

干酪乳杆菌 T1 生物特性及保藏方法研究

王 敏, 陈 冲, 宋丽菊, 齐盼盼, 易真珍, 冯 甦, 张 杰, 赵 建*

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘 要: 干酪乳杆菌是一种具有广泛研究价值和良好研究前景的有益微生物。从青藏高原牧区的牦牛酸奶中分离出一株产细菌素的干酪乳杆菌 T1 (*Lactobacillus casei* T1)。通过探究菌株基本性质, 研究能替代 MRS 的低成本培养基, 筛选冻干保护剂等提高候选生产菌株 T1 的潜在生产价值。结果显示干酪乳杆菌 T1 的生长温度区间为 20~40℃, 耐受的 pH 值范围为 pH2~pH10。T1 菌株对供试革兰阳性细菌和革兰阴性细菌均有较好的抑制作用, 对部分供试真菌也有抑制作用, 豆粕 MRS 培养基适应性好。以存活率为指标, 进行冻干保护研究的结果表明, 供试的 4 种保护剂的保护效果由大到小依次为乳糖、甘油、甘露醇和抗坏血酸。对候选生产菌株 T1 生物特性及菌种的保藏研究为该菌的开发打下坚实的理论基础。

关键词: 干酪乳杆菌; 生物学特性; 菌种保藏

中图分类号: Q939.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0073-04

Biological properties and preservation of *Lactobacillus casei* T1

WANG Min, CHEN Chong, SONG Liju, QI Panpan, YI Zhenzhen, FENG Su, ZHANG Jie, ZHAO Jian

(Key Laboratory of Biological Resource and Ecological Environment of Chinese Education Ministry, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: *Lactobacillus casei*, a probiotics, has a widely research value and prospect. A strain of *Lactobacillus casei* named T1 that can stably produce bacteriocin was isolated from the Tibetan Plateau yak yogurt. The aim of this study was to investigate some basic growth properties of T1, the low-cost medium of MRS, and technical methods for a high freeze-dried survival rate to increase its potential production value. In conclusion, T1 has wide a range of growth temperature (20 °C to 40 °C). Under the condition of pH2 -10, T1 can survive and produce good biomass. The supernatant of T1 exhibited strong inhibitory effect on the relative strains of T1 and Gram-positive bacteria. A strong activity was also observed against the gram-negative bacteria. By adding suitable protective agent, the survival rate of the freeze-dried bacteria was improved. These findings would lay a theoretical foundation for further industrial production.

Key words: *Lactobacillus casei*; biological characteristics; culture preservation

干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 属于乳杆菌属 (*Lactobacillus*)^[1]。干酪乳杆菌作为益生菌的一种, 能够耐受有机体的防御机制, 有效起到使肠道菌群平衡, 促进消化和吸收的作用^[2-3]。同时研究发

现干酪乳杆菌具有降血压^[4]和降胆固醇^[5]的作用, 还能加快细胞分裂速度, 产生抗体和提高免疫功能^[6], 甚至对癌症和肿瘤的生长都有一定的防御作用^[7]。此外, 干酪乳杆菌还因具有缓解乳糖不耐症

收稿日期: 2015-08-03

基金项目: 四川省科技支撑计划 (2013GZX0161), 教育部新世纪人才和川大优秀青年学者项目 (NCET-13-0397, 2013SCU04B14) 和四川省农业科技转化资金和科技成果转化项目 (2013SCNZ007, 2015KJT0001-2014N) 共同资助。

作者简介: 王 敏, 硕士研究生。E-mail: 18428392272@163.com

* 通信作者: 赵 建, 博士, 副教授。E-mail: zj804@scu.edu.cn

和减缓肠胃过敏症状等保健作用而被人们熟悉^[8-9]。另一方面,干酪乳杆菌在发酵过程中可以产生具有抑菌谱广、无抗原性和对热稳定的抗菌肽^[10]。

虽然干酪乳杆菌有着广阔的研发前景,但对于益生菌种,相对研究较多的是双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和植物乳杆菌等,国内对干酪乳杆菌的研究相对较少^[11]。本研究对西藏地区酸奶来源的一株产细菌素的候选生产用 *Lactobacillus casei* T1 (*L. casei* T1) 进行生物性质和菌种保藏方面研究,同时加入干酪乳杆菌标准菌株 *Lactobacillus casei* 20273 (*L. casei* 20273) 作对照,旨在探究 *L. casei* T1 作为候选生产菌株的优势,为进一步开发利用提供理论依据^[12]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 供试菌株:干酪乳杆菌 T1 菌种 (*L. casei* T1), 分离筛选自青藏高原牦牛酸奶;对照菌株:干酪乳杆菌标准菌株, CICC 编号为 20273 (*L. casei* 20273); 指示菌:大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*), 嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*), 短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*), 黄曲霉 (*Aspergillus flavus*), 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*), 总状毛霉 (*Mucor racemosus*), 白地霉 (*Geotrichum candidum*), 均为本实验室保藏菌株。

1.1.2 主要试剂 改良 MRS 培养基 (g L^{-1}): 蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、葡萄糖 20.0 g、 K_2HPO_4 2.0 g、柠檬酸二铵 2.0 g、乙酸钠 5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、吐温-80 1 mL、琼脂 15.0 g (液体培养基不加), pH 自然; 细菌 LB 培养基的配置参照相关文献^[13]; 脱脂乳培养基: 将脱脂乳粉和蒸馏水按比例配成 10% 的培养基。

用于培养基配制的葡萄糖、蛋白胨、牛肉浸膏等试剂为国产分析纯, 脱脂乳粉购自伊利乳业。

1.2 方法

1.2.1 菌体生长曲线和酸化能力的测定 将活化好的 *L. casei* T1 菌株按 2% (v/v) 的比例接入 MRS 培养基中, 37℃ 静置培养 96 h。从接种开始计为 0 h, 0~24 h 每隔 4 h 取样, 24~96 h 每隔 12 h 取样, 测定发酵液在 600 nm 波长下的吸光度 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值及

pH 值。以未接种的液体培养基为空白调零。

1.2.2 初始 pH 值对菌株生长的影响 将 2% (v/v) 的活化 *L. casei* T1 和 *L. casei* T1, 均接入用 1 mol L^{-1} 的 NaOH 或 1 mol L^{-1} 的 HCl 分别调初始 pH 为 2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 的 MRS 液体培养基中。37℃ 静置培养 24 h 后, 分别测定 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ 值。

1.2.3 培养温度对菌株生长的影响 将 *L. casei* T1 和 *L. casei* T1 菌种分别活化后, 经系列梯度稀释后进行平板涂布。分别置于 20℃、27℃、35℃、40℃ 和 45℃ 温度下恒温培养。36 h 后, 采用平板记数法, 分别测定活菌数。

1.2.4 摇瓶接种量对菌株生长的影响 以 2%、4%、6%、8%、10%、15% 和 20% (v/v) 的接种量接入活化 *L. casei* T1 菌液后, 37℃ 静置培养 36 h。选择适当的稀释倍数, 采用显微镜计数法, 进行细菌总数测定。

1.2.5 T1 菌株发酵液的抑菌谱测定 将 *L. casei* T1 接种到 MRS 液体培养基, 37℃ 静置培养 48 h。离心取发酵上清液, 放冰箱备用。双层琼脂扩散打孔法测定抑菌活性。先将融化的固体 MRS 培养基倒入平板, 待其凝固作为底层。加入 1 mL 各指示菌液 (菌悬液终浓度为 $1 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$), 倾入 LB 培养基, 轻摇混匀后水平放置使其凝固, 作为菌层。孔径 7 mm 无菌打孔器打孔, 向每个孔中加入 100 μL *L. casei* T1 发酵上清液, 37℃ 培养 24 h。测定抑菌圈直径大小。

1.2.6 低成本培养基成分的初步优化 初步优化 *L. casei* T1 的发酵工艺。针对生产成本较高, 不适合 *L. casei* T1 作为候选生产菌株进一步大规模工业化生产的问题, 对以豆粕为基础的简化培养基进行初步优化研究。方法如下: 以改良 MRS 液体培养基为基础培养基, 去除蛋白胨 (氮源), 加入 2% 的豆粕作为氮源。以改良 MRS 培养基为对照组。接入 *L. casei* T1 10.5%, 35℃ 恒温静置培养, 36 h 后测活菌数。

1.2.7 *L. casei* T1 的菌种保藏 采用真空冷冻干燥法保存 *L. casei* T1 菌种。首先将 *L. casei* T1 种子液活化, 37℃ 培养 48 h。采用菌落平板计数法, 对冻干前活菌数进行测定。配制 10% 的脱脂乳, 选择浓度为 10% 乳糖, 5% 甘露醇, 5% 甘油, 5% 抗坏血酸作为预选保护剂, 分别加入到已配制好的脱脂乳中, 并对应编号。再于各管中分别加入冷冻干燥的菌体, 在 -20℃ 冰箱里预冻 2 h, 使其均匀冻结在内壁上。打开真空干燥机, 预冷到 -40℃ 以下, 收集冷冻好

的菌体, 放入真空干燥机开过夜干燥。将保存的冻干菌体样品分别于 10 d、20 d 和 30 d 后取出进行活菌数检测, 并计算冻干存活率^[14]。

2 结果与分析

2.1 菌株的生长曲线

L. casei T1 的生长曲线见图 1。菌株在经过较短的延滞期后, 约从 4 h 开始进入对数生长期, 此时菌体活性最强, 迅速生长; 在 36 h 左右达到生长高峰进入稳定期, 一直持续到 72 h 后开始衰亡。*L. casei* T1 的产酸曲线: 在 1~4 h 的范围内, pH 已经明显下降, 这说明 *L. casei* T1 在 4 h 以前已经开始生长, 其延滞期小于 4 h。从产酸曲线可以看出, 菌体大量繁殖产酸, 使得 pH 下降幅度很大, 到对数生长期结束, pH 达到最低点, 此后直至发酵结束, 培养基 pH 值维持在 3.5 ± 0.01 。

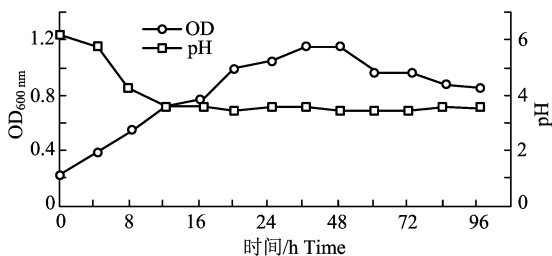


图 1 T1 菌株的生长曲线
Figure 1 Growth curve of T1

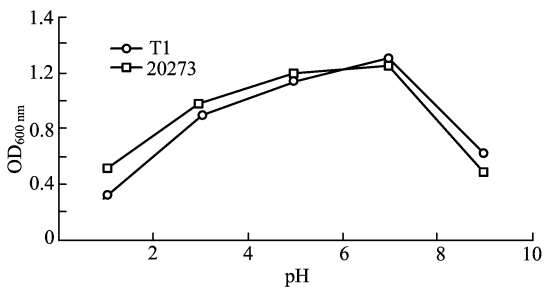


图 2 初始 pH 值对菌液 OD_{600nm} 值的影响
Figure 2 Effect of original pH values on OD_{600nm} value

2.2 不同初始 pH 值对菌株生长的影响

L. casei T1 和 *L. casei* 20273 对酸碱环境的适应

能力相似, 在 pH2~pH10 的培养基里均能生长。随着初始 pH 的增加, 菌液 OD 值随之增加。在初始 pH6~pH8 的培养基里生长最优。初始 pH 大于 8 时, 菌体生长开始减弱 (如图 2)。但在 pH10 的碱性环境里, *L. casei* T1 的生长情况好于标准菌, 即更耐碱性环境。

表 1 温度对菌株活菌数的影响

温度/°C Temperature	T1 活菌数/cfu mL ⁻¹ Viable count of T1	20273/cfu mL ⁻¹ Viable count of 20273
20	$2.30 \pm 0.24 \times 10^6$	0
27	$1.23 \pm 0.54 \times 10^8$	$7.80 \pm 0.30 \times 10^8$
35	$1.50 \pm 0.20 \times 10^8$	$9.80 \pm 0.25 \times 10^8$
40	$9.30 \pm 0.20 \times 10^7$	$2.70 \pm 0.20 \times 10^7$
45	0	0

表 2 摇瓶接种量对总菌数的影响

接种量/% Inoculum size	T1 总菌数/cfu mL ⁻¹ Total plate counts of T1
2	2.50×10^6
4	9.25×10^6
6	1.13×10^7
8	2.15×10^7
10	1.33×10^7
15	3.25×10^6
20	1.75×10^6

2.3 不同培养温度对菌株生长的影响

L. casei T1 可以在较宽的温度范围内生长, 最高生长温度为 40°C, 最低生长温度为 20°C, 活菌数在一定温度范围内表现出先升高后降低的趋势 (如表 1), 其中在 27~35°C 范围内生长较好。但温度过高, 菌体内蛋白质及酶会变性造成菌体死亡, 不适宜菌体生长。而 *L. casei* 20273 在低于 27°C 无法正常生长。说明抗寒和耐热的能力比标准菌株更优。

表 3 T1 的抑菌谱

Table 3 Antibacterial spectrum of T1

指示菌 Indicator bacteria	抑菌活性 Bacteriostatic activity	指示菌 Indicator bacteria	抑菌活性 Bacteriostatic activity
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	++	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	++
鼠伤寒沙门氏菌 <i>S. typhimurium</i>	++	短乳杆菌 <i>Lb. brevis</i>	+
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	+++	黄曲霉 <i>A. flavus</i>	±
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	+++	产黄青霉 <i>P. chrysogenum</i>	-
蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	++	总状毛霉 <i>M. racemosus</i>	-

保加利亚乳杆菌 *L.bulgaricus*

++

白地霉 *G.candidum*

-

注: + 表示抑菌圈直径(mm), “±”表示 7~8 mm, “+”表示 8~10 mm, “++”表示 10~15 mm, “+++”表示 >15 mm, “-”表示阴性。

Note: Inhibition zones were carried out “+”. “±”represents 7-8 mm, “+”represents 8-10 mm, “++”represents 10-15 mm, and “+++” represents over 15 mm, “-”represents negative.

表 4 冻干期间 T1 菌株的活菌数变化

Table 4 The change of viable number of T1 during the freeze-drying

cfu mL⁻¹

冻干保护剂 Cryoprotectant	冻干前活菌数 Viable counts before freeze-drying	冻干后活菌数 Viable counts after freeze-drying		
		10 d	20 d	30 d
10% 乳糖 Lactose	1.23×10 ⁸	8.73 ± 0.94×10 ⁷ (71.00%)	8.73 ± 0.67×10 ⁷ (71.00%)	8.24 ± 0.69×10 ⁷ (67.00%)
5% 甘露醇 Mannitol	1.23×10 ⁸	5.04 ± 0.88×10 ⁷ (41.00%)	5.04 ± 0.23×10 ⁷ (41.00%)	4.98 ± 0.27×10 ⁷ (40.50%)
5% 甘油 Glycerol	1.23×10 ⁸	5.67 ± 0.79×10 ⁷	5.67 ± 0.46×10 ⁷	5.63 ± 0.20×10 ⁷

注: 括号内的数据为冻干后 *L. casei* T1 的存活率(%)。

Note: the data in the parenthesis represent the survival rate (%) of T1 after freeze-drying.

2.4 最佳接种量的确定

接种量对菌体生长量的影响比较明显。总菌数随着接种量的增加而增加。并在接种量为 8% 时达到最大, 接种量超过 8% 后开始下降, 结果如表 2 所示。由此表明较大接种量有利于菌体生长, 但是过大的接种量并不会增加总菌数。菌体在接种量为 8% 时生长较好。

2.5 T1 菌株的抑菌谱结果

由表 3 看出, *L. casei* T1 菌株具有较好的抑菌效果。不但对供试的亲缘关系相近的乳杆菌有抑制作用, 而且可抑制供试非乳酸革兰氏阳性菌株和革兰氏阴性菌株, 对部分供试丝状真菌也有抑制作用。说明具有广谱抗菌性。

3 讨论与结论

干酪乳杆菌虽然是一种常见益生乳杆菌, 但国内对其生物学特性研究报道较少, 主要是对作为益生菌乳制品开发的生长性质的研究^[5,7]。本试验是从青藏高原地区传统发酵酸牦牛奶中分离筛选出产细菌素的 *L. casei* T1 的生长特性和菌种保藏等进行研究测定, 为该菌株作为潜在候选生产菌株提供了理论依据。发现 *L. casei* T1 生长较快, 具有较好的环境适应能力。对酸碱环境适应力较强, 能在 pH2~pH10 条件下的环境下生存, 比 *L. casei* 20273 更耐碱性; 且与标准菌株相比有良好的稳定性, 抗寒和耐热能力高于标准菌株。*L. casei* 产细菌素, 具较广谱的抑菌性。因此具有较大的工业开发价值。采用豆粕作为代替氮源的简化培养基进行初步的优化研究, 能达到较高的生物量, 生产成本大幅度降低, 性价比更高, 适合大规模低成本发酵。同时考察冻

干保护剂对乳酸菌的保藏效果, 本试验所选择的 4 种保护剂对 *L. casei* T1 均有一定的保护作用, 其中质量分数为 10% 的乳糖的保护效果最为显著^[15]。总之, 通过对 *L. casei* T1 的生长特性和保存菌种等的研究, 得到的结果为将其作为候选菌株, 并进一步开发提供了一些重要依据。

参考文献:

- [1] 曹瑞博, 汪建明. 干酪乳杆菌的功能性研究及其应用[J]. 中国食品添加剂, 2009 (z1): 169-172.
- [2] 杨英歌, 黄继翔, 李荣, 等. 耐酸乳酸菌的筛选及生长特性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 248-251; 257.
- [3] FUMIYASU I. Probiotics from present to future[J]. The 2nd International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Health, 2006(5): 30-31.
- [4] 韦慧娟. 乳清蛋白酶解物对干酪乳杆菌生长影响的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2013.
- [5] 肖琳琳, 董明盛. 西藏干酪乳酸菌降胆固醇特性研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 142-145.
- [6] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 98-99.
- [7] 卜永士, 郭本恒. 一株干酪乳杆菌的生物学特性研究[J]. 乳业科学与技术, 2004, 27(2): 49-51; 69.
- [8] 张丽萍, 杨晨, 王成强, 等. 干酪乳杆菌在酸奶生产中的应用研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(2): 23-26.
- [9] 汪建明, 赵仁国, 肖冬光, 等. 高活性干酪乳杆菌粉末发酵剂的初步研究[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(2): 9-13.
- [10] 于微, 高学军, 马春丽, 等. 干酪乳杆菌产细菌素的生物学特性分析[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11542-11543; 11570.
- [11] ELISA B M, ANNA B. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods [J]. International Dairy Journal, 2004, 14: 723-736.

- [12] 刘倩, 崔莹光, 陈莹, 等. 一株乳酸菌细菌素的检测及其产生的最佳条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 11-14.
- [13] 杨洁彬, 郭兴华, 张旒, 等. 乳酸菌生物学基础及应用[M].北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [14] 曾小群, 潘道东, 包红燕, 等. 干酪乳杆菌冻干保护剂研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(1): 44-50.
- [15] 熊涛, 田微, 黄寅. 鼠李糖乳杆菌冻干保护剂的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(5): 8-12.