

北疆传统发酵生奶酪中乳酸菌的耐受性及益生特性测定

麦日艳古·亚生^{1,2}, 伊力米热·热夏提¹, 努尔古丽·热合曼*¹

1 新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054

2 喀什大学生命与地理科学学院 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆 喀什 844000

麦日艳古·亚生, 伊力米热·热夏提, 努尔古丽·热合曼. 北疆传统发酵生奶酪中乳酸菌的耐受性及益生特性测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2044-2062.

Mairiyangu Yasheng, Elmira Rixat, Nurgul Rahman. Tolerance and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented raw cheese in northern Xinjiang[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2044-2062.

摘要:【背景】北疆乳制品中生奶酪作为发酵乳制品, 其中有多种微生物的参与, 是优质食品级微生物的宝贵来源, 然而其中蕴含的丰富的微生物资源也面临着流失。【目的】研究已筛选出的 41 株乳酸菌的生长曲线变化规律, 并对其在低 pH 环境的耐酸特性及益生特性进行分析。【方法】通过人工模拟胃肠液和含 0.3%、0.5%、1.0% 浓度牛胆盐溶液培养, 对从生奶酪中分离鉴定的 41 株乳酸菌菌株进行人工胃肠液、牛胆盐耐受性试验。【结果】41 株乳酸菌中有 6 株乳酸菌(编号为 QM-5、QM-27、UM-12、UM-18、NM-11 和 NM-14)均能在 pH 值分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 时生长较好, 在 pH 2.0 的环境下也保持一定程度的生长。菌株存活率大于 50%, 乳酸菌含量为 10^8 CFU/mL 以上。从生奶酪分离的乳酸菌有极强的耐酸、耐胆盐特性, 可以预测在胃肠道环境生存。41 株菌对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)均有抑制作用。【结论】通过比较耐酸性、胃肠道模拟、胆盐耐受性和抑菌特性等实验结果, 初步选出了 3 株综合耐受性良好的优势菌株。

关键词: 生奶酪; 人工胃液; 抑菌特性; 乳酸菌; 人工胃肠液耐受性

资助项目: 国家自然科学基金(32060528)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060528).

*Corresponding author. E-mail: nurgulum@163.com

Received: 2022-04-25; Accepted: 2022-11-06; Published online: 2023-01-30

Tolerance and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented raw cheese in northern Xinjiang

Mairiyangu Yasheng^{1,2}, Elmira Rixat¹, Nurgul Rahman^{*1}

1 Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

2 Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Xinjiang Pamirs, College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Kashi 844000, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Among dairy products in northern Xinjiang, raw cheese harbors a variety of microorganisms and is a valuable source of high-quality food-grade microorganisms. However, the rich microbial resources contained therein are facing the risk of being lost. [Objective] To establish the growth curves of 41 strains of lactic acid bacteria isolated from raw cheese and characterize their tolerance to low pH environment and probiotic characteristics. [Methods] Forty-one strains of lactic acid bacteria isolated from raw cheese were cultured with simulated gastric fluid and the media containing 0.3%, 0.5%, and 1.0% bovine bile salt. [Results] Among the 41 strains of lactic acid bacteria, 6 strains (QM-5, QM-27, UM-12, UM-18, NM-11, and NM-14) grew well at pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0. In the medium at pH 2.0, QM-5 strain maintained a survival rate above 50% and the viable count more than 10^8 CFU/mL. The lactic acid bacteria isolated from raw cheese has strong resistance to acid and bile salt and can survive in the gastrointestinal environment. Furthermore, the 41 strains had inhibitory effects on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*. [Conclusion] Three dominant strains with antibacterial activity and comprehensive tolerance to acid, simulated gastric fluid, and bile salt were screened out.

Keywords: raw cheese; simulated gastric fluid; antibacterial characteristic; lactic acid bacteria; tolerance to simulated gastric fluid

传统发酵乳制品是大自然中优质乳酸菌进入人体的重要有效载体,更是优良微生物的菌种资源库,同时具有人类饮食文化的精髓等自身优势。每一种传统发酵食品都具有悠久的历史,不同国家、同一国家不同地区甚至同一地区不同采样点的样品中乳酸菌种类及其益生特性均有差异,造成这些差异的原因显然是环境、气候不同或者采用的制作工艺不同而引起。

乳酸菌在发酵食品中的作用有:(1) 能提高食品的保藏性能。在食品的乳酸菌发酵过程中,乳酸菌能转化糖生成乳酸、醋酸、丙酸、丁酸、

戊酸、己酸及醇类,这些物质能抑制有害菌的繁殖;同时某些乳酸菌还能产生乳链球菌素(nisin)、过氧化氢等抗性物质。(2) 提高营养价值。鲜奶、蔬菜汁等经乳酸发酵,可增加食品中的乳酸、醋酸等有机酸及氨基酸等营养成分,大大提高其营养价值且易被人体消化吸收,更益于老人及儿童食用^[1]。

为调整和治疗因肠道等部位微生态失调而引起的疾病,有人提出采用微生态制剂或益生菌剂的措施以恢复微生态平衡的理论,微生态制剂是依据微生态学理论而制成的含有有益菌的活

菌制剂, 主要包括益生菌和益生元。益生菌 (probiotic) 是一类分离自正常菌群, 以高含量活菌为主体, 一般以口服或黏膜途径投入, 有助于改善宿主特定部位微生态平衡并兼有若干其他有益生理活性的生物制剂。乳酸菌就是其中的一个主要大类, 它们是利用糖类进行乳酸发酵, 生成以乳酸为主代谢产物的细菌总称^[2-4]。人体内胃肠道中的酸和胆盐环境能抑制微生物的生长, 潜在的益生菌应具有酸和胆汁的耐受性, 这是菌株在小肠中生存及发挥益生作用不可或缺的因素^[5]。

文献[6]报道, 许多发酵食品中分离得到的益生菌不仅具有改善发酵食品风味的功能, 而且具有抑菌作用。王则臻等^[7]从酸乳中分离鉴定得到的乳酸菌对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有较强的抑菌能力。张旭等^[8]从国内外优良发酵肉品中分离筛选产细菌素的乳酸菌同样对致病菌具有较强的抑制作用。

益生菌在宿主中的存活和定殖能力是其发挥益生作用的前提, 来源于人体胃肠道的菌更容易在人体肠道定殖。传统的天然发酵食品因长期食用而更具有安全性。基于以上原因, 本研究以来自北疆的 5 种传统发酵乳制品生奶酪中分离筛选出的 41 株乳酸菌为研究对象, 进行了耐受性和益生特性实验, 筛选耐酸、耐胆盐、耐人工肠胃液、抑菌特性较好的优质乳酸菌株。这对于开发新的益生菌产品, 促进人类健康将具有重要的现实意义和广阔的应用前景。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

硫酸镁, 天津市致远化工限司 (化学纯度 $\geq 98\%$); 其他试剂, 天津永盛精细化工有限公司 (化学纯度 $\geq 98\%$)。振荡培养箱, 上海天成实验

仪器制造有限公司; 清洁工作台, 苏景集团苏州安泰航空科技有限公司; 酶标仪, 上海易恒科技有限公司; 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司, pH 酸度计, 昆明诺金科技有限公司。

1.1.2 培养基

MRS 培养基(g/L)参考文献[9]配制。

1.2 方法

1.2.1 菌种的活化

将放置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油保藏的 41 株菌以 2% 的接种量接种到 MRS 液体培养基中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 180 r/min 培养 48 h, 同样的接种量进行第 2 次活化^[10]。

1.2.2 生长曲线的绘制

将已活化的 41 株菌接种到 MRS 液体培养基中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 180 r/min 培养 48 h, 接种量为 2%。在此期间每 4 h 取样一次, 用酶标仪测 OD_{600} 值, 每个时间点取 3 个样品作为平行样品, 以培养时间及其相应的 OD_{600} 值分别作为横坐标和纵坐标, 绘制出菌株生长曲线^[11-12]。

1.2.3 酸耐受性测定

试验菌株(30%甘油保存)用 MRS 液体培养基以 2% 的接种量进行 3 次传代培养, 然后用活化好的菌株以 2% 的接种量于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 180 r/min 进行液体培养, 在无菌条件下取 5 mL 菌液, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 保留沉淀。沉淀中加入 4 mL 已灭过菌的生理盐水洗涤后再次离心, 弃上清液。加入 4 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 冲洗、再次离心, 弃去上清液。沉淀中加入 5 mL 的 PBS 溶液, pH 值分别调整为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0, 将乳酸菌重悬于调整 pH 后的 MRS 培养基中均匀振荡后放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅; 在加入酸液后的 0 h 和恒温培养 2 h 后 2 个时间点, 分别取样品稀释涂布 MRS 固体平板, 进行活菌计数, 以测定 2 h 后菌的存活率, 做 3 个平行取平均值^[13-14]。

存活率=pH 值分别调整为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 的 MRS 培养基(CFU/mL)/普通 MRS 培养基(CFU/mL)×100%。

1.2.4 胆盐耐受性测定

先将已活化好 12–14 h 的乳酸菌待测菌液以 2%的接种量分别接种于 MRS 液体培养基和含有牛胆盐浓度(0.3%、0.5%、1.0%)的改良的 MRS 液体培养基中, 37 °C 分别静置培养 0、4、8 h, 然后取样稀释涂布于普通 MRS 固体培养基上, 计算出其活菌数, 对比两种培养基中乳酸菌的生长情况, 并计算出存活率(每个稀释度重复做 3 个平行)^[15-16]。

$$\text{存活率} = \frac{\text{含胆盐MRS培养基}}{\text{普通MRS培养基}} \times 100\%。$$

1.2.5 人工胃液模拟实验

参考文献[17-18]制备人工胃液, 以活化的菌株按 2%的接种量于 37 °C、180 r/min 进行液体培养, 无菌条件下取 5 mL 菌液离心, 保留沉淀; 沉淀中加入 4 mL 无菌生理盐水洗后, 25 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。再加入 4 mL 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 冲洗, 离心, 弃上清液。最后沉淀中加入 5 mL 人工胃液和 1.5 mL PBS 溶液, 准确调 pH 值至 1.5, 振荡均匀后放入 37 °C 恒温水浴锅; 加入人工胃液后在恒温 0 h 和恒温 2 h 后 2 个时间点, 分别取样稀释涂布 MRS 平板, 进行活菌计数, 测定 2 h 后菌株的存活率, 做 3 个平行取平均值。

存活率=含人工胃液的 MRS 培养基(CFU/mL)/普通 MRS 培养基(CFU/mL)×100%。

1.2.6 人工肠液模拟实验

参考文献[19-20]配制人工肠液, 人工肠液模拟实验同 1.2.5。

1.2.7 抑菌特性实验

通过国际通用牛津杯法测 41 株乳酸菌抑菌活性。将指示菌的菌悬液(约 10⁸ CFU/mL)以 1% 的量加入 LB 琼脂培养基中, 使充分混合, 定量

加入 15 mL/皿。待 LB 培养基冷凝后, 轻轻拔掉事先放置的无菌牛津杯[直径为(8.00±0.01) mm]。定量以 100 μL/孔加入乳酸菌带菌的培养液, 并以未接菌的 MRS 培养基(pH 7.0)作为空白对照, 乳酸链球菌素为阳性对照。已加入发酵液的平板置于 37 °C 培养恒温 24 h。培养结束后, 采用通用的游标卡尺来测量抑菌圈直径^[21]。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的测定

由图 1 可知, 菌株的生长曲线呈经典的 S 型^[22], 可以观察到明显的延滞期、对数生长期和稳定期。从图 1 中吸光度值的整体来看, 乳酸菌在 0–16 h 生长迅速, 进入稳定期; 同时, 从图 1 中可以看出各菌的生长情况有所不同, 41 株乳酸菌中除了 UM-2、QM-17、KM-12、KM-14 菌株以外的其他菌株延滞期短, 最快进入对数生长期, 16 h 以后进入稳定期, 在 24–40 h 生长最好, 40 h 以后进入衰退期。而 UM-2、QM-17、KM-12 和 KM-14 菌株延滞期最长, 24 h 时才进入对数生长期, 40 h 后进入衰退期。其他大多数菌株稳定期较长, 在 40–44 h 之间进入衰退期。

2.2 耐酸测试结果

耐酸存活率是指在乳酸菌被吸收过程中保留较高的存活率, 才能达到吸收后较好发挥保健效率的目的。通过耐酸试验可以从生奶酪样品中分离、筛选出在不同 pH 下具有较强耐受性乳酸菌。乳酸菌对酸液耐受性结果如图 2 所示。

从图 2 中可以看到, 在 pH 2.0 时, 41 株乳酸菌处理 0 h 时的平均存活率 75.61%, 处理 2 h 后平均存活率为 68.41%。其中 QM-5 菌株存活率超过了 100%, QM-27、UM-12、UM-18、NM-11、NM-14 乳酸菌存活率在 98%–100% 之间, 试验结果显示在 pH 2.0 时, 这 6 个菌株的存活率最高。

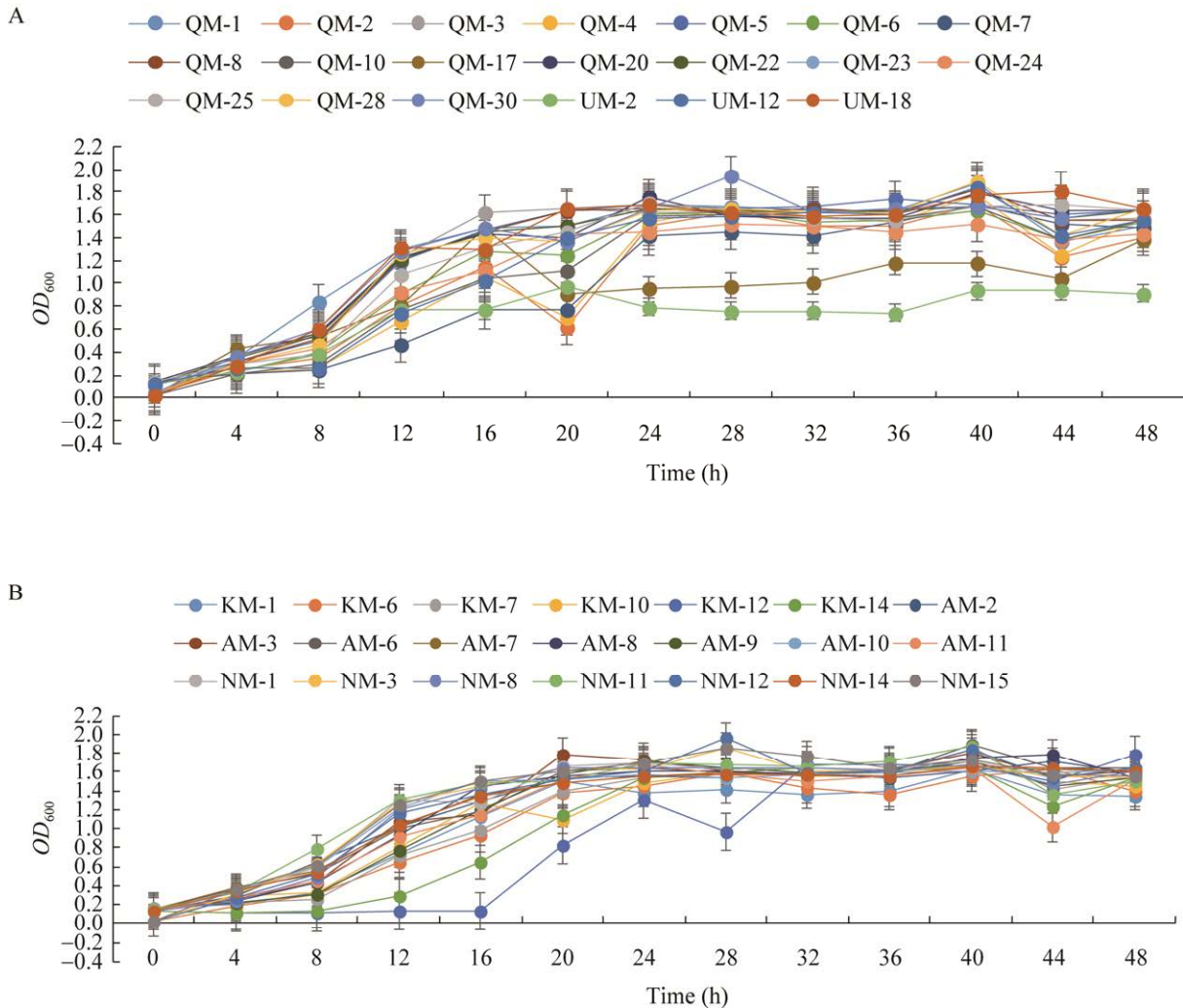


图 1 乳酸菌菌株的生长曲线 A: 前 20 株乳酸菌生长曲线. B: 后 21 株乳酸菌生长曲线

Figure 1 Growth curve of lactic acid bacteria. A: Growth curve of the top 20 lactic acid bacteria. B: Growth curve of the last 21 lactic acid bacteria.

在 pH 2.5 时, 41 株乳酸菌在酸液中处理 0 h 时的平均存活率为 93.37%。在酸性条件下处理 2 h 后, 平均存活率为 76.05%。其中 QM-5、QM-10 的存活率均超过了 100%。QM-3、QM-4、QM-8、QM-27、UM-12、UM-18、KM-6、KM-7、AM-11、NM-8、NM-11、NM-14 的存活率在 90%–100% 之间。结果表明在 pH 2.5 时, QM-5、

QM-10 等 14 个菌株的存活率较高。

当 pH 3.0 时, 41 株乳酸菌在酸液中处理 0 h 时的平均存活率为 61.88%。在酸性条件下处理 2 h 以后平均存活率为 58.55%。处理 2 h 以后 QM-5、QM-27、UM-12、UM-18、NM-11、NM-14 乳酸菌存活率分别为 99.24%、99.05%、98.69%、98.36%、97.03%。结果表明这 6 株乳酸菌在 pH

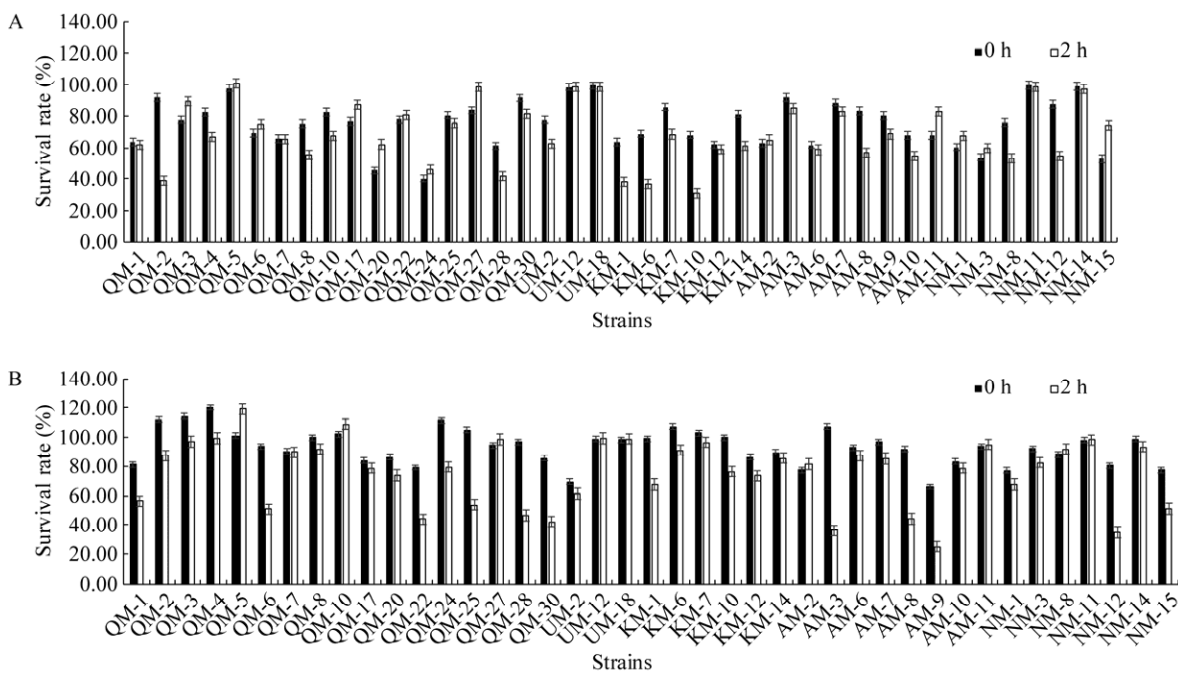
3.0 时存活率最高。

在 pH 3.5 时, 41 株乳酸菌在酸液中处理 0 h 时的平均存活率 78.66%。在酸性条件下处理 2 h 以后平均存活率达到 83.21%。处理 2 h 以后 QM-5、QM-30、KM-1、KM-10、AM-9、AM-11、NM-15 这 7 株乳酸菌存活率均超过了 100%。QM-8、QM-17、QM-22、QM-27、UM-2、UM-12、UM-18、KM-7、KM-12、KM-14、AM-2、AM-7、NM-1、NM-11、NM-14 这 15 株乳酸菌存活率在 90%–99.37%之间。结果显示, 在 pH 3.5 时, 有 7 株菌存活率超过 100%, 有 15 株菌存活率较高。

在 pH 4.0 时, 41 株乳酸菌在酸液中处理 0 h 时的平均存活率 83.84%。处理 2 h 以后平均存活率为 79.32%。处理 2 h 以后 QM-28、QM-30、KM-12 这 3 株乳酸菌存活率均超过了 100%。QM-2、QM-6、QM-7、QM-10、QM-20、QM-25、QM-27、UM-12、UM-18、KM-14、NM-8、NM-11、

NM-14、NM-15 这 14 株乳酸菌存活率在 90%–99.54%之间。结果显示在 pH 为 4.0 时, 有 3 株菌存活率超过 100%, 还有 14 株乳酸菌的存活率也很高。

综上可知, 本实验 41 株乳酸菌当中有 6 株乳酸菌(QM-5、QM-27、UM-12、UM-18、NM-11 和 NM-14)均能在 pH 值为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 时较好地生长, 存活率最高。其中菌株 QM-5 在 pH 4.0 时生长受抑制, 但在其他低酸环境溶液中表现出良好的耐酸性, 说明其最适生长 pH 值低于 4.0。而且在设定的 5 个 pH 值范围内, pH 3.5 时乳酸菌生长最好, 有 7 株存活率超过 100%, 有 15 株存活率较高, 说明北疆生奶酪中分离得到的大多数乳酸菌对酸度均具有较强的耐受能力。Mulaw 等^[23]自 56 株益生菌中筛选出 4 株耐受 pH 2.5 的乳酸菌, 其存活率最低为 77%, 最高为 91%, 略低于本实验中 6 株菌的存活率但相差不大, 其他研究^[24-26]也得到了类似结果。国内学者



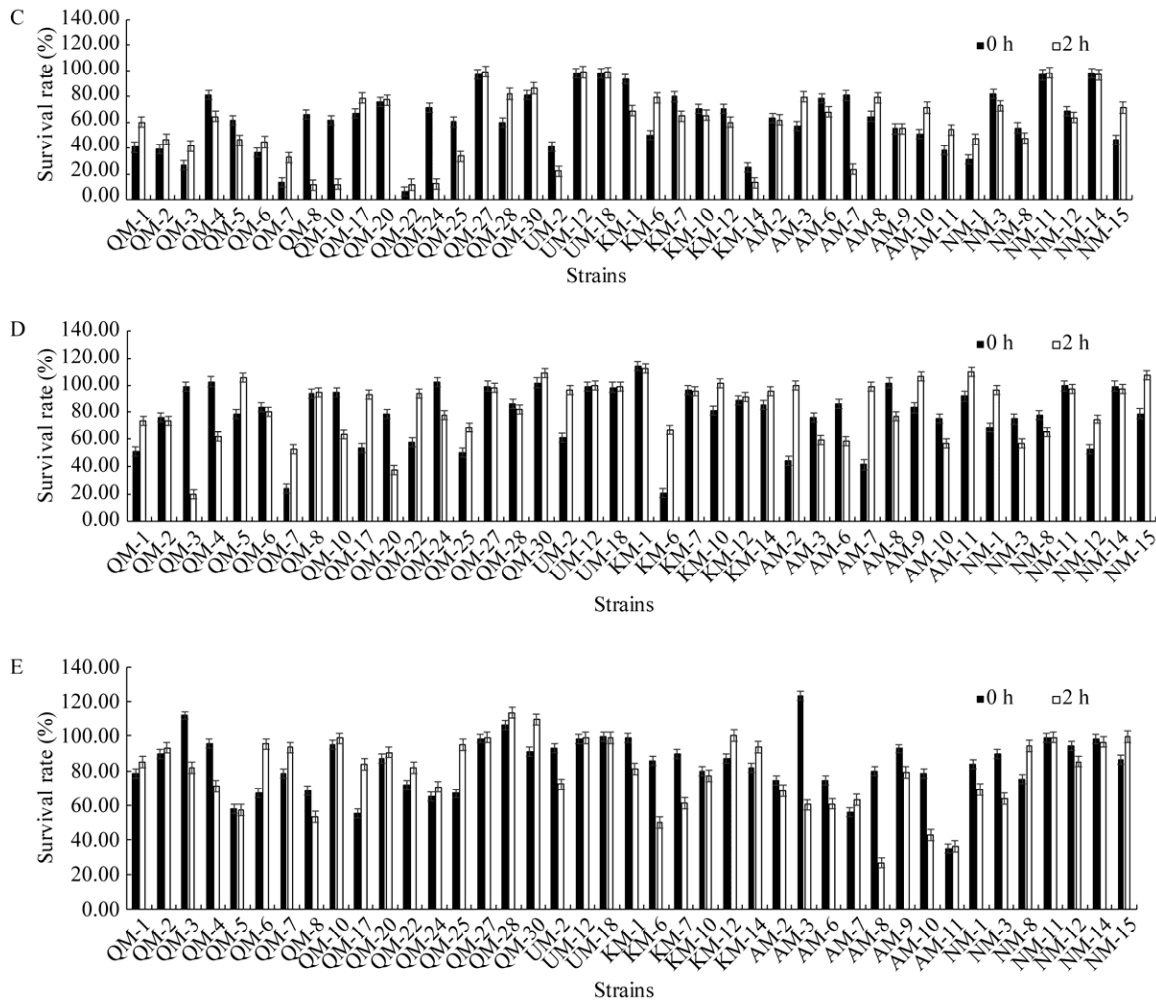


图2 菌株对低 pH 值的耐受性 A: 菌株对 pH 2.0 的耐受性. B: 菌株对 pH 2.5 的耐受性. C: 菌株对 pH 3.0 的耐受性. D: 菌株对 pH 3.5 的耐受性. E: 菌株对 pH 4.0 的耐受性

Figure 2 Tolerance of strains to low. A: Resistance of strain to pH 2.0. B: Resistance of the strain to pH 2.5. C: Resistance of strain to pH 3.0. D: Resistance of strain to pH 3.5. E: Resistance of strain to pH 4.0.

温贺等^[27]从白酸菜中分离的一株植物乳杆菌在 pH 3.0 的条件下存活率为 55%，可见本实验 6 株菌具有更强的耐酸能力，其良好的耐酸能力可能与菌体内多种生物酶参与的代谢途径有关^[28]，具体机理有待进一步研究。不同乳酸菌菌株对酸的耐受力都有一定的差别，这与大多研究报道^[29-30]的一致。

从上述试验结果中，比较存活率较高的 6 个

菌株(QM-5、QM-27、UM-12、UM-18、NM-11、NM-14)的活菌数，进行耐酸活菌数分析。

由表 1 和表 2 可知，菌株 QM-5 属于 *Lactobacillus paracasei*，当菌株处理 0 h 和 2 h 时，不同 pH 条件下活菌数与对照组相比存在显著性差异，而且菌株 QM-5 在 pH 2.5 时活菌数达到最高。这说明 *Lactobacillus paracasei* 菌株在 pH 值分别在 2.5、3.5 时活菌数最高。

表 1 六株乳酸菌在不同 pH 的活菌数

Table 1 Viable count of six strains of lactic acid bacteria at different pH

Group	存活时间 Survival time	菌株编号 Strain No.					
		QM-5	QM-27	UM-12	UM-18	NM-11	NM-14
对照组	活菌数(0 h)	2.98±0.010a	3.45±0.030a	3.15±0.030a	3.01±0.010a	2.96±0.015a	3.01±0.037a
Control group	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)	2.48±0.025c	3.07±0.040a	3.16±0.010a	3.05±0.010a	3.05±0.010a	3.25±0.010a
pH 2.0	Viable count (2 h)						
	活菌数(0 h)	2.91±0.032a	2.88±0.020d	3.10±0.015ad	2.99±0.010a	2.96±0.020a	2.98±0.010ab
pH 2.5	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)	2.49±0.010c	3.03±0.026a	3.12±0.025ae	3.00±0.010b	3.01±0.010ac	3.15±0.010bd
pH 3.0	Viable count (2 h)						
	活菌数(0 h)	3.01±0.050a	3.26±0.037c	3.11±0.005ac	2.96±0.020b	2.91±0.015a	2.97±0.020ad
pH 3.5	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)	2.96±0.041a	3.02±0.008ac	3.14±0.005a	3.01±0.010b	3.00±0.020a	3.03±0.010c
pH 4.0	Viable count (2 h)						
	活菌数(0 h)	1.84±0.045c	3.35±0.015b	3.09±0.010ac	2.95±0.010d	2.87±0.015a	2.95±0.010af
pH 4.5	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)	1.14±0.040e	3.04±0.020a	3.13±0.010ad	3.01±0.010b	3.00±0.010ab	3.15±0.015b
pH 5.0	Viable count (2 h)						
	活菌数(0 h)	2.34±0.017b	3.42±0.010a	3.12±0.020ab	2.96±0.010c	2.94±0.010a	2.98±0.010ac
pH 5.5	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)	2.62±0.040b	2.99±0.015ab	3.14±0.010ab	3.01±0.010b	2.97±0.020ad	3.15±0.010b
pH 6.0	Viable count (2 h)						
	活菌数(0 h)	1.72±0.020c	3.40±0.010ab	3.09±0.010af	2.99±0.010a	2.93±0.015a	2.96±0.010ac
pH 6.5	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)	1.42±0.030d	3.04±0.010a	3.13±0.010ac	3.02±0.015b	3.02±0.015a	3.14±0.015b
pH 7.0	Viable count (2 h)						
	活菌数(0 h)						
pH 7.5	Viable count (0 h)						
	活菌数(2 h)						

同一行不同的字母表示在统计学上具有显著性差异($P<0.05$) (乳酸菌耐酸菌株活菌数 10^8 CFU/mL)

Different letters in the same row indicate statistically significant difference ($P<0.05$) (number of acid-tolerant lactic acid bacteria is 10^8 CFU/mL).

由表 1 和表 2 可知, 菌株 QM-27、NM-14 属于 *Enterococcus durans*, QM-27、NM-14 菌株在 0 h 和 2 h 的 pH 值均为 3.5 时活菌数达到最高。UM-12、UM-18、NM-11 菌株属于 *Enterococcus faecium*, 这些菌株在低 pH 值条件下(pH 2.0)活菌数最高, 因此可以初步认为 *Enterococcus faecium* 菌株比其他种的菌株对酸的耐受力更强。

2.3 耐胆盐测试结果

乳酸菌要定殖于肠道, 必须对胆盐具有一定程度的耐受性, 否则胆盐在细胞外产生的渗透压过高^[31], 对菌体细胞产生影响。胆盐具有抑菌

功能, 适应人体小肠中的胆盐胁迫是益生菌发挥益生功能的重要前提^[32], 所以对胆盐的耐受也是衡量优良益生菌的重要指标。根据食物在胃中的停留时间^[33], 把菌株在不同胆盐浓度的 MRS 培养基中培养 8 h, 随后, 通过计算菌株的存活率表征它们的耐胆盐能力。菌株对胆盐耐受性结果如图 3 所示。

从图 3 可见, 试验 41 株乳酸菌菌株在胆盐浓度 0.3%处理 0 h 的平均存活率为 93.34%, 4 h 的平均存活率为 72.65%, 8 h 的平均存活率为 47.37%。QM-27、UM-2、UM-18、KM-12、KM-14、

AM-3、AM-6、AM-8、NM-8、NM-11、NM-12、NM-14、NM-15 这 13 株菌, 在处理 4 h 和 8 h 后的存活率均大于 50%, QM-22 菌株对胆盐浓度 0.3% 的耐受性最低, 存活率为 29.76%。其余

菌株存活率在 29.76%–50% 之间。

41 株乳酸菌菌株在胆盐浓度 0.5% 处理 0 h 后的平均存活率为 94.67%, 4 h 后的平均存活率为 74.67%, 8 h 的平均存活率为 39.37%。QM-7、

表 2 不同地区分离到的乳酸菌信息统计

Table 2 Statistics of lactic acid bacteria isolated from different areas

菌株编号 Strain No.	最具有亲缘关系的菌株 The most closely related strain	菌株编号 Strain No.	最具有亲缘关系的菌株 The most closely related strain
QM-1	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	KM-6	短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i>
QM-2	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	KM-7	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
QM-3	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	KM-10	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
QM-4	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	KM-12	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>
QM-5	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	KM-14	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>
QM-6	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	AM-2	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-7	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	AM-3	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-8	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	AM-6	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-10	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	AM-7	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-17	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	AM-8	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-20	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	AM-9	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-22	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	AM-10	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-24	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	AM-11	鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhanmosus</i>
QM-25	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	NM-1	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
QM-27	耐久肠球菌 <i>Enterococcus durans</i>	NM-3	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
QM-28	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	NM-8	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
QM-30	副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>	NM-11	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>
UM-2	鸡乳杆菌 <i>Lactobacillus gallinarum</i>	NM-12	粪肠球菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
UM-12	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	NM-14	耐久肠球菌 <i>Enterococcus durans</i>
UM-18	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecium</i>	NM-15	粪肠球菌 <i>Lactobacillus paracasei</i>
KM-1	短乳杆菌 <i>Lactobacillus brevis</i>		

QM-8、QM-20、QM-24、NM-14 这 5 株菌在 4 h 和 8 h 后的存活率均大于 50%。AM-2 菌株对胆盐浓度 0.5% 的耐受性最低, 存活率为 27.60%。其余菌株存活率在 27.60%–50% 之间。

41 株乳酸菌菌株在胆盐浓度 1.0% 处理 0 h 后的平均存活率为 92.11%, 4 h 后的平均存活率为 80.56%, 8 h 的平均存活率为 38.91%。QM-4、QM-27、KM-6、KM-14、NM-14 这 5 株菌在 4 h 和 8 h 后的存活率均大于 50%。NM-1 菌株对胆盐浓度 1.0% 的耐受性最低, 存活率为 24.05%。其余

菌株存活率在 24.05%–50.00% 之间。

食物在经过胃液的消化后会进入十二指肠与具有抑菌作用的胆盐接触。胆盐能改变细胞膜的通透性, 通过破坏细胞膜的完整度造成细胞死亡^[34]。因此, 乳酸菌对人体胃肠道中高浓度胆盐的耐受能力是衡量其潜在益生特性的重要指标。研究表明^[35-36], 小肠内胆盐的含量范围在 0.3% 左右, 一般食物通过需要 1–4 h, 因此本实验选取 0.3%、0.5%、1.0% 的胆盐浓度对 41 株乳酸菌进行 8 h 培养, 存活情况见图 3。综合胆盐

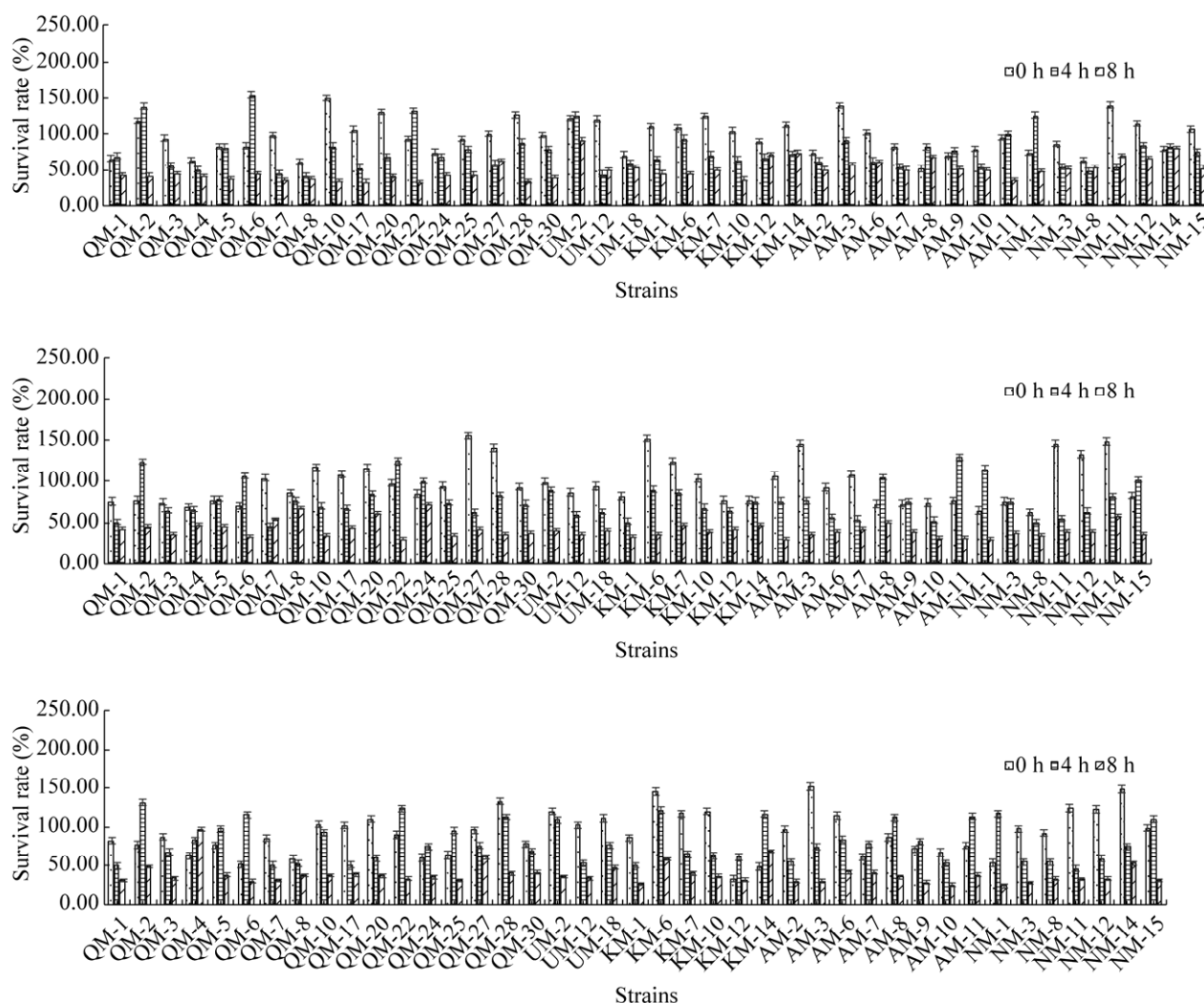


图 3 菌株耐胆盐能力检测 A: 菌株对 0.3% 浓度胆盐的耐受能力. B: 菌株对 0.5% 浓度胆盐的耐受能力. C: 菌株对 1.0% 浓度胆盐的耐受能力

Figure 3 Tolerance of strains to bile salt. A: Tolerance of the strain to 0.3% bile salt. B: Tolerance of the strain to 0.5% bile salt. C: Tolerance of the strain to 1.0% bile salt.

耐受性实验的结果,菌株 QM-27、KM-14、NM-14 为耐胆盐性优良菌株,存活率均大于 50%。由此可见,从北疆乳制品奶酪中分离得出的乳酸菌都有很强的耐胆盐能力,其中上述的 5 个菌株对胆盐的耐受力极强。通过模拟胃肠道条件对乳酸菌进行体外胆盐耐受性筛选,只能预测菌株在无食物保护条件下且胆盐浓度一定时的体内存活状况。

耐胆盐活菌数分析:上述耐胆盐试验存活率较高的 3 个优势菌种(QM-27、KM-14、NM-14),对它们的活菌数进行比较可以发现(表 3),菌株 QM-27、NM-14 属于 *Enterococcus*

durans, 在 0 h 时菌株 QM-27、NM-14 在不同的胆盐浓度条件下,与对照组相比均存在显著性差异($P<0.05$)。

菌株 QM-27、NM-14 在 4 h 时分别在牛胆盐浓度 1%、0.3% 的条件下活菌数最高,尤其是菌株 QM-27 极为耐胆盐,在胆盐浓度为 1% 时处理 8 h 以后的活菌数继续增加,而 8 h 时菌株 NM-14 开始受抑制。

菌株 KM-14 属于 *Lactobacillus gallinarum*, 在 4 h 时菌株 KM-14 不受胆盐浓度影响,胆盐浓度 1% 时活菌数最高。在 8 h 时菌株才开始受胆盐浓度影响,表现出较强的耐受能力。

表 3 三株乳酸菌在不同胆盐浓度中的活菌数

Table 3 Viable count of three strains of lactic acid bacteria in different bile salt concentrations

Group	存活时间 Survival time	菌株编号 Strain No.		
		QM-27	KM-14	NM-14
对照组 Control group	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	1.06±0.017b	1.70±0.081b	1.36±0.015c
	活菌数(4 h) Viable count (4 h)	2.58±0.020a	1.77±0.037b	2.48±0.015ac
	活菌数(8 h) Viable count (8 h)	3.25±0.010a	3.04±0.020a	3.28±0.015a
0.3%	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	1.03±0.026bc	1.86±0.052a	1.03±0.010d
	活菌数(4 h) Viable count (4 h)	1.42±0.010d	1.22±0.020d	1.97±0.015b
	活菌数(8 h) Viable count (8 h)	1.94±0.010c	2.16±0.020b	2.53±0.010b
0.5%	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	1.62±0.010a	1.26±0.010c	1.99±0.020b
	活菌数(4 h) Viable count (4 h)	1.54±0.010c	1.30±0.020c	1.97±0.015ac
	活菌数(8 h) Viable count (8 h)	1.33±0.010d	1.36±0.010d	1.84±0.010c
1.0%	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	1.02±0.010bc	0.83±0.015d	2.04±0.015a
	活菌数(4 h) Viable count (4 h)	1.97±0.015b	2.08±0.045a	1.86±0.015d
	活菌数(8 h) Viable count (8 h)	2.01±0.026b	2.10±0.020c	1.75±0.010d

同一行不同的字母表示在统计学上具有显著性差异($P<0.05$) (乳酸菌耐胆盐性菌株活菌数 10^7 CFU/mL)

Different letters in the same row indicate statistically significant difference ($P<0.05$) (number of viable lactic acid bacteria with bile salt tolerance is 10^7 CFU/mL).

2.4 人工胃液模拟测试结果

耐胃液存活率是指益生菌通过生物体摄入体内后到达胃, 并与一般食物一样停留一段时间的存活率。胃中的益生菌只有定殖于肠道下部才可以发挥作用。人的胃液主要由胃酸和胃蛋白酶组成, 因为有饮食差异, 一般情况下胃液的 pH 值范围在 1.5-4.5 之间, 食物在胃中停留 3 h 左右^[37]。

Pepsin 在人体内部处于酸性环境中被激活, 从而杀死进入胃内中的细菌^[20]。人工胃液耐受性结果表明(图 4), 41 株乳酸菌在胃液模拟环境中都可生长, 但是它们的生长状况却不尽相同,

在 0 h 时所有菌株在 pH 1.5 胃液中的存活率均为 72.96%。培养 2 h 以后所有菌株存活率均为 63.41%, 其中 QM-2、QM-27、UM-12、UM-18、NM-14 菌株 2 h 后的存活率超过 90%。

从胃液存活率试验筛选到的菌株做活菌数比较, 结果见表 4。实验开始后, 对在人工胃液条件下处理 0 h 和 2 h 的菌株进行平板活菌数计数, 结果显示在同一时间点内(2 h), QM-27 与对照组相比, 该菌株活菌数明显高于其他菌株 ($P<0.05$), 说明 QM-27 号菌株对人工胃液具有明显的耐受作用。

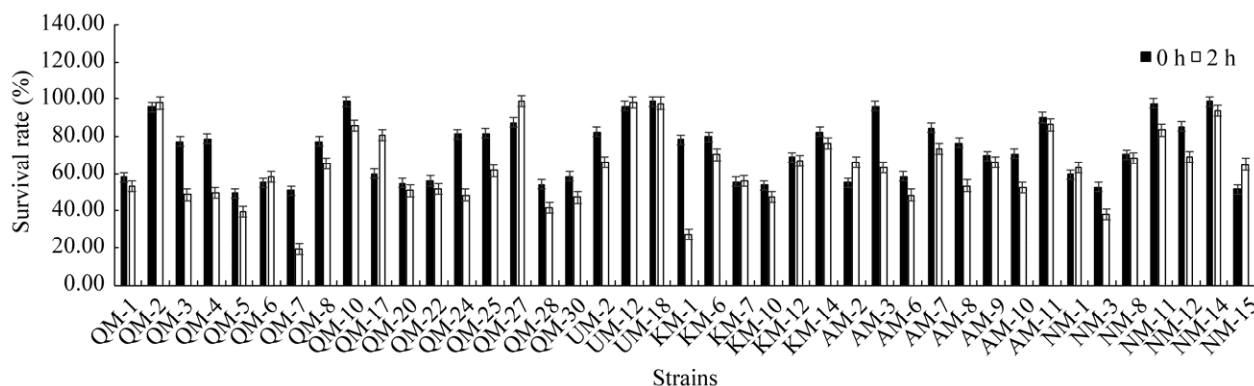


图 4 菌株在人工胃液的生长情况

Figure 4 Growth of strains in artificial gastric juice environment.

表 4 五株乳酸菌在人工胃液浓度中的活菌数

Table 4 Viable count of five lactic acid bacteria in artificial gastric juice

菌株编号 Strain No.	对照组 Control group		人工胃液 Artificial gastric juice	
	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	活菌数(2 h) Viable count (2 h)	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	活菌数(2 h) Viable count (2 h)
	QM-2	2.68±0.025a	2.87±0.015a	2.56±0.015b
QM-27	3.45±0.030a	3.07±0.041a	3.02±0.015b	3.04±0.020a
UM-12	3.15±0.030a	3.16±0.010a	3.03±0.020b	3.11±0.011b
UM-18	3.01±0.010a	3.05±0.010a	2.97±0.015b	2.98±0.010b
NM-14	3.01±0.037a	3.25±0.010a	2.97±0.010b	3.04±0.020b

同一列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P<0.05$) (乳酸菌耐胃液菌株活菌数 10^8 CFU/mL)

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$) (number of live lactic acid bacteria resistant to gastric juice is 10^8 CFU/mL).

2.5 人工肠液模拟测试结果

外来益生菌除经过胃消化外还需经过小肠消化转运才能到达它们的目的地定殖并且发挥作用,因此还有必要进一步对菌体在胃及小肠转运过程中的耐受能力进行研究。通过制备人工肠液模拟测试 41 株乳酸菌,以测试在模拟的肠液环境中表现出来的耐受能力。试验结果见图 5,人工模拟的肠液中分别处理 4 h 和 8 h 时的所有乳酸菌菌株的平均存活率都很高,分别为 67.02%、69.79%,说明大部分菌株具有良好的肠液耐受性。其中处理 8 h 后 QM-2、QM-20、KM-1、KM-12、NM-12 菌株

存活率超过 100%。QM-25、QM-27、UM-18、KM-14、AM-8 菌株存活率在 90%–98%之间。这些菌株具有较强的耐肠液能力。其余部分菌株存活率在 34%–50%之间,说明肠液耐受性一般。本实验结果表明共 10 个菌株在模拟肠液中具有很好的耐受性:菌株 *L. gallinarum* QM-2、QM-25、KM-12、KM-14, *L. paracasei* QM-20、NM-12, *L. brevis* KM-1, *L. rhanmosus* AM-8, *E. durans* QM-27, *E. faecium* UM-18, 它们的存活率均大于 90%。

由表 5 可知,人工肠液处理 4 h 后,菌株 QM-2、KM-1、KM-12 活菌数含量比对照组均

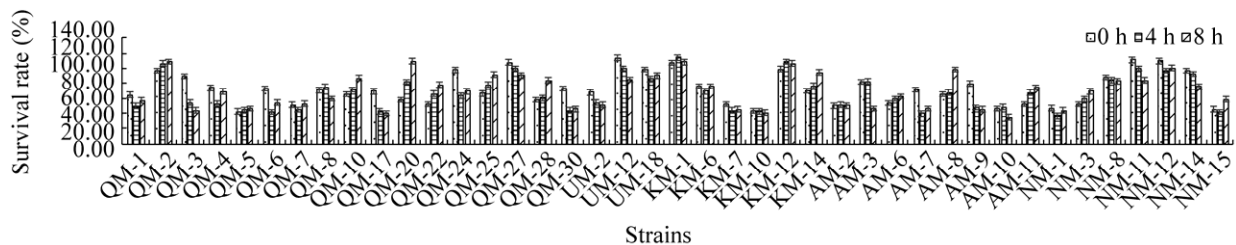


图 5 菌株在人工肠液的生长情况

Figure 5 Growth of bacteria in artificial intestinal fluid environment.

表 5 十株乳酸菌在人工肠液浓度中的活菌数

Table 5 Viable count of ten lactic acid bacteria in artificial intestinal fluid

菌株编号 Strain No.	对照组 Control group			人工肠液 Artificial intestinal fluid		
	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	活菌数(4 h) Viable count (4 h)	活菌数(8 h) Viable count (8 h)	活菌数(0 h) Viable count (0 h)	活菌数(4 h) Viable count (4 h)	活菌数(8 h) Viable count (8 h)
QM-2	2.68±0.035a	2.86±0.015b	3.36±0.040b	2.61±0.070a	3.06±0.020a	3.67±0.016a
QM-20	2.33±0.020a	3.53±0.030a	3.04±0.020b	1.35±0.025b	2.89±0.030b	3.33±0.011a
QM-25	2.74±0.010a	2.46±0.015a	3.08±0.030a	1.82±0.025b	1.92±0.025b	2.83±0.011b
QM-27	2.85±0.010b	2.87±0.010a	3.05±0.010a	3.09±0.010a	2.87±0.010a	2.76±0.020b
UM-18	3.02±0.015a	2.95±0.010a	3.03±0.026a	2.99±0.015a	2.54±0.010b	2.74±0.005b
KM-1	2.63±0.030b	2.88±0.030b	3.38±0.026b	2.84±0.020a	3.30±0.015a	3.67±0.016a
KM-12	3.24±0.020a	3.52±0.035b	3.67±0.020b	3.21±0.030a	3.84±0.040a	3.92±0.016a
KM-14	2.83±0.030a	2.88±0.032a	3.05±0.026a	1.97±0.030b	2.21±0.020b	2.89±0.011b
AM-8	2.67±0.020a	3.02±0.025a	3.54±0.037a	1.76±0.040b	2.05±0.030b	3.49±0.011a
NM-12	2.85±0.010b	2.96±0.020a	3.55±0.041a	3.14±0.025a	2.88±0.020b	3.58±0.026a

同一列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P<0.05$) (乳酸菌耐人工肠液菌株活菌数 10^8 CFU/mL)

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$) (live count of lactic acid bacteria resistant to artificial intestinal fluid is 10^8 CFU/mL).

显著升高。其余的菌株活菌数与对照组比较显著降低($P<0.05$)。人工肠液处理 8 h 后 QM-2、QM-20、KM-1、KM-12 菌株活菌数与对照组比较均显著升高($P<0.05$), 而其余菌株的活菌数与对照组比较显著降低($P<0.05$)。说明这 4 个菌株显著对人工肠液耐受性好。

2.6 乳酸菌抑菌特性测试结果

据报道, 乳酸菌的代谢产物在一定程度上可以抑制致病菌的增长^[31]。因此本实验验证了这 41 株乳酸菌的抑菌效果。选用的病原菌分别是

革兰氏阳性、阴性菌, 即金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 以及非致病菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。乳酸菌对致病菌抑菌的结果如图 6 所示, 乳酸菌菌株发酵的上清液中代谢物的抑菌能力越强, 牛津杯周边的致病菌株的生长能力就越弱, 生长抑制圈就越大。试验结果显示, 41 株乳酸菌对 3 种指示菌均有较好的抑制作用, 尤其是对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最好。乳酸菌发酵液对 2 种致病菌及一种非致病菌的抑菌效果见图 7。

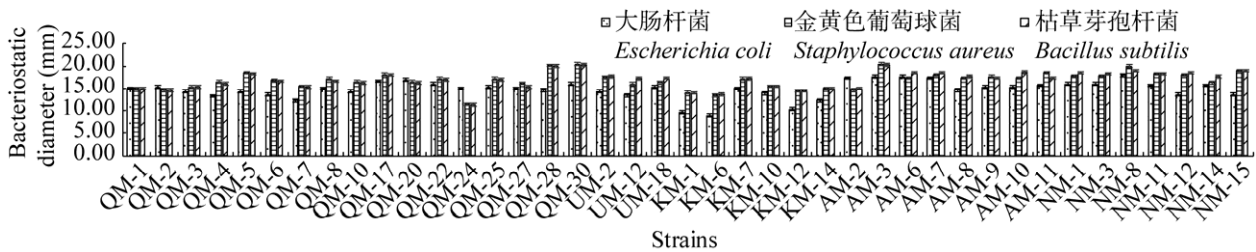


图 6 乳酸菌菌株对指示菌的抑制能力
Figure 6 Inhibition ability of lactic acid bacteria to indicator bacteria.

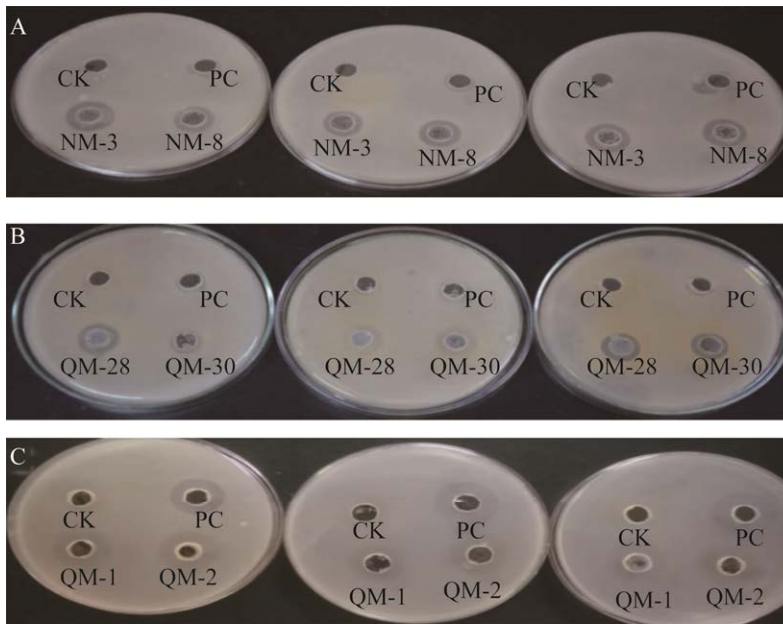


图 7 乳酸菌发酵液对指示菌的抑菌效果 A: 乳酸菌发酵液对大肠杆菌的抑菌效果. B: 乳酸菌发酵液对枯草芽孢杆菌的抑菌效果. C: 乳酸菌发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Figure 7 Bacteriostatic effect of lactic acid bacteria fermentation broth Indicator bacteria. A: Antibacterial effect of lactic acid bacteria fermentation broth on *Escherichia coli*. B: Antibacterial effect of lactic acid bacteria fermentation liquid on *Bacillus subtilis*. C: Antibacterial effect of lactic acid bacteria fermentation broth on *Staphylococcus aureus*.

41 株乳酸菌对大肠杆菌抑菌圈直径平均为 14.80 mm, 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径平均达 16.87 mm, 对枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径平均为 16.93 mm, 均大于阳性对照乳酸链球菌素(nisin)的平均抑菌圈。其中 QM-1、QM-8、QM-17、QM-20、QM-22、QM-25、QM-27、QM-30、UM-18、KM-7、AM-3、AM-6、AM-7、AM-9、AM-10、AM-11、NM-1、NM-3、NM-8、NM-11、NM-14 这 21 个菌株对指示菌的抑菌圈均在 15 mm 以上(表 6), 都具有较强的抑菌活性。

乳酸菌对病原菌的抑制作用是评价功能性

益生性的重要特性之一。以乳酸链球菌素(nisin)对致病菌抑制浓度为试验标准, 对 21 株菌的抑制作用进行分析比较, 结果发现 41 株乳酸菌对 2 种致病菌及非致病菌都有抑制作用。分析结果见表 6, 从中可以看到, 所有菌株对致病菌的抑制作用均显著高于对照组(nisin) ($P<0.05$)。NM-8 菌株对大肠杆菌(*E. coli*)的抑制作用最强, 抑菌圈与对照组相比存在显著性。与对照组相比, QM-30、AM-3 菌株对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑制作用最强。QM-30、AM-3 菌株对非致病菌枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的抑制作用最强。

表 6 21 株乳酸菌和乳酸链球菌素对 3 种指示菌抑菌能力对比

Table 6 Comparison of antimicrobial activity of 21 strains of lactic acid bacteria and nisin against three indicator bacteria (mm)

菌株编号 Strain No.	对照组(nisin) Control group			实验组 Experience group		
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
QM-1	10.67±0.577b	16.00±0.000a	12.17±0.289b	15.00±1.000a	15.00±1.000a	15.00±1.000a
QM-8	11.33±0.577b	16.33±0.577b	10.83±0.764b	15.00±0.000a	17.17±0.289a	16.67±0.577a
QM-17	10.50±0.500b	15.33±0.577b	13.17±0.289b	16.67±0.577a	18.17±0.288a	18.00±0.000a
QM-20	11.67±0.577b	14.67±0.577b	14.50±1.323b	17.00±0.000a	16.50±0.500a	16.33±0.577a
QM-22	11.33±0.577b	16.00±0.000b	11.33±1.257b	16.00±0.000a	17.17±0.289a	17.00±0.000a
QM-25	12.67±1.154b	14.00±0.000b	10.00±1.000b	15.33±0.577a	17.17±0.288a	17.00±0.000a
QM-27	11.00±1.000b	15.33±0.577b	11.33±2.082b	15.00±0.000a	16.17±0.288a	15.33±0.577a
QM-30	12.00±1.000b	16.33±0.577b	13.00±1.000b	16.00±0.000a	20.50±0.500a	20.33±0.577a
UM-18	12.17±0.288b	14.00±0.100b	14.00±1.000b	15.33±0.577a	16.33±0.577a	17.33±0.577a
KM-7	9.00±1.000b	12.67±1.528b	11.67±1.527b	15.00±0.000a	17.17±0.289a	17.17±0.289a
AM-3	7.83±0.763b	16.33±1.155b	12.50±0.500b	17.67±0.577a	20.50±0.500a	20.33±0.577a
AM-6	8.00±1.000b	17.67±0.577a	14.67±0.577b	17.67±0.577a	17.33±1.527a	18.50±0.500a
AM-7	11.33±0.577b	17.67±0.577a	13.17±0.289b	17.33±1.527a	18.00±1.000a	18.50±0.500a
AM-9	12.00±2.000b	15.33±0.577b	11.67±2.082b	15.33±0.577a	17.67±0.577a	17.33±0.500a
AM-10	10.67±1.527a	13.67±5.773a	12.50±0.500b	15.33±0.577a	17.33±0.577a	18.67±0.577a
AM-11	12.67±1.154b	15.00±0.000b	11.83±1.040b	15.67±0.577a	18.50±0.500a	17.33±0.577a
NM-1	10.33±1.527b	16.33±0.577b	13.50±0.500b	16.00±0.000a	17.83±0.763a	18.50±0.500a
NM-3	10.00±1.000b	15.67±0.577b	14.00±0.000b	16.00±1.040a	17.83±0.000a	18.33±1.155a
NM-8	10.67±0.577b	17.67±0.577b	15.33±0.577b	18.00±0.000a	20.00±1.000a	19.00±1.000a
NM-11	10.00±1.000b	14.67±0.577b	14.00±1.000b	15.67±0.577a	18.33±0.577a	18.33±0.577a
NM-14	11.33±0.577b	15.00±1.000a	12.67±0.577b	15.67±0.577a	16.33±0.577a	17.67±0.577a

同一列不同字母表示在统计学上具有显著差异($P<0.05$)

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

3 讨论与结论

益生菌是以口服的方式进入动物消化道内,因此必须保证所选用的菌株具有抵抗较低 pH 值的能力才能有效发挥作用。乳酸菌是肠道中常见的内源性细菌,食用乳酸菌后可以改变肠道内环境,抑制有害菌的繁殖,调节肠道菌群平衡。乳酸菌通过黏菌素与肠黏膜细胞紧密结合,能够修复肠道菌群屏障,防治肠道疾病。作为益生菌中常用的菌种,乳酸菌代谢过程中本身产乳酸,可适应较低 pH 值环境,一般都能够抵抗较低 pH 环境。本研究通过配制不同 pH 的酸液,对北疆生奶酪分离鉴定的 41 株乳酸菌进行了耐酸试验,结果表明,41 株乳酸菌中 6 株乳酸菌(QM-5、QM-27、UM-12、UM-18、NM-11、NM-14)均能在 pH 值分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 时生长较好,在 pH 值为 2.0 的环境下也保持一定程度的生长,菌株存活率均大于 90%。因此这些菌株为极强耐酸菌株。目前已报道了大量关于菌株耐酸能力的研究,但这些研究所选取的酸胁迫条件主要集中在 pH 2.0 及以上,对于菌株在 pH 2.0 以下耐酸能力的研究还很少。在已有的报道中,耐酸能力较强的益生菌为韩墨等^[38]从内蒙古传统酸奶中分离出的鼠李糖乳杆菌 217-3,该菌在 pH 1.5 的酸度下孵育 4 h 后的存活率为 72%,仍低于本研究中菌株 QM-5、QM-27、NM-11 在相同实验条件下的存活率。综上可知,菌株 QM-5、QM-27、NM-11 具有更高的耐酸能力,可以作为具有潜在益生特性的耐酸菌株丰富菌株库。利用胃肠道环境模拟体外实验以及胆盐耐受性实验发现,41 株乳酸菌均可在胃肠道模拟环境和 0.3%、0.5%、1.0%浓度的胆盐环境下生长,从实验结果可以看出,这 41 株乳酸菌对含量为 0.3%、0.5%、1.0%的胆盐溶液均有不同程度的耐受性。随着胆盐浓度的升高,乳酸菌的耐受性

也逐渐降低。其中菌株 QM-27、KM-14、NM-14 对 0.3%、0.5%、1.0%这 3 个浓度均有较好的耐受性,存活率均大于 50%。通过综合耐受性实验、胃肠道模拟实验、胆盐耐受性实验,我们初步筛选出 QM-27 (*Enterococcus*)、KM-14 (*Lactobacillus*)、NM-14 (*Enterococcus*)这 3 株优良菌株。实验结果说明生奶酪发酵过程的优势菌株具有极强的耐酸、耐胆盐能力,可以耐受胃环境,顺利到达肠道并在一定浓度下定殖来发挥益生作用。

史晓萌等^[39]通过对植物乳杆菌 CICC 6238 及从怡能菌粉中分离出的嗜酸乳杆菌 NCFM 和鼠李糖乳杆菌 HN001 进行胃肠道模拟实验,最终存活率分别约为 61.5%、79.4%、77.4%。对比发现菌株 NL8 和 NL56 均具有较好的胃肠道耐受能力且 NL8 的耐受能力更强。这与本研究试验结果一致。云月英等^[40]对 4 株来源于自然发酵肉制品中的乳酸菌进行耐酸耐胆盐性能的测定,结果表明菌株的存活率均>50%,其中菌株 M12 和 M23 经 pH 3.0 的人工模拟胃液处理 2 h 后,存活率分别为 68.66%和 56.72%,经人工模拟肠液处理 10 h 后仍可存活;这 2 株菌具有较强的增殖及产酸能力,24 h 内均已进入稳定生长期,再经人工模拟肠液处理 10 h,活菌数仍高于 10^4 CFU/mL,对人工模拟胃肠液均显示出较好的耐受性。从这些报道并结合本研究实验结果可以看出,乳酸菌对低 pH 值、高胆盐等都具有良好的耐受性,这些已报道的结果与本实验的研究结果一致,说明本研究所筛选的 QM-27 (*Enterococcus durans*)、KM-14 (*Lactobacillus gallinarum*)、NM-14 (*Enterococcus durans*)这 3 株菌能够耐受强酸和高胆盐等胁迫环境,能够在人体内正常生长。然而以上结果为体外实验所得,要进一步验证这些实验结果,还需要进一步进行小鼠体内存活试验,这正是我们下一步要进

行的研究。

本研究以来自几种北疆传统发酵乳制品生奶酪中分离出的 41 株乳酸菌为研究对象进行了各种耐受性和益生特性实验,研究这些菌株的耐酸性及其在人工模拟体内环境条件下的生长状态,同时探讨了这些菌株代谢产物的抑菌作用。研究获得了菌株在真实人体胃肠道环境中的生存状况数据,筛选出具有良好的耐受性、能够在人体胃肠道环境中存活的优势菌株,并观察了这些菌株的存活率,为进一步研究具有益生特性的乳酸菌在发酵乳制品产业中的应用提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] 尹胜利, 杜鉴, 徐晨. 乳酸菌的研究现状及其应用[J]. 食品科技, 2012, 37(9): 25-29.
YIN SL, DU J, XU C. Advances in the research and application of *Lactobacillus*[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(9): 25-29 (in Chinese).
- [2] 张帆, 王建华, 刘立恒, 杨雅麟, 滕达. 嗜酸乳杆菌的培养条件及其生物学特性[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 43-46.
ZHANG F, WANG JH, LIU LH, YANG YL, TENG D. Cultivation conditions on biological characteristic of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(3): 43-46 (in Chinese).
- [3] 玛依诺·木图拉. 赛里木酸奶中产粘乳酸菌的分离筛选及发酵工艺的研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
MAYINUO M. Isolation and identification of eps producing lactic acid bacteria from sayram, traditional Xinjiang ropy yoghurt, and its role in fermentation process[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [4] 李清, 王英, 刘小莉, 董明盛, 周剑忠. 一株广谱抑菌活性乳酸菌的筛选及特性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 332-339.
LI Q, WANG Y, LIU XL, DONG MS, ZHOU JZ. Isolation of a broad-spectrum antibacterial lactic acid bacterium and evaluation of probiotic properties[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 332-339 (in Chinese).
- [5] 赵芳, 李艳琴, 李彬春. 模拟人体胃肠道环境筛选益生乳酸菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1396-1403.
ZHAO F, LI YQ, LI BC. Screening of probiotic *Lactobacillus* in simulated gastrointestinal environment[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1396-1403 (in Chinese).
- [6] HAN FF, FAN HX, YAO M, YANG SS, HAN JH. Oral administration of yeast β -glucan ameliorates inflammation and intestinal barrier in dextran sodium sulfate-induced acute colitis[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 35: 115-126.
- [7] 王则臻, 陈朝晖, 李敏杰. 乳酸菌的抑菌作用及其发酵性能研究[J]. 食品科技, 2012, 37(1): 2-6.
WANG ZZ, CHEN ZH, LI MJ. Performance evaluation on bacteriostasis and fermentability of *Lactobacillus*[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(1): 2-6 (in Chinese).
- [8] 张旭, 赵斌, 张香美, 李平兰. 产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素相关基因的分析[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(4): 168-177.
ZHANG X, ZHAO B, ZHANG XM, LI PL. Screening of bacteriocin producing lactic acid bacteria and the analysis of bacteriocin related genes[J]. Journal of China Agricultural University, 2013, 18(4): 168-177 (in Chinese).
- [9] 杨焱焯. 具有降血压功能的益生菌的筛选[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2006
YANG YJ. The Screening of antihypertensive probiotic[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2006 (in Chinese).
- [10] 武永超, 桑跃, 刘治麟, 张建铭, 赵亮. 乳双歧杆菌 U9 高密度发酵培养基的优化研究[J]. 中国乳业, 2015(12): 74-78.
WU YC, SANG Y, LIU ZL, ZHANG JM, ZHAO L. Optimization of culture medium of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* U9 strain[J]. China Dairy, 2015(12): 74-78 (in Chinese).
- [11] 魏志文. 多菌二步发酵法生产高蛋白饲料的研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2005.
WEI ZW. Study on high protein feed made by multi-strains two-step co-fermentation[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2005 (in Chinese).
- [12] 满兆红, 都启晶, 姜彦君, 高雁斐, 范颖华, 李凤梅, 赵宏坤. 一株鸡源嗜铅乳酸菌的筛选鉴定[J]. 山东农业科学, 2014, 46(2): 72-76, 81.
MAN ZH, DU QJ, JIANG YJ, GAO YF, FAN YH, LI FM, ZHAO HK. Isolation and identification of lead-resistant lactic acid bacteria from chicken[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2014, 46(2): 72-76, 81 (in Chinese).
- [13] 朱晓莹, 买日艳姆古丽, 古丽苏木·托呼逊, 努尔古

- 丽·热合曼. 酸驼乳中优势乳酸菌的胃肠道耐受特性研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 183-186.
- ZHU XY, MARYAMGUL, GULSUM·TOHSUN, NURGUL·RAHMAN. Study on the tolerance to gastrointestinal tract of the dominant lactic acid bacteria in traditional fermented camel milk-shubat[J]. Food Research and Development, 2012, 33(12): 183-186 (in Chinese).
- [14] 杨郁, 张丽靖, 天知诚吾. 乳酸菌耐酸机理的研究[J]. 食品工程, 2007(4): 42-45.
- YANG Y, ZHANG LJ, TIAN ZCW. Research of lactic acid bacteria's acid-resistant mechanism[J]. Food Engineering, 2007(4): 42-45 (in Chinese).
- [15] 吴慧昊, 段龙飞, 张园园, 牛锋. 熊猫粪便中乳酸菌的分离鉴定与降胆固醇作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(11): 14-18.
- WU HH, DUAN LF, ZHANG YY, NIU F. Isolation and identification of lactic acid bacteria and the study of cholesterol-reducing effect from panda excrement[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2011(11): 14-18 (in Chinese).
- [16] 印伯星. 副干酪乳杆菌的分离鉴定及肠道耐受性研究[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(5): 4-7.
- YIN BX. Isolation, identification, and growth tolerance characteristic of *Lactobacillus paracasei*[J]. China Dairy Industry, 2019, 47(5): 4-7 (in Chinese).
- [17] 肖新云, 刘又嘉, 邓艳玲, 谭周进. 伯顿毕赤酵母菌在酸性及胆盐环境的抗逆性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(6): 655-658.
- XIAO XY, LIU YJ, DENG YL, TAN ZJ. Resistance of *Pichia burtonii* in acid and bile salt environment[J]. Chinese Journal of Microecology, 2016, 28(6): 655-658 (in Chinese).
- [18] 王京京, 徐海燕, 汪孟娟, 徐鹏, 陈红. 戊糖片球菌的耐酸及耐胆盐能力研究[J]. 广东饲料, 2014, 23(8): 24-25.
- WANG JJ, XU HY, WANG MJ, XU P, CHEN H. Study on the acid and bile salt resistance of *Pediococcus pentosaceus*[J]. Guangdong Feed, 2014, 23(8): 24-25 (in Chinese).
- [19] 孟丽, 唐善虎, 杨蓉生, 刘亮. 两株干酪乳杆菌生物学特性的研究[J]. 中国乳业, 2008(12): 44-46.
- MENG L, TANG SH, YANG RS, LIU L. Study on biological characteristics of two strains of *Lactobacillus casei*[J]. China Dairy, 2008(12): 44-46 (in Chinese).
- [20] 关小莺, 温靖, 肖更生, 徐玉娟, 吴继军, 余元善, 邹波. 干酪乳杆菌发酵荔枝汁在模拟胃肠道中耐受能力及其抑菌性的研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(4): 96-102.
- GUAN XY, WEN J, XIAO GS, XU YJ, WU JJ, YU YS, ZOU B. Antimicrobial activity of the litchi juice fermented by *Lactobacillus casei* and the strain's tolerance in simulated gastrointestinal tract[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(4): 96-102 (in Chinese).
- [21] 王津, 杨燕萍, 王叶琛, 周志江, 韩焯, 郑成江, 范寰. 母猪粪便中乳酸菌菌株体外益生特性初步研究[J]. 中国饲料, 2014(14): 20-24.
- WANG J, YANG YP, WANG YC, ZHOU ZJ, HAN Y, ZHENG CJ, FAN H. A preliminary study on the probiotic characteristics of lactic acid bacteria strains *in vitro* from sow feces[J]. China Feed, 2014(14): 20-24 (in Chinese).
- [22] 徐云凤, 张欣, 褚泽军, 张萌, 张敏, 陈俊亮. 一株具有高效抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 12-14, 21.
- XU YF, ZHANG X, CHU ZJ, ZHANG M, ZHANG M, CHEN JL. Isolation, identification and growth characteristics of a strain of lactic acid bacteria with efficient antimicrobial activity[J]. Food & Machinery, 2021, 37(3): 12-14, 21 (in Chinese).
- [23] MULAW G, SISAY TESSEMA T, MULETA D, TESFAYE A. *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products[J]. International Journal of Microbiology, 2019: 7179514.
- [24] ADESULU-DAHUNSI AT, JEYARAM K, SANNI AI. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based Nigerian fermented food products[J]. Food Control, 2018, 92: 225-231.
- [25] OH YJ. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from *Omegisool*, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 63(1): 437-444.
- [26] SAKANDAR HA, KUBOW S, SADIQ FA. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers[J]. LWT, 2019, 104: 70-75.
- [27] 温贺, 肖凤艳, 段翠翠, 高磊, 赵玉娟, 牛春华, 赵权, 李盛钰. 植物乳杆菌 Sc52 益生特性评价及其在降血糖产品中的应用[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 148-154.
- WEN H, XIAO FY, DUAN CC, GAO L, ZHAO YJ, NIU CH, ZHAO Q, LI SY. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Sc52 and its

- application in a hypoglycemic product[J]. Food Science, 2018, 39(6): 148-154 (in Chinese).
- [28] WANG C, CUI YH, QU XJ. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria[J]. Archives of Microbiology, 2018, 200(2): 195-201.
- [29] de KOK TCM, van FAASSEN A, GLINGHAMMAR B, PACHEN DMFA, RAFTER JJ, BAETEN CGMI, ENGELS LGJB, KLEINJANS JCS. Bile acid concentrations, cytotoxicity, and pH of fecal water from patients with colorectal adenomas[J]. Digestive Diseases and Sciences, 1999, 44(11): 2218-2225.
- [30] GILLILAND SE, WALKER DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans[J]. Journal of Dairy Science, 1990, 73(4): 905-911.
- [31] 王帅, 贺羽, 贺斌. 自然发酵泡菜中高体外抗氧化活性乳酸菌的筛选及其对模拟胃肠道环境的耐受性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 93-97, 103.
WANG S, HE Y, HE B. Screening of high antioxidant activity lactic acid bacteria in traditional fermented pickles and its tolerance to simulated gastrointestinal environments[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 93-97, 103 (in Chinese).
- [32] 蒙月月, 陆婧婧, 占萌, 霍贵成. 植物乳杆菌 KLDS 1.0318 产酸、耐酸、耐胆盐能力及其免疫特性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 70-76.
MENG YY, LU JJ, ZHAN M, HUO GC. Study on the acid producing ability, acid and bile salt tolerance of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0318 and its immunologic properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(15): 70-76 (in Chinese).
- [33] 宫路路, 龚福明, 李晓然, 熊骏, 柳陈坚. 豆豉中高产乳酸菌的筛选及其产酸条件的优化研究[J]. 中国微生物学杂志, 2013, 25(5): 516-520.
GONG LL, GONG FM, LI XR, XIONG J, LIU CJ. Screening of high-yield lactic acid bacteria from 'douchi' and optimization of its lactic acid producing conditions[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(5): 516-520 (in Chinese).
- [34] 胡斌, 田丰伟, 张灏, 陈卫. 植物乳杆菌脂肪酸构成与胆盐耐受性的相关性分析[J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 27-32.
HU B, TIAN FW, ZHANG H, CHEN W. Correlation analysis of the relationship between fatty acid composition and bile resistance in *Lactobacillus plantarum* strains[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(9): 27-32 (in Chinese).
- [35] 胡爱华, 敖晓琳, 陈岑, 蒲彪, 陈安均, 姜欢笑. 乳酸菌耐酸耐胆盐机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 380-383, 389.
HU AH, AO XL, CHEN C, PU B, CHEN AJ, JIANG HX. Research progress on mechanism of lactic acid bacteria acid and bile salt resistance[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 380-383, 389 (in Chinese).
- [36] CHARTERIS WP, KELLY PM, MORELLI L, COLLINS JK. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(5): 759-768.
- [37] 张珍, 李波清. 乳酸菌主要代谢产物及其作用研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2012, 35(4): 274-276.
ZHANG Z, LI BQ. Research progress on main metabolites of lactic acid bacteria and their functions[J]. Journal of Binzhou Medical University, 2012, 35(4): 274-276 (in Chinese).
- [38] 韩墨, 王燕, 杨志鹏, 张志伟, 王婷. 内蒙古传统酸奶乳酸菌的筛选及体外益生效果评价[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(1): 152-156.
HAN M, WANG Y, YANG ZP, ZHANG ZW, WANG T. Screening of lactic acid bacteria in traditional yoghurt of Inner Mongolia and evaluation of its benefit *in vitro*[J]. Food Research and Development, 2018, 39(1): 152-156 (in Chinese).
- [39] 史晓萌, 陈建国, 李生有, 程池. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌 CICC 6238 的诱变选育及益生特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 71-77.
SHI XM, CHEN JG, LI SY, CHENG C. Mutation breeding of *Lactobacillus plantarum* CICC 6238 for γ -aminobutyric acid production and analysis of probiotic properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(8): 71-77 (in Chinese).
- [40] 云月英, 徐娟, 张小利. 4 株乳酸菌对模拟胃肠环境的耐受性及生长特性研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 53-56.
YUN YY, XU J, ZHANG XL. Tolerance to simulated gastrointestinal environment and growth characteristics of four strains of lactic acid bacteria[J]. China Brewing, 2018, 37(3): 53-56 (in Chinese).