

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.01.039

航天诱变高产酸副干酪乳杆菌 A-4-2 性质与酶活性研究

文鹏程¹ 隋馨瑶¹ 孙二娜² 赵亮^{2,3} 任发政^{1,2} 王莹¹

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;
3. 河北省畜产食品工程技术研究中心, 三河 065200)

摘要: 以航天诱变副干酪乳杆菌 A-4-2 为研究对象, 采用扫描电镜、低 pH 值、荧光定量 PCR (聚合酶链式反应) 等方法对诱变菌株进行了形态学、耐受性、产胞外多糖含量及 β -半乳糖苷酶基因表达量等研究。比较了突变菌株和出发菌株的耐酸、耐胆盐、产胞外多糖、表面疏水性等性能变化和差异以及 β -半乳糖苷酶基因表达量的变化。结果表明, 突变菌株形态学观察结果与野生菌株无明显差异; 在 pH 值 3.5 培养 1 h 与 2 h, 突变菌株较野生菌株的存活率显著升高 ($P < 0.05$); 发酵 7 d 后菌株耐酸能力评价结果显示, 不同 pH 值条件下, 突变菌株的活菌数均显著高于野生菌株 ($P < 0.05$), 且耐胆盐及产胞外多糖的能力均未受到影响, 但菌株表面疏水性显著降低; 突变菌株 β -半乳糖苷酶活性和基因表达量, 均显著高于出发菌株 ($P < 0.05$)。同时, 证明了 β -半乳糖苷酶活性与菌株产酸有密不可分的关系。

关键词: 副干酪乳杆菌; 产酸; β -半乳糖苷酶; 航天诱变

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)01-0346-08

Characteristics and Enzyme Activity of *Lactobacillus paracasei* A-4-2 Produced by Space Mutation

WEN Pengcheng¹ SUI Xinyao¹ SUN Erna² ZHAO Liang^{2,3} REN Fazheng^{1,2} WANG Ying¹

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

3. Research Center of Animal Husbandry and Food Engineering, Sanhe 065200, China)

Abstract: The space mutagenesis *Lactobacillus paracasei* A-4-2 with excellent acid production capability, which was preserved in the laboratory, was selected as the object. The characteristics of A-4-2, including morphology, tolerance, extracellular polysaccharide content and gene expression of β -galactosidase were measured by electron microscopy, low pH value and fluorescence quantitative PCR. The differences of the acid resistance, bile salt, extracellular polysaccharide, surface hydrophobicity and gene expression of β -galactosidase were also evaluated between wild strains and mutant ones. The results showed that there was no significant difference of the morphology between the mutant strain and the wild ones. The survival rate of mutant strain was significantly higher than that of wild one ($P < 0.05$), which was cultivated for 1 h or 2 h at pH value of 3.5. For the acid capacity evaluation of fermentation strains after 7 d cultivation at different pH values, mutant strain on the number of living bacterium was significantly higher than that of wild one ($P < 0.05$), however, the ability of acid resistance, bile salt and extracellular polysaccharide was not changed, the surface hydrophobicity showed a significant decrease. The activities of β -galactosidase and gene expression were significantly higher than those of the original strain ($P < 0.05$). The results indicated that the activity of β -galactosidase was closely related to the acid production capability.

Key words: *Lactobacillus paracasei*; acid producing; β -galactosidase; space mutagenesis

收稿日期: 2018-07-25 修回日期: 2018-08-27

基金项目: 伏羲青年英才培育计划项目(Gaufx-02Y01)、企业研究转化与产业化专项(2018-SF-C29)和甘肃农业大学青年导师基金项目(GAU-QNDS-201717)

作者简介: 文鹏程(1982—),男,副教授,博士,主要从事乳品科学与加工研究,E-mail: wenpch@126.com

通信作者: 任发政(1962—),男,教授,博士生导师,主要从事乳品科学研究,E-mail: renfazheng@263.net

0 引言

航天诱变技术又称“空间诱变技术”,它是利用返回式卫星将植物种子送入太空,利用其特殊的环境,对种子进行多项诱变处理,改变种子自身的基因,从而获得有益突变^[1],有利于选育出变异幅度大的特异的菌种新品种。随着研究的深入,我国利用航天诱变技术开发新产品已经具备一定优势,其研究水平已经位居世界前列。近年来,利用航天育种技术已经培育出 80 多个农作物新品种,并已经投入生产^[2]。魏丽勤等^[3]通过返回式卫星,对泰乐菌素的最终产量进行了空间诱变,测定了弗氏链霉菌产泰乐菌素比出发菌株增加了 74.6%。周方方等^[4]通过空间诱变的方法,将干酪乳杆菌 LC2W 在胞外多糖上进行筛选,通过筛选得到了高产胞外多糖的 3 个菌株(LC2W-1、LC2W-2、LC2W-3),并将其进行了遗传稳定性的测定,结果表明,这 3 株菌的胞外多糖产量相对出发菌株增加了 41.78%、26.15%、32.40%,胞外多糖质量浓度达到 191.48、170.36、178.81 mg/L,且具有良好的遗传稳定性。李雄超等^[5]将干酪乳杆菌 G5 送上太空,利用神舟八号飞船进行太空搭载,使菌株进入太空,产生突变。经过诱变后的菌株,进行了高产胞外多糖的筛选,获得了 2 株高产胞外多糖的乳酸菌,经过诱变后的菌株胞外多糖的产量分别提高了 1.9、1.7 倍。

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)属于益生菌菌种。该菌种分布范围广,在奶酪、酸奶以及泡菜中均有发现,也存在于人体的口腔及肠道中^[6],可有效抑制有害细菌的生长繁殖,维持肠道的生态平衡和正常功能。同时,它可以降低胆固醇含量,增强免疫反应,控制腹泻、缓解乳糖不耐受,抑制肠道病原菌,是一种益生菌菌种^[7-9]。

副干酪乳杆菌 L105 是课题组从云南大理的乳扇中进行分离筛选后又经过耐酸、耐氧适应性驯化得到的。副干酪乳杆菌 L105 搭载于“神舟十一号”飞船经过 33 d 后返回。本文研究航天诱变筛选得到的高产酸菌株 A-4-2 的生长特性、形态学特性、耐受性及 β -半乳糖苷酶活性、基因表达量,以期为该菌株的应用提供一定科学基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源

研究对象为副干酪乳杆菌 A-4-2,该菌株是副干酪乳杆菌 L105 经航天诱变后筛选得到的高产酸菌株。副干酪乳杆菌 L105(出发菌株)为从云南

大理的乳扇中进行分离筛选的副干酪乳杆菌 L9(野生菌株)进行耐酸、耐氧适应性驯化后得到的,该菌株具有良好的发酵性能。

1.1.2 培养基

MRS(乳酸细菌培养基)液体培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 20 g,牛肉膏 10 g,酵母浸粉 5 g,磷酸氢二钾 2 g,柠檬酸二铵 2 g,无水乙酸钠 5 g,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)0.58 g,硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$)0.2 g,吐温 80(Tween-80) 1 mL,蒸馏水 1 L,调节 pH 值至 6.5。

MRS 固体培养基:培养基成分同液体培养基,1 L 添加琼脂 15 g。

MRS 耐胆盐培养基:MRS 液体培养基中胆盐含量根据试验要求添加。

以上培养基均 121℃ 灭菌 15 min;12% 脱脂乳培养基,110℃ 灭菌 10 min;保护剂为 12% 脱脂乳中加入 30% 甘油。

1.1.3 主要仪器及设备

XSZ-4G 型显微镜,COIC 公司;TGL-16B 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;LDZM 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;DELTA320 型 pH 计,METTLER-TOELDO 公司;H1850R 型台式高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;DK-98-II2KW 型洁净工作台,天津泰斯特仪器公司;UV-2102PC 型紫外-可见分光光度计,上海 Unico 公司;DNP-9082 型电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;Bioscreen C 型全自动生长曲线分析仪,芬兰 Bioscreen 公司;JY96-N 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技有限公司;N203 型组织研磨器,美国 Biospec 公司;Model-680 型自动酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;LightCycler 96 型实时荧光定量 PCR(聚合酶链式反应)仪,罗氏诊断产品(上海)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株形态学鉴定

革兰氏染色:将筛选出来的高产酸菌株 A-4-2 与 L9、L105 接种、活化后,分别等量接种于 pH 值为 6.5 的 MRS 液体培养基中,在有氧条件下 37℃ 连续培养 12 h 后,进行革兰氏染色,电子显微镜观察。

透射电镜:将菌株 A-4-2 与 L9、L105 接种、活化后,分别等量接种于 pH 值为 6.5 的 MRS 液体培养基中,在有氧条件下 37℃ 连续培养 12 h 后,进行透射电镜样品处理:取大量样品离心(转速 3 000~4 000 r/min),去除上清液,加入适当 pH 值(7.2~7.4)的 0.1 mol/L PBS(磷酸盐缓冲液)清洗

3次,清洗时菌体悬浮;2.5%戊二醛固定3h,用PBS清洗2次,每次10min。再用纯水清洗2次,用透射电镜Tecnai G2 F20 S-TWIN型(200kV)观察。

1.2.2 菌株保藏

经过鉴定后,确定为副干酪乳杆菌的菌株,将其接种在新鲜的pH值6.5的MRS液体培养基中,将其放入37℃恒温培养箱中,培养12h左右,将培养后的菌液在超净工作台中进行转移,将其转移至10mL离心管中离心10min(4200~4500r/min),弃去上清液,加入保护剂2mL,充分混匀,用移液枪吸取1mL分装于1.5mL离心管中,于-20℃中保存^[10]。

1.2.3 菌株生长曲线测定

将菌株A-4-2与L9、L105接种、活化2代后,按1%接种量分别接种于pH值为6.5的MRS液体培养基中,用Bioscreen C型全自动生长曲线分析仪,在有氧条件下37℃连续培养24h,测定波长600nm处菌悬液的光密度,绘制600nm处光密度(OD值)对培养时间的生长曲线^[11]。

1.2.4 菌株耐酸能力评价

低pH值下菌株致死率:待测菌株接种、活化后,按1%接种量分别接种于pH值为6.5的MRS培养基中,在有氧条件下37℃连续培养16h后,离心收集菌体,将菌体沉淀分别接入pH值为3.5、3.0和2.5的MRS培养基中,并在37℃下分别培养0、2、4h时,对菌株进行平板计数,计算菌株致死率。每组试验至少有3个重复^[12]。

发酵7d后菌株耐酸能力评价:将待测菌株进行37℃静置12h活化后,按1%接种量分别接种于12%的脱脂乳培养基中,放入37℃恒温培养箱中,连续发酵7d后,将发酵乳样品充分混匀,并吸取1mL样品分别加到pH值为3.5、3.0、2.5的MRS液体培养基中,37℃下分别培养0、2、4h时进行活菌计数。每组试验至少有3个重复。

1.2.5 菌株耐胆盐能力评价

待测菌株接种、活化后,按1%接种量分别接种于pH值为6.5的MRS培养基中,在有氧条件下37℃连续培养16h后,离心收集菌体,将菌体沉淀分别接入胆盐质量分数为0.1%、0.2%和0.3%的MRS胆盐培养基中,37℃下分别培养0、1、2、3、4h,对菌株进行平板计数计算菌株致死率。每组试验至少有3个重复^[12-13]。

1.2.6 菌株产胞外多糖能力评价

(1) 胞外多糖的分离与含量测定

将待测菌株经37℃静置12h活化后,按1%的接种量接种于10mL质量分数12%的脱脂乳培养

基中,放入37℃恒温培养箱中,连续发酵7d,在发酵1、3、5、7d时取发酵乳样品10mL,向其加入3mL 16g/(100mL)的三氯乙酸溶液,放入4℃冰箱放置2h后,10000g离心30min,取上清液备用;取6mL上清液,并加入等体积的无水乙醇,4℃静置12h;将混合液10000g离心30min,取沉淀,采用苯酚-硫酸法测定多糖的含量^[14-18]。

(2) 葡萄糖标准曲线的绘制

用万分之一天平称取葡萄糖0.10g,于100mL容量瓶中,加入少量蒸馏水溶解,定容摇匀。从100mL容量瓶中,分别吸取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mL葡萄糖溶液,加入10mL容量瓶中,定容摇匀。蒸馏水做空白对照。吸取不同浓度的标准溶液1mL,于室温(20℃)下在其中加入5%苯酚1mL并摇匀,再快速加入5mL浓硫酸。待反应结束溶液冷却至室温时,用紫外分光光度计于490nm处测其吸光度。空白样以1mL蒸馏水按照同样的步骤进行^[19-20]。获得标准曲线方程式为: $y = 0.009x + 0.136, R^2 = 0.999$ 。

(3) 样品中胞外多糖含量的测定

取1mL样液,于室温下在其中加入5%苯酚1mL并摇匀,再快速加入5mL浓硫酸。待反应结束溶液冷却至室温时,用紫外分光光度计于490nm处测定吸光度,根据标准曲线计算样品中胞外多糖含量。

1.2.7 菌株表面疏水性评价

待测菌株接种、活化后,1%接种量分别接种于pH值为6.5的MRS培养基中,在37℃恒温培养箱中,于有氧条件下连续培养12h后,离心(4200~4500r/min,10~17min)弃去上清液,将菌体沉淀用PBS溶液(pH值7.2)洗涤两次,重悬于0.1mL/L KNO₃(pH值6.2)中,将菌悬液菌体浓度调整为 1×10^8 CFU/mL,同时测定菌悬液在600nm处的吸光度A₀。取上述3mL菌悬液与1mL二甲苯混合,室温放置10min后漩涡混合2min,再于室温下放置20min,测定600nm处水相的吸光度A₁。表面疏水性指数以细菌黏附有机溶剂的百分率A来表示,计算公式为^[21]

$$A = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

1.2.8 菌株β-半乳糖苷酶活力测定

(1) 发酵过程中乳糖酶提取

将活化后的待测菌株按1%接种量接入12%脱脂乳培养基中,37℃连续发酵7d。分别取发酵1、3、5、7d的酸奶样品10mL,用1mol/L NaOH中和至pH值6.5,加入1%的柠檬酸三钠以使酪蛋白胶束溶解,离心(4℃,10000g,10min),弃去上清液;将

菌体细胞沉淀用 PBS 磷酸缓冲溶液 (pH 值 6.5) 洗涤 3 次, 得菌体沉淀。将菌体细胞悬浮于 0.01 mol/L PBS (pH 值 6.5) 中, 进行超声破碎, 注意将样品始终保持在冰浴中, 离心 (4℃, 12 000 g, 5 min), 得酶提取液, 待测酶活^[22]。

(2) 样品中 β -半乳糖苷酶活力测定

ONP (邻-硝基苯酚) 标准曲线制作参照文献^[23]。浓度梯度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14 $\mu\text{mol/mL}$, 按下面方法制备: 准确称取 139 mg ONP 于 1 000 mL 容量瓶中, 用 10 mL 95% 的乙醇溶解, 用水稀释定容, 混匀。用移液管分别取 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 mL 上述配制溶液, 分别加到 100 mL 容量瓶中, 每个容量瓶中加入 25 mL Na_2CO_3 溶液 (50 g Na_2CO_3 和 37.2 g EDTA (乙二胺四乙酸) 于 1 000 mL 容量瓶中, 少量水溶解稀释), 用磷酸盐缓冲液稀释, 混匀。以水作空白, 用 10 mm 比色杯在 420 nm 下测定每个 ONP 标准溶液的吸光度, 以 ONP 浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 方程式为: $y = 0.006x + 0.003$, $R^2 = 0.998$ 。

采用 ONPG (临-硝基酚- β -D-吡喃半乳糖苷) 为酶作用底物, 生成有色产物 ONP, 通过比色法测定, 每个时间点样品做 3 个重复, 每次重复测定 3 次后取平均值。反应体系: 50 mmol/L PBS (pH 值 6.5)、1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L 2-巯基乙醇、2.32 mmol/L ONPG 和 2 mg/mL 酶提取液, 37℃ 水浴反应 30 min, 在 420 nm 波长处测定吸光度。在此条件下, 每分钟从底物 ONPG 中释放出 1 μmol ONP 所需的酶量定义为一个酶活单位 (U)。酶提取液蛋白浓度测定参照试剂盒进行, 标准曲线方程式为: $y = 0.561x - 0.002$, $R^2 = 0.995$ 。

1.2.9 菌株 β -半乳糖苷酶基因表达量测定

酸奶样品中 RNA 提取: 经活化的菌株按 1% 接种量接入 12% 脱脂乳中, 37℃ 连续发酵 7 d。分别取发酵 1、3、5、7 d 的酸奶样品 10 mL, 加入 20 mL 1% EDTA (pH 值 12.0) 混匀, 离心 (4℃, 10 000 g, 10 min), 弃去上清液; 将菌体细胞沉淀用磷酸缓冲溶液 (pH 值 6.5) 洗涤 1 次, 得菌体沉淀。每个时间样品做 3 个重复。核酸提取参照 VANDECASTEELE 等^[24]的方法进行。提取的核酸样品用 70% 预冷乙醇洗涤, 离心 (4℃, 12 000 g, 5 min), 弃上清液, 室温干燥 5 ~ 10 min, 加入 20 μL DEPC (焦炭酸二乙酯) 水测浓度。并立即用 abm 反转录试剂盒合成 cDNA。

引物的设计和合成: 选取 16S rDNA 作为内参基因, 实时荧光定量 PCR 的引物根据美国国立生物

技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库中的基因序列, 采用 NCBI 中 BLAST 在线引物合成软件进行设计, 由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

β -半乳糖苷酶基因扩增引物: 上游引物 5'-ATGGAAT TCTGGGACGGCTG-3'; 下游引物 5'-TAGGAAGTCACTTGCGGCAG-3'。16S rDNA 内标引物: 上游引物 5'-TCTTGGCTGAAAGATGGCGT-3'; 下游引物 5'-TTGCTCCATCAGACTTGCGT-3'。

实时荧光定量 PCR: 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR, 采用 20 μL 反应体系: cDNA 模板 1 μL 、上下游引物各 1 μL 、dd H_2O 7 μL 、SYBR Premix 试剂 10 μL ; real-time PCR 反应程序: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, (95℃ 15 s, 58℃ 30 s, 40 个循环), 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 30 s。每个样品设定 3 个平行, 每次平行试验做 3 次生物学重复。采用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算基因的表达量^[25], 利用内参基因扩增的 C_t 值进行校正, 以发酵 1 d 样品的 β -半乳糖苷酶基因表达量为参照, 计算其它样品中 β -半乳糖苷酶基因的相对表达量 $F = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta\Delta C_t$ 表示处理样本和对照样本间校正过的循环数变化量。

1.2.10 数据统计分析

全部试验数据采用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 19.0 数据处理系统进行分析, 运用 ANOVA 进行统计学分析, 平均值由 3 个重复值所得。所有单因素方差检验均采用 Duncan's 新多变域测定法, 且用 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株形态学鉴定结果

按照 1.2.1 节的方法, 对菌株进行了形态学观察。结果如图 1、2 所示, 电子显微镜结果显示, 3 株菌形态均呈杆状, 排列方式呈链状, 并无明显差别; 透射电镜结果也显示, 3 株菌形态并无明显差别。

2.2 菌株生长曲线评价

为了解突变菌株的生长情况, 测定了突变菌株 A-4-2 与 L105、L9 在 600 nm 处 27 h 的光密度 (OD 值), 结果如图 3 所示。副干酪乳杆菌 27 h 培养过程中培养时间与 OD 值的关系: 0 ~ 12 h 期间, OD 值不断提高, 培养 16 h 时达到对数稳定期, 此后曲线趋于平缓, 曲线呈 S 型。经过统计分析得到, A-4-2 突变菌株在有氧条件下的生长情况基本与野生株 L9 保持一致, 表明了其产酸性能提高的同时, 又不失其原有生长特性。

2.3 菌株耐酸能力评价

根据 1.2.4 节的方法对出发菌株 L105 和突变

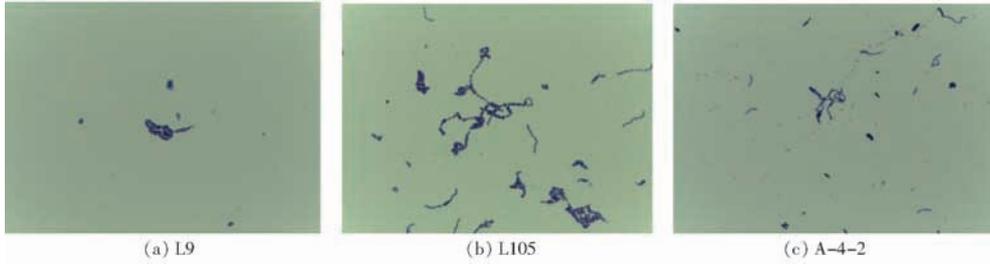


图1 革兰氏染色显微镜观察

Fig.1 Microscopic observation of gram stain

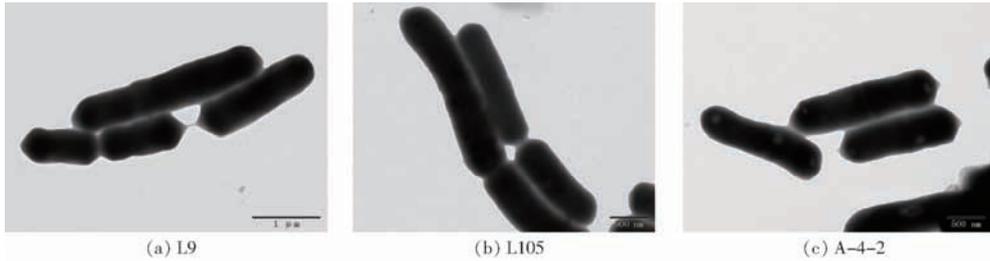


图2 透射电镜观察结果

Fig.2 Observation result of transmission electron microscope

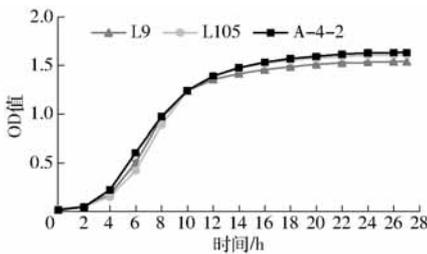


图3 副干酪乳杆菌27 h生长曲线

Fig.3 Growth curves of *Lactobacillus paracasei* for 27 h

株A-4-2的耐酸能力进行比较,结果如表1所示。在不同pH值的培养液中,活菌数明显有所下降,说

明在酸性环境下,副干酪乳杆菌的生长受到了抑制,对菌体代谢活动多需的营养物质以及能量有所减少,对菌体的存活产生了一定的影响。如表1所示,在pH值3.5培养1h与2h,突变株较野生株的存活率显著升高($P < 0.05$),而在pH值3.0与pH值2.5条件下,突变株与野生株各时间存活率在pH值3.0培养1h和2h及pH值2.5培养1h有显著差异($P < 0.05$),其他培养时间无明显差异,且存活率较低,说明突变株维持了良好的耐酸能力。

表1 副干酪乳杆菌不同pH值条件下菌株存活情况

Tab.1 Survival of *Lactobacillus paracasei* under different pH value conditions

pH值	菌株名称	初始菌体浓度/ (lgCFU·mL ⁻¹)	1 h 菌体浓度/ (lgCFU·mL ⁻¹)	1 h 存活率/%	2 h 存活率/%
3.5	L105	(8.97 ± 0.03) ^a	(8.69 ± 0.03) ^c	(80.65 ± 1.40) ^e	(52.69 ± 1.04) ^d
	A-4-2	(8.91 ± 0.03) ^a	(8.73 ± 0.03) ^c	(89.02 ± 2.67) ^f	(65.85 ± 1.04) ^e
3.0	L105	(8.95 ± 0.03) ^a	(8.24 ± 0.03) ^b	(32.13 ± 0.21) ^c	(19.66 ± 0.05) ^b
	A-4-2	(8.90 ± 0.03) ^a	(8.39 ± 0.03) ^b	(48.10 ± 0.21) ^d	(30.89 ± 0.05) ^c
2.5	L105	(8.96 ± 0.03) ^a	(5.40 ± 0.03) ^a	(8.70 ± 0.01) ^a	(0.03 ± 0.02) ^a
	A-4-2	(8.91 ± 0.03) ^a	(5.37 ± 0.03) ^a	(10.49 ± 0.01) ^b	(0.09 ± 0.02) ^a

注:每列相同字母表示不同菌株间无显著性差异;每列不同字母表示不同菌株间有显著性差异且 $P < 0.05$,下同。

根据1.2.4节发酵7d后菌株耐酸能力评价的方法对突变菌株发酵7d后的耐酸能力进行评价,如表2所示。0h时,突变株的活菌菌体浓度为8.28 lgCFU/mL,在pH值为3.5的培养基中培养2h后,活菌有所下降,达到8.20 lgCFU/mL,而在pH值为3.0和2.5的培养基中,菌数下降得更为明显,分别为8.17 lgCFU/mL和8.01 lgCFU/mL,同时结果显示,培养2h和4h后,不同pH值条件下,突

变菌株的活菌数均显著高于野生菌株L9 ($P < 0.05$)。说明突变菌株在发酵7d后,在酸性环境下的生长能力受到明显的抑制。

2.4 菌株耐胆盐能力评价

益生菌潜在的另一个重要特性是它们能够存活于人类小肠内的胆汁中,在大肠中定植并繁殖。本研究对野生株L9和突变株A-4-2的耐胆盐能力进行比较,结果如表3所示。在不同胆盐浓度的

表 2 副干酪乳杆菌发酵 7 d 后不同 pH 值下菌株存活情况

Tab.2 Survival of *Lactobacillus paracasei* under different pH value conditions after 7 d fermentation

pH 值	菌株名称	初始菌体浓度/(lgCFU·mL ⁻¹)	2 h 菌体浓度/(lgCFU·mL ⁻¹)	4 h 菌体浓度/(lgCFU·mL ⁻¹)
3.5	L105	(8.04 ± 0.01) ^a	(7.99 ± 0.01) ^c	(7.86 ± 0.01) ^c
	A-4-2	(8.28 ± 0.01) ^b	(8.20 ± 0.02) ^d	(8.15 ± 0.02) ^c
3.0	L105	(8.04 ± 0.01) ^a	(7.83 ± 0.03) ^b	(7.76 ± 0.01) ^b
	A-4-2	(8.28 ± 0.01) ^b	(8.17 ± 0.02) ^d	(7.95 ± 0.02) ^d
2.5	L105	(8.04 ± 0.01) ^a	(7.74 ± 0.03) ^a	(7.54 ± 0.04) ^a
	A-4-2	(8.28 ± 0.01) ^b	(8.01 ± 0.02) ^c	(7.80 ± 0.04) ^{bc}

表 3 副干酪乳杆菌不同胆盐浓度下菌株存活情况

Tab.3 Survival of *Lactobacillus paracasei* under different bile salt concentrations

胆盐质量分数/%	菌株名称	初始菌体浓度/(lgCFU·mL ⁻¹)	2 h 菌体浓度/(lgCFU·mL ⁻¹)	1 h 存活率/%	2 h 存活率/%
0.1	L105	(8.98 ± 0.03) ^a	(8.61 ± 0.03) ^e	(78.95 ± 1.40) ^d	(43.16 ± 1.04) ^d
	A-4-2	(8.92 ± 0.03) ^a	(8.56 ± 0.03) ^e	(83.33 ± 2.67) ^e	(42.86 ± 1.04) ^d
0.2	L105	(8.94 ± 0.03) ^a	(8.37 ± 0.03) ^c	(52.27 ± 0.21) ^c	(26.82 ± 0.05) ^b
	A-4-2	(8.88 ± 0.03) ^a	(8.45 ± 0.03) ^d	(53.95 ± 0.21) ^c	(37.37 ± 0.05) ^c
0.3	L105	(8.96 ± 0.03) ^a	(7.11 ± 0.03) ^a	(19.57 ± 0.01) ^a	(1.40 ± 0.02) ^a
	A-4-2	(8.91 ± 0.03) ^a	(7.45 ± 0.03) ^b	(28.27 ± 0.01) ^b	(3.51 ± 0.02) ^a

培养液中,副干酪乳杆菌 L105 活菌数随胆盐浓度的升高数量减少,副干酪乳杆菌在高胆盐浓度条件下生长受到抑制。由表 3 可知,0.1% 胆盐条件下培养 2 h,突变株与野生株存活率基本相同,且存活率保持在 40% 左右;相比于含 0.1% 胆盐的培养条件,0.2% 与 0.3% 胆盐含量的两株菌存活率明显下降 ($P < 0.05$),说明胆盐对于副干酪乳杆菌的生长有抑制作用。在胆盐环境培养 2 h 过程中,仅 0.2% 胆盐时,突变株存活率显著高于野生株,其他浓度突变株与野生株的存活率无显著性差异,说明航天诱变没有降低副干酪乳杆菌对胆盐的耐受能力。

2.5 菌株产胞外多糖能力评价

乳酸菌胞外多糖 (EPSs) 通常以与细菌细胞表面相关联的胶囊或分泌到周围介质中的粘液两种形式存在。近年来由于其独特的物理化学性质引起了相当多的关注^[26]。EPSs 可直接应用于发酵乳制品,以增强其质地和流变特性^[27]。将菌株所制备的发酵乳样品进行胞外多糖的测定。突变菌株 A-4-2 具有较高的产胞外多糖的能力,其胞外多糖产量为 419.78 mg/L。相比而言,出发菌株 L105 的胞外多糖产量为 415.11 mg/L,而突变菌株 A-4-2 的产胞外多糖能力比出发菌株 L105 略高。因此,说明航天诱变没有降低副干酪乳杆菌产胞外多糖的能力。

2.6 菌株表面疏水性评价

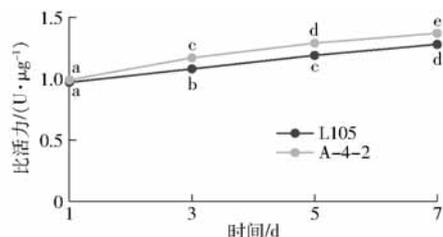
益生菌可有效调节人体免疫系统,这种能力与益生菌的黏附能力相关^[28],而对益生菌黏附能力的研究中发现,菌株的表面疏水性可以影响其黏附能

力,并且是重要的因素之一^[29]。表面疏水性越高,细菌黏附能力越强^[30]。

本文测定了突变菌株与 L105 对二甲苯的疏水能力。突变菌株与 L105 疏水性存在显著差异 ($P < 0.05$)。通常,高度疏水性的菌株具有很强的附着细胞的能力。但有研究表明,一株菌株对细胞的黏附率为 40%,而该菌株的表面疏水能力极低。因此,疏水性可以促进粘附,但强疏水性并不是强粘附的必要条件。

2.7 菌株 β -半乳糖苷酶活力评价

经过全基因组测序后,并没有发现其中与产酸相关的基因发生突变。为了进一步研究产酸提高的原因,本试验对其产酸关键酶,即 β -半乳糖苷酶进行了研究。测定了副干酪乳杆菌发酵 7 d 内的 β -半乳糖苷酶比活力,结果如图 4 所示。

图 4 β -半乳糖苷酶比活力Fig.4 β -galactosidase specific activity

发酵 7 d 内, β -半乳糖苷酶比活力呈明显上升趋势,随着发酵时间的延长而逐渐增大 ($P < 0.05$)。虽然出发菌株与突变菌株酶比活力都呈现上升趋势,突变菌株酶比活力增长的速率显著高于出发菌株 ($P < 0.05$)。发酵 7 d 后,突变菌株的酶活力显著

高于出发菌株 L105 ($P < 0.05$), 这与试验前期测定的滴定酸度的变化保持一致。由图 4 可知, 发酵 1 d 时, 菌株的产酸能力以及酶活力较低, 可能是由于发酵初期, 菌株经发酵产生的一部分 β -半乳糖苷酶与培养基中的乳糖产生反应, 形成了酶复合物, 从而使乳糖得到分解, 生成葡萄糖和半乳糖, 致使 β -半乳糖苷酶的活力较低^[31-32]。随着发酵时间的逐渐延长, 菌株产生的 β -半乳糖苷酶活力逐渐增强, 促进了发酵过程中低聚糖的产生, 随着时间增长, 代谢过程中的低聚糖逐渐增加, 当累积到一定值时, 可充当益生元, 进而对菌体生长起到促进作用, 提升了菌株细胞内 β -半乳糖苷酶的活力, 最终提高了菌株的产酸能力。

2.8 菌株 β -半乳糖苷酶基因表达量评价

为了更进一步研究产酸提高的原因, 从基因水平采用实时荧光定量 PCR 的方法, 对菌株在发酵过程中 β -半乳糖苷酶基因表达量进行了研究, 如图 5 所示。将发酵 1 d 的 β -半乳糖苷酶基因的表达量作为对照, 发现随着菌株发酵时间的延长, β -半乳糖苷酶基因的表达量呈现明显的上升趋势; 发酵 7 d 后, 各菌株中的 β -半乳糖苷酶基因表达量与发酵初期相比, 上升了 1 倍左右 ($P < 0.05$); 同时, 还发现在发酵过程中, 突变菌株的变化曲线一直高于出发菌株。这种结果与之前测定的酶活力呈现对应关系,

并与滴定酸度的结果保持一致。

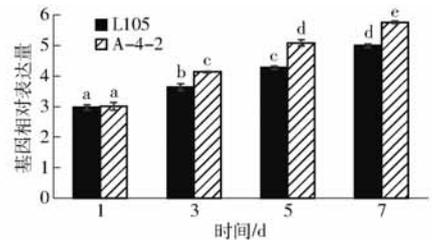


图 5 菌株 β -半乳糖苷酶基因相对表达量
Fig. 5 Gene expression changes of β -galactosidase gene by real-time PCR

3 结束语

本文将筛选获得的突变菌株 A-4-2 进行了形态学观察、生长曲线的测定、耐酸性、耐胆盐能力、胞外多糖含量以及表面疏水性的研究, 结果表明, 经过革兰氏染色、电子显微镜观察以及透射电镜观察, 发现与出发菌株相比突变菌株在形态学上没有明显变化; 经航天诱变后的高产酸菌株耐胆盐、产胞外多糖能力均与野生株无显著差异, 诱变菌株产酸能力及 β -半乳糖苷酶基因表达量升高, 通过进行 β -半乳糖苷酶活性和基因表达量的测定, 探究产酸提高的原因。研究结果有效证明了 β -半乳糖苷酶活性与产酸有密不可分的关系, 为菌株的广泛应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 王浩, 牛颜冰. 航天育种机理的研究进展[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2009, 29(2): 119-122.
WANG Hao, NIU Yanbing. The progresses in mechanism of spaceflight breeding[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2009, 29(2): 119-122. (in Chinese)
- [2] 柴小琴, 张建华, 郑宇宇. 航首 1 号航天二次搭载 SPI 代的农艺性状变异[J]. 草业科学, 2016, 33(9): 1788-1792.
CHAI Xiaoqin, ZHANG Jianhua, ZHENG Yuyu. Research on the variation of 'Hangmu 1' agronomic characters in SPI generation by re-onboard in space[J]. Pratacultural Science, 2016, 33(9): 1788-1792. (in Chinese)
- [3] 魏丽勤, 方晓梅, 李宁梅, 等. 太空搭载泰乐菌素高产菌株的选育[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 1-7.
WEI Liqin, FANG Xiaomei, LI Ningmei, et al. Selection of a high-yield strain of tylosin after space piggyback experiment[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(1): 1-7. (in Chinese)
- [4] 周方方, 吴正钧, 陈臣. 太空搭载高产胞外多糖乳酸菌菌株的选育及其发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 35-38.
ZHOU Fangfang, WU Zhengjun, CHEN Chen. Screening of mutant with high production of exopolysaccharide after spaceship-carried experiment and optimization of its fermentation condition[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(6): 35-38. (in Chinese)
- [5] 李雄超, 张卫兵, 梁琪, 等. 高产胞外多糖干酪乳杆菌的太空诱变选育[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 185-193.
LI Xiongchao, ZHANG Weibing, LIANG Qi, et al. Mutation of *Lactobacillus casei* with high production of exopolysaccharides by space mutagenesis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(18): 185-193. (in Chinese)
- [6] CAI H, RODRIGUEZ B T, ZHANG W, et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity[J]. Microbiology, 2007, 153: 2655-2665.
- [7] MISHRA V, PRASAD D N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103: 109-115.
- [8] 柴红玉, 王潇, 卢富山, 等. 乳酸链球菌和干酪乳杆菌混合培养抑菌性的研究[J]. 江西农业学报, 2015, 27(2): 85-87.
CHAI Hongyu, WANG Xiao, LU Fushan, et al. Study on bacteriostatic activity of mixed cultivation of *Streptococcus lactis* and *Lactobacillus casei*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2015, 27(2): 85-87. (in Chinese)
- [9] WANG X, HUI Y, ZHAO L, et al. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* L9 attenuates PM2.5-induced enhancement of

- airway hyperresponsiveness and allergic airway response in murine model of asthma[J]. PLOS ONE, 2017,12(2): e0171721.
- [10] 李转羽,宋静颐,刘松玲,等.长双歧杆菌 BBMN68 菌株的耐氧驯化研究[J].中国乳业,2015(9):60-64.
LI Zhuanyu, SONG Jingyi, LIU Songling, et al. Oxytolerant domestication of *Bifidobacterium longum* BBMN68[J]. China Dairy,2015(9):60-64. (in Chinese)
- [11] 吕秀明,梁金钟.长双歧杆菌耐氧菌株选育及其高密度发酵条件的研究[J].食品工业科技,2016,37(7):159-163.
LÜ Xiuming, LIANG Jinzhong. Breeding of oxygen-resistant *Bifidobacterium longum* and its high-density fermentation conditions[J]. Science and Technology of Food Industry,2016, 37(7):159-163. (in Chinese)
- [12] PATLE A, PRAJAPATI J B, OLLE H, et al. Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products[J]. Food Bioscience,2013,5:27-33.
- [13] 刘丽莉,杨协力.发酵肉制品中乳酸菌菌种筛选研究[J].农业机械学报,2006,37(8):229-231.
- [14] BOUZAR F, CEMIN J, DESMAZEAUD M. Exopolysaccharide production and texture promoting abilities of mixed-starter cultures in yoghurts production[J]. Journal of Dairy Science,1997,80(10):2310-2317.
- [15] FRENGOVA G I, EMILINA D S, DORA M B, et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains[J]. Zeitschrift fur Naturforschung, C, A Journal of Biosciences,2002,57(9-10):805-810.
- [16] 罗玲泉,刘成国,黄永锋.酸乳中乳酸菌胞外多糖提取的研究[J].乳品加工,2006(12):55-58.
- [17] 刘先,康小红,孙军德.高产胞外多糖乳酸菌的筛选与初步鉴定[J].农产品加工(学刊),2010(3):38-40.
LIU Xian, KANG Xiaohong, SUN Junde. Screening and identification of lactic acid bacteria with high EPS-producing capacity [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing,2010(3):38-40. (in Chinese)
- [18] IBABE G, JAVIERAREIZAGA, ROSAA Z, et al. Screening and selection of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010,58:6149-6156.
- [19] PATEL S, GOYAL A. Isolation, characterization and mutagenesis of exopolysaccharide synthesizing new strains of lactic acid bacteria[J]. The Internet Journal of Microbiology,2010,8(1):1-12.
- [20] 刘芳,黄丹,陈永贵,等.一株高产胞外多糖乳酸菌的筛选与鉴定[J].中国乳品工业,2013,41(12):17-19.
LIU Fang, HUANG Dan, CHEN Yonggui, et al. Screening and identification of a lactic acid bacteria with high yield of extracellular polysaccharide[J]. China Dairy Industry,2013,41(12):17-19. (in Chinese)
- [21] KOS B, SUSKOVIC J, VUKOVIC S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. Journal of Applied Microbiology,2003,94(6):981-987.
- [22] 李转羽,刘松玲,任发政,等.副干酪乳杆菌 L9 的发酵性能驯化及其机理研究[J].中国食品学报,2016,16(7):90-96.
LI Zhuanyu, LIU Songling, REN Fazheng, et al. Studies on fermentation performance domestication and its mechanism of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 9[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2016,16(7):90-96. (in Chinese)
- [23] 马春丽,张兰威.高产酸性能乳酸菌的筛选及产酸机理研究[J].食品工业科技,2010,31(1):189-190.
MA Chunli, ZHANG Lanwei. Study on screening of high acid-producing strains and mechanism of acid-producing[J]. Science and Technology of Food Industry,2010,31(1):189-190. (in Chinese)
- [24] VANDECASTEELE S J, PEETERMANS W E, MERCKX R, et al. Use of gDNA as internal standard for gene expression in staphylococci in vitro and in vivo[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2002,291(3):528-534.
- [25] LIVAK K J, SCHNITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods,2001,25(4):402.
- [26] CAGGIANIELLO G, KLEEREBEZEM M, SPANO G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016,100(9):3877-3886.
- [27] ZANNINI E, WATERS D, COFFE A, et al. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016,100(3):1121-1135.
- [28] 张蓓.藏族传统曲拉制作过程中乳酸菌群变化及曲拉中益生性乳杆菌的筛选和功能性评价[D].郑州:郑州大学,2017.
ZHANG Bei. Study on variation of lactic acid bacteria during traditional Qula preparation and screening and function evaluation of probiotic lactobacillus from Qula[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University,2017. (in Chinese)
- [29] RAM C, CHANDER H. Optimization of culture conditions of probiotic bifidobacteria for maximal adhesion to hexadecane[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2003,19(4):407-410.
- [30] KANG C H, KIM Y G, HAN S H, et al. In vitro probiotic properties of vaginal *Lactobacillus fermentum* MG901 and *Lactobacillus plantarum* MG989 against *Candida albicans*[J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology & Reproductive Biology, 2018,228:232-237.
- [31] COLLADO M C, MERILUOTO J, SALMINEN S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains[J]. European Food Research and Technology,2008,226(5):1065-1073.
- [32] 李梦菲,孙庆惠,张彦,等.耐热乳酸菌的筛选及其 β 热半乳糖苷酶性质分析[J].食品工业科技,2015,36(18):209-213,218.
LI Mengfei, SUN Qinghui, ZHANG Yan, et al. Screening of heat tolerable lactic acid bacteria and characterization of their β -galactosidases[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015,36(18):209-213,218. (in Chinese)