

本文引用:金 剑,劳 嘉,钟 灿,肖文广,曾宏亮,胡国安,贺 炜,张水寒. 黄精发酵体系中植物乳杆菌的分离鉴定和 MTT 法活菌快速检测研究[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(2):246-250.

# 黄精发酵体系中植物乳杆菌的分离鉴定和 MTT 法活菌快速检测研究

金 剑<sup>1</sup>,劳 嘉<sup>2</sup>,钟 灿<sup>1</sup>,肖文广<sup>3</sup>,曾宏亮<sup>1</sup>,胡国安<sup>2</sup>,贺 炜<sup>2\*</sup>,张水寒<sup>1</sup>

(1. 湖南省中医药研究院中药研究所,湖南 长沙 410013;2. 绿之韵生物工程集团有限公司,湖南 长沙 410329;  
3. 湖南中医药大学高等专科学校,湖南 株洲 412008)

**〔摘要〕**目的 从黄精发酵体系中分离鉴定益生菌,并建立其快速检测方法。方法 通过形态学观察、革兰氏染色、16S rRNA 基因序列测定和同源性分析对分离的菌株进行鉴定,采用 MTT 法建立快速检测方法。结果 从鲜黄精发酵体系中分离获得一株乳酸菌,鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*);建立了植物乳杆菌检测的 MTT 法,发现检测最佳波长为 545 nm,适宜染色时间为 2 h,最低检测度为活菌浓度为 10<sup>7</sup> CFU/mL,在活菌浓度为 7×10<sup>7</sup>~3×10<sup>8</sup> CFU/mL 范围内,植物乳杆菌样品活菌浓度与 545 nm 处 OD 呈现良好的线性关系。结论 从黄精发酵体系中分离纯化了一株植物乳杆菌,可以通过 MTT 法快速检测其活菌总数,为益生菌活菌快速检测提供了参考。

**〔关键词〕** 黄精;益生菌;植物乳杆菌;MTT 法;快速检测

**〔中图分类号〕**R283

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.02.013

## Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented broth of polygonatum and fast detection of live bacteria by MTT method

JIN Jian<sup>1</sup>, LAO Jia<sup>2</sup>, ZHONG Can<sup>1</sup>, XIAO Wenguang<sup>3</sup>, ZENG Hongliang<sup>1</sup>, HU Guoan<sup>2</sup>, HE Wei<sup>2\*</sup>, ZHANG Shuihan<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China;

2. Resgreen Group International Inc., Changsha, Hunan 410329, China;

3. Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou, Hunan 412008, China)

**〔Abstract〕** Objective To isolate and identify probiotics from the fermented broth of polygonatum, and to establish a rapid detection method. Methods The isolated strains were identified by morphological observation, Gram staining, 16S rRNA gene sequence determination and homology analysis, and the rapid detection method was established by MTT method. Results A strain of lactic acid bacteria was isolated from the fresh polygonatum fermentation broth and was identified as *Lactobacillus plantarum*. MTT method for the detection of *Lactobacillus plantarum* was established. The study found that the best wavelength was 545 nm, the suitable staining time was 2 h, and the minimum detection of the concentration of live bacteria was 10<sup>7</sup> CFU/mL. In the range of the concentration of live bacteria from 7×10<sup>7</sup> CFU/mL to 3×10<sup>8</sup> CFU/mL, live bacteria concentration of the *Lactobacillus plantarum* and the OD at 545 nm showed a good linear relationship. Conclusion A strain of *Lactobacillus plantarum* was isolated and purified from the fermented broth of polygonatum. The total number of live bacteria can be quickly detected by the MTT method, which provides a reference for the rapid detection of probiotics.

**〔Keywords〕** polygonatum; probiotics; *Lactobacillus plantarum*; MTT method; rapid detection

**〔收稿日期〕**2021-03-23

**〔基金项目〕**长沙市药食两用资源高效提取及综合开发利用技术创新中心项目(kh2004018);湖南省科技厅创新创业技术投资项目(2019GK5081);湖南省科技特派员创新创业项目(2020NK4197);湖南省中医药研究院院级科研课题(202012);长沙市杰出创新青年培养计划(kq2009084)。

**〔第一作者〕**金 剑,男,博士,副研究员,研究方向:中药资源综合开发利用研究。

**〔通信作者〕**\* 贺 炜,男,工程师,E-mail: hewei3218@126.com。

黄精是我国传统的大宗药食两用资源,其具有抗氧化、降血糖、抗疲劳、提高免疫等多种药理作用<sup>[1]</sup>。作为药食两用资源,虽然近年来有黄精酸奶<sup>[2]</sup>、黄精山楂酸奶<sup>[3]</sup>等产品报道,但总体而言黄精的产品形式较为单一,传统黄精的主要产品形式是蒸制之后的黄精饮片<sup>[4-5]</sup>。酵素作为新型的产品形式越来越受到消费者的青睐,而黄精通过发酵技术不仅可以改善口感,还可拓宽中药资源黄精的产品范围<sup>[6]</sup>。通过发酵生产食用酵素成为药食同源产业研究的一个新热点<sup>[7]</sup>。例如人参酵素<sup>[8]</sup>、铁皮石斛酵素<sup>[9]</sup>和归芪参草功能酵素<sup>[10]</sup>等,都已开展了相关研究。杨婧娟等<sup>[6]</sup>进行了黄精发酵工艺的初步研究。陈安徽等<sup>[11]</sup>分析了黄精酵素口服液中钙、铁和锌的形态。胡佳丽等<sup>[12]</sup>关注了黄精发酵过程中洛伐他汀、皂苷等含量与色泽的相关性。钟灿等<sup>[13]</sup>对黄精发酵体系酶活力变化进行了报道,分析了黄精发酵过程中甜度、pH值、抗氧化活性、蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性的动态变化,为黄精酵素的工艺优化和产品研发提供了数据支撑,促进了黄精发酵的产业化发展。

发酵体系中一个关键的因素是微生物,以益生菌为主。研究药食同源发酵,离不开对益生菌的分离、鉴定和活力检测。随着细胞生物学的不断发展,微生物计数在科研和生产中得到广泛的应用。目前,通过平板稀释计数法检测活菌总数应用广泛,但操作复杂、耗时长、准确度偏低且易受环境杂菌污染,有必要建立一种操作简单、快速、准确并可反映细菌活性的细菌计数方法。近年来发现,噻唑蓝[3-(4,5)-dimethylthiazo(-z-y1)-3, 5-di-phenyltetrazoliumromide, MTT]法具有简单、快速、灵敏、稳定等特点,已开始应用于益生菌活菌数快速检测研究<sup>[14-15]</sup>。MTT法能够快速测定益生菌活菌数目,但其精确度与细菌种类、生长状态及其代谢产物有关<sup>[16]</sup>。目前,在黄精发酵体系中暂未有相关研究报道。本研究在黄精发酵体系中,通过分离纯化和鉴定筛选出了一株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),建立了MTT快速检测方法,对益生菌发酵体系的研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

MTT(上海源叶生物科技有限公司,批号:

Y11M11k109515);鲜黄精购自新化县颐朴源黄精科技有限公司,经湖南省中医药研究院刘浩副研究员鉴定为多花黄精(*Polygonatum cyrtonema* Hua),系《中华人民共和国药典》一部<sup>[17]</sup>所收录的品种。

### 1.2 实验设备

紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司,型号:UV755B);振荡器(海门市麒麟医用仪器厂,型号:Vortex-5);立式高压蒸锅(上海申安医疗器械厂,型号:LDZX-75KRBS);洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-1FD);台式高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司,型号:Multifuge X1R);显微镜(日本东京Olympus公司,型号:Olympus CX31);聚合酶链式反应扩增仪(德国汉堡Eppendorf公司,型号:Eppendorf AG)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 改良的MRS培养基 蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,柠檬酸三铵 2 g/L,三水乙酸钠 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.2 g/L,吐温 80 0.5 g/L, CaCO<sub>3</sub> 20 g/L,琼脂 15 g/L。调节 pH 至 6.2,分装后 121 °C 高压灭菌 20 min。

1.3.2 PBS 溶液配制<sup>[15]</sup> 用于溶解 MTT 的 PBS-1 溶液:取 NaCl 4.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.575 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g, ddH<sub>2</sub>O 定容至 500 mL, 超声 5 min 使其溶解完全, 调节 pH 为 7.2, 121 °C 灭菌 15 min, 室温保存。用于稀释菌液样品的 PBS-2 溶液:取 NaCl 4.25 g, KCl 0.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.425 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.135 g, ddH<sub>2</sub>O 定容至 500 mL, 超声溶解, 调节 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min, 室温保存。

1.3.3 乳酸菌的分离和形态观察 黄精发酵方法参照前期报道<sup>[18]</sup>, 取不同发酵时期的发酵液采用 10 倍稀释法, 分别取 0.1 mL 稀释液涂布于培养基上, 37 °C 恒温培养 2~3 d, 观察菌落形态。挑选具有明显菌落形态、溶钙圈较大的单菌落, 在 MRS 平板上重复划线分离菌株, 以纯化单菌落。对纯化的单菌落进行革兰氏染色观察<sup>[19]</sup>。

1.3.4 菌种鉴定 采用 16S rRNA 法对分离的单菌落进行鉴定, 利用 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA, 选择通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增, 其中 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3', 27F: 5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 将 PCR 产物送长

沙擎科生物技术有限公司测序,序列结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)进行 BLAST 比对,下载同源性较高的序列,采用 MEGA 软件邻接法构建系统发育树分析<sup>[20]</sup>。

**1.3.5 微生物平板计数** 发酵体系中的益生菌活菌数量统计参照平板计数法<sup>[15]</sup>进行,于 37 °C 培养箱培养 24 h 后,进行平板菌落计数,统计样品中的活菌总数。通过平板计数,确定不同样品中的活菌总数。

**1.3.6 MTT 法检测** MTT 采用 PBS-1 溶液溶解配制,具体染色检测操作参考文献方法<sup>[15]</sup>。取稀释好的菌液 4.5 mL 于 10 mL 离心管,并在 10 000 r/min 条件下离心 10 min(离心半径 160 mm)后去其上清液,在超净工作台里加入 45 mL PBS-2 溶液、0.4 mL MTT 染色剂后,混匀,37 °C 染色反应后,10 000 r/min 离心 5 min(离心半径 160 mm),分离出离心沉淀甲臜后,加入 4 mL DMSO,10 000 r/min 离心 5 min(离心半径 160 mm),在紫外可见分光光度计下测定其吸光值(optical density, OD)。

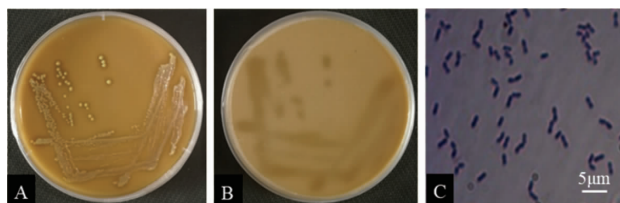
**1.3.7 MTT 法条件优化** (1)最佳吸收波长确定:采用 MTT 法得到的反应液进行 400~700 nm 扫描,取间隔范围为 5 nm,观察最大吸收峰。(2)MTT 染色时间确定:通过观察 MTT 与菌液反应颜色的变化,分别设定 4 个反应时间,即 0、30、60、120、240 min,在最大吸收波长 545 nm 处测定吸光度。(3)MTT 可测量范围确定:将菌液按照 10 倍稀释法稀释至不同浓度,MTT 染色反应 2 h 后,在波长 545 nm 处测定 OD。(4)MTT 法标准曲线绘制:将菌液稀释至 109 CFU/mL 后再细化稀释到不同浓度,MTT 染色反应 2 h 后,在波长 545 nm 处测定 OD,同时通过平板计数法计算样品中的活菌数,以活菌数为横坐标、OD 为纵坐标进行线性关系分析。

## 2 结果

### 2.1 乳酸菌的分离鉴定

从鲜黄精发酵体系中,用 MRS 培养基分离纯化微生物。其菌落表现性状基本一致,直径约 3~5 mm,凸起,呈圆形,表面光滑,细密,色白(图 1A),在 MRS 培养基中能够产生溶钙圈(图 1B)。进一步在显微镜下观察发现,该微生物为圆端直杆菌,长度为

1~4 μm,单个、成对或短链状,缺乏鞭毛,但能运动,革兰氏染色呈现蓝紫色,可以判断分离菌株为革兰氏阳性杆菌(图 1C)。



注:A.平板正面;B.平板反面;C.革兰氏染色显微观察

图 1 黄精乳酸菌在 MRS 培养基的分离

### 2.2 植物乳杆菌鉴定

通过 16S rRNA 序列扩增,测序,序列长度为 1439 bp,基因测序结果已上传 GenBank 数据库并收录,收录信息为 SUB5941108 *Lactobacillus* MN165453。在 NCBI 进行 Blast 基因序列比对,与多条植物乳杆菌的序列匹配达到 100%。进一步下载相关植物乳杆菌菌株序列和其他菌序列,包括干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*),构建系统发育树进行分析(图 2)。结合显微观察和形态学分析,从图 2 可以进一步确定分离获得的微生物为植物乳杆菌,将该菌株命名为 HACM-LP001。

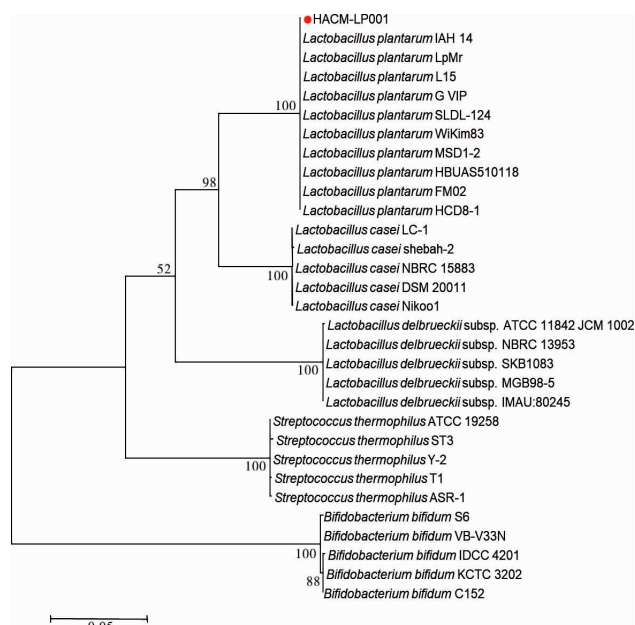
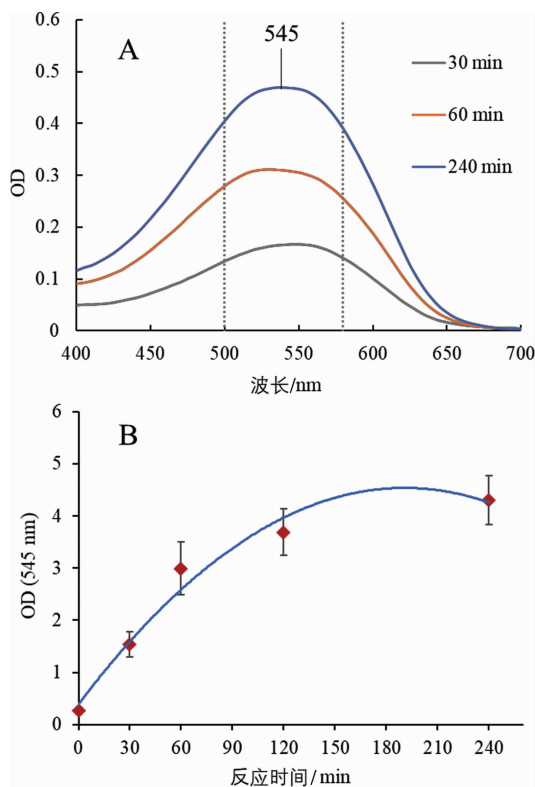


图 2 基于 16S rRNA 序列的分离植物乳杆菌(HACM-LP001)与相关菌株的系统发育树

### 2.3 MTT 法检测波长和染色时间分析

分别在 30、60、240 min,对加入 MTT 后的植物乳杆菌溶液进行 400~750 nm 全波长扫描,测量结果如图 3A 所示。不同时间段,波长扫描图呈现相同的变化趋势,从 400 nm 开始,吸光度逐渐上升,在 500~580 nm 呈现最大吸收曲线,最大吸收波长为 545 nm。从而,选取 545 nm 作为 MTT 与植物乳杆菌显色反应后的最大吸收波长,设置 0、30、60、120、240 min,开展不同反应时间的显色程度实验。从图 3B 可见,不同反应时间 OD 也不同,且随着时间的推移 OD 逐渐增大,在 120 min 曲线开始趋于平稳,表明反应 120 min 后,活菌与 MTT 染色液已充分反应。

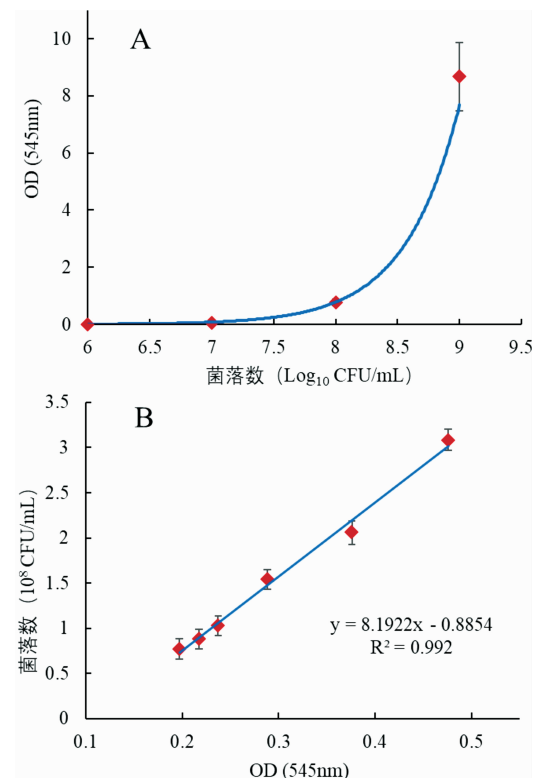


注:A.不同 MTT 染色时间波长扫描;B.最大吸收波长 545 nm 处 OD  
图 3 植物乳杆菌 MTT 法检测波长和染色时间分析

### 2.4 MTT 法灵敏度与活菌线性关系分析

将植物乳杆菌采用 10 倍稀释法稀释至不同浓度,通过平板计数法确定样品中活菌的菌落数,同时采用 MTT 法对含有不同活菌数的样品染色反应 120 min,在 545 nm 处检测该方法的灵敏度。由图 4A 可知,当样品中平板计数法统计的活菌浓度在  $10^9$  CFU/mL 时,MTT 法检测显示的 OD 最大,随着稀释倍数的增大,OD 呈递减状态,当平板计数法统计的活菌浓度在小

于  $10^7$  CFU/mL 时,MTT 法检测显示的 OD 趋于 0。植物乳杆菌样品中浓度在  $10^8$  CFU/mL 时,OD 在 0.2~0.8 之间,是较为合适的测量范围。进一步将植物乳杆菌样品中活菌浓度在  $10^8$  CFU/mL 区间段进行细分,检测 MTT 法显色与平板计数法活菌总数的线性关系,结果如图 4B 所示。在平板计数法统计的活菌浓度为  $7 \times 10^7 \sim 3.1 \times 10^8$  CFU/mL 范围内,OD (545 nm) 和植物乳杆菌样品活菌浓度呈现良好的线性关系,相关系数  $R^2$  为 0.992,从而可以通过 MTT 法快速检测植物乳杆菌样品活菌菌落总数。



注:A.植物乳杆菌 MTT 法灵敏度分析;B.植物乳杆菌 MTT 法线性关系分析

图 4 植物乳杆菌 MTT 法灵敏度与活菌线性关系分析

## 3 讨论

药食同源药材发酵技术的研究是中药领域的一个热点。从药食同源发酵体系中分离鉴定益生菌,并对发酵体系中益生菌活菌数量统计至关重要。但传统的平板计数法过程复杂、耗时长,不能及时反应菌体生长情况<sup>[6]</sup>。因此,有必要在发酵体系中建立一种简单、快速、灵敏的检测方法。

虽然已有一些黄精发酵的研究,但从黄精发酵体系中分离鉴定益生菌鲜有报道。本研究从黄精发酵体系中分离获得了一株乳杆菌,通过革兰氏染色、

基因序列测定及同源性分析,确定为植物乳杆菌(HACM-LP001)。植物乳杆菌是一种益生菌,具有多种保健作用,如调节免疫、维持肠道内菌群平衡、抑制致病菌,降低血清胆固醇含量和预防心血管疾病等<sup>[21]</sup>。基于MTT法发现,HACM-LP001植物乳杆菌在545 nm处有最大吸收峰,染色2 h,菌体浓度在108 CFU/mL左右时,具有良好的线性关系,表明该方法可以用于植物乳杆菌活菌数量的快速检测。

MTT法具有简单、快速、灵敏、稳定等特点,近年来逐渐用于生物细胞的活性检测。其原理是水溶性的MTT染色剂可以与活细胞中的脱氢酶反应,还原成水不溶性的蓝紫色结晶甲瓩并沉积在细胞中。由于死细胞不具备这一反应,因此用DMSO溶解所生成的甲瓩,通过检测光密度值变化,可间接反映细胞生长及增殖活性<sup>[14]</sup>。MTT法在益生菌快速检测中已开展相关研究,杨培洁等<sup>[14]</sup>采用MTT法开展了瑞士乳杆菌的检测条件优化。李娜等<sup>[16]</sup>研究了保加利亚乳杆菌、湿热乳酸链球菌的MTT法快速检测。黄利坤等<sup>[15]</sup>基于MTT法对保加利亚乳杆菌和湿热链球菌进行了测定。MTT法能够快速测定益生菌活菌数目,然而已有研究发现,其精确度与细菌种类、生长状态及其代谢产物有关<sup>[16]</sup>。不同益生菌的MTT法略存在差异,例如:瑞士乳杆菌的最佳波长是510 nm<sup>[14]</sup>,染色1 h即可检测<sup>[15]</sup>;保加利亚乳杆菌和湿热链球菌的最大吸收波长是570 nm,其染色时间分别为1.5 h和2 h<sup>[15]</sup>;而本研究通过全波长扫描植物乳杆菌MTT染色后样品,发现在500~580 nm之间都呈现较大吸收特征,在545 nm处有最大吸收峰,染色时间为2 h。随着染色时间延长,MTT反应更加充分,植物乳杆菌在染色2 h后效果稳定。考虑到方法的灵敏度,待测菌液的浓度需要调整到适宜的范围,从而减小系统误差。

综上所述,本研究是首次从黄精发酵体系中分离纯化发酵乳酸菌,经显微和分子鉴定为植物乳杆菌,基于MTT染色建立了植物乳杆菌的快速检测方法,为益生菌活菌快速检测提供了参考。

## 参考文献

[1] 杨华杰,龚千锋,于欢,等.黄精不同炮制品抗疲劳及抗氧化作用

比较研究[J].江西中医药,2018,49(2):64-67.

[2] 朱建平,谢梦洲,邓文祥,等.黄精酸奶降脂作用的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(7):805-808.

[3] 朱建平,邓文祥,冯楚雄,等.功能性食品黄精山楂酸奶的配方筛选[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):271-274.

[4] JIN J, LAO J, ZHOU R, et al. Simultaneous identification and dynamic analysis of saccharides during steam processing of rhizomes of *Polygonatum cyrtoneura* by HPLC-QTOF-MS/MS [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2855.

[5] 金剑,劳嘉,钟灿,等.基于仿生提取法研究黄精蒸制过程抗氧化活力动态变化[J].湖南中医药大学学报,2019,39(7):837-840.

[6] 杨娟娟,张希,谭书宇,等.黄精发酵工艺的初步研究[J].食品研究与开发,2016,37(17):81-88.

[7] 饶智,陈彦坤,刘斌,等.“药食同源”植物酵素研究进展[J].食品与发酵工业,2020,46(9):290-294.

[8] 刘涛.人参酵素生物转化及发酵工艺研究[D].广州:华南理工大学,2018.

[9] 聂昌平,孙悦,吴丹.铁皮石斛酵素含片的制备工艺[J].食品工业,2019,40(10):27-29.

[10] 胡肖利.归芪参草功能酵素的制备与抗自由基活性的研究[D].兰州:兰州理工大学,2018.

[11] 陈安徽,陈尚龙,巫永华,等.黄精酵素口服液中钙、铁和锌的形态分析[J].现代食品科技,2016,32(1):272-277.

[12] 胡佳莉,刘林,李钟,等.黄精发酵过程中有效成分含量与色泽的相关性[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(15):169-176.

[13] 钟灿,劳嘉,金剑,等.微生物对黄精酵素中酶活性动态变化影响的研究[J].食品与发酵科技,2020,56(4):6-10.

[14] 杨培洁,李腾,陈晓红,等.MTT法测定瑞士乳杆菌MB 2-1活菌数的条件优化[J].食品科学,2013,34(20):99-102.

[15] 黄立坤,杜鹏,霍贵成.MTT法测定乳酸菌活菌数的研究[J].食品工业,2008,29(3):62-65.

[16] 李娜,肖凯军,庞浩,等.MTT法测定甲壳低聚糖对肠道微生物生长的影响[J].食品科学,2012,33(3):101-104.

[17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2020:319-320.

[18] 李金红.泡菜的制作和食用[J].中国调味品,2002,27(1):34-35.

[19] 陈新亮,邵启兵,王超,等.唾液乳杆菌的分离鉴定及生物特性研究[J].食品科学,2016,37(13):157-161.

[20] JIN J, ZHONG C, QIN Y, et al. A new cordycepin-producing caterpillar fungus *Ophiocordyceps xuefengensis* with artificial infection to the host, cultivation of mycelia and stromata [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(20): 1-8.

[21] 王水泉,包艳,董喜梅,等.植物乳杆菌的生理功能及应用[J].中国农业科技导报,2010,12(4):49-55.

(本文编辑 周旦)