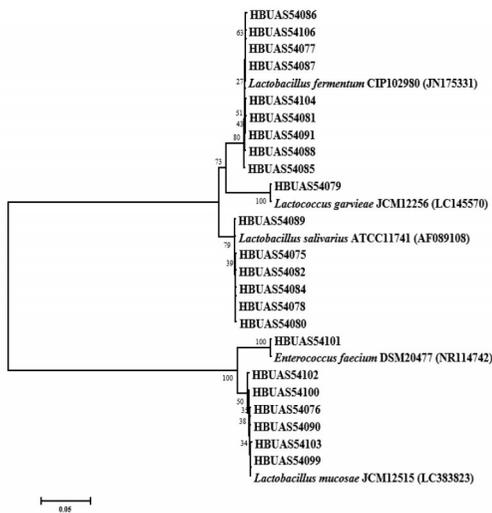


图3 乳酸菌 16S rDNA 序列系统发育树

由图3可看出:菌株HBUAS54087, HBUAS54086, HBUAS54106, HBUAS54077, HBUAS54104, HBUAS54081, HBUAS54091, HBUAS54088 和 HBUAS54085 与模式菌株 *L. fermentum* CIP102980 形成了第一类群,因而鉴定为 *L. fermentum* (发酵乳杆菌); 菌株 HBUAS54099、HBUAS54100、HBUAS54102、HBUAS54103、HBUAS54076 和 HBUAS54090 与模式菌株 *L. mucosae* JCM12515 形成了第二类群,因而鉴定为 *L. mucosae* (黏膜乳杆菌); 菌株 HBUAS54089, HBUAS54075, HBUAS54084, HBUAS54080, HBUAS54078 和 HBUAS54082 与模式菌株 *L. salivarius* ATCC11741 形成了第三类群,因而鉴定为 *L. salivarius* (唾液乳杆菌); 菌株 HBUAS54079 与模式菌株 *L. garvieae* JCM12256 形成了第四类群,因而鉴定为 *L. garvieae* (格氏乳杆菌); 菌株 HBUAS54101 与模式菌株 *Enterococcus faecium* DSM20477 形成了第五类群,因而鉴定为 *E. faecium* (屎肠球菌)。经鉴定发现,23株乳酸菌中分别有9株鉴定为 *L. fermentum*, 6株鉴定为 *L. salivarius*, 分别占分离株总数的39.1%和26.1%。由此

可见, *L. fermentum* 和 *L. salivarius* 为襄阳地区长寿老人肠道中的优势乳酸菌类群。值得一提的是,23株乳酸菌菌株与模式菌株的序列同源性均达到了99%以上,且呈现出明显的聚类趋势,因而本研究的序列分析结果具有较高的准确性。

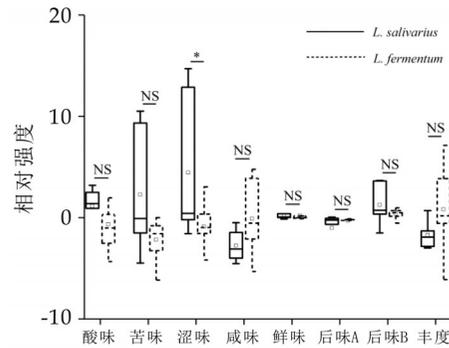
### 2.2 乳酸菌分离株制备发酵乳风味品质的评价

在对襄阳地区长寿老人肠道中乳酸菌进行分离鉴定的基础上,本研究选取可用于食品加工的 *L. salivarius* 和 *L. fermentum* 进行了发酵乳的制备,同时采用电子鼻技术对风味品质进行了评价。各传感器对两类乳酸菌菌种制备发酵乳响应值的差异性分析如表1所示。

由表1可以看出,各传感器对 *L. salivarius* 和 *L. fermentum* 制备的发酵乳响应值差异均不显著( $P>0.05$ ),因而两类乳酸菌菌种制备的发酵乳风味无明显差异。

### 2.3 乳酸菌分离株制备发酵乳滋味品质的评价

本研究进一步使用电子舌对两类乳酸菌菌种制备发酵乳各滋味指标进行了评价,结果如图4所示。



NS为差异不显著;\*为差异显著( $P<0.05$ )。

图4 *L. salivarius* 和 *L. fermentum* 制备发酵乳各滋味指标相对强度的箱型图

由图4可以看出, *L. salivarius* 制备的发酵乳涩味显著高于 *L. fermentum* ( $P<0.05$ ), 而两类乳酸菌菌种制备发酵乳样品的酸味、苦味、咸味、鲜味、后味A(涩味的回味)、后味B(苦味的回味)和丰度(鲜味的回味)差异均不显著( $P>0.05$ )。

### 2.3 PCA 乳酸菌分离株制备发酵乳品质的评价

本研究在使用电子鼻和电子舌技术对15个长寿

表1 各传感器对 *L. salivarius* 和 *L. fermentum* 制备发酵乳响应值的差异性分析

传感器	性能描述 <sup>[14]</sup>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. fermentum</i>	P值
W1C	对芳香类物质灵敏	0.54(0.57, 0.38~0.59)	0.52(0.53, 0.42~0.63)	0.696
W5S	对氢氧化物灵敏	3.48(3.49, 3.05~4.01)	2.94(2.75, 2.03~4.39)	0.124
W3C	对芳香类物质灵敏	0.68(0.71, 0.51~0.74)	0.67(0.67, 0.54~0.78)	0.786
W6S	对氢气有选择性	2.29(1.04, 1.00~8.57)	1.03(1.04, 0.84~1.07)	0.242
W5C	对烷烃、芳香类物质灵敏	0.78(0.82, 0.59~0.84)	0.77(0.79, 0.64~0.87)	0.846
W1S	对甲烷灵敏	8.18(6.98, 6.5~14.78)	8.75(8.52, 5.61~13.34)	0.705
W1W	对有机硫化物灵敏	7.35(7.32, 5.84~9.39)	6.21(5.12, 3.03~14.24)	0.485
W2S	对乙醇灵敏	2.99(2.56, 2.39~5.24)	3.19(3.09, 2.21~4.40)	0.683
W2W	对有机硫化物灵敏	3.78(3.70, 3.29~4.59)	3.65(3.26, 2.48~5.84)	0.792
W3S	对烷烃类物质灵敏	1.15(1.15, 1.11~1.18)	1.17(1.17, 1.12~1.21)	0.192

注:0.54(0.57, 0.38~0.59), 平均数(中位数, 最小值-最大值)。

老人肠道源乳酸菌制备发酵乳风味和滋味品质进行比较分析的基础上,构建了15行×18列的矩阵,同时使用PCA对*L.salivarius*和*L.fermentum*制备的发酵乳的品质进行了评价。经PCA发现,信息主要集中在前4个主成分(principal component, PC),其累计方差贡献率为89.86%,其中,PC1的方差贡献率为41.03%,PC2的方差贡献率为25.01%。

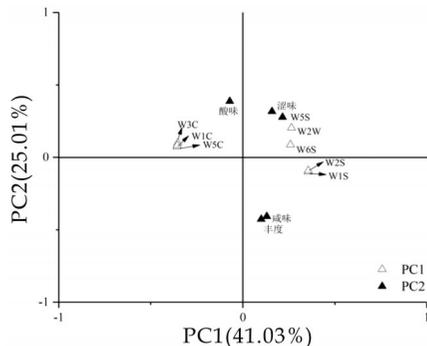


图5 基于PCA *L.salivarius*和*L.fermentum*制备发酵乳品质的因子载荷

由图5可以看出,PC1主要由W1C, W3C, W5C, W6S, W2W, W2S和W1S 7个指标组成,PC2主要由酸味、涩味、咸味和丰度(鲜味的回味)4个指标组成,且W1C, W3C和W5C 3个对芳香物质敏感的传感器分布在X轴负方向,而酸味分布在Y轴正方向,因而在空间排布上分布于第二象限的发酵乳样品具有较佳的品质,其对应的乳酸菌菌株亦具有优良的牛乳发酵特性。因子得分如图6所示。

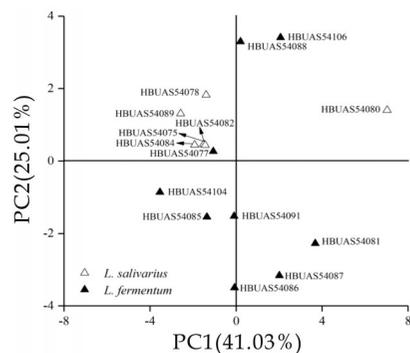


图6 PCA *L.salivarius*和*L.fermentum*制备发酵乳品质的因子得分

由图6可以看出,*L.salivarius*和*L.fermentum*制备的发酵乳在空间排布上呈现出明显的分离趋势,这说明两类乳酸菌菌种制备发酵乳的品质存在明显差异,经MANOVA发现,其差异非常显著( $P < 0.01$ )。结合图5可知,分布于第二象限的发酵乳样品具有较佳的品质,因而本研究分离的*L.salivarius*牛乳发酵特性要优于*L.fermentum*。

### 3 结论

结果表明,*L.fermentum*和*L.salivarius*为襄阳地区长寿老人肠道中的优势乳酸菌类群。经多元方差分析发现,两类乳酸菌制备发酵乳的品质存在明显差异,结合主成分分析发现,*L.salivarius*制备的发酵乳整体风味品质要优于*L.fermentum*,因而本研究分离的*L.salivarius*牛乳发酵特性要优于*L.fermentum*。

### 参考文献:

- [1] CLEMENTE J C, URSELL L K, PARFREY L W, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view[J]. Cell, 2012, 148(6): 1258-1270.
- [2] SEKIROV I, RUSSELL S L, ANTUNES L C M, et al. Gut microbiota in health and disease[J]. Physiological reviews, 2010, 90(3): 859-904.
- [3] CLAESSEON MJ, JEFFERY IB, CONDE S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly[J]. Nature. 2012, 488(7410): 178-184.
- [4] NYANGALE EP, FARMER S, KELLER D, et al. Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers after dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086[J]. Anaerobe, 2014, 30(12): 75-81.
- [5] BENNO Y, ENDO K, MIZUTANI T, et al. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan[J]. Applied and environmental microbiology, 1989, 55(5): 1100-1105.
- [6] BELTRÁN-BARRIENTOS L M, HERNÁNDEZ-MENDOZA A, TORRES-LLANEZ M J, et al. Invited review: fermented milk as antihypertensive functional food[J]. Journal of dairy science, 2016, 99(6): 4099-4110.
- [7] BAIETTO M, WILSON A D. Electronic-nose applications for fruit identification, ripeness and quality grading[J]. Sensors, 2015, 15(1): 899-931.
- [8] SCAGION V P, MERCANTE L A, SAKAMOTO K Y, et al. An electronic tongue based on conducting electrospun nanofibers for detecting tetracycline in milk samples[J]. RSC advances, 2016, 6(105): 103740-103746.
- [9] JIA R, CHEN H, CHEN H, et al. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt[J]. Journal of dairy science, 2016, 99(1): 221-227.
- [10] 郭壮, 蔡宏宇, 杨成聪, 等. 六名襄阳地区青年志愿者肠道菌群多样性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(9): 998-1004.
- [11] 武俊瑞, 王晓蕊, 唐俊扬, 等. 辽宁传统发酵豆酱中乳酸菌及酵母菌分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 78-83.
- [12] 杨成聪, 刘丹丹, 葛东颖, 等. 基于气相色谱-质谱联用技术结合电子鼻评价浸米时间对黄酒风味品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 265-270.
- [13] 王玉荣, 张俊英, 胡欣洁, 等. 湖北孝感和四川成都地区来源的戏曲对米酒滋味品质影响的评价[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 207-210.
- [14] XU L, YU X, LIU L, et al. A novel method for qualitative analysis of edible oil oxidation using an electronic nose[J]. Food chemistry, 2016, 202(7): 229-235.