

# 干酪乳杆菌的筛选 及其在活性乳酸菌饮料中的应用

杨子燕,赵世伟,马万平,赵旭燕,尹柯茹,陈敏,杨子彪\*

(云南皇氏来思尔乳业有限公司,云南大理 671003)

**摘要:**目的:为了筛选应用于活性乳酸菌饮料生产的优质益生菌。方法:以云南省各地区发酵样品中分离出的 120 株干酪乳杆菌为研究对象,筛选具有人工胃液、人工肠液、胆盐耐受性及对肠道致病菌有抑制作用的菌株,同时将筛选出的菌株用于褐色活性乳酸菌饮料的生产发酵实验。结果:筛选出四株干酪乳杆菌 *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5*, 有较强的耐酸、耐胆盐及耐人工消化液的能力;能抑制肠道致病菌:大肠杆菌、福氏志贺氏菌、肠炎沙门氏菌以及革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌,所以具有调节人体肠道菌群平衡的益生潜力。在进行 200 L 发酵罐的生产模拟实验中干酪乳杆菌 *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5* 四株菌的褐色活性乳酸菌饮料成品在口感、稳定性及均能满足生产应用要求,具有很好的研究及应用价值。

**关键词:**干酪乳杆菌,益生潜力,抑菌活性,褐色活性乳酸菌饮料

## Screening of *Lactobacillus casei* and application in active lactic bacteria beverage

YANG Zi-yan, ZHAO Shi-wei, MA Wan-ping, ZHAO Xu-yan, YIN Ke-ru, CHEN Min, YANG Zi-biao\*

(Yunnan Huang's Dairy Company Ltd., Dali 671003, China)

**Abstract:** Objectives: For selecting finest probiotics can be applied to lactobacillus beverages. Methods: 120 strains of *Lactobacillus casei* isolated from fermented foods of Yunnan province were studied, for obtaining *Lactobacillus caseis* that can adapt to simulated digestive tract environment, inhabite intestinal pathogenic bacterias. Then, they are used in fermentation experiment of brown production of active lactobacillus drink. Conclusion: we screen out 4 strains of *Lactobacillus casei* including *L.casei1*, *L.casei2*, *L.casei3*, *L.casei5* with strong tolerance to simulated gastric fluid, man-made digestive juice and bile salt, the four strains of *Lactobacillus casei* have antagonistic activity against the intestinal pathogenic bacterias, sothey have probiotic potential adjusting the balance of intestinal flora. *L.casei1*, *L.casei2*, *L.casei3*, *L.casei5* can satisfy the production requirements through fermentation experiments of brown production of active lactobacillus drink.

**Key words:** *Lactobacillus casei*; resistance strains; antibacterial activity; probiotic potential

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)03-0106-07

doi: 10. 13386/j. issn1002 - 0306. 2018. 03. 022

按照 FAO/WHO 的定义,益生菌是指当人体摄入足够数量的、某种特定活的微生物时,能够促进机体的健康,对胃肠液有耐受性且在胆汁的作用下可以生长<sup>[1]</sup>。干酪乳杆菌是目前研究最为深入、应用最为广泛的益生菌之一,与嗜酸乳杆菌、双歧杆菌一同被认为是目前最为经典的三种益生菌。与其他两种益生菌相比,干酪乳杆菌具有较强的加工性能,并且在调节人体免疫系统,及调节人体肠道环境方面具有突出的功能<sup>[2]</sup>。干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)作为益生菌,在以乳为基质的环境中生长时通过自身分泌的胞外酶的作用,分解的特定蛋白(主要是酪蛋

白)能产生多种对血管紧张素 I 具有抑制作用的肽和短肽,其中以 Val-pro-pro 和 Ile-pro-pro 在体内的抗血压作用最明显<sup>[3]</sup>。干酪还具有抑制肠道病原微生物、调节肠道菌群平衡、增强免疫力的等多种功能<sup>[4]</sup>。我国具有丰富的传统发酵乳制品资源,近年来这些资源得到了广泛的研究和开发,发现其中蕴含着丰富的乳酸菌资源,干酪乳杆菌在大量传统发酵乳制品中占据优势地位,因此具有广泛的来源。本文以云南省各地区发酵制品中分离的 120 株干酪乳杆菌为研究对象,筛选出具有益生潜力、并可应用于褐色活性乳酸菌发酵的菌株,这对于解决国内益生

收稿日期:2017-05-25

作者简介:杨子燕(1986-),女,硕士研究生,中级工程师,研究方向:乳酸菌及其应用,E-mail:306673206@qq.com。

\* 通讯作者:杨子彪(1965-),男,本科,高级工程师,研究方向:乳制品的开发及乳酸菌的应用,E-mail:qutong070104@163.com。

基金项目:云南省优质益生菌菌种选育及高原特色乳制品产业化开发科技示范(2014ZA001)。

菌长期依赖进口问题,以及开发自主知识产权的益生菌产品具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

供试菌株 云南各地区采集的发酵制品中经分离纯化鉴定得到的干酪乳杆菌 120 株;MRS 培养基、乳酸、NaCl、柠檬酸 广东环凯生物技术有限公司,分析纯;分析纯胃蛋白酶(2500 U/mg)、胰蛋白酶(1:300) 上海生工生化试剂公司;牛磺胆酸钠 上海源叶,分析纯;脱脂乳粉(pro 含量为 30%) 新西兰;PCR 试剂盒、细菌基因组提取试剂盒 康为试剂;16s rRNA 引物 上海生工生物工程有限公司;人工胃液:用浓度为 1 mol/L 的 HCl 调整无菌蒸馏水 pH 分别为 2.0、3.0、4.0,加入 NaCl 0.2 g/100 mL、胃蛋白酶 1 g/100 mL,过滤除菌备用<sup>[5]</sup>。人工肠液:胰蛋白酶 5.0 g、磷酸二氢钾 3.4 g、NaCl 2 g、蒸馏水 500 mL 充分混匀溶解后用 NaOH 调 pH 至 7.5,过滤除菌备用<sup>[5]</sup>。

FE20-K 酸度计 Metter Toledo;LRH-250F 生化培养箱 山东博科生物产业有限公司;T100 bio-rad PCR 仪、K8160 凝胶成像系统、DYY-16D 电泳仪 美国伯乐公司;JPB-153 生长曲线仪 bioscreen;JD-CJ-2F 超净工作台 苏州净化;LDZF-30KB 高压灭菌锅 上海申安医疗器械有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 耐酸菌株的初步筛选 120 株干酪乳杆菌分别按 2% 接种量接入 MRS 培养基中,37 °C 培养 18 h,活化三代后取 5 mL 培养液 3000 r/min 离心 10 min,5 mL 灭菌生理盐水混匀制成菌悬液,吸取菌悬液 20 μL 平行接种于 10 mL pH3.0 的 MRS 培养基中,置 37 °C 培养 6 h 测定 OD 值,以空白的 MRS 培养基为阴性对照,以 pH7.0 的 MRS 培养液为阳性对照。pH3.0 的 MRS 培养液的 OD 值与 pH7.0 的培养液的 OD 值之比(存活率)代表菌株的耐受性。超过 30% 为耐酸,20%~30% 为中等耐酸,小于 20% 为非耐酸菌株<sup>[6]</sup>。

同时将 120 株在 MRS 培养基中活化三代后的干酪乳杆菌按 2% 接种量平行接入蛋白含量为 3.0% 的脱脂复原乳中,置 37 °C 培养,观察凝乳情况,取 24 h 以内凝乳的样品滴定酸度。

初步筛选出在 pH3.0 的 MRS 培养基中存活率为 20% 以上,在 24 h 以内凝乳且酸度在 100 °T 及以上的菌株,用于人工胃液耐受性实验。

1.2.2 耐人工胃液的干酪乳杆菌的筛选 将初步筛选出的菌株分别接种于 5 mL MRS 液体培养基中 37 °C 恒温培养 24 h,3000 r/min 离心 10 min,弃去上清后将菌泥悬浮于 5 mL 无菌生理盐水中,取 1 mL 菌悬液加入 9 mL 过滤除菌的 pH 为 2.0 的人工胃液中<sup>[7]</sup>,置 37 °C 恒温培养分别在 0 h 和 3 h 取样测定活菌数,用 MRS 琼脂培养基倾注平板,于 37 °C 培养 48 h 后进行计数,计算存活率<sup>[8]</sup>。

$$\text{存活率}(\%) = A/B \times 100 \quad \text{式(1)}$$

注:A:作用 3 h 活菌数(cfu/mL);B:作用 0 h 活

菌数(cfu/mL)。

取存活率为 50% 以上的菌种接入 pH 为 1.0、1.2、1.5、1.8 的人工胃液中作用 3 h 时分别取 1 mL 涂布接种于 MRS 琼脂培养平板中,37 °C 培养 48 h 后进行观察生长情况。

取 pH2.0 的人工胃液中存活率 50% 以上,且 pH1.5 的人工胃液中作用 3 h 后存活的菌株进行人工消化液耐受性实验。

1.2.3 人工消化液的耐受性测定 1.2.2 中筛选出的菌株的 MRS 培养液离心(3000 r/min,10 min)收集菌体,灭菌生理盐水洗涤 2 次,将菌体悬浮于 5 mL 灭菌生理盐水中制备菌悬液。取菌悬液各 1 mL 分别接种于含 9 mL 经过滤除菌处理的 pH2.5 的人工胃液中,37 °C 培养 0、3 h 后的取培养液 1 mL 测定活菌数,另取 1 mL 接种于 9 mL 过滤除菌的 pH8.0 的人工肠液中,置 37 °C 培养 1、3、5 h,计算在人工胃肠消化液中存活率<sup>[9]</sup>:

$$\text{人工消化液中存活率}(\%) = C/D \times 100 \quad \text{式(2)}$$

注:C:人工肠液中作用 \* h 活菌数(cfu/mL);D:人工肠液中作用 \* h 活菌数(cfu/mL)。

1.2.4 干酪乳杆菌胆盐耐受能力的测定 对人工胃液及人工消化液耐受性强的菌株进行耐胆盐实验。MRS 液体培养基中活化三代的干酪乳杆菌按 2% 接种量(体积百分比)分别接种于 MRS 液体培养基(添加 0.2 g/100 mL 牛磺胆酸钠)和不含胆盐的 MRS 培养基中,置生长曲线仪中 37 °C 培养 16 h 测定吸光值,与培养基中没加胆盐的 OD<sub>600</sub> 相比<sup>[10]</sup>。

同时对各菌株所能耐受的最高胆盐浓度进行测定,将活化两代后的菌株取 400 μL 涂布与含有不同胆盐浓度(分别为 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8、2.0 g/100 mL)的 MRS 平板中,37 °C 培养 24 h 观察生长情况。

1.2.5 干酪乳杆菌的抑菌谱 以大肠杆菌标准株、金黄色葡萄球菌、李斯特菌、志贺氏菌标准株为指示菌,将筛选出的具有益生潜力的干酪乳杆菌的 37 °C 过夜培养后的 MRS 培养液 1 μL 涂布于 MRS 固体培养基的表面涂布均匀后 37 °C 恒温培养 24 h。将过夜培养的指示菌培养液与等量含 0.7% 的琼脂的营养琼脂混合均匀后倾倒入培养 24 h 的干酪乳杆菌固体平板表面,覆盖住整个平板。待凝固后置 37 °C 恒温培养 24 h,记录干酪乳杆菌周围是否有抑菌圈以及抑菌圈的大小<sup>[11]</sup>。

1.2.6 遗传聚类分析 以具有益生潜力的干酪乳杆菌的基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA 片段扩增,以采用细菌通用引物:27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1541R(5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3')为上、下游引物<sup>[12]</sup>,采用 PCR 扩增试剂盒,以 50 μL 的反应体系进行 PCR 反应。反应参数为:95 °C 预变性 5 min,35 个循环的参数设置为 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,72 °C 延伸 10 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增 DNA 片段的大小,测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

经过测序所得到的序列经 Clustal X 序列比对后,采用 MEGA 4.0 中的邻接法(Neighbour-joining)

进行系统发育树构建<sup>[13]</sup>。利用本实验室的嗜热链球菌 *S.thermophilus* 为外群,以本实验室的干酪乳杆菌 RY10-A-01 为参照,利用它们的 16srRNA 基因序列,采用 MEGA 4.0 进行进化树的构建,序列抑制长度为 1460 bp,分析获得的较好抗逆性的干酪乳杆菌的遗传距离。

1.2.7 干酪乳杆菌褐色活性乳酸菌饮料的 200 L 发酵罐生产模拟实验

1.2.7.1 发酵母种制备 活化 3 代的干酪乳杆菌按照 2% 的接种量接入蛋白含量 3.8% + 0.2% 脱脂复原乳中,37 °C 培养 18 h。发酵基料制备<sup>[14]</sup>:配制蛋白含量为 4.6%、果葡糖浆含量为 1.3% 的脱脂乳,20~30 °C, 20 MPa 均质,94 °C 褐变 3 h。接种发酵:按照 2% 的接种量将发酵母种接入发酵基料中,37 °C 发酵培养 72 h。酸度达到 190 + 5 °T 破乳,停止发酵。将乳酸和柠檬酸分别配成 20% 及 12% 的酸液,95 °C 杀菌 5 min 以备用。将发酵液补足水,用酸液调节酸度至 63 °T 后 20 MPa 均质后无菌灌装,灌装产品于 4 °C 贮存。

1.2.7.2 褐色活性乳酸菌饮料感官评价 4 °C 冷藏 24 h 后进行感官评定。感官评价指标:口感(具有该类产品的正常色泽、无肉眼可见的外物、有无异味、无异臭、无分层)<sup>[15]</sup>。感官评定人员:10 人,本

公司专门从事发酵乳制品研发、并取得品鉴师资格证书。

1.2.7.3 离心沉淀率 褐色活性乳酸菌饮料产品 4 °C 冷藏 24 h 后称取 100 g,3200 r/min 离心 15 min,弃去上清液,烘干至恒重,称取沉淀的质量,计算沉淀率(sr)。

$$Sr(\%) = m/M \times 100 \quad \text{式(3)}$$

注:M:样品质量;m:沉淀质量。

1.2.7.4 褐色活性乳酸菌饮料 4 °C 冷藏冷藏期内活菌数及酸度的变化:褐色活性乳酸菌饮料产品于 4 °C 冷藏 24 d,每 6 d 测定一次活菌数。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐酸菌株的初步筛选

从 120 株干酪乳杆菌中筛选出了 51 株在 pH3.0 的 MRS 培养基中存活率大于 20% 耐酸菌株。用于活性益生菌饮料发酵的干酪乳杆菌需要具备一定的产酸性能,见表 1 干酪乳杆菌耐酸性及产酸性能筛选,这 51 株干酪乳杆菌发酵 24 h 酸度可以达到 100 °T 及以上,具备发酵牛奶基料的性能。

### 2.2 人工胃液耐受性干酪乳杆菌的筛选

耐酸性是作为益生菌的基本要求,益生菌进入人体后到达胃部,通过胃的时间一般为 1~2 h,胃液的 pH 波动很大,通常在 pH3.0 左右,空腹或食用酸

表 1 干酪乳杆菌耐酸性及产酸性能筛选

Table 1 Selection of acidoresistant and acid production

菌株编号	pH3.0 存活率(%)	24 h 酸度(°T)	菌株编号	pH3.0 存活率(%)	24 h 酸度(°T)
<i>L.casei1</i>	112.16	184	<i>L.casei27</i>	60.00	158
<i>L.casei2</i>	100.02	179	<i>L.casei28</i>	59.70	157
<i>L.casei3</i>	99.60	176	<i>L.casei29</i>	59.00	132
<i>L.casei4</i>	99.00	176	<i>L.casei30</i>	58.00	132
<i>L.casei5</i>	89.90	166	<i>L.casei31</i>	57.70	129
<i>L.casei6</i>	89.67	177	<i>L.casei32</i>	57.00	135
<i>L.casei7</i>	79.23	176	<i>L.casei33</i>	57.00	134
<i>L.casei8</i>	75.00	166	<i>L.casei34</i>	55.70	130
<i>L.casei9</i>	75.00	167	<i>L.casei35</i>	55.11	128
<i>L.casei10</i>	70.80	162	<i>L.casei36</i>	55.00	123
<i>L.casei11</i>	70.29	161	<i>L.casei37</i>	53.30	130
<i>L.casei12</i>	68.80	164	<i>L.casei38</i>	51.90	138
<i>L.casei13</i>	68.05	160	<i>L.casei39</i>	51.00	126
<i>L.casei14</i>	67.00	162	<i>L.casei40</i>	51.00	119
<i>L.casei15</i>	67.00	167	<i>L.casei41</i>	50.50	124
<i>L.casei16</i>	66.00	159	<i>L.casei42</i>	50.00	125
<i>L.casei17</i>	65.70	163	<i>L.casei43</i>	49.60	118
<i>L.casei18</i>	65.00	158	<i>L.casei44</i>	48.90	108
<i>L.casei19</i>	63.05	154	<i>L.casei45</i>	48.00	115
<i>L.casei20</i>	63.08	108	<i>L.casei46</i>	48.00	107
<i>L.casei21</i>	62.90	163	<i>L.casei47</i>	46.76	104
<i>L.casei22</i>	62.60	168	<i>L.casei48</i>	46.70	107
<i>L.casei23</i>	61.20	146	<i>L.casei49</i>	44.87	101
<i>L.casei24</i>	61.00	146	<i>L.casei50</i>	42.60	100
<i>L.casei25</i>	61.00	148	<i>L.casei51</i>	41.90	106
<i>L.casei26</i>	60.40	152			

性食品时可达 pH1.5<sup>[16]</sup>,这就要求益生菌要具有很好的耐酸性才能进入肠道,进一步发挥作用。将表 1 中筛选出的 51 株耐酸干酪乳杆菌转入 pH2.0 的人工胃液中培养 3 h 后存活率在 50% 及以上有 7 株,分别为 *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5*、*L.casei6*、*L.casei7*、*L.casei9* 结果列于表 2。其中 *L.casei1* 的存活率最高达到 72.53%。

表 2 pH2.0 人工胃液中存活率

Table 2 Survival rate in artificial gastric juice of pH2.0

菌株编号	作用 0 h 活菌数	作用 3 h 活菌数	存活率 (%)
<i>L.casei1</i>	33 × 10 <sup>9</sup>	24 × 10 <sup>9</sup>	72.53
<i>L.casei2</i>	11 × 10 <sup>9</sup>	7 × 10 <sup>9</sup>	63.60
<i>L.casei3</i>	25 × 10 <sup>9</sup>	15 × 10 <sup>9</sup>	60.00
<i>L.casei5</i>	36 × 10 <sup>9</sup>	22 × 10 <sup>9</sup>	61.10
<i>L.casei6</i>	30 × 10 <sup>9</sup>	15 × 10 <sup>9</sup>	50.00
<i>L.casei7</i>	19 × 10 <sup>9</sup>	10 × 10 <sup>9</sup>	52.63
<i>L.casei9</i>	23 × 10 <sup>9</sup>	13 × 10 <sup>9</sup>	55.70

分别将这 7 株干酪乳杆菌进一步接入 pH 为 1.0、1.2、1.5、1.8 的人工胃液中作用 3 h 时分别取 1 mL 涂布接种于 MRS 琼脂培养平板中,生长情况见表 3。进一步筛选出了能够在 pH1.2 的胃液中作用 3 h 后生长良好的 4 株干酪乳杆菌 *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5*,其中 *L.casei1* 可耐受 pH1.0 人工胃液。

表 3 人工胃液中耐受性

Table 3 Tolerance in artificial gastric juice

菌株编号	pH1.0	pH1.2	pH1.5	pH1.8
<i>L.casei1</i>	+	+	+	+
<i>L.casei2</i>	-	+	+	+
<i>L.casei3</i>	-	+	+	+
<i>L.casei5</i>	-	+	+	+
<i>L.casei6</i>	-	-	+	+
<i>L.casei7</i>	-	-	+	+
<i>L.casei9</i>	-	-	+	+

### 2.3 干酪乳杆菌人工消化液的耐受性测定

如图 1 干酪乳杆菌在人工消化液中存活率,最初在 pH2.5 的人工胃液中消化 3 h 后存活率分别为 97.3、95.9、96、70.3,接着在人工肠液中作用时间 2、4、8、16 h, *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3* 前 4 h 内存活率变化很小,4~16 h 内的下降也很平缓,这三株菌对人工肠液的适应性很好, *L.casei5* 在前 4 h 内存活率下降较大,之后比较平缓,但是存活率也维持在 60% 以上,这三株菌对人工肠液的耐受性较好。

### 2.4 干酪乳杆菌胆盐耐受能力的测定

胆盐是由肝细胞分泌的胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合而形成的钠盐或钾盐,能刺激肠道的蠕动功能,抑制肠道细菌的生长,可促进胆固醇的溶解,磷脂起着促进胆固醇溶解的作用,从而使胆汁保持液体状态<sup>[17]</sup>。胆盐抑制许多肠道细菌的生长,进入体内的乳酸菌能否存活取决于是否对体内肠道内的胆

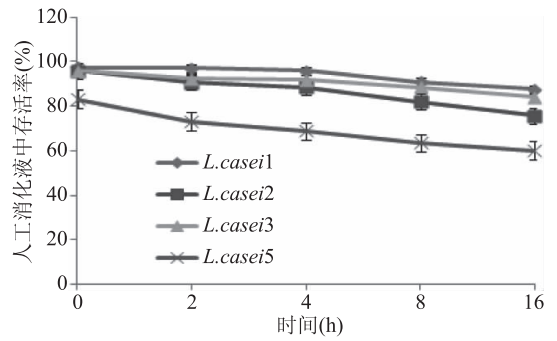


图 1 干酪乳杆菌在人工消化液中存活率

Fig.1 Survival rate in artificial digestion of *Lactobacillus casei*

盐具有一定的耐受能力,才能到达大肠继续发挥作用。人体小肠中胆汁盐的含量以 0.03%~0.30% 而波动着,近年来多数的研究者都采用 0.3% 胆盐浓度来进行益生菌耐胆盐能力的筛选<sup>[17]</sup>。*L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5* 这 4 株干酪乳杆菌在含 0.3 g/100 mL 胆盐的 MRS 液体培养基中与培养基中没加胆盐的 OD<sub>600</sub> 相比分别为 74.90%、68.53%、69.00%、51.20%,如图 2 干酪乳杆菌在 0.3% 胆盐中作用 3 h 的存活率。

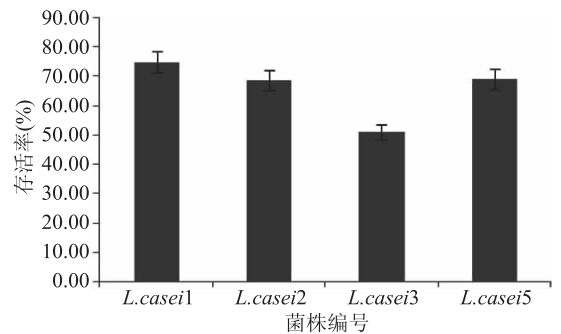


图 2 干酪乳杆菌在 0.3% 胆盐中作用 3 h 的存活率

Fig.2 Survival rate acting 3 hours in 0.3% Bile Salts of *Lactobacillus casei*

各菌株所能耐受的胆盐最高浓度见表 4 干酪乳杆菌最高胆盐耐受浓度其中 *L.casei1* 对胆盐的耐受能力最强,在含胆盐 2.0 g/100 mL 的培养基中还可以生长, *L.casei2*、*L.casei3* 能耐受最高浓度为 1.5 g/100 mL, *L.casei5*、*L.casei6* 耐受最高浓度为 1.2 g/100 mL。

表 4 干酪乳杆菌最高胆盐耐受浓度

Table 4 Highest tolerance concentration in bile salts of *Lactobacillus casei*

胆盐浓度 (g/mL)	菌株编号			
	<i>L.casei1</i>	<i>L.casei2</i>	<i>L.casei3</i>	<i>L.casei5</i>
0.3	+	+	+	+
0.6	+	+	+	+
1.2	+	+	+	+
1.5	+	+	+	+
1.8	+	+	+	+
2.0	+	+	+	-
2.2	+	-	-	-

表5 干酪乳杆菌抑菌谱

Table 5 Antibacterial test of *Lactobacillus casei*

	抑菌圈直径 (mm)			
	大肠杆菌	肠炎沙门 ATCC 13076	福氏志贺氏菌 ATCC12022	金黄色葡萄球菌 ATCC25923
<i>L.casei1</i>	19.36	10.14	15.62	10.42
<i>L.casei2</i>	10.07	7.89	9.92	9.63
<i>L.casei3</i>	8.82	8.58	6.90	7.09
<i>L.casei5</i>	9.38	7.94	10.21	15.67

表6 四株干酪乳杆菌产品稳定性及感官评价

Table 6 Product stability and sensory evaluation of *Lactobacillus casei*

	沉淀率 (%)	感官评价
<i>L.casei 1</i>	1.21	无分层, 口感爽滑, 质地醇厚, 酸香味正常, 无异味
<i>L.casei 2</i>	1.36	无分层, 口感爽滑, 质地醇厚, 酸香味正常, 无异味
<i>L.casei 3</i>	1.33	无分层, 口感爽滑, 质地醇厚, 酸香味正常, 无异味
<i>L.casei 5</i>	1.28	无分层, 口感爽滑, 质地醇厚, 酸香味正常, 无异味

## 2.5 干酪乳杆菌的抑菌谱

益生菌进入人体消化道并定植后大量繁殖它们产生的抗菌素能够有效抑制病原微生物的生长, 调节肠道菌群的平衡, 从而促进人体健康<sup>[18]</sup>。如表5干酪乳杆菌抑菌谱所示, 通过抑菌实验本研究中的干酪乳杆菌 *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5* 均能够有效抑制典型的肠道致病菌大肠杆菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌、以及革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌。其中 *L.casei1* 对大肠杆菌及福氏志贺菌的抑菌效果很明显抑菌圈分别达到 19.36、15.62 mm; 在四株菌中 *L.casei5* 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最显著, 抑菌圈的直径为 15.6 mm。干酪乳杆菌代谢产物中的有机酸、各种肽类对肠道致病菌具有抑制作用, 因此人体摄入一定数量的干酪乳杆菌有利于调节肠道健康。

## 2.6 具有益生潜力的干酪乳杆菌遗传聚类分析

模拟肠道环境进行筛选后获得4株抗逆性较强的干酪乳杆菌。将它们16s rDNA 同源性比对结果进行系统发育进化树的构建, *L.casei1*、*L.casei3*、*L.casei5*、*L.casei2* 与实验室使用的标准菌株干酪乳杆菌同属为一群, 嗜热链球菌 08 单独为一群, 其中 *L.casei5*、*L.casei3*、*L.casei1* 与 RY10-A-01 进化关系最近, *L.casei2* 与 RY10-A-01 较远。

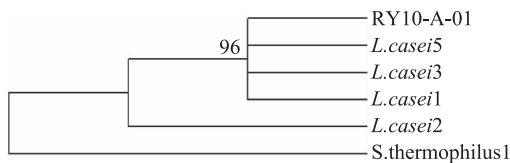


图3 干酪乳杆菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Lactobacillus casei*

## 2.7 干酪乳杆菌褐色活性乳酸菌饮料的200 L发酵罐生产模拟实验

2.7.1 活性乳酸菌饮料的感官评价及稳定性 由筛选出的四株干酪乳杆 *L.casei1*、*L.casei2*、*L.casei3*、*L.casei5* 发酵的活性乳酸菌产品的沉淀率都在 1.5%

以下, 说明产品中不稳定蛋白的产量较低, 产品在货架期内体系相对稳定<sup>[19]</sup>。由表6感官评价结果可知这四株菌发酵的益生菌饮料经过专业的乳品研发人员评价均无分层、异味现象, 酸香浓厚、风味正常满足益生菌饮料的感官需求。

2.7.2 活性乳酸菌饮料冷藏期内的酸度及活菌数变化 本文从活菌数、酸度两个方面评价由4株干酪乳杆菌制备的褐色活性乳酸菌饮料在4℃贮藏条件下的24d稳定性。活菌数方面 *L.casei 1*、*L.casei 2*、*L.casei 3* 这3株干酪乳杆菌在4℃条件贮藏一周活菌数并无下降趋势, 其中 *L.casei 1* 在前期还有轻微的上升趋势; *L.casei 5* 在冷藏第6d时开始下降但下降数量也很少, 结果见图4。褐色活性乳酸菌饮料冷藏期内的活菌数, 其中 *L.casei1* 活力最好的在第24d活菌数仍达到  $10^{10}$  cfu/mL, 这能够保证在货架期内有足够的活菌数。酸度方面, *L.casei 1*、*L.casei 2* 在24d冷藏期内酸度升高比 *L.casei3*、*L.casei5* 明显, *L.casei 1*、*L.casei 2* 分别上升了6℃T和9℃T, *L.casei 3*、*L.casei 5* 分别上升了3℃T和3.5℃T, 见图7褐色活性乳酸菌饮料冷藏期内酸化化趋势, *L.casei 1* 和 *L.casei 5* 在第18d开始酸度上升已经很少, 这有利于活性褐色乳酸菌饮料后酸的控制和最佳风味的保持。以上结果表明这4株菌在4℃贮藏条件下短期内维持缓慢

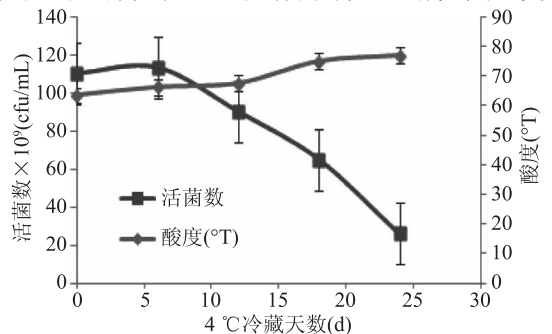


图4 *L.casei 1* 干酪乳杆菌冷藏期内酸度和活菌数变化  
Fig.4 Development of acidity and number of viable bacteria in storage time of *L.casei 1*

的生长,到贮藏的后期活菌数减少也不明显,说明 *L. casei* 1、*L. casei* 2、*L. casei* 3、*L. casei* 5 在 4 °C 贮藏条件下活力较好。

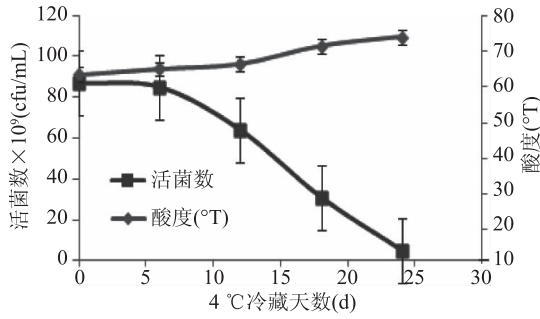


图5 *L. casei* 2 干酪乳杆菌冷藏期内酸度和活菌数变化  
Fig.5 Development of acidity and number of viable bacteria number in storage time of *L. casei* 2

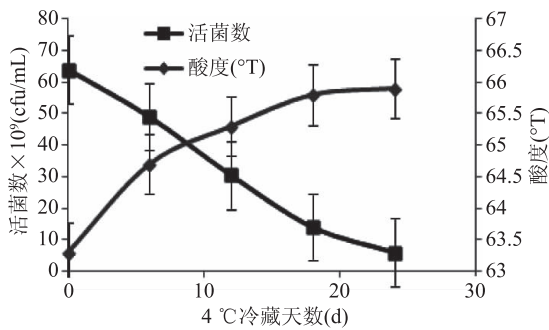


图6 *L. casei* 3 干酪乳杆菌冷藏期内酸度和活菌数变化  
Fig.6 Development of acidity and number of viable bacteria number in storage time of *L. casei* 3

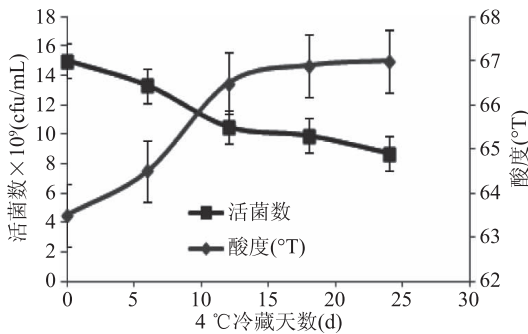


图7 *L. casei* 5 干酪乳杆菌冷藏期内酸度和活菌数变化  
Fig.7 Development of acidity and number of viable bacteria number in storage time of *L. casei* 5

### 3 结论

本研究筛选出四株干酪乳杆菌 *L. casei* 1、*L. casei* 2、*L. casei* 3、*L. casei* 5,其中 *L. casei* 1 来源于云南大理白族婴儿的粪便、*L. casei* 2 及 *L. casei* 3 来源于云南大理剑川地区的水牛奶、*L. casei* 5 来源于云南迪庆奶疙瘩中,是少数民族地区的野生菌种,丰富了我国发酵乳制品行业的益生菌菌种资源。通过耐酸产酸实验、人工胃液、人工消化液、胆盐耐受实验筛选出具有耐酸性强、能够顺利通过人工胃液、人工消化液、胆盐作用的四株干酪乳杆菌 *L. casei* 1、*L. casei* 2、*L. casei* 3、*L. casei* 5,具有初步的益生潜力且能抑制:大肠杆菌 ATCC 11775、福氏志贺氏菌 ATCC12022、肠

炎沙门 ATCC 13076 以及革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 ATCC25923,说明这四株菌能够产生抑菌物质抑制病原微生物的生长,调节肠道菌群平衡、抑制肿瘤的发生<sup>[20]</sup>、对促进人体消化道健康方面有重要研究意义。本研究筛选的干酪乳杆菌具有很好的益生菌产品开发应用潜力,对活性乳酸菌饮料的生产具有很好的指导价值。

### 参考文献

[1] F.N Arroyo - Lopez, K.rantsiou J.bautista - Gallego, et al. Screening of Lactic Acid Bacterial From Fermented Table Olives with Probiotic Potential[J]. Food Research international, 2013, 3 (50) :135-142.

[2] 曹永强. 干酪乳杆菌 N1115 产酸特性及其在发酵乳中的应用[D]. 北京: 中国工商大学, 2016: 37.

[3] 张书光, 张云娟, 代卫东, 等. Valli 乳制品中干酪乳杆菌的分离鉴定[J]. 微生物学杂志, 2015, 5(1) :32-3.

[4] 赵佳锐, 范小兵, 杭晓敏, 等. 肠道益生菌体外抑菌活性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 18(2) :89-93.

[5] 薛梅. 鼠李糖乳杆菌 lv108 对免疫低下大鼠肠道菌群及代谢的影响研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2016: 36-40.

[6] 陈霞, 顾瑞霞. 臭豆腐乳酸菌多样性及耐酸乳酸菌的筛选分离[J]. 中国酿造, 2010, 4(10) :22-24.

[7] Shen W, Yu QF, Wang YH, et al. Isolation, Identification and Lead adsorption Study of Lead-resistant Lactobacillus casei strains from feces of healthy newborns[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2016, 36(12) :1602-1608.

[8] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 分离自内蒙古传统发酵酸马奶中 *L. casei* Zhang 潜在益生特性的研究[J]. 中国乳品工业, 2006, 3(34) :30-37.

[9] Pirje Hü tt, Eleri Lapp, Jelena Štšepetova, Imbi Smidt, et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains [J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2016, 27(2) :10-27.

[10] 李利, 孔丽, 张宁. 耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J]. 食品科学, 2015, 36(21) :125-128.

[11] 韩诚斌. 副干酪乳杆菌素抑菌活性及抑菌机理的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江农业大学, 2008: 29-37.

[12] Chandok H, Shah P, Akare UR, et al. Screening, Isolation and Identification of Probiotic Producing Lactobacillus acidophilus Strains EMBS081 & EMBS082 by 16S rRNA Gene Sequencing [J]. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 2015, 7(3) :242-248.

[13] 陈芝兰, 杨吉霞, 李梦寒, 等. 西藏地区传统发酵乳中乳酸菌多样性及微生物数量分析[J]. 食品科学, 2013, 34(17) :140-145.

[14] 徐致远, 吴艳, 郭本恒, 等. 一种褐色益生菌乳饮料的研制[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8) :242-234.

[15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 饮料: GB7101-2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016-11-13.

[16] 熊涛, 宋苏华, 黄锦卿, 等. 植物乳杆菌 NCU116 在模拟人

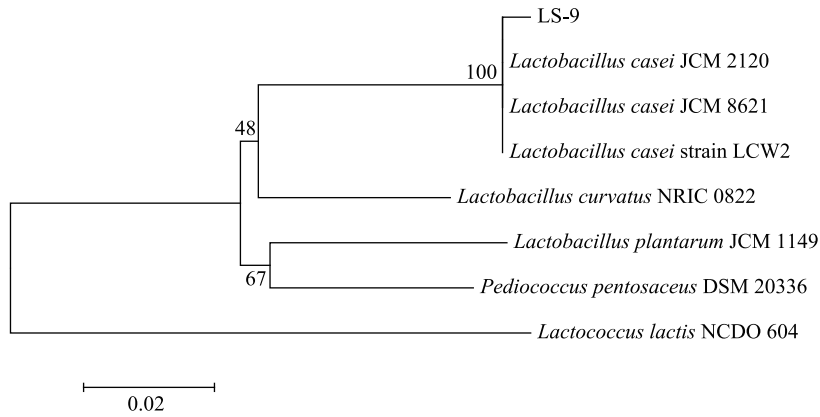


图10 基于16S rRNA的LS-9菌株系统发育树

Fig.10 Phylogenetic tree of LS-9 strain based on 16S rRNA



图11 发酵酸奶的凝固形态

Fig.11 Solidification state of fermented yogurt

鉴定为干酪乳杆菌。将菌株作为发酵剂进行全脂奶发酵实验,凝乳时间约为6 h、酸度为102.4 °T、活菌数为 $1.25 \times 10^8$  CFU/mL。研究结果为加快乳酸菌在传统发酵食品中的现代化生产提供理论基础。

### 参考文献

- [1] 敖晓琳, 张小平, 史令, 等. 四川泡菜中两株优良乳酸菌的鉴定及不同发酵条件对其发酵泡菜品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 152-156.
- [2] 商军, 钟方旭, 王亚林, 等. 几种发酵蔬菜中乳酸菌的分离与筛选[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 195-199.
- [3] 闫刘慧. 泡菜中乳酸菌特性分析及模拟肠道存活定植作用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 6-8.
- [4] Rhee S J, Lee J E, Lee C H. Importance of lactic acid bacteria in Asia fermented foods [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(11): S5.
- [5] Chen Y S, Yanagida F, Hsu J S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(1): 125-130.

(上接第111页)

- [6] Wu RN, Wu ZX, Zhao CY, et al. Identification of lactic acid bacteria in suancai, a traditional Northeastern Chinese fermented food, and salt response of *Lactobacillus paracasei* LN-1 [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(3): 1325-1332.
- [7] 吴满刚, 管泳宇, 吴雪燕, 等. 豆豉发酵中的乳酸菌复合诱变及产酸条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 2: 35-39.
- [8] 张岩, 肖更生, 陈卫东, 等. 发酵蔬菜的研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 184-186.
- [9] 陈建华, 朱望银, 杜亚填. 湘西泡菜优质乳酸菌的筛选与应用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 201-205.
- [10] 甘伯中, 杜宁娟, 李帆, 等. 青海牧区酸奶中乳酸菌分离及发酵性能的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 2: 174-177.
- [11] 龚加路, 赵兴秀, 邹伟, 等. 高产酸乳酸菌的分离鉴定及其益生特性的研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(3): 17-31.
- [12] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003, 330-361.
- [13] 尚玉琳, 孟祥晨. 不同酸奶发酵剂的发酵性能比较[J]. 食品科技, 2011, 36(10): 41-45.
- [14] GB 5413.34-2010. 食品安全国家标准-乳和乳制品酸度的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 裴乐乐, 罗青春, 孟霞, 等. 不同原料四川发酵泡菜的细菌多样性分析[J]. 中国调味品, 2016, 41(2): 39-43.
- [16] 杜欣, 李理, 刘冬梅. 碳源对益生菌发酵黄浆水抗氧化和抑菌活性的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 129-134.
- [17] 马伟玲, 尹礼国, 张文学, 等. 泡菜乳酸菌 LJ-4 增殖培养基的优化[J]. 中国调味品, 2014, 39(5): 45-48.
- [18] 曲玲童, 牛文静, 孙征, 等. 锦州腌渍小菜中耐盐乳酸菌的筛选与产酸性能研究[J]. 中国调味品, 2012, 31(6): 83-87.
- [19] 巨晓英, 韩焯, 周志江. 自然发酵泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 29-31.
- [20] 陈涛, 马映昆, 陈福生. 适合豆乳发酵的乳酸菌筛选及其应用[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 76-82.

- [17] 杨晓宁, 张七斤, 杨成龙. 不同来源乳酸菌耐酸耐胆盐实验[J]. 动物医学进展, 2014, 3(2): 73-77.
- [18] Xu S, Liu T, Radji CA, Yang J, Chen L. Isolation, Identification, and Evaluation of New Lactic Acid Bacteria Strains with Both Cellular Antioxidant and Bile Salt Hydrolase Activities *In Vitro* [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(11): 1919-1928.
- [19] 韩甜甜, 梁志军. 杀菌型褐色乳酸菌饮料稳定性的研究[J]. 饮料工业, 2016, 9(1): 18-21.
- [20] EFSA. Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health [J]. EFSA Journal, 2011, (1)9: 24-74.