

# 甘南州牧区优良乳酸菌耐受特性的研究

崔 琴, 俞建民, 张 丽, 余群力\*, 安志刚

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:**对分离自甘南州牧区酸牦牛奶中的4株优良乳酸菌的生长性能、耐酸能力、耐胆盐能力、耐渗透压能力和抑菌能力进行了研究。结果表明:4株乳酸菌均有较好的生长特性;球菌A-2-1和杆菌F-2-1在极限pH1.5仍能生长;当胆酸盐浓度达到0.5%时,杆菌B-4-2-1生长受到抑制,其余3株菌均能生长;杆菌F-2-1和G-3-2对浓度高达8%的NaCl均表现出一定的耐受性;同时4株乳酸菌也表现出良好的抑菌效果,杆菌B-4-2-1对金黄色葡萄球菌抑制作用较强,抑菌圈直径19mm,在对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用中菌株F-2-1效果明显,抑菌圈直径分别为18mm和22mm,研究结果可以为其在发酵乳制品中的应用提供参考依据。

**关键词:**益生菌, 乳酸菌, 耐受性, 抑菌活性

## Study on the tolerance property of super LAB strains in pastoral area of Gannan prefecture

CUI Qin, YUN Jian-min, ZHANG Li, YU Qun-li\*, AN Zhi-gang

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** 4 LAB strains, which were isolated from fermented yak milk gathering from the herdsman's home in pastoral area of Gannan prefecture, were studied in the ability of growth characteristics, acid-tolerance, bile salt-tolerance, NaCl-tolerance and antibacterial activity. The results indicated that: all of 4 strains had high growth property; cocci A-2-1 and bacillus F-2-1 can grow in ultimate pH1.5; when the high level of bile salts reached 0.5%, only strain B-4-2-1 was inhibited; strains F-2-1 and B-4-2-1 had high degree tolerance property of 8% NaCl; meanwhile 4 strains exhibited strong inhibitory activity: B-4-2-1 had the strongest effect of inhibition from *Staphylococcus aureus*, with inhibit circle 19mm, while F-2-1 had the strongest effect of inhibition from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, with inhibit circle 18mm and 22mm respectively. The results provide a reference basis for application in fermented dairy products.

**Key words:** probiotic; lactic acid bacterial; tolerance property; antibacterial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)03-0216-04

近年来, 益生菌(双歧杆菌、乳酸杆菌、球菌等)<sup>[1-2]</sup>以其独特的营养与保健作用越来越受到人们的关注。优良的乳酸菌益生菌株不但要有良好的发酵性能, 同时应具有较强的耐受特性, 包括耐酸、耐胆盐、耐渗透压等, 以确保其通过胃及肠道的苛刻环境并定植生长, 以发挥生理功效。本研究对从甘南州牧区牧民制作的酸牦牛奶中分离、鉴定的具有优良发酵性能的菌株进行了耐受性的研究, 为生产具有良好益生特性的发酵乳制品提供科学的参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

乳酸菌菌株 采自甘南州牧区牧民制作的酸牦牛奶, 经分离、筛选具有优良发酵性能的菌株; 杆菌G-3-2(植物乳杆菌, *L.plantarum*) 分离自夏河县阿

木去乎乡西里宁巴加木村; 杆菌F-2-1(干酪乳杆菌, *L.casei*) 分离自夏河县阿木去乎乡民马隆村; 杆菌B-4-2-1(肠乳杆菌, *L.intestinalis*) 分离自夏河县博拉乡扎酒村; 球菌A-2-1(乳酸乳球菌, *L.lactis*) 分离自合作市那吾乡四合大队拉代村; 指示菌菌株 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌, 广东省微生物菌种保藏中心; MRS基础培养基 蛋白陈、牛肉膏、酵母膏、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、牛胆盐, 脱脂乳粉。

YX-280 手提式压力蒸汽灭菌锅 合肥华泰医疗设备有限公司; SW-CF-2FD 型超净工作台 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; HG303-4A 电热恒温培养箱、HG101-3A 电热鼓风干燥箱 南京飞腾实验仪器公司; PHS-3B 精密 pH 计 上海电磁仪器厂; THZ-22 恒温振荡器 江苏太仓实验设备厂; 722 型分光光度计 上海分析仪器厂。

### 1.2 实验方法

一般认为, 益生菌产品发挥功能特性的活菌数

收稿日期: 2009-03-25 \* 通讯联系人

作者简介: 崔琴(1984-), 女, 硕士, 研究方向: 动物食品营养与工程。

基金项目: 兰州市科技项目(2008-1-41)。

临界值为  $10^6$  cfu/mL<sup>[3-4]</sup>, 故进行实验的前提是始终将该浓度作为最低点加以控制。

1.2.1 菌株生长性能的测定 将充分活化恢复活力的菌株以 3% 的接种量接入灭菌的 MRS 液体培养基中, 分装于若干干燥的已灭菌的 250mL 的三角瓶中, 37℃ 下培养, 在 0、2、4、6、8、10、12、16、20h 取样, 600nm 波长下测定 OD 值, 直到 OD 值基本不变时停止实验, 以未接种的液体培养基为空白校零。

1.2.2 耐酸能力的测定 把在 MRS 液体培养基 37℃ 培养 24h 的菌株按 3% 比例分别接种到用盐酸调好的 pH 分别为 1.5、2.5、3.5、4.5、6.5 的灭菌 MRS 液体培养基中, 37℃ 恒温培养, 在 0、2、4、6、24h 分别测定发酵液在 600nm 波长下的 OD 值, 以空白培养基接种相同浓度的菌体进行对照, 并以各自对应的 pH 培养基作调零。

1.2.3 耐胆酸盐能力的测定 把在 MRS 液体培养基中 37℃ 培养 24h 的菌株按 3% 比例分别接种到牛胆盐浓度为 0.00%、0.05%、0.1%、0.5%、1.0%、1.5% 的灭菌 MRS 液体培养基中, 37℃ 恒温培养, 在 0、2、4、6、24h 分别测定发酵液在 600nm 波长下的 OD 值, 以空白培养基接种相同浓度的菌体进行对照, 并以各自对应的胆酸盐浓度培养基作调零。

1.2.4 耐渗透压能力的测定 把在 MRS 液体培养基中 37℃ 培养 24h 的菌株按 3% 分别接入含 NaCl 质量分数为 3%、4%、5%、6%、7%、8% 的 MRS 液体培养基中, 37℃ 恒温培养, 在 0、2、4、6、24h 分别测定发酵液在 600nm 波长的 OD 值, 以空白培养基接入相同浓度的菌体作对照, 并以各自对应胆酸盐浓度培养基作调零。

1.2.5 抑菌活性的检测 采用纸片法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸菌生长性能测定结果

对菌株进行生长特性的测定, 有助于确定菌株在保存时的收获时间和在发酵剂制备过程中发酵剂活力的监控。液体培养基中的生长曲线测定, 主要以菌体细胞数量的增加为测定指标。对供试的 4 株乳酸菌进行了生长曲线的测定, 结果如图 1。

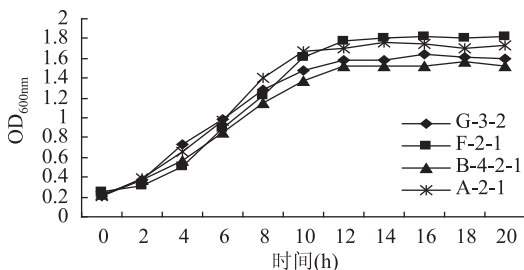


图 1 菌株在 MRS 培养基中的生长曲线 (OD 值)

从图 1 可以看出: 所有供试菌株的菌体密度在培养开始时都没有很大变化, 2h 后开始大量生长, 进入指数生长期, 10h 左右逐渐趋于平缓, 进入生长稳定期。其中球菌 A-2-1 在培养过程中经过较短的延滞期进入指数生长期, 10h 达到生长高峰开始进入生长稳定期; 杆菌 F-2-1 则经过了稍长的延滞期后开始进入指数生长期, 12h 后达到生长高峰进入稳定

期; 其余两株杆菌在 12h 左右分别达到各自的生长高峰进入稳定期。但是, 从该曲线中并不能判定菌株生长稳定期和衰亡期的时间界限, 因为在衰亡期中, OD 值的测定包含活菌以及一部分被自身代谢产物抑制甚至杀死的菌, 因而, 以从 OD 值达到最大时开始迅速收获菌株便能获得高质量和高数量的活菌株。确定菌种保存时菌体最佳收获时间是球菌 10h, 杆菌 12h 可以迅速收获菌体。

### 2.2 耐酸能力的测定结果

胃酸对微生物的影响很大。正常胃液 pH 为 3.0 (2.2~4.4), 大部分来自食物中的微生物被胃液中的胃酸杀死。为了能够发挥乳酸菌的保健作用, 这些乳酸菌在通过胃肠道时必须能够存活。这就要求乳酸菌在低 pH 条件下处理后仍然有较高的活菌数。本实验采用比浊法对四株菌的耐酸能力进行研究, 结果见图 2。

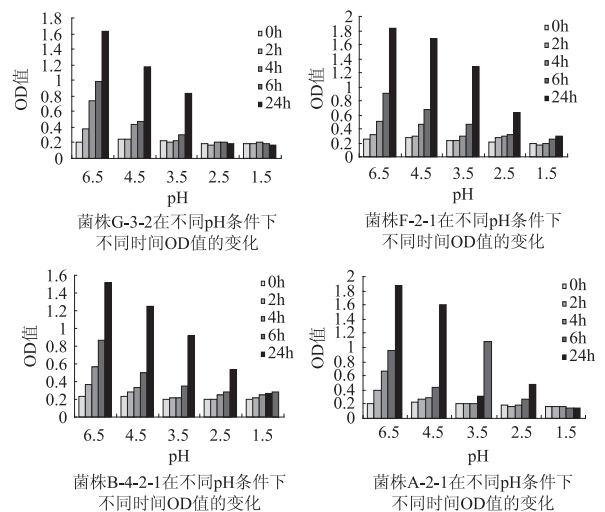


图 2 不同 pH 对实验菌株生长的影响

从图 2 可以看出, 当培养基 pH 从 6.5 下降到 pH1.5 时, 同一菌株培养 24h 后的细胞浓度也由高急剧降低, 说明 pH 对菌株生长影响极大。其中杆菌 G-3-2 受抑制最明显, 自 pH3.5 开始, 培养前 4h 菌株几乎没有生长, OD 值没有变化, 在第 6h 时, 细胞浓度有了小幅度上升, 培养 24h 后, 细胞浓度才有明显的提高, 在更低 pH 下, 培养过程中菌浓度几乎没有发生变化, 说明菌已被抑制或杀死; 杆菌 F-2-1 和 B-4-2-1 在各 pH 均有明显的增长, 只是生长幅度随 pH 的降低而降低, 但是仍能在极限 pH1.5 生长, 表明其具有良好的耐酸性; 球菌 A-2-1 在 pH6.5、4.5、3.5、2.5 时均有所增长, 但在极限 pH1.5 时完全被抑制或杀死。

### 2.3 耐胆酸盐能力的测定结果

人体胆盐浓度一般为 0.3%~0.5%<sup>[5-6]</sup>。乳酸菌耐受胆盐的能力也是保证乳酸菌能在肠道存活的必备条件<sup>[7]</sup>。Gilliland 等人进行比较实验表明, 具有较高胆汁耐受能力的嗜酸乳杆菌比耐受胆汁能力低的菌株更能显著地提高小肠上端乳杆菌含量<sup>[8]</sup>。

实验菌株生长受胆酸盐的影响很大, 不同菌株的胆酸盐耐受性差异明显, 结果如图 3。可以看出, 从胆酸盐浓度 0.1% 开始, 各菌株生长均受到明显影

响。菌株 B-4-2-1 在 0.5% 及更高的胆酸盐浓度下不能生长; 菌株 G-3-2、F-2-1、A-2-1 的生长相类似, 在胆酸盐浓度为 0.5% 时均能生长, 但在胆酸盐浓度为 1.0% 和 1.5% 时均不能生长; 相比而言球菌 A-2-1 的菌体浓度均比其余两株杆菌高, 表明球菌 A-2-1 有较强的胆酸盐耐受能力, 而菌株 F-2-1 和 G-3-2 相对耐胆酸盐浓度的能力较弱。

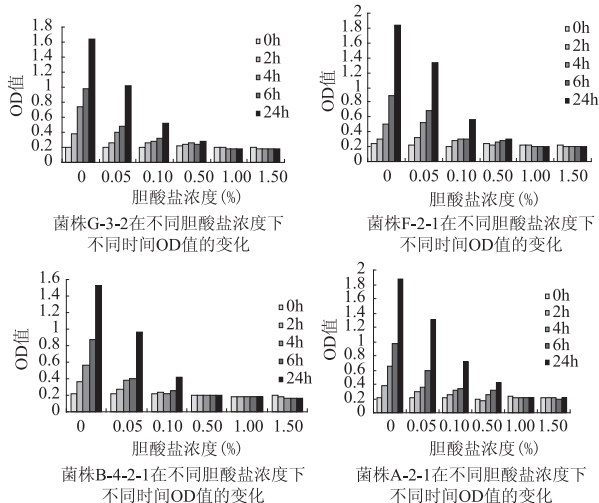


图3 不同的胆酸盐浓度对实验菌株生长的影响

## 2.4 耐渗透压能力的测定结果

微生物对渗透压变化有一定的适应能力, 渗透压突然较大程度的改变, 对微生物的生长不利, 甚至死亡。本实验用已有研究的 NaCl 浓度, 研究实验菌株对渗透压变化的适应能力。

由图4可以看出, 这4株菌对 NaCl 浓度变化都表现出了一定的耐受作用。实验菌株对不同 NaCl 浓度的耐受能力差异较大, 其中杆菌 F-2-1、G-3-2 在所有浓度中都能生长, 但相比较而言杆菌 G-3-2 在 NaCl 浓度为 6%、7%、8% 时增长幅度较低, 耐受能力较弱; 球菌 A-2-1 在 NaCl 浓度为 8% 时完全被抑制; 菌株 B-4-2-1 在 NaCl 浓度达到 7%、8% 时不能生长。

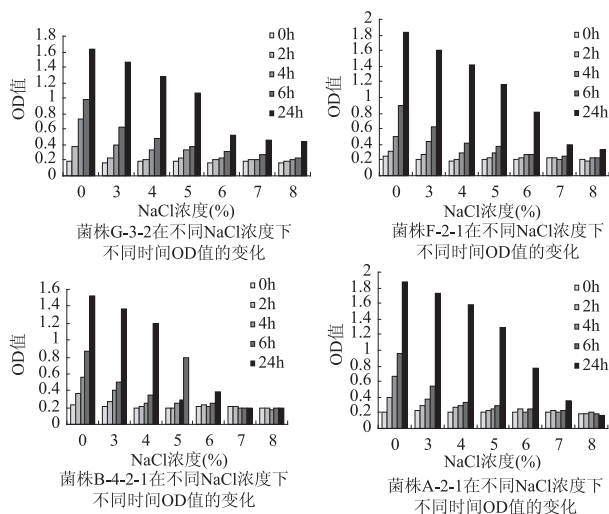


图4 不同 NaCl 浓度对实验菌株生长的影响

## 2.5 抑菌活性的测定结果

乳酸菌在代谢过程中会产生有机酸、细菌素、过

氧化氢和类细菌素等物质<sup>[6]</sup>。实验室或临床实践研究表明, 这类物质可以抑制胃肠道中某些有害微生物, 如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等生长繁殖, 对致病菌引起的肠道感染、腹泻等疾病有预防和保护作用。本实验用抑菌圈大小来考虑实验菌株的抑菌能力, 见表1。

表1 实验菌株的抑菌实验结果(mm)

实验菌株	指示菌种		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
G-3-2	11	13	15
F-2-1	13	18	22
B-4-2-1	19	11	20
A-2-1	17	16	18

通过实验结果发现, 纸片周围有呈透明的抑菌圈出现, 说明供试菌株对指示菌种均有一定的抑制作用, 测量发现不同的菌株出现的抑菌圈大小不等, 说明各菌株对不同指示菌种的抑制能力亦不相同, 结果如表1。从表中可以看出, 对金黄色葡萄球菌抑制作用最强的为 B-4-2-1, 抑菌圈直径为 19mm, 球菌 A-2-1 的抑制效果仅次于 B-4-2-1, 为 17mm, 其余两菌株 G-3-1 和 F-2-1 的抑菌效果较弱, 分别为 11mm 和 13mm; 而对大肠杆菌的抑制作用中, 菌株 F-2-1 效果最强, 抑菌圈直径为 18mm, 其余三株菌株的抑菌效果相对较弱; 在对枯草芽孢杆菌的抑制作用中, 菌株 F-2-1 的抑菌圈直径达到 22mm, 抑菌效果很好, 其余三株 G-3-2、B-4-2-1、A-2-1 的抑菌圈直径分别为 15、20、18mm, 说明抑制枯草芽孢杆菌的能力良好。

## 3 结论

实验表明 4 株乳酸菌不但具有良好的生长性能, 而且均表现出不同程度的耐受特性, 其中球菌 A-2-1 和杆菌 F-2-1 在极限 pH1.5 仍能生长; 当胆酸盐浓度达到 0.5% 时, 除了杆菌 B-4-2-1 外其余 3 株菌均能生长; 在耐渗透压方面, 杆菌 F-2-1 和 G-3-2 对浓度高达 8% 的 NaCl 均表现出一定的耐受力; 在对病原菌的拮抗方面, 4 株乳酸菌也表现出良好的抑菌效果, 对金黄色葡萄球菌抑制作用最强的为 B-4-2-1 抑菌圈直径达 19mm, 菌株 F-2-1 对大肠杆菌的抑制作用最强, 抑菌圈直径为 18mm, 在对枯草芽孢杆菌的抑制作用中, 菌株 F-2-1 的抑菌圈直径达到 22mm, 抑菌效果很好。

## 参考文献

- [1] 杨汝德, 林勉, 陈惠音. 益生菌及其应用[J]. 中国乳品工业, 2000, 28: 29-31.
- [2] 薛银刚. 鼠李糖乳杆菌的筛选、鉴定及加工特性研究[D]. 扬州大学, 2006, 5.
- [3] Brian J B Wood. 发酵食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 213-245.
- [4] Danie J O' Sullivan. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49: 1751-1760.
- [5] Lankaputhra W E V, N P Shah. Survival of lactobacillus

# 大分子葡聚糖-牛血清蛋白 抗原偶联物的制备与表征

方丽莎<sup>1</sup>, 谢珍茗<sup>1</sup>, 梁达奉<sup>2</sup>, 余林<sup>1,\*</sup>

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510003;

2. 广州蔗糖研究所, 广东广州 510316)

**摘要:** 用还原胺化法制备大分子葡聚糖-牛血清蛋白(BSA)拟糖蛋白抗原, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合考马斯亮蓝和过碘酸-品红两种染色方法验证偶联物的生成。考察不同反应条件(葡聚糖 T40 的氧化度, 偶联 pH, 氧化葡聚糖和蛋白质的比值, 偶联时间)对偶联反应的影响。确定拟糖蛋白抗原的最佳偶联条件为: 葡聚糖 T40/氧化剂  $\text{NaIO}_4 = 1/120$  (物质的量比), 偶联溶液 pH8.0, 葡聚糖 T40/BSA = 1/1 (物质的量比), 偶联时间 24h。并将此反应条件用于 T10 和 T100 拟糖蛋白抗原的合成。

**关键词:** 葡聚糖, 拟糖蛋白, 抗原, 偶联条件

## Synthesis and characterization of macromolecular dextran and protein conjugates antigen

FANG Li-sha<sup>1</sup>, XIE Zhen-ming<sup>1</sup>, LIANG Da-feng<sup>2</sup>, YU Lin<sup>1,\*</sup>

(1. Faculty of Light and Chemical, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510003, China;

2. Guangzhou Institute of Sucrose, Guangzhou 510316, China)

**Abstract:** A high active yield dextran-BSA conjugate antigen was prepared by Reductive Amination Method. The covalent attachment of dextran to protein was confirmed by SDS-PAGE stained Coomassie brilliant blue and PAS-fuchsin. Different reaction conditions including oxidation of dextran, pH, dextran and BSA concentrations, reaction time various, showed different effects on the entire reaction. The optimum condition was dextran/  $\text{NaIO}_4 = 1:120$ , pH 8.0, dextran/BSA = 1:1 and 24h. And this reaction conditions to be used for synthesized other neoglycoproteins antigens contained T10 and T100.

**Key words:** dextran; neoglycoprotein; antigen; reaction conditions

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)03-0219-04

在甘蔗和蔗汁中, 葡聚糖是由微生物产生的酶引起葡萄糖聚合而成的。在制糖工艺过程中, 从蔗汁到精制产品都存在着葡聚糖所引起的不良影响。目前葡聚糖的检测方法主要是化学分析方法, 具有准确度不高、操作繁琐复杂等缺点。免疫学检测方法不要求从样品中预分离葡聚糖, 具有快速、灵敏、特异性强、重复性好等优点, 适合于糖厂的制糖全过

程中葡聚糖含量的测定<sup>[1-2]</sup>。葡聚糖的免疫检测需要具有较强免疫活性的葡聚糖抗原以制作抗体。葡聚糖的主链、支链、支链基团、分子量及空间三维结构均影响着葡聚糖的生物活性, 决定其免疫活性强弱。而结构单一的葡聚糖虽然分子量很大, 但从免疫学角度看, 其分子结构简单, 免疫原性微弱, 属于不完全抗原, 很难单独在动物体内诱导抗体应答, 制备抗体非常困难。研究表明,  $\beta-(1,3)-D-$  主链结构对于多糖的高免疫活性是必需的, 其他结构的葡聚糖免疫活性均较低。且分支度在 0.2~0.33; 大分子量的葡聚糖, 特别是 100~200kDa 的高分子组分(可以通过和蛋白质偶联成大分子量的共价复合物); 改变葡聚

收稿日期: 2009-05-08 \* 通讯联系人

作者简介: 方丽莎(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事糖蛋白抗原工程的研究。

基金项目: 省部产学研结合项目。

acidophilus and bifidobacterium spp in the presence of acid and bilesalts[J]. 1995, 3: 2-7.

[6] 余瑛, 张娅, 刘瑞, 等. 导入东北不同乳杆菌对常见病原菌的抑菌效果研究[J]. 马西南农业学报, 2006, 19: 294-296.

[7] Gilliland S E. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli[J]. Appl Environm Microbiol, 1989, 33: 15-18.

[8] 吕宾. 嗜酸乳杆菌生物学特性及其发酵乳的研究[J]. 中国乳品工业, 2002(5): 37-39.