

3 株乳杆菌表面疏水性及凝聚性研究

于小番, 陈忠琴, 党欣桐, 过叶青, 蒋 萌, 许慧卿* (扬州大学旅游烹饪学院, 江苏扬州 225127)

摘要 [目的]探讨干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌和植物乳杆菌的表面疏水性以及凝聚性。[方法]采用 MATH 法测定 3 株乳杆菌的表面疏水性, 自凝聚试验测定菌株的自凝聚率, 共凝聚试验测定 3 株乳杆菌与致病菌的共凝聚率。[结果]3 个菌株的涡旋时间与表面疏水性呈负相关, 静置时间与自凝聚作用呈正相关, 且凝聚作用与致病菌的粘附和菌体自身特性有关。[结论]3 株乳杆菌在肠道中均表现出良好的凝聚能力。

关键词 副干酪乳杆菌; 干酪乳杆菌; 植物乳杆菌; 疏水性; 凝聚性

中图分类号 TS201 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)22-0055-03

Surface Hydrophobicity and Coherency of Three Strains of *Lactobacillus*

YU Xiao-fan, CHEN Zhong-qin, DANG Xin-tong, XU Hui-qing* et al (Tourism and Cuisine College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127)

Abstract [Objective] To explore the surface hydrophobicity and coherency of *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*. [Method] The hydrophobic rates were determined by using MATH. Self condensation rates of bacterial strains were determined by self condensation test. Coagulation rates of *Lactobacillus* with pathogenic bacteria were determined by coagulation test. [Result] The vortex time of bacterial strains was negatively correlated with the surface hydrophobicity, and the static time was positively correlated with the self condensation, the condensation was related to the adhesion of pathogenic bacteria and the characteristics of bacteria. [Conclusion] Three strains of *Lactobacillus* demonstrates good condensation ability in the gut.

Key words *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus casei*; *Lactobacillus plantarum*; Hydrophobicity; Coherency

益生菌自被发现和定义以来, 已被广泛应用于预防疾病和增强体质等方面。乳酸杆菌是益生菌菌群的重要成员, 被广泛应用于食品发酵行业以及保健食品行业。作为一种对人体健康起到重要作用的活性益生菌, 乳酸杆菌在改善胃肠道微环境, 促进机体对营养物质的消化和吸收、增强机体免疫力等方面有显著功效, 因而日益受到人们的重视^[1]。乳杆菌是革兰氏阳性菌, 其广泛分布于含有碳水化合物的动植物发酵产品中, 也见于温血动物的口腔、阴道和肠道内。该属细菌分解糖的能力强, 分解蛋白质类的能力极低, 乳杆菌耐酸, 最适 pH 为 5.5~5.8, 甚至更低。

疏水性在胶体溶液的稳定性中起着十分重要的作用^[2]。细菌表面的疏水性能够使其在极性水中表现出不稳定状态, 从而引起一系列菌体排列的变化。菌株表面结构的差异性导致其疏水性的不同^[2-5]。

乳杆菌的表面结构(如蛋白质、代谢分子、DNA 分子等)能够为其黏膜表面的粘附能力提供竞争优势, 使其特异性粘附后在肠道中定殖^[6], 然后通过空间占位抑制病原菌在肠道中定殖, 并且通过抢夺营养物质以及释放抑菌物质来降低致病菌的生存率, 从而达到抑制病原菌的目的。此外, 乳杆菌可以通过与致病菌的共凝聚作用, 减少致病菌在肠道中的数量, 改变肠道中的菌群结构, 改善肠道微环境。笔者通过对几种乳杆菌的表面疏水性以及凝聚能力进行研究, 探求涡旋时间对表面疏水能力以及静置时间对凝聚力的影响。此外, 研究副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)与

多种致病菌的共凝聚能力, 来探究这几种乳杆菌是否能加剧致病菌的凝聚从而起到抑制病菌的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株复苏与培养 将保存在 -70 ℃ 冰箱中的乳杆菌菌种取出后置于 37 ℃ 水浴箱中解冻。于超净工作台上吸取 200 μL 菌液接入 10 mL MRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧培养 18 h。取一环培养物划线于 MRS 固体平板上, 37 ℃ 厌氧培养 18 h, 之后再取一环培养物划线于 MRS 固体平板上, 37 ℃ 厌氧培养 18 h。挑取单菌落接种于 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧培养 18 h。

将保存在 -70 ℃ 冰箱中的副溶血性弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌菌种取出, 置于 37 ℃ 水浴箱中解冻。于超净工作台上吸取 200 μL 菌液接入 10 mL MRS 液体培养基中, 37 ℃ 培养 18 h。

1.2 绘制乳杆菌生长曲线 在乳杆菌经 2 次固体培养基划线菌接种于液体培养基后, 测出此时菌液的 OD 值, 此后每隔一段时间(0、2、3、4、6、8、11、13、14、15、17、18、19、21、23、25 h)测 1 次 OD 值, 直至 25 h, 每个重复测定 3 次, 取平均值。

1.3 MATH 法测定菌株表面疏水性 将培养好的乳杆菌菌液以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 然后悬垂于生理盐水中, 调节菌液使之在 600 nm 波长下的 OD 值为 0.8~1.0, 记为 OD₁。将菌液分成 6 份, 每份 2.4 mL, 加入 0.4 mL 三氯甲烷, 分别振荡涡旋 10、20、30、40、50、60 s, 静置 20 min, 以生理盐水为空白对照, 测得水相, 重复 3 次, 取平均值, 记为 OD₂。

菌株表面疏水性(CSH) = $(1 - OD_2 / OD_1) \times 100\%$

1.4 菌株自凝聚率的测定 将培养好的乳杆菌菌液以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 然后悬垂于生理盐水中, 以生理盐水为空白对照, 调节菌液使

之在 600 nm 波长下 OD 值约为 1.0, 记为 OD_1 。取 5 支型号一致的试管做好标记, 每支试管加入 4 mL 调整好浓度的菌悬液, 分别室温静置 1、2、3、4、5 h, 然后各吸取 1 mL 上层溶液测得其吸光值, 重复 3 次, 取平均值, 记为 OD_2 。

菌株自凝聚率 = $(1 - OD_2 / OD_1) \times 100\%$

1.5 菌株与致病菌共凝聚率的测定 将培养好的乳杆菌及致病菌菌液以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 然后悬垂于生理盐水中, 以生理盐水为空白对照, 调整受试菌株菌液浓度, 使其在 600 nm 波长下 OD 值约为 0.4。分别取调好浓度的乳杆菌菌悬液 2 mL 于 4 支试管中, 再分别加入 2 mL 4 种致病菌悬液相混合, 以 4 mL 乳杆菌和相应致病菌菌悬液作为对照组, 振荡涡旋 3 min 后 37 °C 静置 2 h, 然后吸取 1 mL 上层溶液测定吸光值, 重复 3 次。

菌株共凝聚率 = $[(OD_{乳} + OD_{菌}) / 2 - OD_{混}] / [(OD_{乳} + OD_{菌}) / 2] \times 100\%$

式中, $OD_{乳}$ 为乳酸菌菌悬液在 600 nm 处测得的 OD 值; $OD_{菌}$ 为致病菌菌悬液在 600 nm 处测得的 OD 值; $OD_{混}$ 为混合上层溶液在 600 nm 处测得的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 生长曲线分析 3 株乳杆菌的生长情况如图 1 所示。由图 1 可知, 3 株乳杆菌均经历适应期、对数期、稳定期 3 个阶段, 18 ~ 20 h 活性最高, 生长状况最稳定。从生长情况看, 3 株菌到达对数生长期与进入稳定生长期的时间没有明显差别, 而到达稳定期时植物乳杆菌的浓度要明显低于其他 2 株菌。后续试验中选取生长 18 h 的菌株。

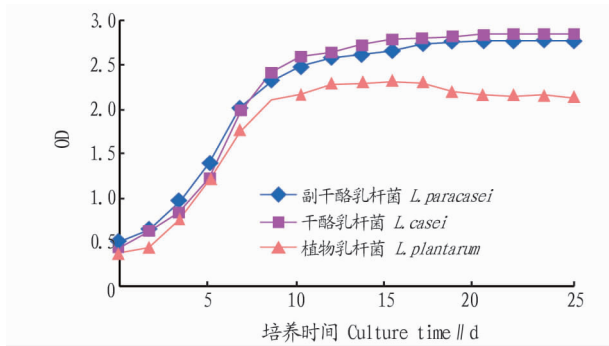


图 1 3 株乳杆菌生长曲线

Fig. 1 The growth curve of three strains of *Lactobacillus*

2.2 菌株的表面疏水率 3 株乳杆菌的表面疏水率如图 2 所示。由图 2 可知, 在涡旋初期, 涡旋时间与疏水率呈正相关; 20 s 后, 涡旋时间与副干酪乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌的疏水性都呈现负相关, 且涡旋时间越长, 疏水作用越弱; 至 40 s 后, 疏水率趋于 0。将 3 种菌株进行比较, 副干酪乳杆菌与干酪乳杆菌的疏水率相似, 且疏水性优于植物乳杆菌。

2.3 菌株的自凝聚率 3 株菌的自凝聚率如图 3 所示, 菌株在不同静置时间下 OD_2 值的变化如图 4 所示。将图 3 和图 4 结合, 可以更加直观地看出, 3 个菌株的 OD_2 值随着静置时间的增加均呈现出下降趋势, 而菌液自凝聚率呈现出上升趋势。菌液自凝聚率的上升趋势并不是一条直线, 副干酪乳杆

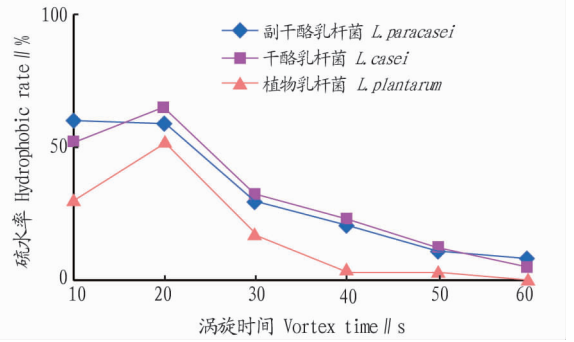


图 2 3 株乳杆菌在不同涡旋时间下的表面疏水率变化

Fig. 2 The change of surface hydrophobic rate of three strains of *Lactobacillus* at different vortex time

菌和干酪乳杆菌初期上升较快, 后期上升较慢, 而植物乳杆菌初期上升较慢, 后期上升较快。静置 4 ~ 5 h, 菌液自凝聚率已逐渐趋于一致。当静置 5 h 后, 副干酪乳杆菌的自动凝聚率基本不会发生显著性变化, 维持在 30% 左右。

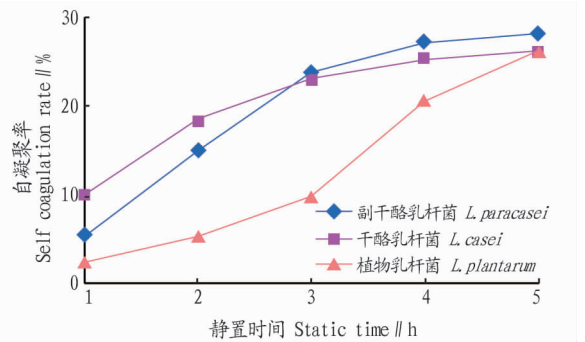


图 3 3 株乳杆菌在不同静置时间下的自凝聚率变化

Fig. 3 The change of self coagulation rate of three strains of *Lactobacillus* at different static time

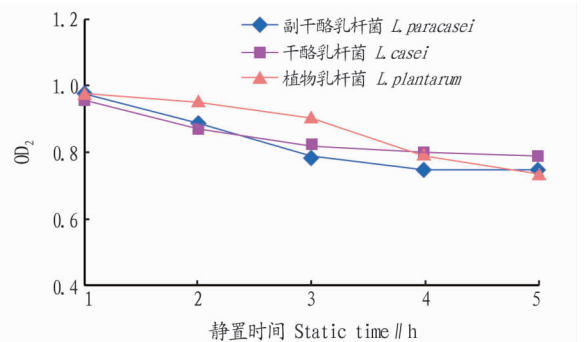


图 4 3 株乳杆菌在不同静置时间下的 OD_2 值变化

Fig. 4 The change of OD_2 of three strains of *Lactobacillus* at different static time

试验过程中, 菌液涡旋振荡后很快开始沉淀, 上层溶液逐渐澄清, 下层溶液逐渐浑浊, 此现象与试验数据体现出来的结果一致。

2.4 菌株与致病菌的共凝聚率 大肠杆菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌均是体内常见的致病菌, 在人体肠道内的生长繁殖容易引起各项生理、病理反应。研究发现, 粘附在肠道的乳杆菌可以通过竞争粘附位点或空间位阻、产生抑菌物质等来抑制致病菌的粘附作用。

由图 5 可以看出,副干酪乳杆菌与 4 株致病菌的共凝聚率以副溶血性弧菌的混合液最高,达 9.48%;其次是金黄色葡萄球菌的混合液,为 4.06%;之后是大肠杆菌混合液,为 3.18%;最低的是沙门氏菌的混合液,只有 0.77%。结果表明,副干酪乳杆菌有促进副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌在液态基质中聚集的能力,但对沙门氏菌几乎没有效果。乳酸菌有促进致病菌聚集的能力,可能会影响其对致病菌的抑制能力^[7],因此副干酪乳杆菌对副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等致病菌可能有一定的抑制能力。

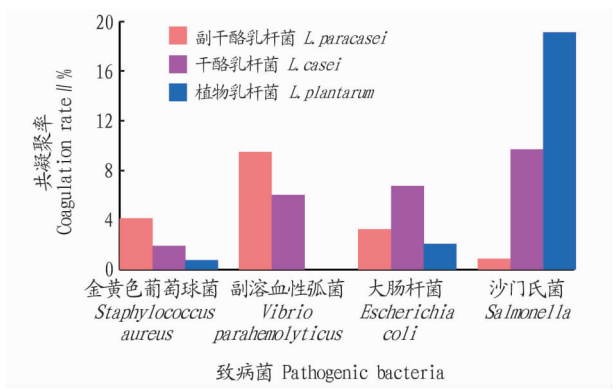


图 5 3 株乳杆菌与 4 株致病菌共凝聚率测定结果

Fig.5 The determination result of the coagulation rate of three strains of *Lactobacillus* and four strains of pathogenic bacteria

从图 5 可以看出,副干酪乳杆菌对副溶血性弧菌的共凝聚效果最好,而干酪乳杆菌以及植物乳杆菌对沙门氏菌的抑制效果相较于其他 3 种致病菌好,且植物乳杆菌对沙门氏菌的共凝聚率达 19.11%。

3 讨论

Savage^[8]研究了 22 株乳杆菌生长阶段与粘附的关系,发现与指数期相比,绝大部分乳杆菌生长到稳定期后的粘附表现更好。该试验所用乳杆菌均为培养 18 h 的菌株。由于培养时间、温度、pH、菌液浓度、Ca²⁺、糖和蛋白质等因素会影响乳杆菌的表面疏水性和自动聚集能力,因此除了选用合适的试验菌株外,试验过程中还应保证培养温度为 37℃,培养时间为 18 h,菌液浓度一致,所用设备一致,同时控制 Ca²⁺、糖和蛋白质等因素,避免造成差异影响试验结果和获得生长活性高且状况好的菌株。

研究表明,大部分表面疏水性低的菌株,其粘附性也不高,所以细菌的表面疏水性会影响其在体内的粘附能力。通过该试验结果发现,如果涡旋时间过长,乳杆菌在肠道内的

粘附能力可能会降低。试验结果表明,植物乳杆菌的粘附能力较干酪乳杆菌弱,这与林晓姿等^[9]的研究成果一致。

研究表明,乳酸菌的自凝聚能力与其在体内的粘附能力有密切关系^[10],因此静置时间可能因影响菌株的自凝聚能力而影响其粘附能力。该研究表明,静置时间与 3 株乳杆菌的自凝聚作用呈正相关。

乳杆菌促进致病菌聚集的能力,可能会影响其对致病菌的抑制能力,因此副干酪乳杆菌对副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等致病菌可能有一定的抑制能力。试验结果表明,3 株乳杆菌对不同致病菌的共凝聚能力不同,这可能由于致病菌的自身特性决定了其对乳杆菌的不同凝聚能力。

综上所述,时间是影响粘附性能的因素之一,粘附通过作用一定的时间达到动态平衡。通过试验,再次验证了疏水性、自凝聚能力以及粘附性三者之间的正相关联系规律的同一性和普遍性,为后续粘附性质的研究奠定基础。同时,该研究所选用的几种乳杆菌菌株的表面疏水性和自凝聚特性均高于前人研究,表明菌株存在着一定的特异性,可通过对干酪乳杆菌表面性质的测定,快速而高效地筛选出具有高粘附性质的乳杆菌,为制备高粘附性干酪乳杆菌种及其相关应用制剂做准备。

参考文献

[1] 雷虹,李秀琼,庄海雾,等.副干酪乳杆菌 HD1.7 产生抗菌物质的初步研究[J].工业微生物,2007,37(4):16-19.

[2] ROSENBERG M. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon:Water interface[J]. Crit Rev Microbiol, 1991, 18(2):159-173.

[3] PARKER N D, MUNN C B. Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida*[J]. FEMS microbiology letters, 1984, 21(2):233-237.

[4] KOGA T, OKAHASHI N, TAKAHASHI I, et al. Surface hydrophobicity adherence and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c[J]. Infection immunity, 1990, 58(2):289-296.

[5] IWABUCHI N, SUNAIRI M, ANZAI H, et al. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*[J]. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2003, 30(1):51-60.

[6] 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(2):49-52.

[7] 张育红,张铭.从无机氮形态及时空分布研究河流污染和自净程度[J].江苏环境科技,1995(3):2-6.

[8] SAVAGE D C. Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(6):1992-1995.

[9] 林晓姿,梁璋成,何志刚,等.两株自选乳酸菌的益生特性[J].北京工商大学学报(自然科学版),2012,30(1):30-35.

[10] LIM N K, YOOHK J C, PARK H K, et al. The relationship between cell surface hydrophobicity (CSH) and stress tolerance in *Bifidobacterium* spp. [J]. Food science and biotechnology, 1998, 7:66-70.

本刊提示 来稿请用国家统一的法定计量单位的名称和符号,不要使用国家已废除了的单位。如面积用 hm^2 (公顷)、 m^2 (平方米),不用亩、 尺^2 等;质量用 t (吨)、kg (千克)、mg (毫克),不用再担等;表示浓度的 ppm 一律改用 mg/kg 、 mg/L 或 $\mu\text{L/L}$ 。