

# 不同气体环境对益生菌 *Bifidobacterium lactis* V9 生长的影响

其木格苏都<sup>1</sup> 白梅<sup>2</sup> 孔亚楠<sup>2</sup> 魏爱彬<sup>2</sup> 王记成<sup>2</sup> 张和平<sup>2\*</sup>

(1. 青岛君益食品有限公司 山东 青岛 266107)

(2. 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘 要:** *Bifidobacterium lactis* V9 (*B. lactis* V9) 是一株具有良好益生特性且遗传稳定的益生菌, 工业化生产环境中气体组成关系着益生菌活菌数量, 进而影响其益生功效。【目的】研究不同气体环境对 *B. lactis* V9 生长及代谢的影响。【方法】在固体 MRS 培养基、液体 MRS 培养基及巴氏杀菌脱脂乳接种 *B. lactis* V9, 于不同的气体环境中培养。【结果】在固体 MRS 培养基上, *B. lactis* V9 在混合气体( $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$ )环境中菌落形成较氮气环境( $N_2:99.99\%$ )多, 在空气环境( $N_2:O_2\approx 79:21$ )中菌落形成极少。*B. lactis* V9 在 MRS 液体中培养 24 h, 混合气体环境下其活菌数( $9.11\pm 0.11 \log CFU/mL$ )显著高于空气环境下的活菌数( $8.04\pm 0.10 \log CFU/mL$ ) ( $P<0.01$ ), 在混合气体环境下 *B. lactis* V9 代谢生成的乙酸和乳酸量分别为  $12.79\pm 0.86 \text{ mmol/L}$  和  $11.99\pm 0.73 \text{ mmol/L}$ , 显著高于在空气环境中生成量  $0.65\pm 0.07 \text{ mmol/L}$  和  $2.75\pm 0.57 \text{ mmol/L}$  ( $P<0.01$ ), 乙酸/乳酸比值分别为 1.06:1 和 0.24:1。*B. lactis* V9 在巴氏杀菌脱脂乳中发酵 18 h, 混合气体环境下 pH 值( $4.48\pm 0.07$ )显著低于空气环境下的 pH 值( $5.03\pm 0.12$ ) ( $P<0.01$ ), 混合气体环境下其活菌数( $9.02\pm 0.15 \log CFU/mL$ )显著高于空气环境下的活菌数( $8.53\pm 0.08 \log CFU/mL$ ) ( $P<0.01$ )。混合气体和空气环境下发酵脱脂乳产生的乙酸和乳酸量分别为  $60.52\pm 2.30 \text{ mmol/L}$ 、 $5.17\pm 1.02 \text{ mmol/L}$  和  $16.86\pm 0.34 \text{ mmol/L}$ 、 $5.92\pm 0.81 \text{ mmol/L}$ , 乙酸/乳酸的值分别为 11.71:1 和 2.85:1。【结论】在  $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$  混合气体环境下有利于 *B. lactis* V9 在液体 MRS 和脱脂乳中生长, 其活菌数可以增加 0.5–1 个数量级。这一研究结果也可为 *B. lactis* V9 益生菌发酵乳的生产 and 产品中 *B. lactis* V9 活菌培养计数提供指导。

**关键词:** 益生菌, *Bifidobacterium lactis* V9, 气体组成, 生长

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100901, 2011AA100902)

\*通讯作者: 86-471-4319940; Fax: 86-471-4307205; 信箱: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2011-11-04; 接受日期: 2012-03-01

# Effects of air condition on the viability of probiotic bacteria: *Bifidobacterium lactis* V9

QIMUGESUDU<sup>1</sup> BAI Mei<sup>2</sup> KONG Ya-Nan<sup>2</sup> WEI Ai-Bin<sup>2</sup>  
WANG Ji-Cheng<sup>2</sup> ZHANG He-Ping<sup>2\*</sup>

(1. Qingdao Junyi Food Co., Qingdao, Shandong 266107, China)

(2. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineer of Education Ministry of China,  
Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** *Bifidobacterium lactis* V9 (*B. lactis* V9) has been demonstrated as a probiotic with well properties and stable genetics. The gas composition in environment of industrial manufacture is positively associated with viable numbers of probiotic and nextly have influence on probiotic properties. **[Objective]** The influence of different gas environment on the growing of *B. lactis* V9. **[Methods]** By MRS agar plate, liquid MRS medium and pasteurized skim milk inoculated with *B. lactis* V9. **[Results]** On the MRS agar plate, the numbers of *B. lactis* V9 forming colonies under mixed gas environment ( $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$ ) was more than nitrogen gas environment ( $N_2: 99.99\%$ ) and few colonies formed under normal air environment ( $N_2:O_2\approx 79:21$ ). In the MRS liquid medium for 24 h, the viable counts under mixed gas were  $9.11\pm 0.11$  log CFU/mL which was significantly higher than growing in normal air condition with  $8.04\pm 0.10$  log CFU/mL ( $P<0.01$ ). Moreover, the acetate and lactate production under mixed gas condition were respectively significantly higher than normal air condition ( $12.79\pm 0.86$  mmol/L VS  $11.99\pm 0.73$  mmol/L,  $0.65\pm 0.07$  mmol/L VS  $2.75\pm 0.57$  mmol/L,  $P<0.01$ ). In addition, the acetate/lactate molar ratio was 1.06:1 and 0.24:1, respectively. After 18 h of pasteurized skim milk fermentation, the reduced pH of fermented milk under mixed gas condition was significantly lower than normal air condition ( $4.48\pm 0.07$  VS  $5.03\pm 0.12$ ,  $P<0.01$ ). The viable counts under mixed gas were  $9.02\pm 0.15$  log CFU/mL which was significantly higher than growing in normal air condition with  $8.53\pm 0.08$  log CFU/mL ( $P<0.01$ ). The acetate and lactate production under mixed gas condition vs. normal air condition in fermented milk were  $60.52\pm 2.30$  mmol/L and  $5.17\pm 1.02$  mmol/L VS  $16.86\pm 0.34$  mmol/L and  $5.92\pm 0.81$  mmol/L, respectively. The acetate/lactate molar ratio was 11.71:1 and 2.85:1, respectively. **[Conclusion]** These study suggested that mixed gas condition with  $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$  was beneficial for *B. lactis* V9 growing in liquid medium and pasteurized skim milk fermentation increased by 0.5–1 grade of viable counts during the same time. It can provide instruction for preparation of probiotic fermented milk and viable bacterial counting of *B. lactis* V9.

**Keywords:** Probiotic Bacteria, *Bifidobacterium lactis* V9, Air condition, Viability

乳酸菌是发酵食品中的自然生物防腐剂, 而其中的一些菌株对宿主健康有益, 被称为益生菌。发展到现在, 由 2001 年 FAO 和 WHO 提出

的益生菌定义为大多数学者所认可, 即“当给予宿主足够的量时, 可以对宿主起到有益作用的微生物活体”。益生菌制品从最初的亚洲小作坊加工

逐渐传播到欧洲和美国市场,由此而生的功能性食品更是目前增长最快的食品之一<sup>[1]</sup>。全球工业分析家预测预计到 2015 年全球益生菌市场将达到 288 亿,即使这样依然认为该市场还处于起步阶段,有着巨大的发展空间。因此,需要更有效、稳定的益生菌及益生菌产品来迎接应对这一挑战。饮食是摄入益生菌最方便的方式,特别是便于储存、装卸、运输,而且是在保质期内稳定的功能性益生菌食品。乳及其制品是大多数益生菌良好的载体,其中发酵乳是公认最好的载体之一。

肠道中足够的益生菌活菌数是对宿主达到良好益生功效的保证<sup>[2]</sup>,因此各个国家对产品中益生菌的活菌数都有明确规定,其含量不得低于  $10^6$  CFU/mL<sup>[3]</sup>。双歧杆菌(*Bifidobacterium*)的益生特性已被人们普遍接受,但 *Bifidobacterium* 属于专性厌氧菌,在工业化生产时需要解决由于氧中毒而导致其活菌数较低的问题。Miller、Craig William 等<sup>[4-5]</sup>将高氧气消耗菌种与双歧杆菌进行复配,兼性厌氧菌嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)在生长时能利用溶解氧,可有效保护双歧杆菌生长,但到发酵后期, *S. thermophilus* 代谢产生的酸会抑制 *Bifidobacterium* 生长,所以这种保护只在发酵初期有效,对随后的加工及贮存期间溶氧起不到作用(酸奶一般用聚乙烯和高聚苯乙烯来包装,厚度在 300  $\mu\text{m}$ –350  $\mu\text{m}$  之间,对酸奶的溶氧率为 1.0–5.0  $\text{cm}^2/(\text{kg}\cdot\text{d})$ <sup>[6]</sup>)。Dave 和 Shah 报道将 L-半胱氨酸<sup>[7]</sup>和抗坏血酸<sup>[8]</sup>作为除氧剂添加到酸奶生产中, L-半胱氨酸是一种含硫氨基酸,既可以降低氧化还原电位,又可以作为一种氨基酸氮源;抗坏血酸是一种常见的食品添加剂,二者都可以减少溶氧维持低的氧化还原电位,有利于 *Bifidobacterium* 生长,但会影响到一般酸奶发酵剂中 *S. thermophilus* 的生长,进而影响到酸奶的质构和风味,因此对于一般酸奶可能不太适合。微胶囊包埋技术也被用来提高

*Bifidobacterium* 活菌数,但多项研究表明微胶囊包埋只对一部分菌有作用,应用受限<sup>[9]</sup>。Mills 等研究发现,直接降低溶氧、氧化还原电位可保护非发酵巴氏杀菌乳在储存期间的 *Bifidobacterium* 活菌数<sup>[10]</sup>,但只能维持原来的接菌量,活菌数不会增加。

乳双歧杆菌 V9 (*B. lactis* V9)分离自健康蒙古族儿童粪便,其具有较强的耐酸性,在人工胃肠液中具有有良好的耐受性<sup>[11]</sup>。对致病菌株(志贺氏痢疾杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、埃希氏大肠杆菌)具有一定程度的拮抗作用,可以有效治疗小鼠的腹泻<sup>[12]</sup>。临床研究表明, *B. lactis* V9 具有调节肠道菌群的作用,对便秘和急慢性腹泻患者治疗效果显著,服用 *B. lactis* V9 3 周,对便秘、急性腹泻和慢性腹泻患者的治疗有效率分别为 95.3%、95.4% 和 89.9%<sup>[13]</sup>。对其基因组学研究显示,其菌株遗传极为稳定,在传代保藏过程中发生重组、突变几率极小,可保障其安全生产<sup>[14]</sup>。

本文以上述综述为出发点,通过改变培养基中气体组成,研究 *B. lactis* V9 在固体 MRS 培养基表面和液体 MRS 及脱脂乳中的生长情况,为其在益生菌制品生产应用开阔思路,并提供理论依据和数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源:** *B. lactis* V9 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室乳酸菌菌种保藏中心(LABCC)提供。

**1.1.2 试剂和仪器:** 纽西兰超特级脱脂乳粉;合成 MRS 培养基(Oxoid);高纯气体(北京华通精科气体化工有限公司);REX-C700 厌氧培养箱;厌氧指示条(Oxoid, Anaerobic Indicator BR0055);除氧剂(Oxiod, AnaeroGen AN35);MINIVAC PD-52 真空泵(Yamato-ULVAC, 日本);U-2000 型

紫外可见分光光度计(HITACHI, 日本); 1100 液相色谱系统(Agilent, 美国); NSC-II A-1200 无菌工作台; HA-300M 全自动高压灭菌器(HIRAYAMA, 日本)。稀释液 PBS 和双歧杆菌选择性培养基 TPY 的配制参照文献[11]。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌落形成:** 将真空冷冻保存的 *B. lactis* V9 菌粉接种于液体 MRS 培养基中, 37 °C 厌氧培养活化 2 代后, 划线于固体 MRS 培养基上, 并将划线平板分别置于普通培养箱(空气环境,  $N_2:O_2 \approx 79:21$ )、充氮气培养箱( $N_2: 99.99\%$ )和混合气体培养箱( $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$ )中, 37 °C 恒温培养 72 h, 观察菌落形成状况。在厌氧培养箱中预置厌氧指示条以检验无氧环境。用于划线的固体 MRS 培养基预先置于厌氧培养箱 24 h 进行脱氧处理。在厌氧培养时, 培养箱中空气要先充高纯氮气置换 2 次, 然后再充混合气体或氮气。保证每次充气后培养箱为正压, 防止空气吸入, 同时可以在培养期间随时观测培养箱的密封情况。另外, 培养箱中预先放置除氧剂和厌氧指示条, 充气后指示条的颜色由浅红色转变为白色, 说明培养箱中为无氧环境。

**1.2.2 *B. lactis* V9 在 MRS 液体中生长:** *B. lactis* V9 活化方法同 1.2.1, 跟踪测定第 3 代  $OD_{600}$  值, 取  $OD_{600}=1.0$  (Mid-log phase) 时培养液以 2% (V/V) 接种于 MRS 液体中, 分别置于普通培养箱和混合气体培养箱中, 37 °C 恒温培养。具体操作方法同 1.2.1。每 3 h 测定 pH 值、 $OD_{600}$  值和活菌数, 同时留样测定乳酸和乙酸含量。

**1.2.3 *B. lactis* V9 在脱脂乳中生长:** *B. lactis* V9 活化方法同 1.2.1, 取第 3 代  $OD_{600}=1.0$  时菌液离心所得菌体, 加同体积 11% 灭菌脱脂乳, 以 2% 接种于巴氏杀菌(95 °C, 5 min)脱脂乳中, 分别置于普通培养箱和混合气体培养箱, 37 °C 恒温箱中培养。具体操作方法同 1.2.1。每 6 h 测定 pH 值、

$OD_{600}$  值和活菌数, 同时留样测定乳酸和乙酸含量。

**1.2.4 pH 值测定:** 试验样品调整温度至 20 °C, 采用精密 pH 计(雷磁 PHS-3C, 海精密科学仪器有限公司)测量。

**1.2.5 浊度测定:** MRS 培养基样品适当稀释后测定, 以未加菌的空白样为参比, 采用比浊法于 600 nm 处测定其浊度。

**1.2.6 活菌数测定:** 10.0 g 样品于 90.0 g PBS 稀释液中, 于水平摇床(200 r/min)振摇 15 min, 然后梯度稀释, 采用双歧杆菌选择性培养基 TPY 固体培养基平板倾注法, 37 °C 厌氧( $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$ )培养 72 h。

**1.2.7 液相色谱法测定乳酸、乙酸含量:** 准确称取样品 1 g 于 10 mL 离心管中, 加入 3 mL 1 mol/L HCl 振荡混匀, 3 500×g, 离心 10 min, 95 °C 水浴 15 min。取上清液经 0.45 μm 膜过滤待进样分析。色谱条件: 流动相: 甲醇缓冲溶液(浓度为 10 mmol/L 的 PBS, pH 2.0)=3:97 (V/V), 流速为 0.5 mL/min, 紫外检测波长为 210 nm, 柱温为 35 °C, 进样量 10 μL。

**1.2.8 数据统计分析:** 试验数据采用 SAS ANOVA 程序处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 气体环境对 *B. lactis* V9 菌落形成的影响

双歧杆菌是一类专性厌氧乳酸菌, 既没有呼吸链也不含有过氧化氢酶, 一般认为是严格厌氧的, 因此在工业化生产中会出现氧中毒。然而在具体的培养中发现, 部分菌株具有氧代谢酶, 可以在 0.1%–21.0% 氧气环境中存活<sup>[15–19]</sup>, 表明不同的双歧杆菌菌株对氧气的耐受能力不同。目前, 国内在双歧杆菌菌种的分离鉴定中较常使用的厌氧气体组成为  $N_2:H_2:CO_2=80:10:10$ <sup>[11]</sup>, 同时, 越来越多的研究发现, 一些双歧杆菌的氧气耐受

能力与二氧化碳有关, 即这些菌只在二氧化碳存在时才表现出一定的氧耐受力。对于 *B. lactis* V9, 在空气、氮气和混合气体环境中, 其菌落形成情况完全不同, 见图 1。在混合气体和氮气环境中菌落形成明显多于空气环境, 说明 *B. lactis* V9 在很大程度上受到了空气中氧气的抑制。*B. lactis* V9 在混合气体中菌落生长状况优于氮气中的, 说明单纯的无氧环境不一定能保证 *B. lactis* V9 的生长处于最佳状态, 还需要考虑无氧气体环境的组成成分。此结果与 Shinji Kawasaki 等<sup>[20]</sup>的报道一致, 在无氧条件下, CO<sub>2</sub> 可以促进双歧杆菌菌落生长, 但不会改变菌株的氧气耐受能力。部分双歧杆菌菌种在 CO<sub>2</sub> 存在时具有一定的氧耐受性, 而且可在一定浓度的 CO<sub>2</sub> 条件下生长, 也是部分双歧杆菌的分离鉴定依据。CO<sub>2</sub> 刺激菌落形成与一些参与 CO<sub>2</sub> 固定、水解和羧基化反应的酶有关。另外, 推测可能因为 CO<sub>2</sub> 是氧化形式的“C”, 可以像氧气一样作为电子受体, 来维持细胞内氧化还原电位平衡。但 CO<sub>2</sub> 促进作用的具体机理还有待研究。本实验结果表明, *B. lactis* V9 不是严格厌氧菌, 在空气环境中有菌落形成, 但在混合气体环境中生长更加良好。

## 2.2 气体环境对 *B. lactis* V9 在液体 MRS 培养基中生长的影响

鉴于 2.1 的研究结果, 采用混合气体和空气

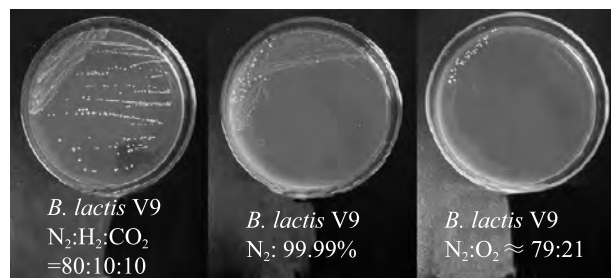


图 1 不同气体环境下 *B. lactis* V9 在固体 MRS 培养基上菌落生长情况

Fig. 1 Effects of gas condition on colony formation by *B. lactis* V9

条件对 *B. lactis* V9 的生长进行进一步研究。混合气体和空气环境下, *B. lactis* V9 在液体 MRS 培养基中的生长曲线见图 2。可以看出, 在混合气体环境中, *B. lactis* V9 生长曲线呈“S”型, 18 h 左右是对数生长中期(Mid-log Phase), 24 h 开始进入稳定期; 而在空气环境中, OD<sub>600</sub> 值一直持续缓慢增长, 表示 *B. lactis* V9 生长明显受到限制。另外, 在混合气体环境下, 由于 CO<sub>2</sub> 在液体 MRS 中的溶解, 不接种 *B. lactis* V9 的液体 MRS 作为对照样培养 30 h 后的 pH 值从初始 6.43 降到了 6.29。从表 1 可以看出, 接种 *B. lactis* V9 培养 30 h 后, 混合气体环境 pH 值(4.42±0.24)显著低于空气环境 pH 值(5.55±0.24)( $P<0.01$ )。从 *B. lactis* V9 的生长趋势和培养基的 pH 值变化上可以看出, 液体 MRS 培养基在混合气体环境下可有效促进 *B. lactis* V9 生长。这一点也可以从活菌数变化上得到证实, 培养 24 h 后, 混合气体环境中 *B. lactis* V9 活菌数(9.11±0.11 log CFU/ mL)显著高于空气环境(8.04±0.10 log CFU/mL)( $P<0.01$ )。

现有的研究表明, 对氧气敏感的双歧杆菌在有氧时会积累 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 会抑制其糖代谢的

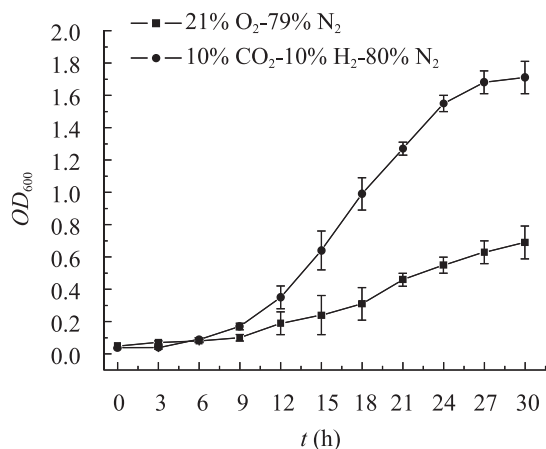


图 2 *B. lactis* V9 在不同气体环境下液体 MRS 培养时 OD<sub>600</sub> 值变化

Fig. 2 The changes of OD<sub>600</sub> with *B. lactis* V9 cultured in liquid MRS medium under different gas environments

关键酶——果糖-6-磷酸-磷酸酮酶(F6ppk),从而引起氧中毒<sup>[17]</sup>。在这些反应中, NADH 氧化酶、NADH 过氧化酶和超氧化物歧化酶(SOD)的作用最关键。在一定范围内增加氧气的浓度, 双歧杆菌分解  $H_2O_2$  的 NADH 氧化酶和 NADH 过氧化酶活力都明显高于无氧环境<sup>[21]</sup>。这些酶在兼性厌氧乳酸菌中也存在, 并且某些菌株在有氧环境下生长良好, 这种对氧气的耐受能力与菌体内碳水化合物代谢转变联系在一起。本研究对培养基中主要的碳水化合物——葡萄糖的代谢产物乳酸、乙酸的含量进行了跟踪检测。

本实验所用液体 MRS 培养基中含有  $16.70 \pm 0.35$  mmol/L 的乙酸(源于添加的无水乙酸钠), 不含有乳酸。培养 24 h 时, 去除原来培养基中含有的乙酸, 在混合气体环境下 *B. lactis* V9 代谢生成的乙酸和乳酸量分别为  $12.79 \pm 0.86$  mmol/L 和  $11.99 \pm 0.73$  mmol/L, 显著高于在空气环境中生成量为  $0.65 \pm 0.07$  mmol/L 和  $2.75 \pm 0.57$  mmol/L ( $P < 0.01$ ), 混合气体和空气环境中乙酸/乳酸比值分别为 1.06:1 和 0.24:1。Talwalkar 和 Kailasapathy 研究了 4 株双歧杆菌在不同氧环境中的代谢变化, 发现每个双歧杆菌菌株的氧耐受能力不同,

如代谢物中乙酸与乳酸的比例随着环境中氧气浓度的增加而减少<sup>[21]</sup>。

R. González 报道<sup>[22]</sup>, 在缺氧条件下, 代谢 TPYG 培养基产乳酸的最大浓度为 8.1 mmol/L, 乙酸/乳酸的摩尔比为 3.5:1; 而在有氧条件下, 乳酸浓度增加超过 2 倍, 乙酸/乳酸下降到 1.5:1。本研究发现, 液体 MRS 培养基中乙酸、乳酸产量受气体组分条件影响, 在混合气体环境下产生的乳酸浓度是空气环境的 4 倍左右, 而乙酸却多出约 20 倍。当有氧培养转向无氧培养时糖代谢产物会发生变化, 主要是乳酸转化成乙酸, 同时伴随产生 2 倍的 ATP<sup>[23]</sup>。以上结果可以说明混合气体环境有利于 *B. lactis* V9 在液体 MRS 培养基中生长, 可以有效增加活菌数, 代谢产生乙酸、乳酸量增加, 且改变了乙酸与乳酸比例。

### 2.3 气体环境对 *B. lactis* V9 在脱脂乳中生长的影响

在巴氏杀菌脱脂乳中, *B. lactis* V9 的生长情况与液体 MRS 培养基中类似, pH 值和活菌数变化结果见表 2。发酵 18 h, 混合气体环境 pH 值 ( $4.48 \pm 0.07$ ) 显著低于空气环境 pH 值 ( $5.03 \pm 0.12$ ) ( $P < 0.01$ ), 混合气体环境的活菌数

表 1 *B. lactis* V9 在液体 MRS 培养基中培养时 pH 值和活菌数变化( $n=3, x \pm s$ )  
Table 1 The changes of pH and viable counts of *B. lactis* V9 cultured in liquid MRS medium under different gas environments ( $n=3, x \pm s$ )

时间 Time (h)	pH 值 pH value		活菌数 Viable counts (logCFU/mL)	
	空气 Air condition	混合气体 Mixed gas environment	空气 Air condition	混合气体 Mixed gas environment
0	$6.43 \pm 0.02^a$	$6.43 \pm 0.02^a$	$7.01 \pm 0.04^a$	$7.01 \pm 0.04^a$
6	$6.42 \pm 0.10^a$	$6.31 \pm 0.10^a$	$7.09 \pm 0.08^a$	$7.24 \pm 0.03^a$
12	$6.24 \pm 0.13^b$	$5.76 \pm 0.16^a$	$7.34 \pm 0.06^b$	$7.94 \pm 0.02^a$
18	$5.96 \pm 0.15^b$	$5.28 \pm 0.10^a$	$7.63 \pm 0.04^b$	$8.63 \pm 0.08^a$
24	$5.77 \pm 0.23^b$	$4.81 \pm 0.17^a$	$8.04 \pm 0.10^b$	$9.11 \pm 0.11^a$
27	$5.64 \pm 0.14^b$	$4.54 \pm 0.17^a$	$8.17 \pm 0.09^b$	$9.13 \pm 0.06^a$
30	$5.55 \pm 0.24^b$	$4.42 \pm 0.24^a$	$8.35 \pm 0.06^b$	$9.02 \pm 0.11^a$

注: 角标中含有不同字母的数据之间差异显著( $P < 0.01, n=3$ ).

Note: The superscripts "a, b" mean values within a row with different letters differ significantly ( $P < 0.01, n=3$ ).

表 2 *B. lactis* V9 在脱脂乳中培养时 pH 值和活菌数变化( $n=3, x \pm s$ )  
Table 2 The changes of pH and viable counts in skim milk fermented by *B. lactis* V9 under different gas environments ( $n=3, x \pm s$ )

时间 Time (h)	pH 值 pH value		活菌数 Viable counts (logCFU/mL)	
	空气 Air condition	混合气体 Mixed gas environment	空气 Air condition	混合气体 Mixed gas environment
0	6.50±0.04 <sup>a</sup>	6.50±0.04 <sup>a</sup>	7.23±0.06 <sup>a</sup>	7.23±0.06 <sup>a</sup>
6	6.06±0.11 <sup>b</sup>	5.76±0.18 <sup>a</sup>	7.78±0.05 <sup>a</sup>	7.84±0.12 <sup>a</sup>
12	5.48±0.06 <sup>b</sup>	4.84±0.09 <sup>a</sup>	8.11±0.11 <sup>a</sup>	8.62±0.03 <sup>a</sup>
18	5.03±0.12 <sup>b</sup>	4.48±0.07 <sup>a</sup>	8.53±0.08 <sup>b</sup>	9.02±0.15 <sup>a</sup>

注: 角标中含有不同字母的数据之间差异显著( $P<0.01, n=3$ ).

Note: The superscripts “a, b” mean values within a row with different letters differ significantly ( $P<0.01, n=3$ ).

( $9.02 \pm 0.15 \log \text{ CFU/mL}$ )显著高于空气环境的活菌数( $8.53 \pm 0.08 \log \text{ CFU/mL}$ )( $P<0.01$ )。混合气体和空气环境下发酵脱脂乳产生的乙酸、乳酸量分别为  $60.52 \pm 2.30 \text{ mmol/L}$ 、 $5.17 \pm 1.02 \text{ mmol/L}$  和  $16.86 \pm 0.34 \text{ mmol/L}$ 、 $5.92 \pm 0.81 \text{ mmol/L}$ , 乙酸/乳酸比值分别为 11.71:1 和 2.85:1。在混合气体环境下, *B. lactis* V9 发酵脱脂乳(主要是乳糖)生成的乙酸量远远多于乳酸。此结果与 *B. lactis* V9 在 MRS 中生长类似, *B. lactis* V9 发酵脱脂乳生成的酸以乙酸为主。Meile 等<sup>[24]</sup>发现乳双歧杆菌可以耐受反应器顶空 10% 氧气, 在氧气环境中乳酸浓度为  $9.9 \text{ mmol/L}$ , 明显高于厌氧条件下的  $5.6 \text{ mmol/L}$ , 乳酸的增量引起了代谢产物中乙酸/乳酸摩尔比的变化, 从 10.1:1 降到 4.7:1。这样的变化趋势与本实验结果类似。但是乙酸/乳酸摩尔比的变化范围相差较大, 这可能是由于菌株自身特性、介质中糖浓度不同以及气体条件不同等因素造成的。

从本研究对益生菌 *B. lactis* V9 的研究可以看出, 无氧环境的气体组成会影响到 *B. lactis* V9 的生长及代谢。目前, 我国国标《GB 4789.35-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》<sup>[25]</sup>和《GB/T 4789.34-2008 食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验》<sup>[26]</sup>中在对双歧杆菌计数方法中只提到“厌氧培养  $48 \pm 2 \text{ h}$  后计数平板上的所有菌落数”, 未对具体的气体环境做出规定。所以对于 *B. lactis* V9 而言, 同为厌氧条件的纯氮气环境和混合气体环境, *B. lactis* V9 的菌落形成明显有差异, 这样就有可能在执行标准时因为厌氧气体组成的不同造成 *B. lactis* V9 活菌计数结果的不同。诚然, 双歧杆菌活菌计数结果还受其他诸多条件影响, 正如刘伟等所报道的“双歧杆菌目前还没有一套准确和严格的计数方法”<sup>[27]</sup>, 这就需要人们进一步全面地探索研究。

物学检验 双歧杆菌检验》<sup>[26]</sup>中在对双歧杆菌计数方法中只提到“厌氧培养  $48 \pm 2 \text{ h}$  后计数平板上的所有菌落数”, 未对具体的气体环境做出规定。所以对于 *B. lactis* V9 而言, 同为厌氧条件的纯氮气环境和混合气体环境, *B. lactis* V9 的菌落形成明显有差异, 这样就有可能在执行标准时因为厌氧气体组成的不同造成 *B. lactis* V9 活菌计数结果的不同。诚然, 双歧杆菌活菌计数结果还受其他诸多条件影响, 正如刘伟等所报道的“双歧杆菌目前还没有一套准确和严格的计数方法”<sup>[27]</sup>, 这就需要人们进一步全面地探索研究。

### 3 结论

本研究通过在固体 MRS 培养基、液体 MRS 培养基及巴氏杀菌脱脂乳接种乳双歧杆菌 *Bifidobacterium lactis* V9 (*B. lactis* V9), 研究不同气体环境对 *B. lactis* V9 生长及代谢的影响。研究显示, *B. lactis* V9 不是绝对厌氧菌, 混合气体 ( $\text{N}_2:\text{H}_2:\text{CO}_2=80:10:10$ ) 环境可有效促进其菌落形成, 更有利于其在 MRS 液体和巴氏杀菌脱脂乳中生长。此混合气体环境, 可应用于益生菌制剂及制品的生产。这一研究结果可为 *B. lactis* V9 益生菌发酵乳的生产和产品中 *B. lactis* V9 活菌培

养计数提供指导。此外,气体组成条件对代谢产物中乙酸/乳酸摩尔浓度比变化的影响,为改善益生菌产品口感提供新思路 and 可行性证据。综上所述可见,环境中气体组成影响着 *B. lactis* V9 的生长速度及代谢组成,但具体的相关关系和作用机理尚不明确,仍需深入研究。

## 参考文献

- [1] Charalampopoulos D, Rastall RA. Prebiotics and Probiotics Science and Technology[M]. Springer: Springer Science + Business Media, 2009: 725-762.
- [2] Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, et al. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(Suppl 1): S19.
- [3] Talwalkar A, Kailasapathy K. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2004, 3(3): 117-124.
- [4] Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(1/2): 1-17.
- [5] Miller CW, Nguyen MH, Rooney M, et al. The control of dissolved oxygen content in probiotic yoghurts by alternative packaging materials[J]. Packaging Technology and Science, 2003, 16(2): 61-67.
- [6] Miller CW, Nguyen MH, Rooney M, et al. The influence of packaging materials on the dissolved oxygen content of probiotic yoghurt[J]. Packaging Technology and Science, 2002, 15(3): 133-138.
- [7] Dave RI, Shah NP. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures[J]. International Dairy Journal, 1997, 7(8/9): 537-545.
- [8] Dave RI, Shah NP. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures[J]. International Dairy Journal, 1997, 7(6/7): 435-443.
- [9] Talwalkar A, Kailasapathy K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.[J]. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2004, 5(1): 1-8.
- [10] Bolduc MP, Raymond Y, Fustier P, et al. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1038-1048.
- [11] 高鹏飞, 孙志宏, 张和平等. 蒙古族儿童源益生菌特性双歧杆菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 210-216.
- [12] 高鹏飞, 孙志宏, 张和平等. *B. animalis* V9对腹泻动物的保护性作用及其机制研究[J]. 中国微生物生态杂志, 2009, 21(5): 385-387.
- [13] 王记成, 高鹏飞, 周琦, 等. 双歧杆菌 V9对便秘和腹泻患者的临床研究[J]. 营养学报, 2011, 33(1): 70-74.
- [14] 陈霞. 具有益生功能的 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9的安全性评估、生理功效及其全基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2010.
- [15] Cox RP, Marling N. High-affinity oxygen uptake by *Bifidobacterium bifidum*[J]. Antonie Von Leeuwenhoek, 1992, 62(4): 291-297.
- [16] Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, et al. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species[J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75(12): 3296-3306.
- [17] Shin SY, Park JH. Activities of oxidative enzymes related with oxygen tolerance in *Bifidobacterium* sp.[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 7(5): 356-359.
- [18] Ahn JB, Hwang HJ, Park JH. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 11(3): 443-451.
- [19] Kawasaki S, Mimura T, Satoh T, et al. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B.*

*boum* and *B. thermophilum*, to oxygen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10): 6854–6858.

[20] Kawasaki S, Nagasaku M, Mimura T, et al. Effect of CO<sub>2</sub> on colony development by *Bifidobacterium* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7796–7798.

[21] Talwalkar A, Kailasapathy K. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(8): 2537–2546.

[22] González R, Blancas A, Santillana R, et al. Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(5): 606–610.

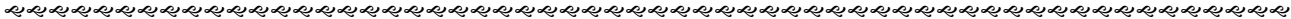
[23] Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1987, 46(3): 269–280.

[24] Meile L, Ludwig W, Rueger U, et al. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1997, 20(1): 57–64.

[25] GB 4789.35-2010. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].

[26] GB/T 4789.34-2008. 食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验[S].

[27] 刘伟, 李德斌, 高利. 双歧杆菌计数方法的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(9): 34–36.



2012 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表 (2-2)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
13	“生化工程模型与控制专业委员会”庆祝中国微生物学会成立 60 周年年会	中国微生物学会生化工程模型与控制专业委员会	8 月	100	上海	夏建业 庄英萍 021-64251946
14	第 9 届海洋生物技术与创新药物论坛	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	200	内蒙古	焦炳华 缪辉南 王梁华 021-81870975
15	第十五次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	9 月	500	辽宁 大连	蒋建东 025-84395326
16	第二届全国芽胞杆菌研究与应用学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	福建 福州	刘波 laeptb@163.com
17	第三届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	10 月 10-15 日	400	浙江 杭州	张丹 13777216902
18	2012 年全国微生物毒素与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	10 月 下旬	350	湖北 武汉	张庆红 010-66867398
19	第四届全国微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	10 月	200	四川 成都	阮志勇 13301101231
20	兽医微生物学青年学术论坛	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	10 月	150	北京	丁家波 13683505108
21	纪念中国微生物学会成立六十周年暨 2012 年学术年会	中国微生物学会	10 月 26-30 日	600	江苏 南京	王旭 010-64807200
22	首届中国放线菌生物学大会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	11 月	150	上海	覃重军 021-54924171
23	第七届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11-12 月	100	湖南 长沙	夏立秋 xialq@hunnu.edu.cn