

文章编号: 1674-5566(2018)01-0141-08

DOI:10.12024/jso.20170402030

西藏开菲尔粒中 *Lactobacillus kefir* 的分离与鉴定

贾宇声¹, 王兴兴¹, 潘迎捷^{1,2,3}, 王永杰^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

摘要: *Lb. kefirifaciens* 是西藏开菲尔粒中的优势菌株, 约占乳酸菌总数的 95%。通过分离纯化, 构建克隆文库并结合 16S rRNA 基因测序、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、菌落 PCR 和显微镜观察等手段分析了开菲尔粒中的非优势乳酸菌 *Lb. kefir*。扫描电镜显示, 其细胞形态呈短杆状 (0.8 ~ 1.5 × 0.6 ~ 0.7 μm), 比 *Lb. kefirifaciens* 短, 且细菌聚集生长的趋势更为明显。在所构建的克隆文库中, 25 个菌落经测序分析, 发现有 1 条序列属于 *Lb. kefir*。以开菲尔粒为样品, 通过分离纯化, 应用菌落 PCR 方法验证的 22 个单菌落中, 有 5 个单菌落是 *Lb. kefir*。此外, 对开菲尔粒进行 PCR-DGGE 检测, 发现 4 个开菲尔粒样品中都有 *Lb. kefir* 的存在。这些结果都证明了 *Lb. kefir* 在开菲尔粒中稳定存在且所占比例相对较小, 是一种非优势乳酸菌。

关键词: 西藏开菲尔粒; *Lb. kefir*; 扫描电镜; 克隆文库; 分离培养; DGGE; 细胞形态观察

中图分类号: TS 201.3; S 917.1 **文献标志码:** A

西藏开菲尔粒一般呈乳白色, 无固定形状, 外形类似于花椰菜, 其直径一般在 0.3 ~ 3.5 cm 之间。西藏开菲尔粒主要由多糖和蛋白质组成, 其表面和内部栖息着数量众多的微生物, 主要有两大类: 细菌和酵母菌。

大量研究证实西藏开菲尔粒和开菲尔乳具有很高的益生作用, 如抑制和预防肿瘤的发生^[1-2]、促进伤口愈合^[3]、降低胆固醇含量、改善肠道菌群等^[4], 对胃肠过敏反应和提高免疫能力方面也具有积极的作用^[5]。

在前期工作中对本实验室培养的西藏开菲尔粒的微生物组成进行了探索^[6-7]。研究结果显示, *Lb. kefirifaciens* 是西藏开菲尔粒中的主要优势菌株, 约占乳酸菌总数的 95%。*Lb. kefirifaciens* 是开菲尔粒中常见的乳酸菌, 在 CHEN 等^[8], NINANE 等^[9], ZHOU 等^[10], VARDJAN 等^[11]的研究中, 均在开菲尔粒中发现了 *Lb. kefirifaciens* 的存在。除了 *Lb. kefirifaciens*, 开菲尔粒中还有其他种属的乳酸

菌, 比如 *Lb. kefir* (CHEN 等^[8]), *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Lc. Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostac mesenteroides* (ZHOU 等^[10])。

西藏开菲尔粒中除了 *Lb. kefirifaciens* 外, 其他种类的乳酸菌可能也参与牛奶发酵并在与酵母菌共生的过程中发挥作用。本文通过分离纯化, 结合 16S rRNA 基因测序、变性梯度凝胶电泳、菌落 PCR 和显微镜观察等手段分析了西藏开菲尔粒中的非优势乳酸菌。

1 材料与方法

1.1 主要材料

西藏开菲尔粒 (本实验室保存), 灭菌乳 (光明)。

1.2 主要实验仪器设备与试剂

1.2.1 仪器

扫描电镜 (日立, HCP-2)、PCR 仪 (Eppendorf)、微量分析玻璃换膜过滤器 (密理博)、真空泵 (密理博, 220V/50Hz)、荧光显微镜

收稿日期: 2017-04-20 修回日期: 2017-10-26

基金项目: 上海高校特聘教授东方学者岗位计划基金 (20101222); 上海市科学技术委员会科技支撑项目 (10540503000); 上海市科委工程中心建设 (11DZ2280300)

作者简介: 贾宇声 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: eqjiayusheng228@hotmail.com

通信作者: 王永杰, E-mail: yjwang@shou.edu.cn

(卡尔蔡司, Scope. A1)、移液枪(Eppendorf)、组织研磨器(天根, OSE-Y20)、厌氧罐与厌氧指示剂(日本三菱瓦斯化学株式会社)、电泳仪(Bio-Rad)、灭菌锅(SANYO)、酶标仪、变性梯度凝胶电泳成像系统(BioRad Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR + System)、荧光定量 PCR 仪(ABI 7500 Fast real time PCR system)。

1.2.2 试剂

Zeiss “Immersion” 518F 无荧光镜油(卡尔蔡司), 硝酸纤维素滤膜(0.2 μm 孔径, 密理博), 500 mmol/L Na₂-EDTA, 0.1 mol/L PBS, 900 mol/L NaCl, 20 mol/L Tris-HCl(pH 8.0), 0.01% SDS (w/V), SYBR Green I 核酸染料(Solarbio), 甘油(生工生物工程), Na₂HPO₄ · 12H₂O(生工生物工程), NaCl(生工生物工程), 包埋剂, 封片剂, MRS 固体培养基(北京陆桥技术有限公司), MRS 肉汤(北京陆桥技术有限公司), 天根细菌基因组提取试剂盒, 曲拉通缓冲液(20 mmol/L Tris, pH 8.0; 2 mmol/L Na₂-EDTA; 1.2% Triton), 无水乙醇(生工生物), 1.2 mol/L 山梨醇缓冲液, 2 × Taq PCR MasterMix(天根生化), PCR 产物回收试剂盒(天根)。

1.3 开菲尔粒乳酸菌基因组 DNA 提取

1.3.1 西藏开菲尔粒的培养

将 -20 °C 保存的西藏开菲尔粒按照 1:10 的比例接种到超高温灭菌的光明纯牛奶中, 25 °C 静置培养 24 h, 然后用灭菌水清洗已发酵的牛奶, 将开菲尔粒按比例重新接种到纯牛奶中, 继续按照上述方法培养。

1.3.2 开菲尔粒乳酸菌的分离培养

取 50 mg 的开菲尔粒加入离心管中充分研磨, 加入 450 μL 无菌生理盐水混匀, 进行梯度稀释。取每个梯度的研磨稀释液 100 μL 分别涂布到 MRS 固体培养基上, 放入厌氧盒中, 30 °C 条件下静置培养 5 ~ 6 d。在合适稀释梯度下的固体培养基上选取单菌落, 分别接种到 MRS 液体培养基中扩大培养。在 30 °C 条件下静置培养 5 ~ 6 d。一部分菌液用于基因组提取, 测序鉴定其种属, 剩余菌液 4 °C 冰箱保存, 留以备用。

1.3.3 开菲尔粒乳酸菌基因组 DNA 提取

分别取分离培养后的 25 株菌的菌液 5 mL, 在 20 °C、转速为 10 000 r/min 的条件下离心 1 min, 去除上清, 沉淀得到的菌体用于提取基因组

DNA。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302), 并严格按照其方法步骤进行实验, 纯化后的 DNA 用 60 μL 纯水洗脱最终得到细菌基因组 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳及 DNA 浓度检测后, -20 °C 保存, 以用于后续实验。

1.3.4 开菲尔粒微生物基因组 DNA 提取

样品前处理:(1)用无菌剪刀和镊子随机剪取开菲尔粒外表面、内表面和中间部分 3 ~ 4 块, 共计 40 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 用组织研磨器将样品研碎, 重悬与 600 μL 山梨醇缓冲液中, 继续研磨至均匀, 加入 5 μL 溶壁酶, 放置到金属浴内, 30 °C, 30 min。(2)6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 108 μL 曲拉通缓冲液和 72 μL 溶菌酶, 置于金属浴内, 37 °C 孵育 50 min。

基因组提取:基于海洋动物组织基因组提取试剂盒操作流程并进行了适当的优化。(1)加入 200 μL GA 缓冲液, 并加入 4 μL RNA 酶, 室温静置 5 min, 去除 RNA。(2)加入 50 μL 蛋白酶 K, 再加入 220 μL GB 缓冲液, 颠倒混匀。置于金属浴。70 °C, 10 min。(3)加入 220 μL 无水乙醇, 混匀, 转至吸附柱 CB3 中, 12 000 r/min 离心 30 s。(4)弃废液, 加入 600 μL GD 缓冲液, 12 000 r/min 离心 30 s。(5)弃废液, 加入 600 μL PW 缓冲液, 12 000 r/min 离心 30 s。(6)重复上一步骤。(7)继续离心 2 min。(10)将吸附柱 CB3 放入新离心管中, 悬空滴加洗脱液 TE 100 μL, 室温静置 2 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中。

1.3.5 开菲尔粒乳酸菌克隆文库的构建与鉴定

以西藏开菲尔粒基因组为模板, 用细菌通用引物 27F-1492R 扩增 16S rRNA 基因全长序列。PCR 反应体系为 50 μL, 其中包含 25 μL 2 × Taq PCR MasterMix, 约 100 ng 基因组 DNA。10 μmol/L 引物各 1 μL, PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 35 个循环: 变性 94 °C, 30 s, 退火 55 °C, 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 72 °C 再延伸 10 min。按照 PCR 产物纯化回收试剂盒的说明, 对 PCR 扩增产物(200 μL)进行纯化, 洗脱的体积为 100 μL。纯化后的 PCR 扩增产物首先使用酶标仪来确定 DNA 浓度。每组纯化的 PCR 产物, 根据连接试剂盒的操作说明, 连接至 pGM-T 克隆载体并进行 16 °C 过夜。将大肠杆菌 TOP10 感受态细胞置于冰浴中融化后轻轻混匀, 防止细胞破裂。把连接

有 PCR 产物的克隆载体加入到感受态细胞中,冰浴放置 30 min。将菌液转移至 42 °C 水浴中热激 60~90 s,然后迅速转移到冰浴中冷却 2 min。向菌液中加入 500 μ L LB 培养基(不含抗生素),混匀后置于 37 °C 200 r/min 振荡培养 60 min。取适量转化后的菌液,加到添加氨苄青霉素并涂有 IPTG 和 X-Gal 的 LB 培养基进行培养,经蓝白斑筛选、菌落 PCR 筛选出阳性克隆,最后使用 T7 通用引物由上海生工生物有限公司进行序列测定。

1.4 测序分析方法

使用 Geneious 软件^[12]对测序所得到的序列进行预处理,去除载体序列,检测嵌合体。然后

将序列应用 BLASTN 程序^[13]进行相似性序列搜索分析。比对结果,根据相似度进行排序分类:序列相似度大于 97% 小于 99% 的,将其归于属的水平上;序列相似度大于等于 99% 的,根据其最相似序列归在种的水平上,并做统计学分析。

1.5 菌落 PCR

用已灭菌吸头在单菌落上沾取微量菌体到 PCR 反应管中作为反应模板,以 *Lb. kefir* 特异性引物 LK2-F 和 LK2-R 为引物(表 1)进行菌落 PCR,验证所取菌落是否为 *Lb. kefir*。PCR 反应体系和反应程序见表 2 和表 3。

表 1 实验中用到的引物

Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer Name	引物核酸序列(5'-3') Primers nucleic acid sequence	扩增长度/bp Amplified fragment length	参考文献 References
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	1 465	[15]
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		
338F ^a	CCTACGGGAGGCAGCAG3	180	[16]
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
LK2-F	TTA GAG TGC TTG CAT TTA GAA TGA T	274	本实验
LK2-R	GTG GCC GAT TAC CCT CTC AG		

注:a.引物 5'端有 40 bp 的 GC 夹子(CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG)

Note: a. There are 40 bp GC clamp on 5' end

表 2 PCR 反应体系

Tab.2 PCR reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume
2 × Taq PCR MasterMix	25 μ L
正向引物 Forward primer	1 μ L
反向引物 Reverse primer	1 μ L
模板 Template	菌体
水 Water	22 μ L
总体积 Total	50 μ L

1.6 扫描电镜

Lb. kefir 在 MRS 液体培养基中培养 5~6 d 后,取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 10 min 后,弃上清液留取菌液沉淀。加入 2.5% 戊二醛前固定 2 h 以上,放置于 4 °C 冰箱中。加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PBS,静置 15 min 进行清洗,重复 3~4 次。用 1% 的锇酸后固定 1~2 h。加入 0.1 mol/L PBS,静置 15 min 进行清洗,重复 3~4 次。乙醇梯度脱水:50%、70%、80%、90%、95%、100%、100% (加无水硫

酸钠)各 15 min。加入 V(乙酸异戊酯):V(乙醇)=1:1 溶液放置 30 min。加入纯乙酸异戊酯放置 30 min。然后进行 CO₂ 临界点干燥,粘样,镀膜,上镜观察。

表 3 PCR 反应程序

Tab.3 PCR reaction program

循环步骤 Cycle step	温度/°C Temperature	时间 Time	循环数 Cycle number
预变性 Predegeneration	95	5 min	1
变性 Denaturation	94	30 s	35
退火 Annealing	55	30 s	
延伸 Extension	72	1 min	
延伸 Extension	72	10 min	
保温 Hold	4	∞	

1.7 PCR-DGGE

用从开菲尔粒中分离纯化所得到的 *Lb. kefiranofaciens* 与 *Lb. kefiri* 纯培养菌株作为 PCR-DGGE 参照。以西藏开菲尔粒微生物基因组(提取方法参照 1.3.4), 以及 *Lb. kefiranofaciens* 与 *Lb. kefiri* 两株纯培养乳酸菌基因组(提取方法参照 1.3.3) 作为模板, 用通用引物 338F-518R 扩增 16S rRNA 基因的 V3 区, PCR 反应体系为 50 μ L, 其中包扩 25 μ L 2 \times Taq PCR MasterMix, 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, 约 100 ng 基因组 DNA, 其中引物为通用引物 338F 5' 端有 40 bp 的 GC 夹子^[14]。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进入 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测目的产物的长度。

取 20 μ L PCR 产物上样于 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度为 40% ~ 60% (100% 变性剂含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。制备好的胶体在 1 \times TAE 缓冲液中先 60 V 预电泳 30 min, 待温度上升至 60 $^{\circ}$ C 后打开压力泵, 然后在 60 V 的

固定电压下电泳 16 h (Bio-Rad, USA)。电泳结束用浓度为 1 \times SYBR Green I 核酸染料染色 20 min。通过凝胶成像系统对染色后的凝胶片进行拍照与分析。

2 结果与分析

2.1 细菌克隆文库的构建和鉴定

以开菲尔粒基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 16S rRNA 基因全长序列连接到 pGM-T 载体上, 转化到 TOP10 大肠杆菌感受态细胞中, 进行蓝白斑筛选及菌落 PCR 鉴定。在菌落 PCR 结果为阳性的菌落中选取 25 个进行测序。对这 25 条测序所得序列进行相互比对, 发现其中 24 条序列属于同一序列, 1 条序列与其余 24 条序列有差异。将全部 25 条序列上传至 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列比对, 结果如表 4 所示, 发现 24 条相同的序列与 *Lb. kefiranofaciens* 有 99% 的相似性, 另外 1 条序列与 *Lb. kefiri* 有 99% 的相似性。据此推测在西藏开菲尔粒中, 除主要乳酸菌 *Lb. kefiranofaciens* 外, 还含有少量 *Lb. kefiri*。

表 4 克隆文库测序结果

Tab. 4 Clone library sequencing results

菌落数量 Colony number	种名 Species	最相近序列 Similar sequence	相似性 Similarity	E value E value	覆盖率 Coverage
24	<i>Lb. kefiranofaciens</i>	NR_117066.1	99%	0	98%
1	<i>Lb. kefiri</i>	NR_113336.1	99%	0	99%

2.2 *Lb. kefiri* 分离培养及鉴定

开菲尔粒研磨后, 加入无菌水进行梯度稀释, 将稀释的菌悬液涂布到 MRS 固体培养基, 培养后获得开菲尔粒乳酸菌单菌落, 菌落形态如图 1 所示。观察发现一共获得了 2 种菌落形态不同的乳酸菌。其中一种菌落直径较小, 菌落表面光滑, 菌落相对较厚。另一种菌落直径较大, 表面粗糙, 菌落相对较薄。

以菌落为模板, 使用 *Lb. kefiri* 特异性引物 LK2-F 和 LK2-R (表 1), 通过菌落 PCR 共验证了 22 个菌落。结果如图 2 所示, 在 22 个待验证的菌落中, 有 5 个菌落的菌落 PCR 结果呈阳性, 意味着这 5 个单菌落是 *Lb. kefiri*。把已鉴定为 *Lb. kefiri* 的菌落接种到 MRS 液体培养基中扩大培养, 留以后续实验之用。将菌落 PCR 结果与菌落形态对应起来, 得出 *Lb. kefiri* 菌落直径较小, 菌落表面光滑且相对较厚。

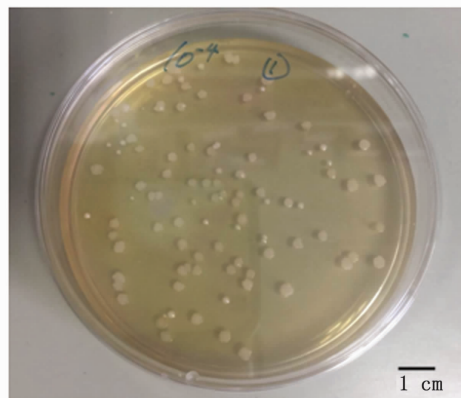


图 1 MRS 固体培养基培养的开菲尔粒中乳酸菌单菌落

Fig. 1 Single Colony of lactic acid bacteria from kefir grains on MRS solid medium

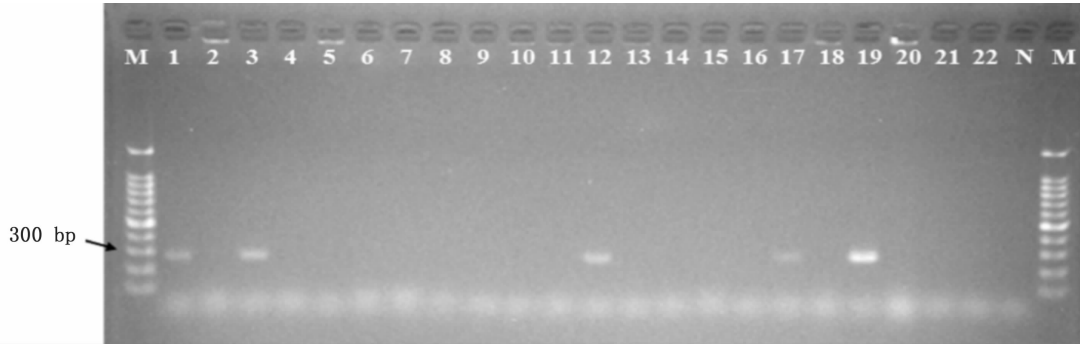


图2 22个菌落的PCR结果凝胶电泳图
 Fig.2 Colony PCR gel electrophoresis of 22 colonies

2.3 *Lb. kefir* 扫描电镜观察

图3为 *Lb. kefir* 的扫描电镜图片,通过观察发现 *Lb. kefir* 是一种短状杆菌(0.8 ~ 1.5 ×

0.6 ~ 0.7 μm)。与 *Lb. kefiranofaciens* 的细胞形态^[7]进行对比,虽然都是杆状细菌,但 *Lb. kefir* 细胞相对较短且细菌聚集生长的趋势更为明显。

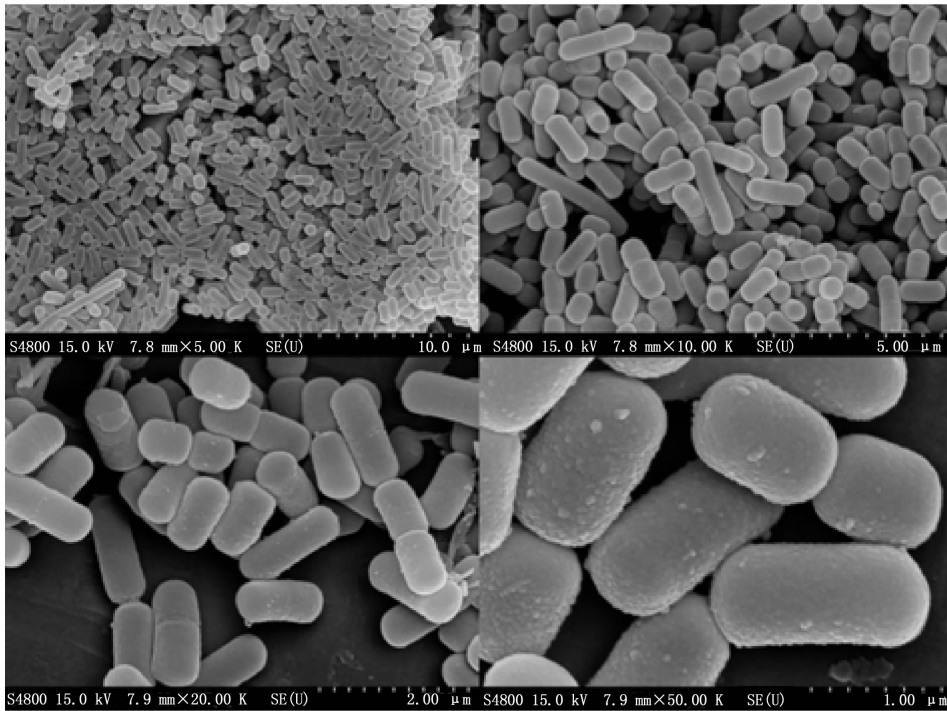


图3 *Lb. kefir* 的扫描电镜图片
 Fig.3 Scanning electron micrographs of *Lb. kefir*

2.4 利用 PCR-DGGE 检测开菲尔粒中的 *Lb. kefir*

两次采样,一共4个开菲尔粒样品以及 *Lb. kefiranofaciens* 纯培养和 *Lb. kefir* 纯培养进行了PCR-DGGE实验,结果如图4所示。

4个开菲尔粒样品的DGGE条带中最亮的条带位置与 *Lb. kefiranofaciens* 纯培养的条带位置相

同,证明开菲尔粒样品中 *Lb. kefiranofaciens* 的存在且为优势菌种,此结果也与之前研究结论相一致。4个开菲尔粒样品中都存在一微弱条带,其位置与 *Lb. kefir* 纯培养的条带位置相同,说明开菲尔粒中存在 *Lb. kefir*,不过其数量要远小于 *Lb. kefiranofaciens*。对于KG样品(a, b, c和d)PCR-DGGE电泳图,除了中部和靠近底部的两个

条带比较集中的电泳条带外,还出现了一些弥散的条带。这是在 PCR 过程中发生不可避免的非特异性扩增所导致的。结合 LK1 和 LK2 两个参考菌株的电泳条带特征,KG 样品电泳图中的弥散条带是 PCR 所产生的背景噪声,并不影响实验结果。

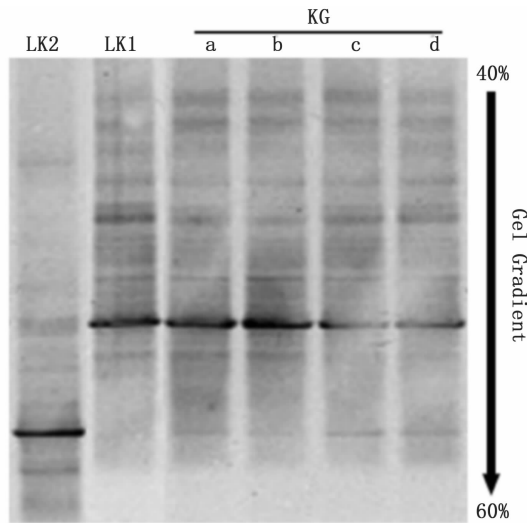


图4 西藏开菲尔粒基因组以及分离纯培养的 *Lb. kefiranofaciens* 和 *Lb. kefiri* 基因组 DGGE 实验
Fig. 4 PCR DGGE of Tibetan kefir grains and *Lb. kefiranofaciens* and *Lb. kefiri*

Lk2: *Lb. kefiri*; Lk1: *Lb. kefiranofaciens*; a, b, c, d: 不同批次西藏开菲尔粒样品

Lk2: *Lb. kefiri*; Lk1: *Lb. kefiranofaciens*; a, b, c, d: different Tibetan kefir grain samples

3 讨论

本文的研究结果表明,在西藏开菲尔粒的乳酸菌中,除优势菌株 *Lb. kefiranofaciens* 以外,还含有非优势菌株 *Lb. kefiri*。在其他研究结果中发现,开菲尔粒中的乳酸菌不仅限于 *Lb. kefiranofaciens*,还有其他种属的乳酸菌也稳定存在于开菲尔粒微生物群落中,比如 *Lactobacillus kefiri* (CHEN 等^[8]), *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* (ZHOU 等^[10])。此次研究结果证明了开菲尔粒微生物组成的多样性,并且与其他研究的结论相一致。开菲尔粒的发酵作用是在其内部全部微生物共同作用下完成的,因此认识其中的非优势菌种也是非常必要的。

扫描电镜观察发现,*Lb. kefiri* 为短状杆菌,

聚集在一起形成相对致密的菌膜。对比之前的研究结果,*Lb. kefiranofaciens* 是长状杆菌(1.7 ~ 2.5 × 0.5 ~ 0.6 μm),聚集程度相对较小^[7]。因此 *Lb. kefiri* 在细胞形态以及生长聚集模式上与 *Lb. kefiranofaciens* 可能有着明显的区别。LU 等^[6] 研究发现西藏开菲尔粒的外表面结构相对紧实,本次研究通过电镜观察 *Lb. kefiri* 生长时,发现其具有非常明显的聚集趋势,所以推测 *Lb. kefiri* 主要分布在西藏开菲尔粒的外表面。WANG 等^[17] 的研究结果中发现,*Lb. kefiri* 与其他乳酸菌相比,拥有显著的生物膜合成特性,因此推测 *Lb. kefiri* 在维持开菲尔粒整体结构方面可能起着一定作用。

此外,本次实验试图利用荧光原位杂交的方法观察 *Lb. kefiri* 在西藏开菲尔粒中的分布情况时,发现特异性探针并没有与 *Lb. kefiri* 中的 RNA 结合给出荧光信号。当对西藏开菲尔粒进行溶菌酶破壁处理时,*Lb. kefiranofaciens* 特异性探针可以与 *Lb. kefiranofaciens* 结合发出荧光信号^[7],但 *Lb. kefiri* 探针却仍然没有给出信号。可能的原因之一是 *Lb. kefiri* 在开菲尔粒中的数量过少,导致荧光杂交信号较弱,难以被显微镜捕获。

通过克隆文库构建与鉴定、分离培养以及 DGGE 证明了 *Lb. kefiri* 稳定存在于本实验室所培养的西藏开菲尔粒中。基于克隆文库的测序结果,分离培养阳性菌落个数和 DGGE 电泳条带的亮度,都一致地表明 *Lb. kefiri* 在开菲尔粒中所占比例较小,是开菲尔粒中一种非优势乳酸菌。这些结论也与其他研究结果相一致^[18]。

以上发现对 *Lb. kefiri* 有了新的认识和了解,为以后西藏开菲尔粒的研究奠定了一定理论基础。

参考文献:

- [1] ZAMBERI N R, ABU N, MOHAMED N E, et al. The antimetastatic and antiangiogenesis effects of kefir water on murine breast cancer cells[J]. Integrative Cancer Therapies, 2016, 15(4): NP53-NP66.
- [2] JALALI F, SHARIFI M, SALEHI R. Kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia [J]. Medical Oncology, 2016, 33(1): 7.
- [3] HUSEINI H F, RAHIMZADEH G, FAZELI M R, et al. Evaluation of wound healing activities of kefir products[J]. Burns, 2012, 38(5): 719-723.
- [4] XING Z, TANG W, GENG W, et al. In vitro and in vivo

- evaluation of the probiotic attributes of *Lactobacillus kefirifaciens* XL10 isolated from Tibetan kefir grain [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(6): 2467-2477.
- [5] NIELSEN B, GURAKAN G C, ÜNLÜ G, et al. Kefir: a multifaceted fermented dairy product [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2014, 6(3/4): 123-135.
- [6] LU M, WNA X, SUN G, et al. Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101387.
- [7] 王兴兴. 西藏开菲尔粒中优势菌的鉴定、分布与稳定性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- WANG X X. The dominant, stable bacterial species and its distinct morphotypes in response to its distribution in Tibetan Kefir grains [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [8] CHEN H C, WANG S Y, CHEN M J, et al. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(3): 492-501.
- [9] NINANE V, MUKANDAYAMBAJE R, BERBEN G. Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions [J]. *Journal of AOAC International*, 2007, 90(4): 1111-1117.
- [10] ZHOU J Z, LIU X L, JIANG H H, et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(8): 770-775.
- [11] VARDJAN T, LORBEG P M, ROCELJ I, et al. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(5): 2729-2736.
- [12] KEARSE M, MOIR R, WILSON A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(12): 1647-1649.
- [13] CHEN Y, YE W C, ZHANG Y D, et al. High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(16): 7762-7768.
- [14] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* [M]. New York: Wiley, 1991: 115-175.
- [16] PARK E J, CHANG H W, KIM K H, et al. Application of quantitative real-time PCR for enumeration of total bacterial, archaeal, and yeast populations in kimchi [J]. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47(6): 682-685.
- [17] WANG S Y, CHEN K N, LO Y M, et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain [J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(2): 274-285.
- [18] LEITE A M O, MAYO B, RACHID C T C C, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis [J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(2): 215-221.

Isolation and identification of *Lactobacillus kefir* from Tibetan kefir grains

JIA Yusheng¹, WANG Xingxing¹, PAN Yingjie^{1,2,3}, WANG Yongjie^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Production on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: Our previous work suggests that *Lb. kefirifaciens* is the dominant bacterial species in Tibetan kefir grains and comprises approximately 95% of all lactic acid bacteria. In this research, bacterial isolation and purification, 16S rRNA gene cloning and sequencing, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), colony PCR and scanning electron microscope observation were performed to understand non-dominant lactic acid bacteria in kefir grains. Scanning electron microscope observation revealed that the cells of *Lb. kefir* are short rod ($0.8 - 1.5 \times 0.6 - 0.7 \mu\text{m}$), which were shorter than *Lb. kefirifaciens*. *Lb. kefir* cells tended to form aggregates in pure culture condition. After sequencing analysis, 1 of 25 clones was related to *Lb. kefir*. For 22 colonies isolated from kefir grains, 5 colonies are *Lb. kefir*. In addition, DGGE results showed that *Lb. kefir* exists in all kefir grain samples. These results demonstrate that *Lb. kefir* exists in kefir grain and remains stable and is non-dominant.

Key words: Tibetan kefir grains; *Lb. kefir*; scanning electron microscope; clone library; isolation and purification; DGGE; cell morphology observation