

文章编号:1671-9352(2008)07-0051-05

酸适应乳酸菌的筛选及其酸适应条件的研究

刘怀龙,孟祥晨*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:对24株包括双歧杆菌、植物乳杆菌、乳酸乳球菌和保加利亚乳杆菌在内的4类乳酸菌酸耐受力进行评价,结果发现除4株保加利亚乳杆菌有较强的酸耐受力外,其余20株均为酸敏感菌株。将这20株酸敏感菌株酸适应(pH 4.5, 1 h)后,有13株菌的酸耐受力得到提高。其中,乳酸乳球菌 KLDS4.0312 酸适应能力最强,酸适应后其酸耐受力可提高7 542倍。确定了乳酸乳球菌 KLDS4.0312 最佳酸适应条件为 pH 4.5, 30 min,且稳定期的菌体酸适应后,酸耐受力仅能提高27倍,酸适应能力明显低于对数期菌体。

关键词:酸适应;乳酸乳球菌;存活率;筛选

中图分类号:Q931 **文献标志码:**A

Screening of lactic acid bacteria with high-acid adaptive capacity and characterization of their acid-adaptive conditions

LIU Huai-long, MENG Xiang-chen*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The acid tolerance of 24 lactic acid bacteria including *Bifidobacterium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactococcus lactis* were evaluated. Twenty out of 24 lactic acid bacteria were sensitive to acid except 4 *L. bulgaricus*. When these 20 lactic acid bacteria were exposed to a moderate acid environment for acid adaptation, the acid tolerance of 13 strains could be improved. Among them, *L. lactis* KLDS4.0312 had the highest acid adaptive capacity and the acid tolerance was increased by 7 542 times. The optimal conditions for acid adaptation in KLDS4.0312 were pH 4.5 and 30 min. But the acid adaptation of the stationary phase cells of KLDS4.0312 could only be enhanced up to 27-fold compared with the parental strains, and the acid adaptive capacity in KLDS4.0312 stationary phase cells was lower than that in log phase cells.

Key words: acid adaptation; *Lactococcus lactis*; survival rate; screening

当前各种益生菌制剂大量涌现,市场前景广阔。然而,益生菌本身发酵产生的乳酸、乙酸以及过胃时的胃酸等酸胁迫(acid stress)均会明显降低制剂的活菌数。因而,提高益生菌的酸耐受力是目前益生菌制品研制与开发的技术关键。另外,一些乳酸菌常用作发酵剂,如能找到提高其酸胁迫抗性的途径,实现普通生产条件下浓缩发酵剂的生产 and “细胞工厂”的高密度培养,将会极大推动该菌在工业生产中的应用。

研究证明,费氏丙酸杆菌^[1]、嗜酸乳杆菌^[2]、双歧杆菌^[3]等益生菌可通过酸适应(acid adaptation)提高其酸胁迫抗性。这些益生菌可在较短的酸适应时间内引发酸应激反应(acid tolerance response, ATR),使得 F₁F₀-ATPase、谷氨酸脱羧酶、细胞膜脂肪酸组成和应激蛋白表达等发生相应变化^[4],提高菌体的酸耐受力,但酸适应能力在菌种和菌株水平上存在明显差异。本试验拟从24株保藏菌株中筛选具有较强酸适应能力的菌株,确定其最佳酸适应条件,并

收稿日期:2008-04-20

基金项目:国家“863”计划资助项目(2006AA10Z344)

作者简介:刘怀龙(1981-),男,硕士研究生,主要研究方向为乳品微生物。

*通讯作者:孟祥晨(1970-),女,教授,博士生导师,研究方向为乳品加工与食品微生物。Tel:0451-55191813;Email:sxhcmeng@163.com

比较对数期与稳定期菌体的酸适应能力大小,以在生产中合理应用并为其它菌株提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器设备

1.1.1 菌种与培养基

24株乳酸菌均来源于乳品工业微生物菌种保藏中心(东北农业大学)。TPY和MRS培养基参照文献[5]配制。

1.1.2 主要仪器设备

SPX-150B生化培养箱(上海智城),GL-21M离心机(上海市离心机机械研究所),VORTE-5混匀器(海门麒麟贝尔),HVE-50型高压灭菌器(日本HIRAYAMA),厌氧培养箱(自行设计),紫外-可见分光光度计(美国BECKMAN)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株酸耐受力的评价

24株乳酸菌以5%接种量分别接种至TPY或MRS液体中,37℃厌氧或普通培养18~20h,各取10mL菌液,6000r/min,10min离心,收集的菌体分散于pH2.5的PBS中,37℃作用2h(保加利亚乳杆菌作用3h,双歧杆菌作用pH值为2.0,植物乳杆菌作用pH值为1.5)。作用前后分别取样,采用标准平板菌落计数法测定活菌数。

1.2.2 菌株酸适应能力的 评价

8株双歧杆菌、2株植物乳杆菌和10株乳酸乳球菌以5%接种量接种至TPY或MRS液体中,37℃厌氧或普通培养4~6h后,各取10mL菌液,6000r/min,10min离心,收集的菌体分散于等体积pH4.5MRS或TPY液体培养基中,37℃适应1h,同以上条件离心,收集的菌体分散于10mLpH2.5(双歧杆菌作用pH值为2.0,植物乳杆菌作用pH值为1.5)的PBS中,37℃作用2h。未适应株作对照。作用前后分别取样,采用标准平板菌落计数法测定活菌数。

1.2.3 对数期与稳定期菌体酸适应能力的比较

乳酸乳球菌KLDS4.0312以5%接种量接种于250mLMRS液体中,37℃条件下培养,每2h取1次样,紫外可见分光光度计600nm处测定培养液的吸光值和用酸度计进行pH值测定,绘制生长曲线和pH值变化曲线。

乳酸乳球菌KLDS4.0312于37℃分别培养4h和20h,6000r/min,10min离心,收集的菌体分散于等体积pH4.5MRS中,37℃适应45min,适应后的菌液同以上条件离心,收集的菌体分别分散于10

mLpH2.5的PBS中,37℃作用2h。未适应株作对照。作用前后分别取样,采用标准平板菌落计数法测定活菌数。

1.2.4 菌株最佳酸适应条件的确定

乳酸乳球菌KLDS4.0312于37℃培养4~6h,分别取10mL菌液,6000r/min,10min离心,收集的菌体分散于等体积pH4.0、pH4.5、pH5.0、pH5.5MRS液体中,37℃适应30min和120min,适应后的菌液同以上条件离心,收集的菌体分别分散于10mLpH2.5的PBS中,37℃作用2h。未适应株作对照。作用前后分别取样,采用标准平板菌落计数法测定活菌数。

1.2.5 标准平板菌落计数法

取1mL待测菌液进行梯度稀释,取适宜稀释梯度的菌液倾注MRS或TPY平板,将平板置于37℃条件下培养24~48h,待长出可计数的菌落时进行计数,计数结果乘以稀释倍数即可得到待测菌液中的活菌数。

2 结果与分析

2.1 菌株酸耐受力评价

24株菌株的酸耐受力评价结果如图1~4所示。4株保加利亚乳杆菌在pH2.5的酸胁迫中作用3h后,活菌数没有明显下降,均在 10^8 cfu/mL以上;其中KLDS1.9206存活率最低,但仍为60.91%,说明这4株保加利亚乳杆菌对酸不敏感,不适宜作为出发菌株进行下一步研究。

植物乳杆菌在pH1.5的酸胁迫中作用2h,活菌数下降1~2个数量级;双歧杆菌在pH2.0的酸胁迫中作用2h,活菌数下降2~3个数量级;而乳酸乳球菌对酸最为敏感,在pH2.5的酸胁迫中作用2h,活菌数下降5~8个数量级,部分菌株作用后没有活菌数存在。选取除4株保加利亚乳杆菌外的其余20株菌进行下一步试验,评价菌株的酸适应能力。

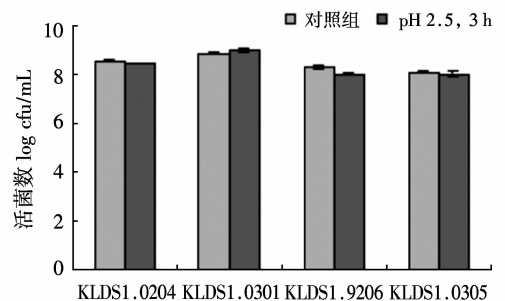


图1 酸胁迫对保加利亚乳杆菌存活的影响
Fig.1 Impact of acid stress on the survival rate of *L. bulgaricus*

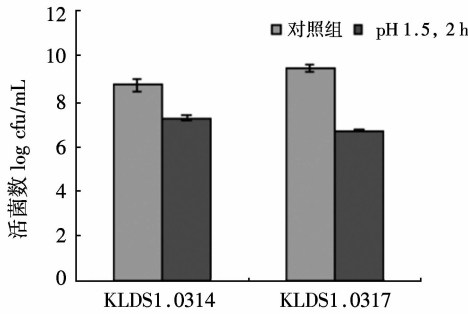


图2 酸胁迫对植物乳杆菌存活的影响

Fig.2 Impact of acid stress on the survival rate of *L. plantarum*

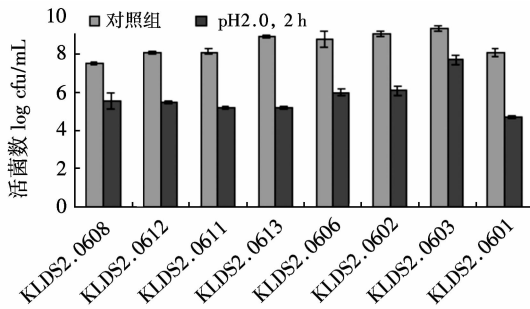


图3 酸胁迫对双歧杆菌存活的影响

Fig.3 Impact of acid stress on the survival rate of *Bifidobacterium* sp.

表1 双歧杆菌对照株与适应株在 pH 2.0 PBS 中作用 2 h 的活菌数

Table 1 Survival counts of *Bifidobacterium* sp. adapted and non-adapted cells in pH 2.0 PBS for 2 h

菌株	对照株		适应株	
	作用前	作用后	作用前	作用后
<i>B. longum</i> KLDS2.0608	3.20×10^7	3.55×10^5	6.00×10^8	1.78×10^6
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0611	1.351×10^8	1.59×10^5	9.85×10^8	1.70×10^5
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0613	8.35×10^8	1.62×10^5	6.85×10^8	4.15×10^5
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0606	5.45×10^8	9.20×10^5	6.05×10^8	9.40×10^5
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0602	1.14×10^9	1.28×10^6	1.38×10^9	3.15×10^4
<i>B. bifidum</i> KLDS2.0603	2.09×10^9	4.80×10^7	4.45×10^8	4.80×10^7
<i>B. longum</i> KLDS2.0601	1.21×10^8	5.00×10^4	1.37×10^8	9.40×10^4
<i>B. adolescent</i> KLDS2.0612	1.09×10^8	3.00×10^5	2.82×10^8	2.76×10^5

2.2.2.2 2株植物乳杆菌酸适应能力的的评价

2株植物乳杆菌对照株和适应株在 pH 1.5 的酸胁迫中作用 2 h 的活菌数如表 2 所示。其中 KLDS1.0317 有一定的酸适应能力,该菌在 pH 4.5 的 MRS 液体

表2 植物乳杆菌对照株和适应株在 pH 1.5 PBS 中作用 2 h 的活菌数

Table 2 Survival counts of *L. plantarum* adapted and non-adapted cells in pH 1.5 PBS for 2 h

菌株	对照株		适应株	
	作用前	作用后	作用前	作用后
<i>L. plantarum</i> KLDS1.0314	5.11×10^8	1.80×10^7	8.24×10^8	2.40×10^7
<i>L. plantarum</i> KLDS1.0317	3.00×10^9	5.20×10^6	9.78×10^8	4.50×10^6

2.2.2.3 10株乳酸乳球菌酸适应能力的的评价

10株乳酸乳球菌对照株和适应株在 pH 2.5 的酸胁迫中作用 2 h 的活菌数如表 3 所示。9株乳酸乳球菌在酸适应过程中均呈现出一定的酸应激现象,相比于对照株,适应菌株体在酸胁迫中作用 2 h

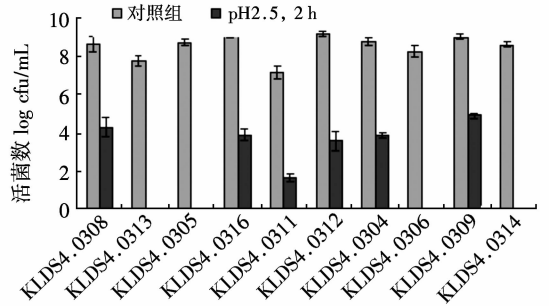


图4 酸胁迫对乳酸乳球菌存活的影响

Fig.4 Impact of acid stress on the survival rate of *L. lactis*

2.2 菌株酸适应能力评价结果

2.2.1 8株双歧杆菌酸适应能力的的评价

对 8 株双歧杆菌的酸适应能力进行了评价,对照株与适应株在 pH 2.0 的酸胁迫中作用 2 h 的活菌数如表 1 所示。其中 KLDS2.0613、KLDS2.0603 和 KLDS2.0601 有一定的酸适应能力,菌体在 pH 4.5 的 TPY 液体中适应 1 h 后,其在酸胁迫中的酸耐受力相比于对照株分别提高 3.12 倍、4.69 倍和 1.66 倍。而另外 5 株双歧杆菌酸适应后,菌体的酸胁迫抗性反而有所下降。

中适应 1 h,菌体在酸胁迫中作用 2 h 后的存活率是 0.46%,而对照株为 0.17%。而 KLDS1.0314 酸适应后,菌体酸胁迫抗性下降了。

后,活菌数可分别提高 2 ~ 4 个数量级。其中 KLDS4.0312 适应株对酸胁迫的耐受力是对照株的 7 542 倍,在酸胁迫中作用 2 h 后存活率可达 1.64%,酸适应能力最强。因而,选取该株作为目标菌株进行下一步试验,确定其最佳酸适应条件,并判断对数

期与稳定期菌体酸适应能力的大小。

表3 乳酸乳球菌对照株和适应株在 pH 2.5 的 PBS 中作用 2 h 的活菌数
Table 3 Survival counts of *L. lactis* adapted and non-adapted cells in pH 2.5 PBS for 2 h

菌株	对照株		适应株	
	作用前	作用后	作用前	作用后
<i>L. lactis</i> KLDS4.0308	4.70×10^8	2.03×10^4	3.45×10^8	5.60×10^5
<i>L. lactis</i> KLDS4.0313	5.80×10^7	0	3.65×10^7	2.50×10^1
<i>L. lactis</i> KLDS4.0305	5.90×10^8	0	3.30×10^8	2.60×10^4
<i>L. lactis</i> KLDS4.0316	1.55×10^9	7.65×10^3	1.61×10^9	1.67×10^7
<i>L. lactis</i> KLDS4.0311	1.49×10^7	4.50×10^1	1.20×10^8	1.40×10^2
<i>L. lactis</i> KLDS4.0312	1.69×10^9	3.70×10^3	1.60×10^9	2.62×10^7
<i>L. lactis</i> KLDS4.0304	6.70×10^8	7.85×10^3	8.05×10^8	2.28×10^6
<i>L. lactis</i> KLDS4.0306	1.87×10^8	0	1.62×10^8	6.05×10^3
<i>L. lactis</i> KLDS4.0309	1.14×10^9	8.60×10^4	1.23×10^9	2.16×10^7
<i>L. lactis</i> KLDS4.0314	4.45×10^8	0	3.30×10^8	1.40×10^4

本试验选择 pH 4.5, 1 h 为酸适应条件^[1], 对不同乳酸菌的酸适应能力进行了评价。很多乳酸菌在酸适应过程中可以诱发酸应激反应而提高自身酸耐受力, 如 *L. bulgaricus* VI-1010 在 pH 4.75 条件下适应 30 min, 酸耐受力可提高 250 倍^[6]。但并非所有菌株的酸耐受力可在酸适应后得到提高, 本试验中 5 株双歧杆菌、1 株植物乳杆菌和 1 株乳酸乳球菌在酸适应后酸耐受力反而降低了。这说明, 酸适应能力大小在菌种和菌株水平上存在着差异, 因而及时筛选具有较强酸适应能力的菌株在实际生产中具有重要意义。

2.3 菌株最佳酸适应条件的确定

乳酸乳球菌 KLDS4.0312 在 pH 4.0、pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5 溶液中分别适应 30 min 后, 菌体在 pH 2.5 的酸胁迫中作用 2 h 的存活率分别为: 3.90%、7.96%、4.84%、4.11%; 若将该菌体在以上 pH 条件下适应 120 min, 则菌株在酸胁迫中作用 2 h 后存活率分别为: 2.67%、5.35%、3.71%、2.18%; 而对照株在酸胁迫中作用 2 h, 未能检出活菌数(图 5)。由结果可知在 pH 4.5 处适应 30 min 时, 菌体酸耐受力最强, 为其最佳酸适应条件。

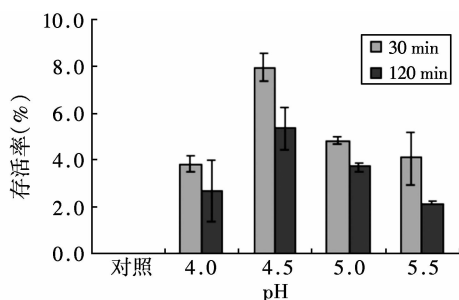


图5 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 的最佳酸适应条件
Fig.5 The optimal conditions for acid adaptation of *L. lactis* KLDS4.0312

乳酸乳球菌 KLDS4.0312 适应 30 min 后, 酸耐受力

得到了明显提高, 相比较而言, 菌体适应 120 min 后酸耐受力反而因为长时间的酸作用而有所降低, 说明随着时间的延长, 酸适应作用逐渐向酸胁迫作用转化, 酸应激反应不如短时间适应时明显。Jan 等人^[7]也认为 *P. freudenreichii* 菌体在酸适应 3 min 内就引发了 ATR 反应, 而后菌体对酸的抵抗力在 10 min 内呈对数值增加, 并在一定时间内达到最大值。

2.4 对数期与稳定期菌体酸适应能力的比较

乳酸乳球菌 KLDS4.0312 的生长曲线如图 6 所示, 该菌对数期较短, 12 h 即进入生长稳定期。选取 4 h(对数期)和 20 h(稳定期)培养的该菌进行酸适应, 将适应株和对照株菌体同时转移至 pH 2.5 的酸胁迫中作用 2 h, 活菌数结果见图 7。对数期菌体对照株存活率小于 0.01%, 适应株存活率为 1.63%, 适应后菌体酸耐受力提高 7 542 倍; 稳定期菌体对照株存活率为 0.20%, 适应株存活率为 5.47%, 适应后菌体酸耐受力仅提高 27 倍。对数期菌体的酸适应能力明显强于稳定期菌体。这说明, 菌体培养本身也是一个缓慢的酸适应过程, 期间菌体的酸胁迫抗性逐步提高。因而, 在研究菌株的酸适应机制时, 选取对数期菌体作为目标菌更具代表性。

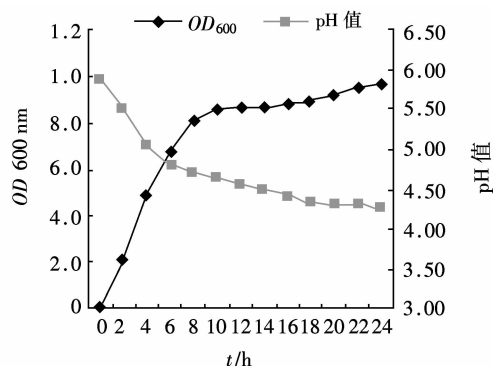


图6 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 的生长曲线
Fig.6 The growth and pH curve of *L. lactis* KLDS4.0312

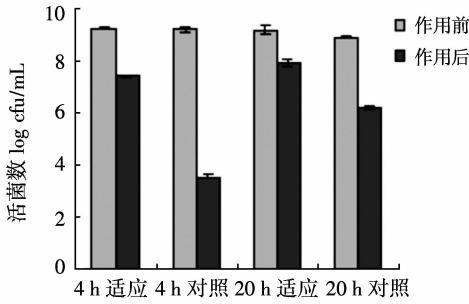


图7 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 对数期菌体与稳定期酸适应能力的比较

Fig.7 The acid adaptive capacity of log phase and stationary phase cells of *L. lactis* KLDS4.0312

通常认为,对数期菌体对于酸、热、渗透压、 H_2O_2 和乙醇等胁迫的抵抗力要低于稳定期菌体,本试验得出了相同的结论。大规模食品级工业生产中要求乳酸菌细胞达到一定高的密度才能收获,主要在对数生长末期或静止期,此培养阶段的菌体抗胁迫能力高于对数期菌体,这与菌体在培养过程缓慢酸适应有关。在菌体发酵至稳定期这个过程中, F_1F_0 -ATPase 活性不断增加^[8],一些与酸耐受力相关的应激蛋白被诱导产生^[9],菌体酸耐受力提高。另外,将酸适应方法在食品级发酵罐规模的生产中应用是可行的,但酸适应能力在种和株水平上存在差异,需要提前评价各菌株的酸适应能力和最佳酸适应条件。

3 结论

(1) 对 24 株初筛菌株的酸耐受力进行了评价,4 株保加利亚乳杆菌对酸不敏感,不适宜作为目标菌株研究酸适应机制。而植物乳杆菌、双歧杆菌和乳酸乳球菌在酸胁迫中作用后,活菌数均下降 1 个数量级以上,作为目标菌进行酸适应能力评价。

(2) 20 株双歧杆菌、植物乳杆菌和乳酸乳球菌中有 13 株菌在酸适应后诱发了酸应激反应,酸耐受力得以提高,但酸适应能力在种和株水平上存在显著差异。其中乳酸乳球菌 KLDS4.0312 酸适应能力最强,pH 4.5 处适应 1 h 后菌体酸耐受力可提高 7.542 倍。

(3) 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 最佳酸适应条件为:pH 4.5、30 min,该菌适应 30 min 可明显提高菌体的酸胁迫抗性;适应 120 min 后,菌体酸胁迫抗性反而因为长时间的酸作用而有所下降。

(4) 乳酸乳球菌 KLDS4.0312 稳定期菌体酸适应后酸耐受力仅提高 27 倍,远低于对数期菌体的 7.542 倍,说明对数期菌体具有较强的酸适应能力,也说明菌体培养本身是一个缓慢的酸适应过程。

参考文献:

- [1] JAN Gwénaél, LEVERRIER Pauline, PICHEREAU Vianney, et al. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5):2029-2036.
- [2] AZCARATE-PERIL Andrea, ALTERMANN Eric, HOOVER-FITZULA Rebecca L, et al. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(90):5315-5322.
- [3] MAUS J E, INAHAM S C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(1):146-154.
- [4] COTTER Paul D, HILL Colin. Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(3):429-453.
- [5] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [6] LIM Eng Mong, ANNE Lafon, LARBI Dridi, et al. Identification of stress proteins in *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* by two-dimensional electrophoresis[J]. Lait, 2001, 81:317-325.
- [7] JAN Gwénaél, ROUAULT-JEAN Annette, MAUBOIS Louis. Acid stress and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Lait, 2000, 80:325-336.
- [8] NANNEN L Nancy, HUTKINS W Robert. Proton-tanslocating aenosine tiphosphatase activity in Lactic acid bacterial[J]. Journal of Dairy Science, 1991, 74(3):747-751.
- [9] 袁静,朱力,冯尔玲,等.长双歧杆菌 NCC2705 菌株应激蛋白的研究[J].微生物学报,2006,46(3):390-396.

(编辑:于善清)