

乳酸菌对酸和胆碱盐的耐受能力

The Tolerance of Lactic Acid Bacteria to Acid and Choline Salts

李琴心，齐益宁，陈雨薇，尹佳*

生命科学学院，湖南师范大学，长沙，湖南省

*通讯作者邮箱: jiayin@hunnu.edu.cn

摘要：益生菌菌株的理想特性之一是在低 pH 值和牛胆汁的存在下生存和生长，同时需要通过胆盐的胃酸性环境和结肠碱性环境在小肠中生存。本文介绍了怎样评估乳酸菌对酸和胆碱的耐受能力以及在体外模拟胃肠道的环境下，通过比较低 pH 环境和高胆汁浓度环境，评价乳酸菌菌株作为益生菌的可行性。

关键词：乳酸菌，耐酸耐胆碱性，模拟胃肠道，体外

材料与试剂

1. 离心管
2. 胰蛋白胨（生工，A505250）
3. 酵母粉（生工，A515245 酵母提取物）
4. 氯化钠（上海沪试）
5. 琼脂（生工，A505255）
6. LB 肉汤培养基（生工，A507002）
7. MRS 肉汤培养基（赛默飞，CM1175）
8. pH 计
9. 0.45 滤膜
10. 胰蛋白酶（国药，64008860）
11. 胃蛋白酶（生工，A600688-0100）
12. 牛胆碱（西格玛，B8631）
13. 生理盐水（医用）

仪器设备

- 30 1. 量筒
- 31 2. 玻璃棒
- 32 3. 离心机（艾本德 5424）
- 33 4. 紫外分光光度计（北京普析）
- 34 5. 90mm 塑料培养皿（biosharp BS-90-D）
- 35 6. 纯水制备仪（ELGA PURELAB 系列）
- 36 7. 移液器（Eppendorf Research plus 单道固定量程移液器）
- 37 8. 吸头（生工，F601227）
- 38 9. 烘箱（天津泰斯特 101-0AB 型电热鼓风干燥箱）
- 39 10. 厌氧培养箱（Whitley, DG250）
- 40 11. 超净工作台（天津泰斯特，CJ-2D）
- 41 12. 10 μ l 接种环（生工，F619312）
- 42 13. 高压灭菌锅（上海庆开，GI54TW）
- 43 14. 冰箱（美菱）
- 44 15. 摇床（Eppendorf ThermoMixer C 恒温混匀仪）

45

46 软件

- 47 1. Excel

48

49 实验步骤

50 一、益生菌的引种

- 51 1. 实验用的乳酸菌可以是自然界或者经加工的产品中分离出来，需保证菌种的纯洁
- 52 性，无微生物污染。确定菌种之后，可以提取基因组 DNA，结合 PCR 及 DNA
- 53 测序，BLAST 分析进一步确认菌种的纯度，检测其生长情况，是否传代正常。

54 二、测试益生菌对酸和胆碱的耐受能力

55 1. 试剂的配制

- 56 1.1 用 1M HCl 分别调节 MRS 培养液的 pH 值至 2.0, 3.0, 4.0, 115 °C 高压蒸汽
- 57 灭菌 20 min，保温至合适温度备用。

1.2 在 MRS 液体培养基中分别加入 0%、0.1%、0.3%和 0.5% (w/v)的牛胆碱，充分振荡，使牛胆碱完全溶解。灭菌，保温至合适温度备用。

2. 菌种的准备

2.1 从 - 80 °C冰箱将菌保取出置于冰盒中，用无菌接种环采用平板划线的方式将菌种接种到 MRS 固体培养基上，于 37 °C恒温箱倒置过夜培养。

2.2 注意：菌保拿出后要及时放回去，以免损失菌的活性。

2.3 从平板上挑取单克隆。用灭菌牙签或者枪头挑取平板上由单个菌生长成的单菌落，置于装有 1 ml 培养基的 1.5 ml 或者 2.0 ml 的微型离心管里，摇晃牙签或吹打混匀菌液，并做好标记，将离心管放于 37 °C，900 rpm 的恒温混匀仪上培养。

2.4 菌种活化。18 h 后，吸取 100 μl 菌液转移至含 900 μl MRS 液体培养基的微型离心管中继续培养 18 h，重复此操作两次。目的是提高乳酸菌活性。

2.5 扩大培养。将在微型离心管中培养的菌液转入装有 50 ml MRS 液体培养基的灭菌小锥形瓶中，37 °C培养箱培养 18 h。

注：全过程都要在超净工作台上进行，需要严格无菌操作。

3. 检测对酸和胆盐的耐受程度

3.1 将已保温的调节好 pH 的培养液和加入了牛胆碱的 MRS 培养液放入超净工作台，每种培养液分装 900 μl × 3 管至灭菌的微型离心管中，并做好标记。

3.2 将小锥形瓶中的菌液倒入已灭菌的离心管中，充分混匀，每个离心管中接入适量菌液，使菌液在 OD = 600 nm 下的吸光度在 0.2 - 0.8 之间（此区间内 OD 值与浓度成正比例），振荡混匀，放入培养箱中培养 12 h。

3.3 以未接菌液的培养液为对照，测量培养 12 h 后菌液的 OD 值

3.4 计算成活率：Survival (%) = OD（实验组）× 100%/ OD（对照组）^[1]

4. 体外模拟胃肠道检测对酸和胆碱盐的耐受性

4.1 将培养的实验菌株以 3000 rpm 的速度离心 10 min，弃上清，重悬于等体积模拟胃液中并立即进行平板活菌计数，37 °C培养 3 h 后第二次进行平板活菌计数。

4.2 将耐酸 3 h 后的菌悬液以 3000 rpm 的速度离心 10 min，弃上清，重悬于等体积的模拟肠液中，37 °C 培养 2 h 进行平板活菌计数，继续培养 2 h 进行最后一次平板活菌计数。^[2]

注：平板上所长菌落需在 30 - 300 之间才为有效。

结果与分析

1. 检测对酸和胆盐的耐受程度

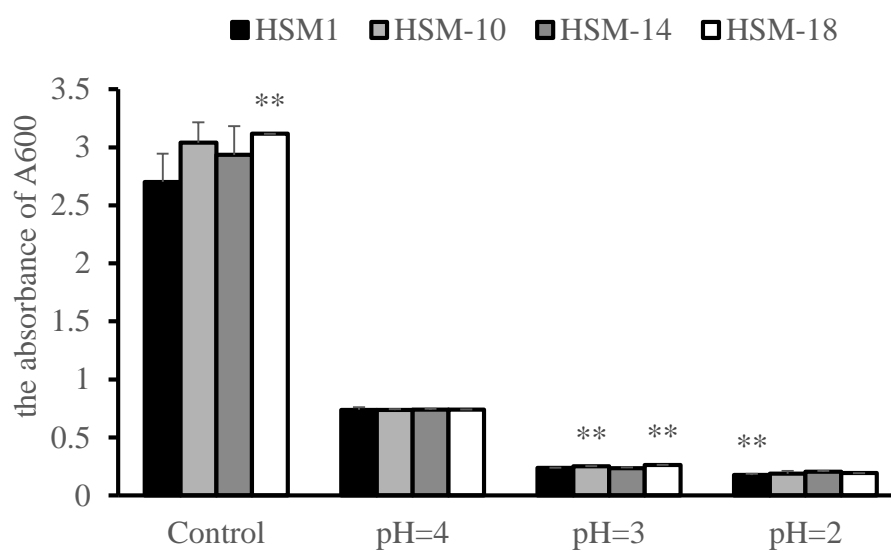


图 1. 4 株乳酸菌在酸性 pH 条件下培养 12 h 后的存活状况^[3]

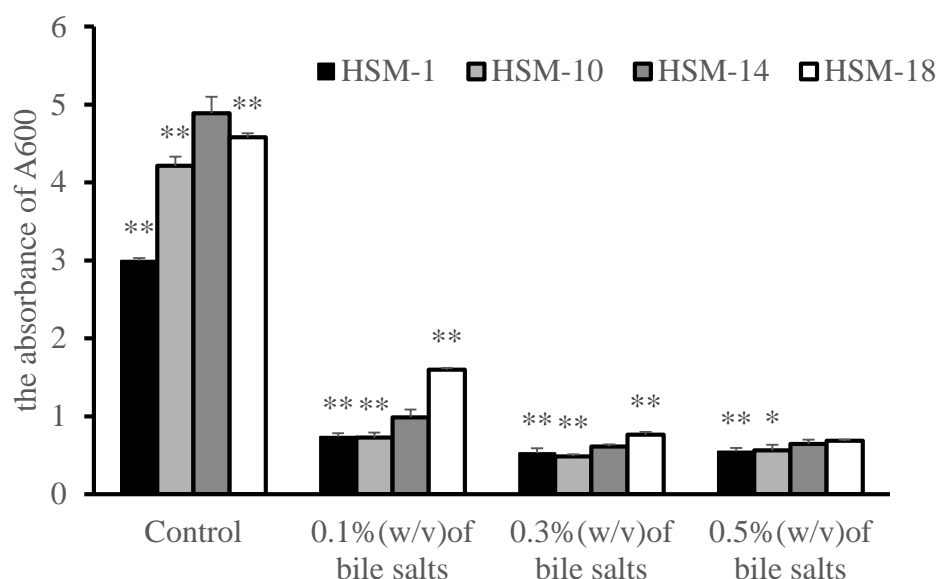


图 2. 4 株乳酸菌在不同胆碱盐条件下培养 12 h 的存活情况^[3]

1.1 在低 pH 值和牛胆汁存在下存活和生长是乳酸菌益生菌菌株可取的特性。人的大肠含有胆盐，其浓度在 0.3% ~ 0.5% 之间。一般来说，胃液的 pH 值取决于摄食时间和饮食，可能在 1.5 ~ 4.5 之间变化。在低 pH 值和牛胆汁存在下的生长和存活被认为是未来益生菌菌株最理想的特性。

1.2 乳酸菌菌株在 2.0、3.0 和 4.0 的 pH 条件下，37 °C 在 MRS 液体培养基中培养 12 h，以确定其耐酸能力(图 1)。HSM-1、HSM-10、HSM-14 和 HSM-18 在 pH 4.0 的 MRS 条件下生长效果最好(分别为 27.33%、24.27%、25.22% 和 23.75%)。将 MRS 液体培养基的 pH 为 3.0 时，存活率为 8% ~ 9%，继续降低 MRS 液体培养基 pH 为 2.0 时，存活率为 6% ~ 7%。为了评估受试乳酸菌菌株对胆碱盐的耐受性，四株菌株分别用 0.1%，0.3% 和 0.5% 的牛胆碱处理，并在 37 °C 孵育 12 h。四株菌株对不同浓度的牛胆碱均有抗性。随着牛胆碱的增加，细菌存活率下降(图 2)。

1.3 综上所述，HSM-1、HSM-10、HSM-14 和 HSM-18 在低 pH 和牛胆汁条件下均有生长和存活的能力，表明这些菌株能够耐受胃肠道环境条件。

2. 体外模拟胃肠道检测对酸和胆碱盐的耐受性

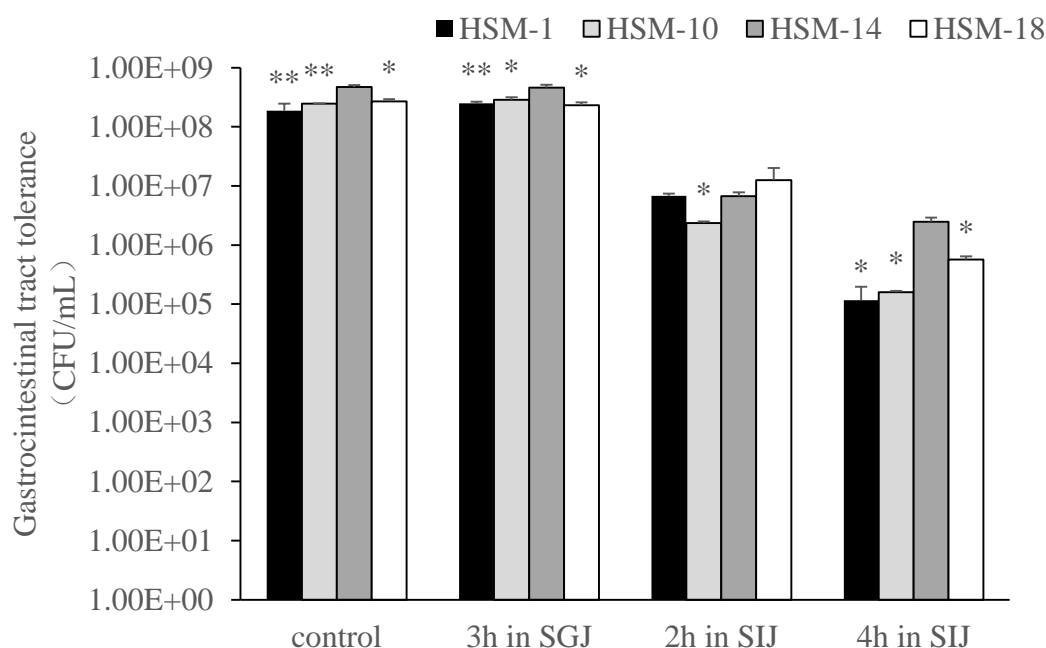


图 3. 4 株乳酸菌在体外模拟胃肠道条件下的存活情况^[3]

2.1 益生菌需要通过胃的酸性环境和结肠的碱性环境抵抗胆盐在小肠中生存。胃液 pH 在 3.0 左右，胃消化可以持续 3 h。根据前期研究报道，筛选益生菌耐酸性的标准是在 pH 为 3.0 的条件下持续培养 3 h。人胆汁的生理浓度在 0.3% ~ 0.5% 之间，食物通过小肠的时间约为 4 h，胆汁的平均浓度为 0.3%。通过模拟胃肠道环境，比较低 pH 环境和高胆汁浓度环境，评价实验菌株作为益生菌的可行性。

2.2 4 株乳酸菌菌株经过 3 h 的模拟胃液处理和 4 h 的模拟胰液处理后的存活率如图 3 所示。这 4 株乳酸菌菌株在模拟胃液中培养 3 h 后存活率都很高。结果显示，随着培养时间的增长，四株乳酸菌的存活率下降。

2.3 在 pH 3.0 时，HSM-1 和 HSM-10 的存活率分别提高了 0.125Log₁₀ CFU/mL 和 0.064Log₁₀ CFU/mL，生存率高于 100%，而 HSM-14 和 HSM-18 的存活率分别降低了 0.012Log₁₀ CFU/mL 和 0.065Log₁₀ CFU/mL。此外，所有 4 株乳酸菌菌株在模拟胰液中存活率均下降。暴露于模拟胰液 4 h 后，HSM-1 的存活率下降最大，约为 3.208 Log₁₀ CFU/mL，其次是 HSM-10 下降 3.186

Log₁₀ CFU/ml SM-14 和 HSM-18 分别下降 2.28Log₁₀ CFU/ml .674Log₁₀ CFU/ml 这四种菌株中，HSM-1 对胆盐最耐受。鉴于不同的生存率，HSM-14 的变异趋势最小，说明其在模拟胃肠道环境中生存能力最强。

溶液配方

1. MRS 固体培养基 1000 mL

序号	试剂	质量/体积
1	MRS培养基粉末	52 g
2	琼脂粉	14.4 g

2. MRS 液体培养基 1000 mL

序号	试剂	质量/体积
1	MRS培养基粉末	52 g

注：MRS 培养基灭菌温度为 115 °C、20 min，锥形瓶等灭菌温度为 120 °C、20 min。

3. 模拟胃液 100 ml

序号	试剂	质量/体积
1	生理盐水	100 mL
2	0.1 mol/L HCl	1.01 mL
3	胃蛋白酶	0.3 g

注：用调节生理盐水（质量分数为 0.9%）的 pH 至 3.0，灭菌后加入胃蛋白酶，由于生理盐水的实际 pH 值与理论 pH 可能不一致，实际用于调节 pH 所用的 0.1 mol/L HCl 的量与理论可能存在偏差。

4. 模拟胰液 100 ml:

序号	试剂	质量/体积
1	生理盐水	100 mL
2	0.1 mol/L NaOH	1.01 mL
3	牛胆碱	0.9 g
4	胰蛋白酶	0.1 g

注：调节生理盐水（质量分数为 0.9%）的 pH 至 8.0，灭菌后加入胰蛋白酶，随后加入牛胆碱并使其充分溶解。由于生理盐水的实际 pH 值与理论 pH 可能不一致，实际用于调节 pH 所用的 0.1 mol/L NaOH 的量与理论可能存在偏差。

致谢

感谢国家自然科学基金青年项目（31700004），全国大学生平台创新和创业培训项目(S 202010542046)，湖南省科技厅创新人才与平台计划（2019RS5001），湖南创新型省份建设专项经费（2019RS3022）的支持。

参考文献

1. Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W. and Zheng, X. D. (2016). [Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese.](#) *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17 (8), 597–609.
2. Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P. (2005). [Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars.](#) *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3060-3067.
3. Chen, T., Wang, L., Li, Q., Long, Y., Lin, Y., Yin, J., Zeng, Y., Huang, L., Yao, T., Abbas, M. N. et al. (2020). [Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk.](#) *BMC microbiology*, 20(1), 228.