

缓解铅毒性植物乳杆菌 CCFM8661 的微生物学性质及其应用的研究

田丰伟¹, 翟齐啸¹, 孙媛媛¹, 王刚¹, 张秋香¹, 张灏¹, 陈卫^{1,2*}

(1. 江南大学食品学院, 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要: **目的** 研究植物乳杆菌 CCFM8661 的微生物学性质和应用性质。**方法** 分析不同环境因素如温度、pH、食盐等对其的影响, 并探究植物乳杆菌 CCFM8661 用于发酵乳和发酵豆奶中的应用。**结果** 植物乳杆菌 CCFM8661 是一株嗜温性细菌, 最适生长温度在 32 ℃, 最适起始生长 pH 在 6.5。在液体 MRS 培养基中在 32 ℃ 条件下, 最大活菌浓度为 4.8×10^9 cfu/mL。CCFM8661 能耐受的最高食盐浓度为 8.5% (w/w)。CCFM8661 可以作为补充发酵剂用于酸乳制作, 对酸乳菌种的生长无抑制作用, 同时对酸乳产品的理化指标、感官与质构指标无有害影响。**结论** 植物乳杆菌 CCFM8661 在豆乳中生长和产酸良好, 可作为发酵剂用于酸豆乳的制作。

关键词: 植物乳杆菌 CCFM8661; 微生物学性质; 发酵乳; 发酵豆奶

A preliminary study of microbiological properties and applications of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661

TIAN Feng-Wei¹, ZHAI Qi-Xiao¹, SUN Yuan-Yuan¹, WANG Gang¹, ZHANG Qiu-Xiang¹, ZHANG Hao¹, CHEN Wei^{1,2*}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: Objective To investigate microbiological properties of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661. **Methods** The influence of different environmental factors such as temperature, pH, salt, etc., on *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 were discussed. Besides, the applications of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 for fermented milk and fermented soymilk were explored. **Results** The results showed that, *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 was a mesophilic bacteria, its optimum growth temperature was 32 ℃ and optimum initial growth pH was 6.5. In the condition of 32 ℃ in MRS liquid medium, the maximum viable cell concentration reached 4.8×10^9 cfu/mL. The highest salt concentration which CCFM8661 could tolerate was 8.5% (w/w). CCFM8661 could be used as a supplementary starter to fermented yogurt without inhibitory effects on yogurt bacteria, while it showed no harmful effects to physical and chemical indicators and sensory and textural index to the product. **Conclusion** *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 grew and produced acid well in soymilk, so it could be used as starter culture for the production of fermented soybean milk.

基金项目: 国家自然科学基金(31371721)、国家科技支撑计划(2013BAD18B01)、江苏自然科学基金(BK20131102)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (31371721), National Science and Technology Support Program (2013BAD18B01) and Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20131102)

*通讯作者: 陈卫, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: weichen@jiangnan.edu.cn

*Corresponding author: CHEN Wei, Professor, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China. E-mail: weichen@jiangnan.edu.cn

KEY WORDS: *Lactobacillus plantarum*; microbiological properties; fermented milk; fermented soy milk

1 引言

乳酸菌是一类革兰氏阳性、不产芽孢、不进行呼吸、分解糖类以乳酸为主要产物的多种异源细菌的统称^[1], 是益生菌的主要来源。乳酸菌的微生物学性质对食品的发酵加工具有重要的影响。乳酸菌的微生物学性质是由菌种本身的遗传特性所决定的, 同时受到环境因素的显著影响。乳酸菌的食品生物加工过程可以看作是乳酸菌与环境因素如温度、pH、食盐等相互作用的过程, 通过此过程以期达到生产特定性质的乳酸菌发酵食品。因此, 有必要深入了解一些新发现的乳酸菌的微生物学性质。本文将研究具有缓解铅暴露诱导氧化应激和毒性作用的专利植物乳杆菌 CCFM8661 的微生物学性质, 探究植物乳杆菌 CCFM8661 用于发酵乳和发酵豆奶中的应用, 为将植物乳杆菌 CCFM8661 用于食品生物加工积累数据和奠定基础^[2-4]。

2 材料与方法

2.1 材料试剂与仪器设备

植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* CCFM8661), 江南大学食品生物技术实验室菌种保藏中心提供。脱脂奶粉和全脂奶粉, 购自新西兰恒天然(Fonterra)集团公司; 普通酸乳发酵剂, 由光明乳业提供; 大豆, 购自无锡雪浪菜场。MRS 培养基, 购自青岛海博生物技术有限公司。MC 培养基, 用于发酵乳中嗜热链球菌的计数; 其他为实验室常规化学试剂与材料。

5415R 型 - 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司); SW-CJ-1CV 型微生物实验操作超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 320-S 型 pH 酸度计(梅特勒-托利多仪器公司); UV-2100 型紫外/可见分光光度计(尤尼科公司); NDJ/79 型粘度计(同济大学机电厂); Brookfield DV- II 型粘度计(美国 Brookfield Engineering Laboratories 公司); TA-XT2 质构仪(英国 Stable Microsystems 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 乳酸菌的培养

将待测试的乳酸菌菌株以 1% 接种量接入 MRS

液体培养基中, 置于 37 °C 厌氧培养箱中培养至对数期, 连续培养 2 代, 得到新鲜培养物, 备用。

2.2.2 温度和起始 pH 对生长的影响

将乳酸菌按接种量 1% (v/v) 接种到 MRS 液体培养基中, 分别置于不同温度(8 °C~48 °C)下于水浴培养箱中静置培养 18 h, 测定培养物在 620nm 波长处的 OD 值。将菌体按接种量 1% (v/v) 接种到不同起始 pH 值的 MRS 液体培养基中, 在 37 °C 温度下静置培养 18 h, 测定培养物在 620 nm 波长处的 OD 值^[5]。

2.2.3 乳酸菌生长曲线的测定

根据需要, 对培养物进行十倍系列稀释, 并采用标准平板计数法对培养物中的活菌数量进行计数。并测定不同时间的细菌活菌水平^[5]和滴定酸度^[6, 7]。

2.2.4 乳酸菌对 NaCl 耐受性的测定

按 0.1% (v/v) 接种量接入到含有不同质量分数(0%~9.5%) NaCl 的 MRS 培养基中, 置于 37 °C 静置培养 18 h, 观察培养物的产酸变色情况。

2.2.5 乳酸菌用于酸乳和酸豆乳制作、产品指标测定、评价和活菌计数

含 CCFM8661 酸乳的制作, 按照文献^[8]所述的方法制备酸乳。植物乳杆菌 CCFM8661 发酵酸豆乳的制作, 按照文献^[9]所述的方法制备豆乳和酸豆乳。滴定酸度按照文献^[6, 7]中总酸度的测定方法测定。粘度测定: 测定温度为 25 °C, 利用 NDJ-5S 型粘度计(10x 转子)测定发酵样品的粘度, 测定三次, 取算术平均值。发酵乳脱水收缩性, 按照文献^[6]中方法测定。产品其他质构特征按照文献^[10]所述的方法来进行。产品感官评价: 按照文献^[11]对酸乳进行感官评价; 按照文献^[12]对发酵酸豆乳进行感官评价。产品中乳酸菌的活菌计数按照国标《GB 4789.35-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》^[13]进行乳酸菌的活菌计数。

3 结果与讨论

3.1 温度对植物乳杆菌 CCFM8661 生长的影响

实验结果如图 1。从图中可以看出, 植物乳杆菌 CCFM8661 的生长温度范围在 10 °C~42 °C 之间, 具有一个较宽的生长温度谱, 最适生长温度为 32 °C 左右, 属于嗜温性微生物; 当温度低于 10 °C 时, 植物

乳杆菌 CCFM8661 无法生长, 其最低生长温度在 10 °C 左右; 当温度超过 42 °C 时, 植物乳杆菌 CCFM8661 无法生长, 其最高生长温度在 42 °C。

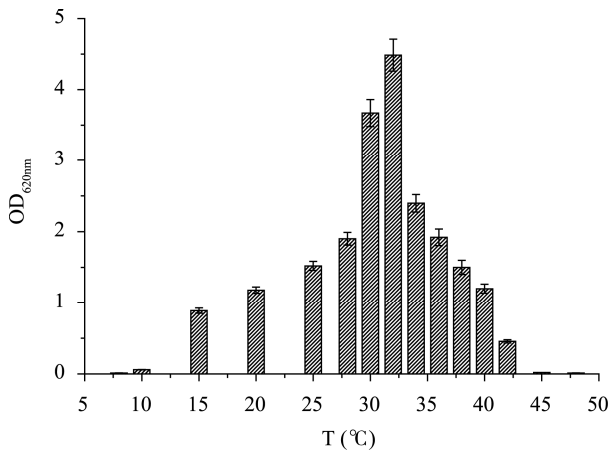


图 1 不同温度对植物乳杆菌 CCFM8661 菌株生长的影响
Fig. 1 Effects of different incubation temperatures on the growth of *L. plantarum* CCFM8661

3.2 培养基起始 pH 值对植物乳杆菌 CCFM8661 生长的影响

实验结果如图 2 所示。从图中可以看出, CCFM8661 的起始生长 pH 范围在 3.5~8.5 之间, 最适生长起始 pH 在 6.5 左右, 最低起始生长 pH 为 3.5, 最

高起始生长 pH 在 8.5。

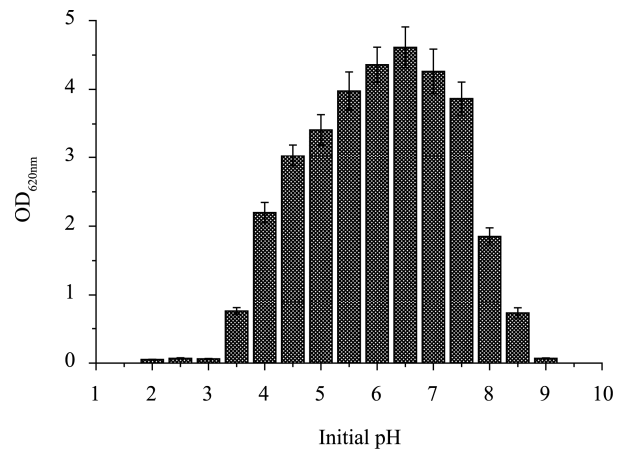


图 2 不同起始培养基 pH 值对 CCFM8661 菌株生长的影响
Fig. 2 Effects of different initial pHs on the growth of *L. plantarum* CCFM8661

3.3 植物乳杆菌 CCFM8661 在不同培养体系中的生长曲线

实验结果如图 3 所示。CCFM8661 在液体 MRS 培养基中生长周期较短, 生长速度快。在 0.1% 接种量水平下培养约 6 h 后即进入对数生长期, 培养 18 h 后即进入稳定期; 在液体 MRS 培养基中 CCFM8661 最大活菌数可以达到 4.8×10^9 cfu/mL。

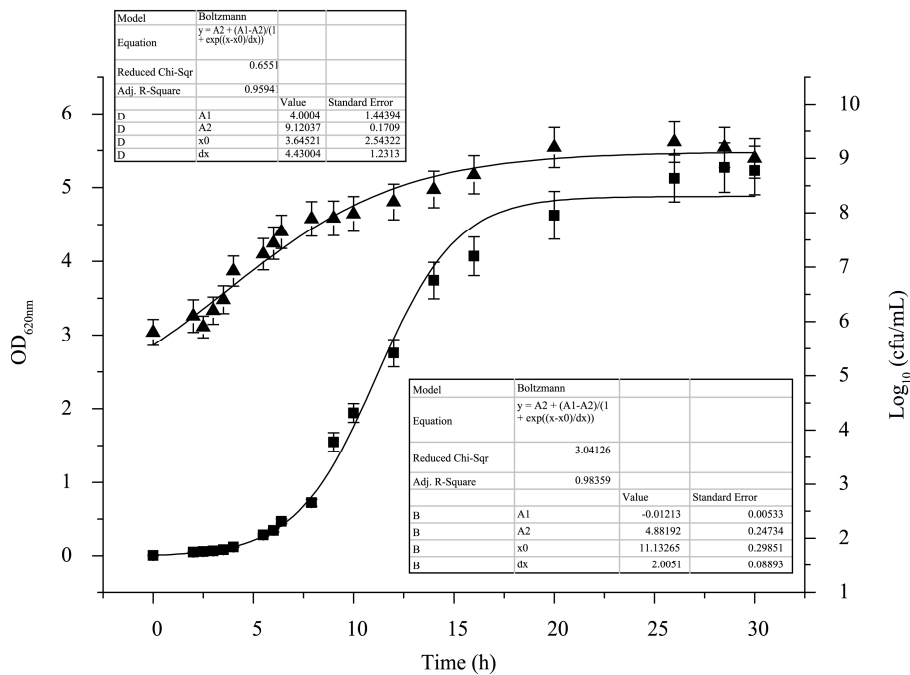


图 3 *L. plantarum* CCFM8661 在液体 MRS 培养基中的生长曲线(: $\text{Log}_{10}(\text{cfu/mL})$; : $\text{OD}_{620\text{nm}}$)
Fig. 3 Growth curves of *L. plantarum* CCFM8661 in MRS media (: $\text{Log}_{10}(\text{cfu/mL})$; : $\text{OD}_{620\text{nm}}$)

乳酸菌在乳中的生长能力将决定其能否在乳制品中应用和相应的应用方式。分别测定了植物乳杆菌 CCFM8661 在复原脱脂乳(12%)和添加了 2% 葡萄糖的复原脱脂乳(12%)中的细胞生长变化和体系滴定酸度的变化情况, 实验结果如图 4。

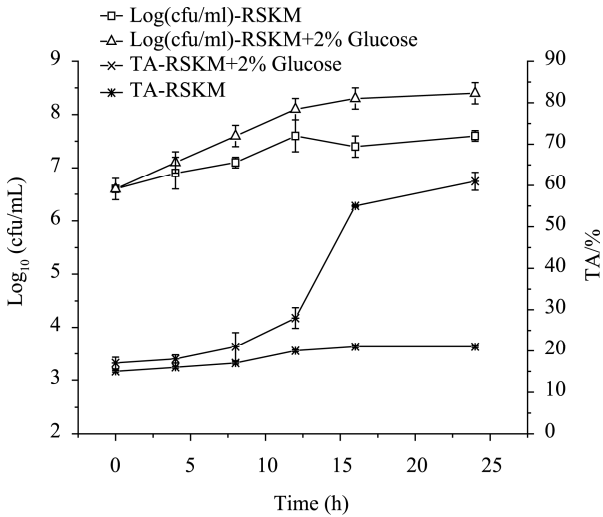


图 4 *L. plantarum* CCFM8661 在复原脱脂乳中的生长和酸度变化情况

Fig. 4 Growth profile and acidity development of *L. plantarum* CCFM8661 in RSM

从图 4 中可以看出, CCFM8661 菌株在不含葡萄糖的复原脱脂乳中生长缓慢, 在 0.1% 起始接种量下, 经过 24 h 的培养, 菌数从 6.6 Log₁₀(cfu/mL) 增加到 7.6 Log₁₀(cfu/mL), 菌数约增加了 1 个 Log₁₀(cfu/mL)。在复原脱脂乳中添加了 2% 葡萄糖时, 菌数从 6.6 Log₁₀(cfu/mL) 增加到 8.4 Log₁₀(cfu/mL), 菌数约增加了 2 个 Log₁₀(cfu/mL), 葡萄糖的添加促进了 CCFM8661 在复原脱脂乳中的生长。这种生长能力的差异与 CCFM8661 菌株对碳水化合物如乳糖的利用能力有关。

3.4 植物乳杆菌 CCFM8661 耐受 NaCl 的能力

乳酸菌对氯化钠的耐受能力将影响其在含盐

发酵食品中的应用。在 MRS 培养基中加入不同浓度的氯化钠, 测定了植物乳杆菌 CCFM8661 对不同氯化钠水平的耐受情况, 实验结果见表 1。CCFM8661 能在含质量分数为 0~7% 的 NaCl 浓度范围内正常生长, 当氯化钠水平超过 7% 时, 呈现出一定的抑制作用, CCFM8661 能生长的最大食盐浓度为 8.5%。从耐盐性的食盐结果来看, 植物乳杆菌 CCFM8661 具有良好的耐盐性, 可以用在一些含盐的食品中。

3.5 植物乳杆菌 CCFM8661 在发酵乳和发酵酸奶中的应用初探

3.5.1 将植物乳杆菌 CCFM8661 用于酸乳制作

由前文研究可知, CCFM8661 在牛乳中的生长能力和产酸能力有限。因此, CCFM8661 并不能单独用于酸奶的制作。决定 CCFM8661 能否作为补充发酵剂用于酸乳制作取决于 CCFM8661 对酸奶菌种是否有抑菌作用。本研究以普通酸乳发酵菌种为发酵剂, 研究了添加 CCFM8661 (起始细胞浓度 10⁷ cfu/mL) 对酸乳发酵过程中嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌生长的影响, 实验结果如图 5 所示。

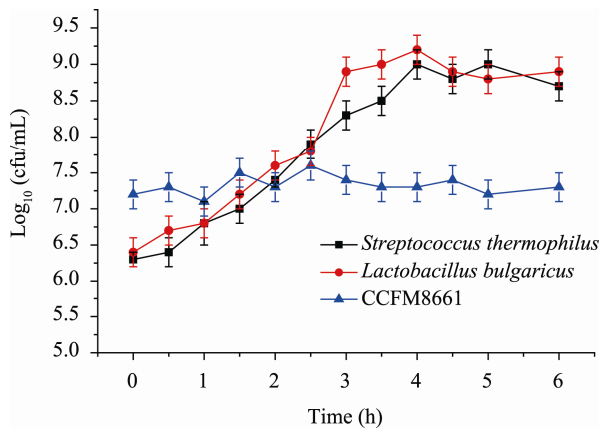


图 5 CCFM8661 与酸奶发酵剂菌株在乳中的生长情况
Fig. 5 Growth profile of *L. plantarum* CCFM8661 and yogurt starter bacteria in RSM

表 1 植物乳杆菌 CCFM8661 菌株对不同水平氯化钠(NaCl)的耐受能力
Table 1 Tolerance of *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 against different NaCl levels

氯化钠浓度(%)	0	2	4	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9
混浊程度	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-
产酸变色	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	黄	紫

注: MRS 培养基中添加溴甲酚紫, 如生长产酸则颜色变为黄色

从图 5 中可以看出, 受到酸乳发酵条件和自身微生物学性质的制约, CCFM8661 很难生长, 菌数仅能维持在初始添加水平上。同时从图 5 中可以看出, CCFM8661 的添加并没有抑制嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的生长。

分别测定了采用 CCFM8661-酸奶发酵剂和只采用酸奶发酵剂制备得到的两种产品的凝乳时间、pH、滴定酸度和质构等相关指标, 实验结果如表 2 所示。添加与不添加 CCFM8661 对酸乳的凝乳时间、滴定酸度和质构指标没有明显的影响, 同时在产品外观、风味和口感等感官指标方面无显著差异。因此, 在酸乳中添加 CCFM8661 不会对酸乳的产品指标产生有害的影响。因此, 植物乳杆菌 CCFM8661 可以作为补充发酵剂用于酸乳的生产。

表 2 添加植物乳杆菌 CCFM8661 共发酵酸乳的产品评价 (n=3)

酸奶指标	CCFM8661+LB+ST	LB+ST
凝乳时间(h)	3.8±0.2	3.5±0.3
pH	4.36±0.03	4.25±0.05
酸度(%，以乳酸计)	1.08±0.03	1.11±0.02
脱水收缩率(%)	49.8±4.2	51.6±3.5
粘度(Pa·s)	3768±262	3779±325
硬度(g)	0.124±0.009	0.138±0.006
凝聚性	0.475±0.006	0.518±0.004
粘着性(g)	-0.216±0.014	-0.224±0.008
感官评分	90.5±6.4	92.2±5.6

3.5.2 利用植物乳杆菌 CCFM8661 制作发酵酸豆乳

豆乳是由豆科植物大豆制备而成的一种组成成分类似于乳的富含优质蛋白质的液体食品^[14]。研究发现, 乳酸菌具有许多突出的功能性质, 也有许多研究探讨了利用不同乳酸菌菌种来制作酸豆乳并改善酸豆乳的功能性质。豆乳发酵不仅能改善豆乳的保藏特性, 修饰产品的质构和风味特征, 而且还可以将豆乳作为一种有益乳酸菌的理想食物载体而赋予产品特定的健康属性^[15, 16]。为此, 本文研究了利用筛选得到的植物乳杆菌 CCFM8661 进行单菌发酵制作酸豆乳的可行性。向豆乳(固形物含量 8.2%)中接种约 10^6 cfu/mL CCFM8661 细胞, 置于 37℃ 下发酵, 分别

测定不同发酵时间的菌数和 pH 变化情况, 实验结果如图 6 所示。

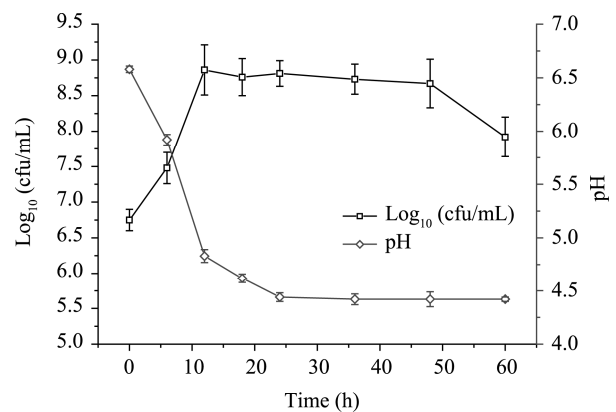


图 6 *L. plantarum* CCFM8661 在豆乳中的生长和酸度变化情况

Fig. 6 The growth profile and acidity development of *L. plantarum* CCFM8661 in soymilk

从图 6 可以看出, 与在牛乳中生长能力较差相比, CCFM8661 能够在豆乳中生长, 在起始 10^6 cfu/mL 接种水平下, 经过约 12 h 发酵, 菌数能够达到 7.2×10^8 cfu/mL, 发酵豆乳体系的 pH 从起始的 6.5 左右经过 12 h 发酵降低到 pH4.4 左右。CCFM8661 单菌发酵豆乳的产品指标如表 3。综合图表的研究结果, CCFM8661 在豆乳中具有良好的生长能力和产酸能力, 产品的质构指标和感官整体接受度尚可。CCFM8661 能作为发酵剂用于发酵酸豆乳的制作。由于市场上缺乏成熟的发酵酸豆乳产品, 无法对产品指标进行横向的比较, 在今后产品开发中可以依据特定的产品属性需求, 开展进一步的应用研究。

表 3 CCFM8661 单菌发酵酸豆乳的产品评价 (n=3)

Table 3 Evaluation on the fermented soymilk by *L. plantarum* CCFM8661

产品指标	CCFM8661 发酵酸豆乳
酸度(%，以乳酸计)	0.76±0.09
脱水收缩率(%)	16.8±1.6
粘度(Pa·s)	2542±215
硬度(g)	0.106±0.004
凝聚性	0.460±0.005
粘着性(g)	-0.210±0.012
感官评价总体得分	82.6±11.2

4 结 论

植物乳杆菌 CCFM8661 是一株嗜温性微生物,最适生长温度在 32 ℃,生长温度范围在 10 ℃~42 ℃;最适起始生长 pH 在 6.5,起始生长 pH 范围在 3.5~8.5。在液体 MRS 培养基中在 32℃ 条件下,CCFM8661 的生长符合 Boltzmann 对数增长模型,经培养 6 h 进入对数增长期,培养 18 h 进入稳定期,在液体 MRS 培养基中最大活菌浓度为 4.8×10^9 cfu/mL。在复原脱脂乳中,CCFM8661 生长缓慢,在 0.1% 接种量条件下,在含糖的复原脱脂乳中菌数仅增加了约 1 $\text{Log}_{10}(\text{cfu/mL})$,添加葡萄糖使菌数增加了 2 个 $\text{Log}_{10}(\text{cfu/mL})$ 。CCFM8661 能耐受的最高食盐浓度为 8.5%(w/w)。CCFM8661 可以作为补充发酵剂用于酸乳制作,对酸乳菌种的生长无抑制作用,同时对产品的理化指标和感官与质构指标无有害影响。植物乳杆菌 CCFM8661 在豆乳中生长和产酸良好,可以用作发酵剂用于酸豆乳的制作。

参考文献

- [1] Salminen S, Von Wright A, Lahtinen S, *et al.* Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects [M]. Oxon: Taylor & Francis, 2011.
- [2] Tian F, Zhai Q, Zhao J, *et al.* Lactobacillus plantarum CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice [J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 150(1-3): 264-271.
- [3] Zhai Q, Wang G, Zhao J, *et al.* Protective effects of Lactobacillus plantarum CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(5): 1508-15.
- [4] 田丰伟, 陈卫, 翟齐喙, 等. 一种能够缓解铅毒性的植物乳杆菌及其用途. 中国, ZL 201210046323.5 [P/OL]. 2012. Tian FW, Chen W, Zhai QX, *et al.* A kind of plant lactobacillus that can ease the toxicity of lead and its uses. China, ZL 201210046323.5 [P/OL]. 2012.
- [5] Baltz R H, Davies J E, Demain A L, *et al.* Manual of industrial microbiology and biotechnology [M]. Birmingham: ASM Press, 2010.
- [6] 金世琳, 韩光烈. 乳品工业手册 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1987. Jing SL, Hang GL. Dairy industry handbook [M]. Beijing: Light Industry Press, 1987.
- [7] 大连轻工业学院等八所院校. 食品分析 (第一版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. Dalian Institute of Light Industry, *et al.* Food Analysis (first edition) [M]. Beijing: Light Industry Press, 1994.
- [8] 东北农学院. 实验三 乳制品制作 in 畜产品加工实验指导[M]. 北京: 农业出版社, 1987. Northerneast Agricultural Institute. Experiment 3: Preparation of dairy products in Experimental guide to animal products processing [M]. Beijing: Agricultural Press, 1987.
- [9] Mital BK, Steinkraus KH. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk [J]. J Food Sci, 1975, 40(1): 114-118.
- [10] 毛健, 宁佳, 赵建新. 不同酸奶发酵剂菌株发酵性质的评价[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(12): 8-11. Mao J, Ning J, Zhao JX. Evaluate of fermentation nature of different yogurt culture strains [J]. China Dairy Ind, 2010, 38(12): 8-11.
- [11] Harper SJ, Barnes DL, Bodyfelt FW, *et al.* Sensory ratings of commercial plain yogurts by consumer and descriptive panels [J]. J Dairy Sci, 1991, 74(9): 2927-2935.
- [12] Pyo YH, Song SM. Physicochemical and sensory characteristics of a medicinal soy yogurt containing health-benefit ingredients [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(1): 170-5.
- [13] 中华人民共和国卫生部. GB 478935-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验 [S]. 北京: 2010. Ministry of Health, China. GB 478935-2010 National food safety standard: Food microbiological examination: Lactic acid bacteria [S]. Beijing: 2010.
- [14] Johnson LA, White PJ, Galloway R. Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization [M]. Urbana: AOCS Press, 2008.
- [15] Kim Y, Yoon S, Lee S B, *et al.* Fermentation of soy milk via lactobacillus plantarum improves dysregulated lipid metabolism in rats on a high cholesterol diet [J]. PLoS One, 2014, 9(2): 8.
- [16] Marazza JA, Nazareno MA, de Giori GS, *et al.* Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with Lactobacillus rhamnosus [J]. J Funct Foods, 2012, 4(3): 594-601.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



田丰伟, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: fwtian@jiangnan.edu.cn



陈卫, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。
E-mail: weichen@jiangnan.edu.cn