

乳酸菌的耐热实验

Heat Resistance Test of Lactic Acid Bacteria

陈雨薇¹, 李琴心¹, 齐益宁¹, 尹佳^{1*}

¹ 动物肠道功能调控湖南省重点实验室, 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: 耐热性是乳酸菌运用于生产的一个十分重要的指标, 确定益生菌的热稳定性和优化热阈值具有重要意义, 在工业应用中具有较好的前景。益生菌即在高温下具有较高的生存率则更具有工业优势, 有利于应用于生产。耐热实验将一株细菌菌液分别置于一个温度梯度下, 处理一定时间后, 根据生存率判断细菌的耐热程度。

关键词: 耐热, 乳酸菌, 温度梯度, 稀释涂布法, 生存率

材料与试剂

1. 涂布器
2. 离心管 (1.5 ml, 15 ml)
3. MRS 肉汤培养基 (赛默飞, CM1175)
4. 琼脂 (生工, A505255)
5. PBS 缓冲液 (国药, HYSH3025601)
6. MRS 固体培养基 (见溶液配方)
7. MRS 液体培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 量筒
2. 玻璃棒
3. 涂布器
4. 移液枪
5. 恒温水浴锅 (江苏荣华仪器, HH-4)
6. 90 mm 塑料培养皿 (biosharp BS-90-D)

- 31 7. 纯水制备仪 (ELGA PURELAB 系列)
- 32 8. 吸头 (生工, F601227)
- 33 9. 烘箱 (天津泰斯特 101-0AB 型电热鼓风干燥箱)
- 34 10. 厌氧培养箱 (Whitley, DG250)
- 35 11. 超净工作台 (天津泰斯特, CJ-2D)
- 36 12. 10 μ l, 20 μ l 接种环 (生工, F619312)
- 37 13. 高压灭菌锅 (上海庆开, GI54TW)
- 38 14. 冰箱 (美菱)
- 39 15. 摇床 (Eppendorf ThermoMixer C 恒温混匀仪)

40

41 实验步骤

42 一、制备细菌悬液 (以下操作均于超净工作台上进行)

- 43 1. 将待测菌株从-80 °C 冰箱取出置于冰盒上, 用无菌接种环采用连续划线的方式将待
- 44 测菌株接种于普通的 MRS 固体培养基上以分离得到单菌落, 将培养皿于 37 °C 厌
- 45 氧培养箱中倒置培养 24 h。
- 46 2. 从厌氧培养箱中取出培养皿, 用灭菌后的牙签或枪头挑取平板上由单个菌生长成的
- 47 单菌落, 接种于装有 1 ml MRS 液体培养基的微型离心管 (1.5 ml 或 2.0 ml) 中,
- 48 轻轻摇晃牙签或枪头至混匀, 盖上微型离心管盖子。 (谢凤珍等, 2014)。做好标记
- 49 置于 37 °C 厌氧培养箱中静置培养 12 h, 直至 OD₆₀₀ 约为 3.0。
- 50 3. 将步骤 2 培养后的菌液震荡混匀, 取 100 μ l 菌液转移至装有 900 μ l MRS 液体培养
- 51 基的微型离心管中, 做好标记, 于 37 °C 厌氧培养箱继续培养 18 小时, 为了保证
- 52 乳酸菌的活性。重复此操作两次, 直至 OD₆₀₀ 约为 3.0。
- 53 4. 将步骤 3 培养后的菌液震荡混匀, 取 1ml 菌液转移至装有 30 ml MRS 液体配养
- 54 基的灭菌小锥形瓶中, 轻轻混匀置于 37 °C 厌氧培养箱培养 24 h, 直至 OD₆₀₀ 约为
- 55 3.0。
- 56 5. 取 10 ml 锥形瓶中菌液至 15 ml 离心管中, 盖上盖子颠倒混匀, 再取 15 ml 离心管
- 57 中的菌液 1.5 ml 于 2.0 ml 微型离心管中, 共四管。分别编号为 1, 2, 3, 4。

58 注: 不能直接取用锥形瓶中的菌液, 避免上下层菌液不均匀影响实验结果。

59 二、将菌液进行热处理

将编号为 1, 2, 3, 4 的菌液分别至于预调到 37 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C 的水浴锅中处理 5 min, 处理后立即放在冰盒中。

注: 处理温度和时长可根据细菌的耐受情况进行适当调整。

三、测定存活细菌数

1. 用灭菌 PBS 缓冲液对菌液进行梯度稀释至 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} (周平等, 2014)。取热处理的菌液 100 μ l 置于装有 900 μ l 灭菌 PBS 缓冲液的微型离心管中,
2. 取适当稀释倍数的菌液 10 μ l, 用无菌接种环或涂布器将菌液均匀涂布于 MRS 固体培养基上, 待干燥后将培养皿于 37 °C 厌氧培养箱中倒置培养 24 h。每个热处理组 3 个重复, 试验后将处理后的菌液置于 4 °C 冰箱中保存。
3. 观察平板上的菌落生长情况, 检查是否被污染 (一个平板内是否有两种或两种以上的形态的菌落), 观察三个重复中菌落数是否差别很大。如有上述两种情况的任一种, 则需重新进行实验。平板中菌落数在 30-300 即为有效, 结果取平均值为实验结果。

四、计算生存率

$$\text{Survival (\%)} = \text{CFU/ml (t)} \times 100 / \text{CFU/ml (t}_0\text{)}$$

结果与分析

1. 耐热实验结果

本实验待测菌为 HSM-1, HSM-10, HSM-14, HSM-18 四株乳酸菌。热处理后 HSM-1 表现出最高的存活率, 其次是 HSM-10 和 HSM-14。50 °C 热处理 5 min 后, HSM-1 存活率为 74.6%, HSM-10 和 HSM-14 的生存率分别为 57.5% 和 32.7%, 而 HSM-18 的热处理后存活率最低为 9.0%。60 °C 热处理 5 min 后, HSM-1 存活率为 74.2%。HSM-10 和 HSM-14 的生存率分别下降到 14.4% 和 11.6% (Chen *et al.*, 2020)。在 70 °C 热处理后, 菌株存活率下降不到 1%。这些结果表明, 在 50 °C 和 60 °C 条件下, 与其他三种菌株相比, HSM-1 具有更好的耐热性, 更利于工业化应用。

表 1. 四种乳酸菌体外耐热实验结果 (Chen *et al.*, 2020)

Strain	Heat-treatment		
	50 °C	60 °C	70 °C
HSM-1	74.6%	74.2%	0.2%
HSM-10	57.5%	14.4%	0.1%
HSM-14	32.7%	11.6%	0.4%
HSM-18	9.0%	0.0%	0.0%

失败经验

一、失败原因

1. 操作过程中没有严格地无菌操作。
2. 细菌活化程度低，导致后期生长速度太慢。
3. 细菌接种后菌落数太多或太少，使实验结果不精确。

二、补救经验

1. 若平板染菌则重新用储存在 4 °C 冰箱的的菌液重新稀释涂布于 MRS 固体培养基进行实验
2. 把握细菌培养时间，取对数期生长的细菌进行实验。
3. 稀释倍数和处理时间根据不同菌的特点进行预试验摸索。

溶液配方

1. MRS 固体培养基配方 (1,000 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 液体培养基配方 (1,000 ml)

序号	试剂	质量/体积
----	----	-------

MRS 培养基灭菌温度为 115 °C、20 min。

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 (S202010542046), 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. 谢凤珍,华承伟,牛宏阳.(2014).[耐热木聚糖酶源细菌筛选、鉴定及酶学性质](#)[J].河南科技学院学报(自然科学版),42(05):7-10.
2. 周平,罗惠波,黄丹,邓波,王庆,黄治国,卫春会,邓杰.(2016).[中高温大曲中一株耐热细菌的分离鉴定及其风味代谢产物分析](#)[J].食品工业科技,37(24):215-220.
3. Chen,T.,Wang,L.,Li,Q.,Long,Y.,Lin,Y.,Yin,J.,Zeng,Y.,Huang,L.,Yao,T.,Abbasi,M.N.,Yang,H.,Wang,Q.,Tang,C.,Khan,T.A.,Liu,Q.,Yin,J.,Tu,Q.,&Yin,Y.(2020).[Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk.](#) *BMC microbiology* 20(1), 228.