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

**实验步骤**

一、制备细菌悬液 (以下操作均于超净工作台上进行)

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厌氧培养箱中倒置培养24 h。
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，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)。做好标记置于37 °C厌氧培养箱中静置培养12 h，直至OD600约为3.0。
3. 将步骤2培养后的菌液震荡混匀，取100 μl菌液转移至装有900 μl MRS液体培养基的微型离心管中，做好标记，于37 °C厌氧培养箱继续培养18小时，为了保证乳酸菌的活性。重复此操作两次，直至OD600约为3.0。
4. 将将步骤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3.0。
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。

*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。*

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100μl置于装有900μl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 μl，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 ℃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

Survival (%) =CFU/ml (t) ×100/CFU/ml (t0)

**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 ℃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 |

1. MRS液体培养基配方 (1,000 ml)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **序号** | **试剂** | **质量/体积** |
| **1** | MRS培养基粉末 | 52 g |

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](http://www.cqvip.com/QK/96963A/201405/663212219.html)[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](http://www.cqvip.com/QK/92916X/201624/670789970.html)[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).[Functionalprobiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk.](https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-020-01920-6) *BMC microbiology* 20(1), 228.