

内蒙古传统谷物发酵食品 - 酸粥中 益生乳杆菌的体外筛选

王湘竹¹,陈忠军¹,李春罡²,刘子龙¹,赵晶晶¹

(1. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院,内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古伊利集团,内蒙古 呼和浩特 010106)

摘要:从传统谷物发酵食品 - 酸粥中分离并鉴定了 13 株乳杆菌,研究其生物学特性,为开发不同类型和不同功能的乳酸菌发酵剂和发酵食品奠定了基础。通过体外测试了其耐酸、耐胆汁及降胆固醇能力。结果发现,7 株菌在 pH 值 3.0 的条件下存活率达 50 % 以上,对胆固醇的降解率在 50 % 以上,耐胆汁效果良好。其中菌株 NSZL-2、NSZL-11 和 NSZL-12 具有良好的生物学特性,有可能成为潜在功能性菌株。

关键词:乳杆菌;耐酸;耐胆汁;降胆固醇

中图分类号:Q939.117 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)01-0207-05

Screening of Probiotic *Lactobacillus* from Traditional Grain Fermentation Food - Acid Gruel in Inner Mongolia

WANG Xiang-zhu¹,CHEN Zhong-jun¹,LI Chun-gang²,LIU Zi-long¹,ZHAO Jing-jing¹

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. Inner Mongolia Yi Li Group, Huhhot 010106, China)

Abstract: 13 *Lactobacillus* strains that were isolated from traditional grain fermentation food-acid gruel in Inner Mongolia were identified, and the biological characteristics of the strains were studied. It is the basic for the development of various types and function of lactic acid bacteria starter and fermentation food. The strains were examined for resistance to pH, bile-tolerance and cholesterol-lowering ability in vitro. The result showed that the survival rate of 7 strains are exceeding 50 % on the conditions of pH 3.0, and the degradation ability of cholesterol of another 7 strains were exceeding 50 %, at the same time the results of bile-tolerance are good. In result the lactobacillus NSZL-2, NSZL-11 and NSZL-12 being good biological characteristics may become potential functionality strain.

Key words: *Lactobacillus*; Acid-tolerance; Bile-tolerance; Cholesterol-lowering

乳酸菌可以提高食品营养价值,改善食品风味,提高食品保藏性能和附加值,故乳酸菌的特殊生理活性和营养功能正日益引起人们的重视。近年来,国内外广为重视乳酸发酵谷物制品,并对其营养价值的提高做了大量研究。Hamad 研究发现经乳酸菌发酵后的小麦、大麦、小米、稻米的营养价值大大提高^[1]。Nonsan 报道玉米粉自然乳酸发酵后赖氨酸、色氨酸含量大大提高^[1]。王欣德研制的以大麦、小麦为原料的多菌株发酵饮料,代谢产物对人体有益^[2]。

在内蒙古地区,乳制品是相当重要的一大类地方食品,人们对其进行了大量的研究工作。而对于内蒙古地区的传统谷物发酵食品—酸粥却研究甚少,对其中的主要微生物的生物学特性及功能、工业化生产方法等方面报道很少。

本研究从传统谷物发酵食品—酸粥中分离优势微生物菌群—乳酸菌,进行初步鉴定,并对其生物学特性及功能进行研究。旨在挖掘具有开发潜力的功能性菌株,为开发不同类型和不同功能的乳酸菌发酵剂和发酵食品奠定基础。

收稿日期:2008-12-21

基金项目:内蒙古教育厅项目(NJZY07045)

作者简介:王湘竹(1983-),女,内蒙古鄂托克旗人,在读硕士,主要从事乳酸菌功能性研究。

通讯作者:陈忠军(1971-),女,内蒙古呼和浩特人,教授,博士,主要从事食品微生物研究工作。

1 材料和方法

1.1 菌株

从内蒙古不同地区和不同家庭采集谷物发酵食品 - 酸粥样品,进行菌种分离及纯化,并对分离得到的乳酸菌进行属的鉴定。

标准菌株 - LB (*Lactobacillus bulgaricus*),由内蒙古农业大学微生物实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 乳杆菌的分离鉴定 将酸粥按 1% (V/V) 接种量接种于麦芽汁培养基中富集培养 2~3 代后,于微生物洁净工作台内划线于改良 MC 固体培养基上,37℃ 厌氧培养 24~48 h,找到单个菌落,革兰氏染色后镜检。找到革兰氏染色呈阳性的杆菌,做过氧化氢酶试验,找出此试验为阴性的菌株,初步将其鉴定为乳酸杆菌^[3]。将分离到的革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的杆菌,制成供试菌液,做硝酸盐还原、明胶液化、pH4.5 生长、pH9.6 生长、H₂S 产生、吲哚产生、运动性、石蕊牛乳试验、温度试验、联苯胺试验、葡萄糖产气试验。从而确定是否归于乳杆菌属^[3-5]。

1.2.2 耐酸试验 活化 2 代的供试菌用灭菌生理盐水制成含菌数为 10⁸ CFU/mL 的菌悬液。按 5% (V/V) 的比例接种于 pH 值 3.0 与正常 pH(对照组)的 MRS 液体培养基中,混匀,立即取出一份做 10 倍比稀释,取 2 个合适的稀释度倾注 MRS 琼脂平板,设 2 组平行;然后将接种后的试管于 37℃ 下培养 2 h 后,同样分别取出一份做 10 倍比稀释,取 2 个合适的稀释度倾注 MRS 琼脂平板,设 2 组平行,37℃ 培养 24~48 h,进行菌落计数,并计算存活率。

存活率 =

$$\frac{\text{pH 值 3.0 的培养基接入菌后于 37℃ 下培养 2 h 后的活菌数}}{\text{pH 值 3.0 的培养基接入菌后立即做计数时的活菌数}} \times 100\%$$

选取在 pH 值 3.0 的 MRS 液体培养基中存活率 50% 的菌株,接种到 pH 值 3.0 的 MRS 液体培养基中,37℃ 培养 24~96 h,若液体培养基变混浊,则该菌株耐酸^[6-8]。

1.2.3 耐胆汁试验 从斜面上挑取一环供试菌至 MRS 液体培养基中,活化 2 代后,经离心用灭菌生理盐水配制为含菌数为 10⁸ CFU/mL 的供试菌液 1% (V/V) 接种于含胆汁的 MRS 液体培养基中,同时 1% (V/V) 接种于不含胆汁的 MRS 液体培养基中作为对照 37℃ 培养,每小时测一次吸光值 (OD_{600nm})

OD 值增加 0.3 个单位以上后停止培养 以时间和 OD 值作生长曲线,分别找出供试菌在含胆汁和不含胆汁培养基中生长时 600 nm 吸光值增加 0.3

个单位所需的时间,以两者的时间差(称为延迟时间 LT)的大小来判断该菌对胆汁的耐受能力。正数为生长延迟,负数为生长促进^[9]。

含胆汁的 MRS 液体培养基:MRS 液体培养基中添加 0.2% (m/V) 硫代乙醇酸钠,0.3% (m/V) 牛胆汁干燥物。

1.2.4 降胆固醇试验 将 MRS 液体培养基中活化 2 代的菌株按 1% (V/V) 接种于高胆固醇培养基中,并设 2 个平行组,37℃ 厌氧培养 (Danielson 指出在厌氧和胆汁盐存在的条件下,乳杆菌对培养介质中胆固醇含量的降低效果明显^[10]) 24 h 后 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定其胆固醇含量,测定方法采用 OPA 法(邻苯二甲醛法)^[11]测定胆固醇含量,然后计算胆固醇降解率。

高胆固醇培养基:MRS 培养基中添加 0.3% (m/V) 牛胆汁,0.2% (m/V) 硫代乙醇酸钠,150 μg/mL 胆固醇。

$$\text{胆固醇降解率} = \frac{\text{OD}_{0.550} - \text{OD}_{1.550}}{\text{OD}_{0.550}} \times 100\%$$

OD_{0.550}—未接入菌株的高胆固醇培养基在 550 nm 下的吸光值

OD_{1.550}—接入菌株经 24 h 厌氧培养的高胆固醇培养基在 550 nm 下的吸光值

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

从内蒙古地区的传统谷物发酵食品 - 酸粥中分离出 13 株菌株,其均呈革兰氏染色阳性、杆状,过氧化氢酶试验阴性,故初步确定为乳杆菌属。菌株编号分别为 NSZL-1、NSZL-2、NSZL-3、NSZL-4、NSZL-5、NSZL-6、NSZL-7、NSZL-8、NSZL-9、NSZL-10、NSZL-11、NSZL-12、NSZL-13。对其进行属的鉴定(表 1)。

从表 1 可知,13 株菌株具有不明胶液化、不产 H₂S、无运动性、不产吲哚、联苯胺反应阴性等特性,且多数菌株不能还原硝酸盐,在石蕊牛乳试验中具有产酸、脱色、凝乳及不液化等特性。同时,菌株营养要求复杂,在 pH 值 4.5 的环境中生长良好,pH 值 9.6 时也可生长,符合乳杆菌属生物学特性,将其确定为乳杆菌属。

本研究中所分离的 13 株杆菌,4、15、45、53 均不生长,40 生长良好,为中温菌。其发酵葡萄糖均不产气,属同型发酵菌。

2.2 低 pH 值对乳杆菌存活率的影响

菌群在到达肠道之前首先要通过胃,胃中分泌的胃酸构成了抵御大多数摄入微生物的第一道屏

障。胃液 pH 值的大小根据饮食结构不同波动很大,通常为 3.0 左右。而食品通过胃的时间相对较短,一般为 1~2 h^[12,13]。因此,本试验观察 2 h 内各菌株在 pH 值 3.0 的 MRS 液体培养基中活菌数的变化,通过其变化判断菌株在酸化培养基中的生存情况(图 1)。

表 1 各菌株属的鉴定结果

Tab. 1 Critical results about genus and species of Lactobacillus														
项目 Items	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	LB
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
明胶液化试验 Gelatin liquefy experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH4.5 生长试验 pH4.5 growth experiment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH9.6 生长试验 pH9.6 growth experiment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S 产生试验 H ₂ S producde experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吲哚产生试验 Indole producde experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气试验 Glucose gas production experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
运动性试验 Exercise-induce experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶试验 H ₂ O ₂ experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
联苯胺试验 Benzidine experiment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
温度生长试验 Temperature growth test	4	15	40	45	53									
	4	15	40	45	53									
	4	15	40	45	53									
	4	15	40	45	53									
石蕊牛乳试验 Litmus milk experiment	产酸 Acid production	脱色 Decoloration	凝乳 Curd	液化 Liquefaction										
	产酸 Acid production	脱色 Decoloration	凝乳 Curd	液化 Liquefaction										
	产酸 Acid production	脱色 Decoloration	凝乳 Curd	液化 Liquefaction										
	产酸 Acid production	脱色 Decoloration	凝乳 Curd	液化 Liquefaction										

注：+ .表示试验结果呈阳性；- .表示试验结果呈阴性；乳杆菌菌株编号简写为 1,2,3 ..13。
Note：+ . Indicates result of experiment is active；- . Indicates result of experiment is inactive；Lactobacillus numbers abk are 1,2,3 ..13.

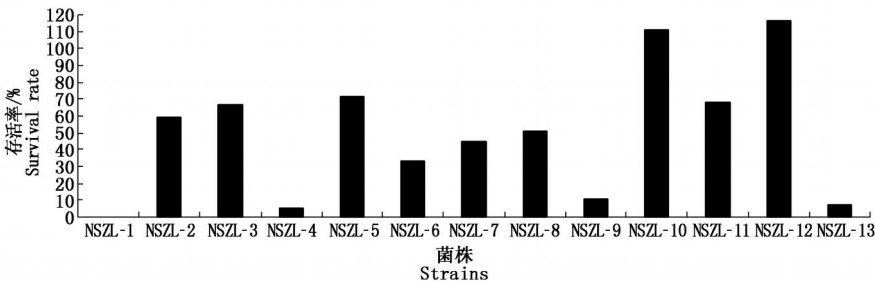


图 1 在 pH 值 3.0 的 MRS 液体培养基中菌株 2 h 后的存活率

Fig.1 Strains on the conditions of MRS pH3.0 the survival rate after 2 h

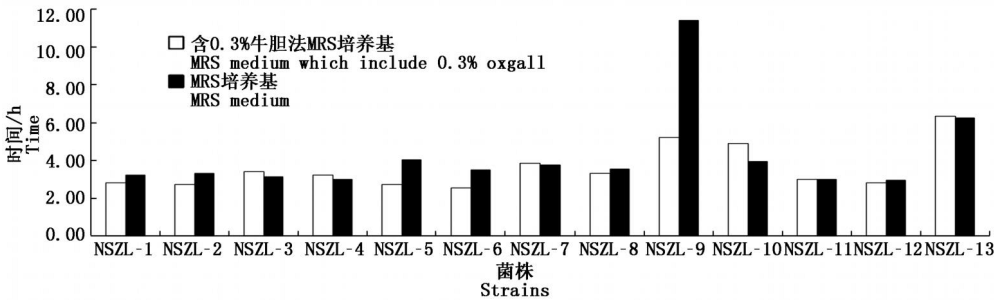


图 2 菌株 OD₆₀₀增长 0.3 个单位所需时间

Fig.2 Strains the time of OD₆₀₀ increase to 0.3 units

由图 1 可以看出,各菌株对 pH 值 3.0 环境的耐受性差异很大。在 pH 值 3.0 的条件下,存活率在 100 % 以上的有 2 株菌,分别为 NSZL-10 和 NSZL-12,说明这 2 株菌不仅能够耐受 pH 值 3.0 的环境,而且还可以在这种环境中生长。菌株 NSZL-1 在 pH 值 3.0 的环境中不能存活,2 h 后其活菌数为 0。在该环境下,存活率在 50 % ~ 100 % 的有 5 株乳杆菌,分别为 NSZL-2、NSZL-3、NSZL-5、NSZL-8、NSZL-11。

将存活率 50 % 的菌株,接种到 pH 值 3.0 的 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 ~ 96 h,观察其生长情况(表 2)。

表 2 在 pH 值 3.0 的 MRS 液体培养基
中各乳杆菌菌株的生长情况
Tab. 2 lactobacillus on the conditions of MRS
pH 3.0 the growth complexion

菌株编号 Strains number	生长情况 The growth complexion
NSZL-1	ND
NSZL-2	+
NSZL-3	+
NSZL-4	ND
NSZL-5	+
NSZL-6	ND
NSZL-7	ND
NSZL-8	+
NSZL-9	ND
NSZL-10	+
NSZL-11	+
NSZL-12	+
NSZL-13	ND

注: ND. 表示未测试; +. 表示生长。
Note: ND. Indicates non-measured; +. Indicates culture.

由表 2 可见,有半数以上的菌株在 pH 值 3.0 的

MRS 液体培养基中可以生长。故这些菌株有通过人体胃的潜能,有可能成为潜在功能性菌株。

2.3 胆汁对乳酸菌生长的影响

因为人体小肠中胆汁盐含量在 0.03 % ~ 0.30 % 之间波动,故 0.30 % 的胆汁浓度是筛选耐胆汁菌株的关键浓度^[14]。所以采用 0.3 % (m/V) 牛胆汁作为筛选耐受肠道内胆汁的标准。

各菌株在两种不同培养基中 OD₆₀₀ 增长 0.3 个单位所需时间见图 2,各菌株的 LT 对比见图 3。

由图 2 可知,OD₆₀₀ 增长 0.3 个单位所需时间大部分在 2.5 ~ 4.0 h,只有 4 株菌用的时间大于 4 h,分别为菌株 NSZL-5、NSZL-9、NSZL-10、NSZL-13,其中菌株 NSZL-9 需要的时间最长。

由图 3 可知,牛胆汁对其中的 7 株菌都有生长促进作用,尤其是对 NSZL-9 菌株的促进作用最大,其次是菌株 NSZL-5;对菌株 NSZL-11 作用不大,所以菌株 NSZL-11 基本没有延迟时间;其余的 5 株菌都存在不同程度的生长延迟。可见大多数菌株有耐受人体小肠中胆汁盐的潜能。

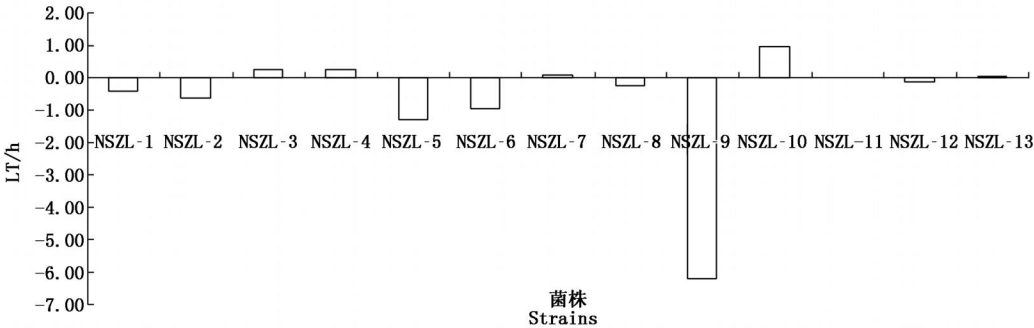


图 3 各菌株 LT 对比图

Fig. 3 Strains the LT contrast

2.4 菌株对胆固醇的降解作用

随着人们生活水平的不断提高,一些心脑血管疾病的发病率逐年上升,严重影响着人类的健康,而血清胆固醇水平过高则是引起这一系列疾病的重要因素之一。早在 1963 年 Spoerry 等^[15]发现非洲 Samr-buru 和 Masai 族的人由于大量饮用乳杆菌发酵的乳

制品,其体内血清胆固醇的含量比较低。国内外的大量研究也证实,不同种类的乳酸菌具有降低胆固醇的效果。服用乳酸菌及其相关制品,可以降低人体血清的水平,降低心血管病的发病率。因此筛选降胆固醇能力较强的乳酸菌具有重要的现实意义。

将分离得到的 13 株乳杆菌进行了体外胆固醇

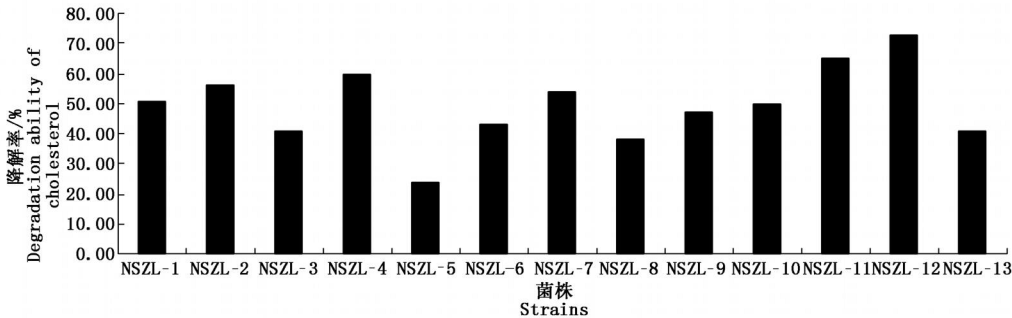


图 4 各菌株对胆固醇的降解率

Fig. 4 Strains the degradation ability of cholesterol

降解试验(图 4)。由图 4 可知,各菌株对胆固醇降解能力差异很大,对胆固醇的降解率在 50 % 以上的有 7 株,分别为 NSZL-1、NSZL-2、NSZL-4、NSZL-7、NSZL-10、NSZL-11、NSZL-12,其中,菌种 NSZL-12 对其降解率高达 72.91 %。

3 结论

潜在功能性菌株的体外筛选通常需要满足以下基本要求:能够耐受强酸环境、高浓度的胆汁;具有高效的降胆固醇能力。本研究针对以上基本要求,对从酸粥中分离得到的 13 株乳杆菌进行了体外耐酸、耐胆汁试验及降胆固醇能力的测试。结果表明,乳杆菌 NSZL-2、NSZL-11 及 NSZL-12 对胆固醇的降解能力较强,并且有很强的耐酸、耐胆汁盐能力。因此,初步确定菌种 NSZL-2、NSZL-11 及 NSZL-12 为潜在的功能性菌株。本研究为开发不同类型和不同功能的乳酸菌发酵剂和发酵食品奠定了基础。

参考文献:

- [1] 杨洁彬,郭兴华. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.
- [2] 顾瑞霞. 乳酸菌与人体保健[M]. 北京:科学出版社,1995.
- [3] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [4] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)[M]. 北京:科学出版社,1984.
- [5] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [6] 周雨霞,王志峰. 传统乳制品中潜在益生植物乳杆菌的体外筛选[J]. 中国乳品工业,2006,34(2):19-21.
- [7] 禹慧明,林勇. 益生乳杆菌的筛选及特性研究[J]. 微生物学通报,2002,29(1):53-56.
- [8] 顾瑞霞,谭东兴,郭久和,等. 胆汁酸盐和低 pH 值对乳酸菌活性的影响[J]. 微生物学通报,1996,23(3):144-146.
- [9] 赵佳锐,范晓兵. 人体肠道益生菌体外降胆固醇活性研究[J]. 微生物学报,2005,45(6):920-923.
- [10] Danielson A D. Anticholesterolemic property of *Lactobacillus acidophilus* yoghurt fed to mature boars[J]. J Anim Sci, 1989(67):966-974.
- [11] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1985(49):377-381.
- [12] Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell[J]. J Dairy Sci, 1987(70):1-12.
- [13] 曹钰,孙玲玲,陆健. 酸与胆汁耐性芽孢益生菌的筛选[J]. 饲料研究,2006(12):31-34.
- [14] Gilliland S E, Staley T E, Bush L J. Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct[J]. Dairy Sci, 1984, (67):3045-3051.
- [15] Mna G V, Spoerry A. Study of surfactant and cholesteremia in the Massi[J]. Am J Clin Nutr, 1974(27):464-469.