

植物乳杆菌 LPL10 的体外益生特性研究

陈琼, 甘祥武, 黄魁英, 赵乐怡, 李学优, 鲍志宁, 曹丁, 邓钧尹 (广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要 [目的]在筛选到一株食品源植物乳杆菌 LPL10 的基础上,通过对其耐酸性、耐胆盐、抑菌能力和产酸能力进行研究,确定其益生特性。[方法]采用平板活菌计数法测定 LPL10 的耐酸、耐胆盐性能,通过抑菌圈法评价菌株的抑菌能力,高效液相色谱法测定 LPL10 发酵产有机酸能力。[结果]植物乳杆菌 LPL10 具有良好的低酸耐受能力,在 pH 3.5 条件下培养 24 h 活菌数为 1.2×10^8 cfu/mL,存活率为 148%;LPL10 受 0.1% 胆盐抑制影响较小,培养 24 h 后活菌数为 3.60×10^8 cfu/mL,存活率为 356%;植物乳杆菌 LPL10 对指示菌金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和绿脓杆菌均有良好的抑制作用;LPL10 发酵上清液中产的主要有机酸为乳酸和乙酸,相对含量分别为 20.33、25.26 mg/L。[结论]体外益生特性研究表明,植物乳杆菌 LPL10 可以作为潜在的益生性菌株。

关键词 植物乳杆菌;耐酸;耐胆盐;抑菌;产酸能力

中图分类号 TS 201.3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)02-0156-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.02.047



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Vitro Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* LPL10

CHEN Qiong, GAN Xiang-wu, HUANG Kui-ying et al (Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663)

Abstract [Objective] The probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* LPL10 obtained from food products were evaluated through acid tolerance, bile salt resistance, antibacterial activity and acid-producing ability. [Method] The resistance to acid and bile salt of LPL10 were researched by plate counting method, its antibacterial property by the inhibition zone method, the acid-producing ability by high performance liquid chromatography. [Result] *Lactobacillus plantarum* LPL10 had a good acid-lowering tolerance, and the viable count was 1.2×10^8 cfu/mL in 24 h at pH 3.5, the survival rate was 148%. There was low suppression on containing 0.1% bile salt for LPL10, the viable count was 3.60×10^8 cfu/mL after the culture of 24 h and its survival rate was 356%; LPL10 played an inhibitory role in *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Lactic acid and acetic acid were the main organic acids produced by fermenting broth of LPL10, the relative contents were 20.33 and 25.26 mg/L, respectively. [Conclusion] The research results showed that *Lactobacillus plantarum* LPL10 could be a potential probiotic strain.

Key words *Lactobacillus plantarum*; Acid tolerance; Bile salt resistance; Antibacterial activity; Acid-producing ability

乳酸菌是发酵糖类且主要产物为乳酸的一类革兰氏阳性、无芽孢、厌氧生长细菌的总称,它不仅能够增强机体免疫力和抵抗力,还能防止部分胃肠道疾病的发生^[1-3]。作为一种重要的乳酸菌,植物乳杆菌属于乳杆菌科中的乳杆菌属,厌氧或兼性厌氧,该菌与其他乳酸菌的不同之处在于植物乳杆菌的活菌数比较高,能大量产酸,而且产出的酸性物质能够降解重金属。植物乳杆菌常见于肉类、奶油及很多蔬菜发酵制品中,能通过胃并定植于肠道发挥益生作用,诸如调节肠道菌群平衡、对致病菌有抑制作用、降低血清胆固醇含量和预防心血管疾病、缓解乳糖不耐症等。植物乳杆菌及其代谢产物作为微生态调节剂,可抑制人或动物体内常见的致病菌,在食品、饲料等领域受到广泛关注。要发挥益生作用,益生菌必须能够耐受人体的胃肠道中胃酸和胆汁等不良环境^[4-7]。鉴于此,笔者以植物乳杆菌 LPL10 为研究对象,分别测定其耐酸耐胆盐、抑菌及产酸特性,以期开发出 1 株潜在的益生性菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 植物乳杆菌 LPL10 来源于农家酸豆角(已通过生化试验和 16S rDNA 序列分析方法鉴定);指示菌金黄色葡萄球菌 SAU08、藤黄微球菌 MLU02、绿脓杆菌 PPY01 来源于广东省微生物种质资源库。

基金项目 2018 年广东省微生物种质资源库项目。

作者简介 陈琼(1990—),女,湖北武穴人,助理工程师,硕士,从事食品生物技术研究。

收稿日期 2018-09-07

1.1.2 主要试剂及培养基。胆盐:广东环凯微生物科技有限公司;有机酸标准品:Sigma;其他普通试剂均为国产分析纯。

LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g, pH 7.4,配制 1 L,固体培养基加入 1.2% 琼脂粉。

NA 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g, pH 7.2~7.4,配制 1 L,固体培养基加入 1.2% 琼脂粉。

MRS 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 8 g,酵母膏粉 4 g,葡萄糖 20 g,磷酸氢二钾 2 g,柠檬酸三氨 2 g,乙酸钠 5 g,硫酸镁 200 mg,硫酸锰 50 mg,吐温 80 g, pH 6.2±0.2,配制 1 L,固体培养基加入 1.2% 琼脂粉。

1.1.3 主要仪器设备。显微镜:重庆奥特光学仪器有限公司;752N 型紫外可见分光光度计:上海仪电分析仪器有限公司;生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计:上海仪电科学仪器股份有限公司;PCR 仪:Bio-Rad 公司;高效液相色谱仪:岛津 LA20 液相色谱仪;低温冷冻离心机:Eppendorf 5427 R。

1.2 方法

1.2.1 耐酸性能研究。用 7 mol/L 的盐酸分别调节 MRS 培养基 pH 为 2.5、3.0 和 3.5。将植物乳杆菌 LPL10 菌种活化后(菌液中菌的活菌数为 8.1×10^7 cfu/mL),以 2% 的接种量分别接种于 pH 2.5、3.0 和 3.5 的 MRS 培养基,于 37 °C 恒温培养箱中静置培养,并在 0、2、24 h 取样,稀释至合适梯度后涂布 MRS 培养基,培养 24 h 后计算活菌数。对照普通 MRS 培养基中涂布后的菌落数,计算菌的存活率。公式为存活率 = $N_0/N_t \times 100\%$,其中 N_0 表示低 pH 的活菌数, N_t 表示普通

MRS 的活菌数。

1.2.2 耐胆盐性能研究。将植物乳杆菌 LPL10 菌种活化后(菌液中菌的活菌数为 1.01×10^8 cfu/mL),以 2% 的接种量接种于胆盐浓度分别为 0.1%、0.3% 和 0.5% 的 MRS 培养基中,于 37 ℃ 恒温培养,并在 0、2、24 h 取样,稀释至合适梯度后涂布 MRS 培养基,培养 24 h 后计算活菌数。以普通 MRS 中涂布后的菌落数为对照,计算菌的存活率。公式为存活率 = $N_0/N_t\times 100\%$,其中 N_0 表示胆盐培养基的活菌数, N_t 表示普通 MRS 的活菌数。

1.2.3 抑菌试验。

1.2.3.1 指示菌悬液的制备。选取金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、绿脓杆菌为指示菌,将斜面培养的 3 种指示菌用 4~5 mL 生理盐水洗脱下来,测其 OD₆₀₀ 并设置 OD₆₀₀ = 4.00±0.01。

1.2.3.2 试验平板的制备。将 3 种指示菌培养基加热融化并冷却到 40~50 ℃,然后按 1 μL/mL 的比例添加已调配好的指示菌悬液,摇匀;用灭过菌的移液管分别移取 10 mL 已调节好的各培养基到 90 mm 培养皿中,待其凝固后用灭过菌的打孔器(直径 2.7 mm)打孔;各孔加入 5 μL 植物乳杆菌发酵上清液,于 37 ℃ 恒温培养 24 h,观察抑菌效果,并测量抑菌圈直径^[8]。

1.2.4 测定产酸能力。将植物乳杆菌 LPL10 菌种活化后,以 2% 的接种量接种于 MRS 培养基中,37 ℃ 静置培养 48 h,发酵结束后取发酵液 4 mL,离心取上清液,采用 0.22 μm 过滤膜进行过滤。液相操作条件为 Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm),线性梯度洗脱,进样量 20 μL,示差显示器检测,流动相 5 mmol/L 硫酸,流速为 0.6 mL/min,柱温 65 ℃。采用面积外标法进行定量测定。

2 结果与分析

2.1 耐酸性试验结果 人体胃酸 pH 主要维持在 2.0~3.0,益生菌通过口服进入肠道需经过胃的酸性环境^[8],因此耐酸性试验选取 3 个 pH,分别为 2.5、3.0 和 3.5。由图 1 和 2 可以看出,植物乳杆菌 LPL10 具有一定的耐酸能力。MRS 培养基 pH 为 2.5 时,LPL10 培养 2 h 活菌数依然保持在 9.35×10^6 cfu/mL 水平,但 24 h 后活菌数明显降低,生长受到抑制;在培养基 pH 3.0 条件下,LPL10 培养 2 和 24 h 后,活菌数都与初始菌数保持在同一数量级上,说明 LPL10 已能较好的耐受酸的影响,并保持一定的生长率;pH 为 3.5 时,LPL10 的生长已不受抑制,培养 24 h 存活率达到 148%,显示出良好的耐受性。

2.2 耐胆盐试验结果 耐胆盐试验结果显示(图 3 和 4),随着培养基胆盐浓度越高,LPL10 存活率逐渐降低。在 0.1% 胆盐浓度下 LPL10 的生长受胆盐影响较小,培养 2 h 活菌数为 1.39×10^8 cfu/mL,培养 24 h 后活菌数增长至 3.60×10^8 cfu/mL,存活率达 356%;在 0.3% 胆盐浓度下 LPL10 的生长已经受到较大的抑制,培养 24 h 存活率为 15.3%,但活菌依然维持在 10^7 cfu/mL 水平,LPL10 虽受到抑制,但也维持一定的生长率。不同胆盐浓度下发酵液 pH 及 OD₆₀₀ 与活菌

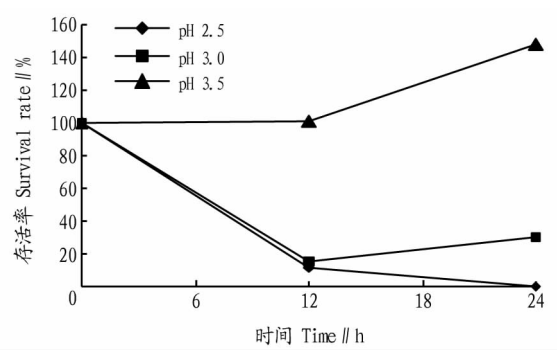


图 1 植物乳杆菌 LPL10 对酸的耐受性的影响
Fig.1 Effects of the *Lactobacillus plantarum* LPL10 on the tolerance of acid

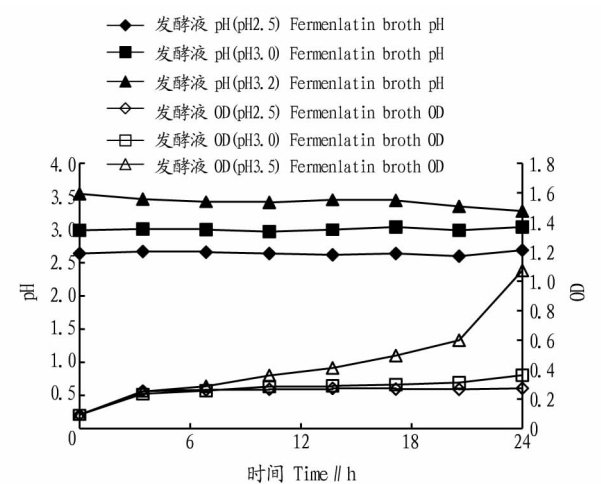


图 2 植物乳杆菌 LPL10 培养过程中发酵液 pH 和 OD 的变化
Fig.2 Changes of fermentatin broth pH and OD during the culture of *Lactobacillus plantarum* LPL10

数保持一致。

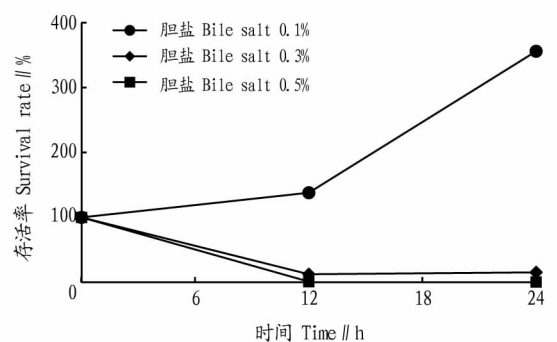


图 3 植物乳杆菌 LPL10 对胆盐的耐受性
Fig.3 Effects of *Lactobacillus plantarum* LPL10 on the tolerance to bile salt

2.3 抑菌试验结果 采用打孔法对植物乳杆菌 LPL10 的抑菌能力进行测定,抑菌圈直径越大,表示菌体的抑菌效果越好。试验结果显示,LPL10 对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、绿脓杆菌均有一定的抑制作用,其中对绿脓杆菌的抑制效果最明显,其抑菌圈直径为 6.49 mm。由于植物乳杆菌产酸也具有一定的抑菌效果,还需确定 LPL10 是否具有产细菌素功能。

2.4 产酸特性 产酸是乳酸菌的一个重要益生特性,产何种

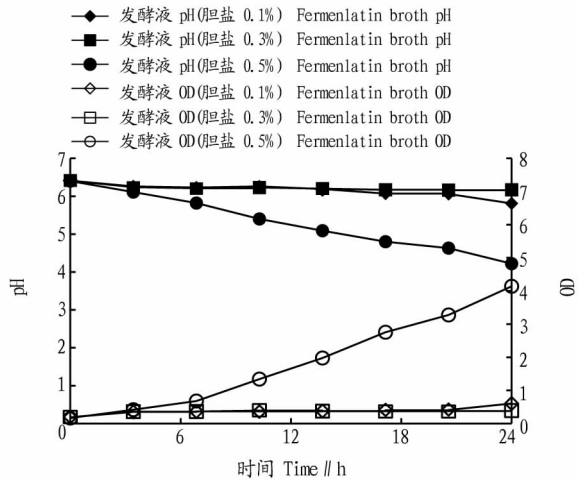


图4 植物乳杆菌 LPL10 在不同胆盐浓度下的发酵液 pH 和 OD
Fig.4 Changes of fermentatin broth pH and OD of *Lactobacillus plantarum* LPL10 under different bile salt concentrations

酸与产酸能力强弱对乳酸菌的应用具有指导作用^[9]。该试验通过高效液相色谱法对 LPL10 发酵产有机酸能力进行了测定,图 5 和 6 分别是有机酸标准品和 LPL10 发酵上清液液相图。对两者的有机酸出峰时间进行比较,结果显示 LPL10 发酵上清液中主要有机酸为乳酸及乙酸,经过计算其浓度分别为 20.33、25.26 mg/L(表 1)。

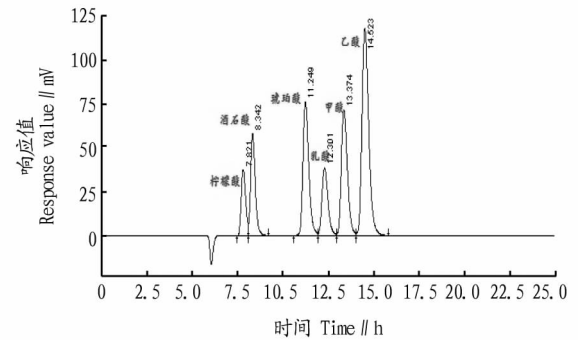


图5 标准品的有机酸组成液相图
Fig.5 Liquid chromatogram of the organic acid compositions of standard

3 结论与讨论

植物乳杆菌是一种被广泛应用于食品、发酵、青贮等方面的益生菌。随着研究的深入,近年来植物乳杆菌也逐渐被用作肠道微生态改善制剂用于改善肠道微生态环境,因此对其各种益生能力的要求也逐渐提高。该研究中菌株 LPL10 为筛选于食品源的野生菌株,已经过生理生化、16S rDNA 鉴定确定为植物乳杆菌,并通过体外耐酸耐胆盐、抑菌、产酸能力试验,对该株菌的益生特性进行了初步研究。耐酸试验中

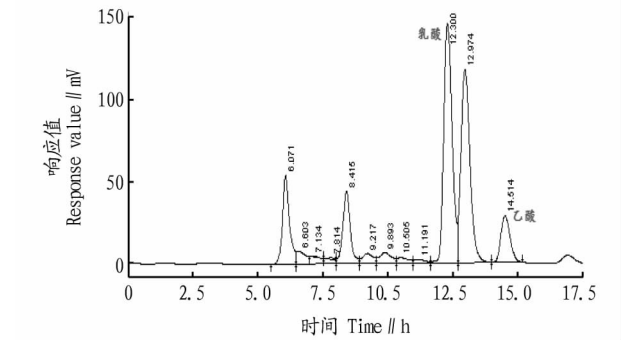


图6 LPL10 发酵上清液的有机酸组成液相图
Fig.6 Liquid chromatogram of the organic acid compositions of fermentatin broth of LPL10

表1 LPL10 发酵上清液的主要有机酸组成
Table 1 The main organic acid compositions of fermentatin broth of LPL10

有机酸 Organic acid	出峰时间 Appearance time min	浓度 Concentration mg/L
乳酸 Lactic acid	12.300	20.33
乙酸 Acetic acid	14.514	25.26

植物乳杆菌 LPL10 显示出良好的耐酸能力,能够耐受 pH 3.5 的酸性环境,但其在低酸环境中的稳定性还不够突出,后续还有较大的优化空间。在 0.1% 的胆盐浓度下,LPL10 菌落的存活率达到 100% 以上。植物乳杆菌 LPL10 对常见的致病菌均有一定的抑制作用,其中对绿脓杆菌的抑制效果最明显。液相检测结果显示,菌株具有良好的产酸能力。LPL10 在体外试验中显示出了良好的益生潜力,后续可进一步优化其相应特性。

参考文献

[1] 王水泉,包艳,董喜梅,等.植物乳杆菌的生理功能及应用[J].中国农业科技导报,2010,12(4):49-55.
[2] 靳志强,王延祥.植物乳杆菌在人体肠道的益生特性[J].中国乳品工业,2007,35(9):30-34.
[3] 黄秀敏,张宜靖,李学优,等.植物乳杆菌发酵培养基的优化[J].安徽农业科学,2016,44(24):6-7,22.
[4] LIU Y W, LIONG M T, CHIEH T Y. New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis[J]. J Microbiol, 2018, 56(9):601-613.
[5] 王春光,张雪,李达,等.酸菜来源植物乳杆菌的分离鉴定与耐受性研究[J].食品科技,2010,35(10):35-38.
[6] 唐雅茹,于上富,国立东,等.一株降胆固醇乳杆菌的筛选及其益生作用的研究[J].食品工业科技,2016,37(1):142-144,152.
[7] 侯颖,王维宇,牛明福,等.自然发酵泡菜汁中植物乳杆菌的分离鉴定与体外益生特性研究[J].动物营养学报,2017,29(10):3611-3619.
[8] 甘祥武,黄魁英,曹丁,等.3株植物乳杆菌 LPL04、LPL05、LPL14 的益生特性[J].食品科技,2017,42(12):2-5.
[9] 林龙镇,邹卫玲,李安章,等.产酸、耐酸乳酸菌的分离鉴定及益生特性[J].华南农业大学学报,2018,39(2):95-102.