

# 植物乳杆菌 NCU116 在模拟人体消化环境中的耐受力

熊 涛, 宋苏华, 黄锦卿, 黄 寅, 谢明勇

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

**摘 要:** 模拟人体消化道环境, 即在人工胃液、人工肠液、胆盐和高盐环境下对植物乳杆菌 NCU116 的耐受力进行研究。结果表明: 植物乳杆菌 NCU116 在 pH1.5 和 pH2.5 的人工胃液中培养 3h, 存活率分别达到了 32.62% 和 45.76%, 在 pH3.5 以上的人工胃液中能保持很高的存活率; 在人工肠液中作用 4h, 存活率达到了 49.63%; 牛胆盐环境中培养 24h 后的 NCU116 活菌数随牛胆盐质量浓度(0.03~1.00g/mL)的增加而降低, 但活菌数均保持在  $10^7$  CFU/mL 以上; NaCl 高盐环境中培养 24h 后的活菌数随 NaCl 质量浓度(1~8g/100mL)的增加而稍有降低, 当 NaCl 质量浓度为 8g/100mL 时, 活菌数仍在  $10^8$  CFU/mL 以上。这表明植物乳杆菌 NCU116 对人工胃液、人工肠液、胆盐和高盐具有较好的耐受力, 在食品和保健品工业中具有良好的应用前景。

**关键词:** 植物乳杆菌 NCU116; 胃肠道环境; 高盐环境; 耐受性

## Tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in Stimulated Digestive Environments

XIONG Tao, SONG Su-hua, HUANG Jin-qing, HUANG Yin, XIE Ming-yong

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in several stimulated human digestive environments such as artificial gastric fluid, artificial intestinal fluid, bile salt environment and high salt environment was investigated. The results showed that survival rates of *Lactobacillus plantarum* NCU116 were 32.62% and 45.76% after 3 h of incubation in artificial gastric fluid with pH 1.5 and pH 2.5, respectively, and a higher survival rate was achieved when the pH of artificial gastric fluid equaled or exceeded 3.5. After 4 h incubation in artificial intestinal fluid, the strain revealed a survival rate of 49.63%. The number of viable NCU116 cells after 24 hours of incubation in bile salt environment exhibited a downward trend as the concentration of bile salt increased from 0.03 to 1.00 g/100 mL, and remained higher than  $10^7$  CFU/mL at the highest bile salt concentration. The number of viable NCU116 cells after 24 hours of incubation in high-concentration NaCl environment slightly declined with increasing NaCl concentration from 1 to 8 g/100 mL, and was higher than  $10^8$  CFU/mL when the NaCl concentration was 8 g/100 mL. In summary, *Lactobacillus plantarum* NCU116 has excellent tolerance in artificial gastric fluid, artificial intestinal fluid, bile salt environment and high salt environment and will thus have promising application prospects in the food and healthcare food industries.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum* NCU116; gastrointestinal environment; high salt environment; tolerance

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)11-0114-04

如今社会日新月异, 人民生活水平日益提高, 对医疗、健康等方面的要求也逐步提高, 各种“益生菌”类保健食品、保健药品日渐走俏。与此同时, “益生菌”的研究已成为国际上的热门研究课题。益生菌<sup>[1-2]</sup>通常是指摄入一定数量, 能以活菌状态到达胃肠道, 调节肠道菌群平衡, 对人体或动物健康起促进作用的单一或特定微生物的混合物。研究表明, 益生菌具有多种

生理功能: 缓解乳糖不耐症; 促进蛋白质、单糖及钙、镁等营养物质的吸收; 产生 VB 族等大量有益物质; 改善人体胃肠道功能, 调节肠道内菌群平衡; 抑制胆固醇吸收, 降血脂、降血压作用; 免疫调节作用, 增强人体免疫力和抵抗力; 提高 SOD 酶活力, 消除人体自由基, 具抗衰老、延年益寿作用; 预防女性泌尿生殖系统细菌感染; 抗肿瘤、预防癌症<sup>[3]</sup>等。因此, 能否

收稿日期: 2010-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060224); 教育部留学回国人员创业基金项目(赣教财字[2009]135 号)

作者简介: 熊涛(1970—), 男, 教授, 博士研究生, 研究方向为细胞工程和酶工程。E-mail: xt-ncu@hotmail.com

顺利通过胃肠环境并定植于肠道是益生菌的重要筛选标准之一。实验通过人工模拟胃肠道环境,探讨植物乳杆菌 NCU116 在模拟胃肠道环境中的存活能力,为这株乳杆菌能否在胃肠道环境中发挥健康促进作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与培养基

植物乳杆菌 NCU116 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室保藏。

MRS 液体培养基采用参考文献[4-5]制备。

### 1.2 试剂与仪器

胰蛋白酶(酶活力 1250Trypus/mg) 丹麦 Novozymes 公司;胃蛋白酶(酶活力 1:10000) 美国 Sigma 公司;牛胆盐 上海蓝季科技发展有限公司;NaCl 天津市大茂化学试剂厂。

YXQ-LS-50S II /75S II 立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;Airtech 生物安全柜 苏净集团安泰公司;DNP-9272 型生化培养箱 上海精宏实验设备有限公司;PHS-2F 型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

### 1.3 人工胃液的配制

准确量取质量浓度为 100g/L 的盐酸 16.4mL,加蒸馏水稀释,调节 pH 值,使 pH 值分别达到 1.5、2.5、3.5、4.5。然后,分别加入胃蛋白酶,加入量按照 1g/100mL 的质量浓度比计算,充分溶解后,用孔径 0.20 μm 微孔滤膜过滤除菌,制得人工胃液备用<sup>[6]</sup>。

### 1.4 人工肠液的配制

称取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.4g,加蒸馏水 250mL 溶解,用 0.4g/100mL 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 6.8,加水稀释至 500mL,然后按照 1g/100mL 的质量浓度比加入胰蛋白酶,充分溶解后,用孔径 0.20 μm 微孔滤膜过滤除菌,制得人工肠液备用<sup>[7]</sup>。

### 1.5 人工胃液耐受性实验

取用葡萄糖溶液稀释 5 倍的菌粉,按体积分数 1% 的接种量接种到 pH 值分别为 1.5、2.5、3.5、4.5 的人工胃液中混匀,37℃、100r/min 摇床培养,分别于 0、1、2、3h 后取样,在 600nm 波长处测定其透光率,并进行乳酸菌活菌计数<sup>[8]</sup>。

$$\text{存活率} / \% = \frac{\text{人工胃液处理 3h 后活菌数} / (\text{CFU} / \text{mL})}{\text{人工胃液中初始菌数} / (\text{CFU} / \text{mL})} \times 100 \quad (1)$$

### 1.6 人工肠液耐受性实验

取用葡萄糖溶液稀释 5 倍的菌粉,按体积分数 1% 的接种量接种到人工肠液,混匀,37℃、100r/min 摇

床培养,分别于 0、1、2、3、4h 后取样,在 600nm 波长处测定其透光率,并进行乳酸菌活菌计数<sup>[8]</sup>。

$$\text{存活率} / \% = \frac{\text{人工肠液处理 4h 活菌数} / (\text{CFU} / \text{mL})}{\text{人工肠液中初始菌数} / (\text{CFU} / \text{mL})} \times 100 \quad (2)$$

### 1.7 耐胆盐实验

在 MRS 液体培养基中加入牛胆盐,使其质量浓度分别为 0、0.03、0.10、0.20、0.30、0.50、0.75g/100mL 和 1.00g/100mL,121℃ 高压蒸气灭菌 30min,冷却至 37℃ 以下备用,将活化后的种子液以体积分数 5% 的接种量接种到上述处理后的培养基中,37℃ 恒温培养 24h 后,进行乳酸菌活菌计数<sup>[8]</sup>。

### 1.8 耐高盐实验

在 MRS 液体培养基中加入 NaCl 固体,使其质量浓度分别为 0、1、2、3、4、5、6、7g/100mL 和 8g/100mL,121℃ 高压蒸气灭菌 30min,冷却至 37℃ 以下备用,将活化后的种子液以体积分数 5% 的接种量接种到上述处理后的培养基中,37℃ 恒温培养 24h 后,进行乳酸菌活菌计数<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工胃液耐受性

益生菌必须进入人体的胃肠道并达到一定浓度<sup>[9]</sup>才能发挥其功能。从口腔到肠道过程中,益生菌首先必须以活菌状态通过胃才有可能进入肠道<sup>[10]</sup>。食物(尤其是流体)通过胃的时间一般为 1~2h,根据饮食结构的不同,人体胃液的 pH 值波动很大,通常在 pH3.0 左右,空腹或食用酸性食品时可达 pH1.5,食用碱性食品时可达 pH4~5,胃液的这种酸性环境可以激活胃蛋白酶原,从而杀死随食物进入胃内的细菌。益生菌如果要在人体内发挥益生作用,就必须具有一定的耐酸能力和耐胃蛋白酶的能力<sup>[11]</sup>。植物乳杆菌 NCU116 在不同的 pH 值情况下,与人工胃液作用不同时间后,检测到的活菌数变化和透光率变化见图 1、2。

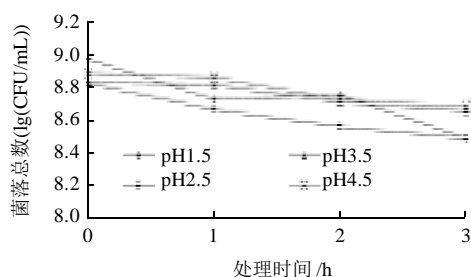


图1 NCU116 与不同 pH 值人工胃液作用不同时间的菌落总数  
Fig.1 Change in viable NCU116 count during incubation in artificial gastric fluid with different pH values

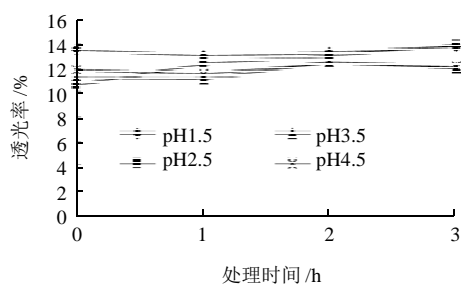


图2 NCU116与不同pH值人工胃液作用不同时间的透光率

Fig.2 Change in transmittance of NCU116 during incubation in artificial gastric fluid with different pH values

由图1可知,植物乳杆菌NCU116在pH1.5和2.5的人工胃液中,经过3h培养,存活率分别达到了32.62%和45.76%,在pH3.5和4.5的人工胃液中均能保持很高的存活率。此外,从图2可知,培养过程中,各人工胃液在600nm波长处的透光率基本保持平稳,稍有增长趋势。

## 2.2 人工肠液耐受性

食物经过胃液消化后,进入肠道,小肠内存活着大量的微生物,数量大,且种类繁多,各种益生菌对肠液必须具有一定的耐受性,并保持一定数量的活菌数,才能发挥其益生作用。小肠的环境是碱性的,其pH值大约为7.6,肠液中含有大量水分、各种消化酶、胆汁酸等多种成分,这些对肠内菌群均有影响。食物在小肠中的停留时间一般为1~4h。植物乳杆菌NCU116经过人工肠液作用不同时间后,检测到的活菌数变化和透光率变化见图3、4。

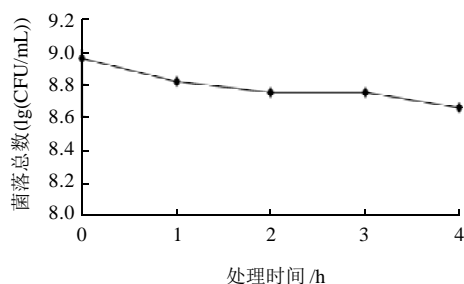


图3 NCU116与人工肠液作用不同时间的菌落总数

Fig.3 Change in viable NCU116 counts during incubation in artificial intestinal fluid with different pH values

由图3可知,植物乳杆菌NCU116在人工肠液中作用4h后,存活率仍较高,达到了49.63%,在600nm波长处的透光率也基本保持平稳(图4),稍有下降,这表明植物乳杆菌NCU116对肠液的耐受力较好。

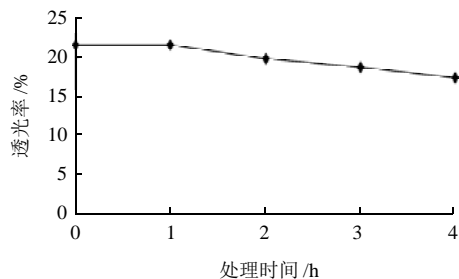


图4 NCU116与人工肠液作用不同时间的透光率

Fig.4 Change in transmittance of NCU116 i during incubation in artificial intestinal fluid with different pH values

## 2.3 耐胆盐实验结果

胆盐是肝细胞分泌的胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合形成的钠盐或钾盐,它是胆汁参与消化和吸收的主要成分。胆盐排到小肠后,大部分由小肠黏膜吸收入血,再入肝脏组成胆汁。人体小肠中胆盐的质量浓度在0.03~0.3g/100mL的范围波动<sup>[12]</sup>,益生菌要在小肠中定殖,必须耐受胆盐的抑制作用<sup>[13-14]</sup>。植物乳杆菌NCU116在胆盐质量浓度分别为0、0.03、0.10、0.20、0.30、0.50、0.75g/100mL和1.00g/100mL的MRS液体培养基中恒温培养24h后活菌计数,结果见图5。

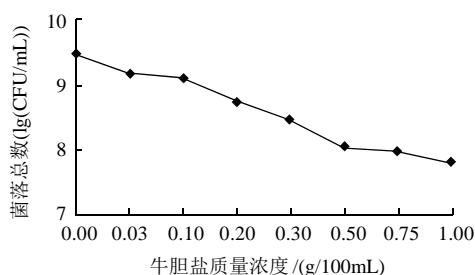


图5 NCU116对牛胆盐的耐受力

Fig.5 Tolerance of NCU116 to bile salt

由图5可知,培养24h后,活菌数随牛胆盐的质量浓度增加而降低,菌体在0.30g/100mL的牛胆盐中生长良好,活菌数还在 $10^8$ CFU/mL以上,即使在1.00g/100mL的牛胆盐中也能生长,活菌数仍在 $10^7$ CFU/mL以上。表明植物乳杆菌NCU116对胆盐具有较强的耐受力,在食品工业具有很好的应用前景。

## 2.4 耐高盐实验结果

人体胃肠道中NaCl质量浓度在1.00~4.00g/100mL的范围波动。不同的微生物对渗透压<sup>[15]</sup>的抵抗力不同,但不论哪种微生物,对渗透压的抵抗力是有一定限度的,超过一定限度则使微生物生长受到抑制。微生物最适在等渗溶液中生长繁殖,如果将微生物置于低渗溶液或水中,大多数微生物具有较为坚韧的细胞壁,而且个体较小,因而在低渗溶液中一般不会像无细胞壁的细胞那

样容易发生裂解,具有细胞壁的微生物受低渗透压的影响不大;如果将微生物置于高渗溶液中,则微生物发生质壁分离现象,失水收缩,而水分又是微生物生理生化反应所必需,失水会抑制其生长。植物乳杆菌 NCU116 在 NaCl 质量浓度分别为 0、1、2、3、4、5、6、7g/100mL 和 8g/100mL 的 MRS 液体培养基中恒温培养 24h 后活菌计数,结果见图 6。

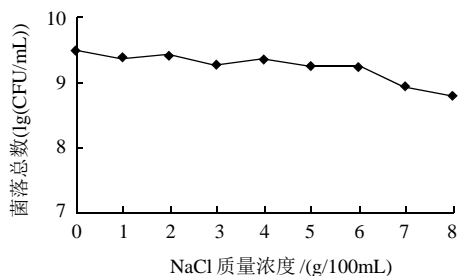


图 6 NCU116 对 NaCl 的耐受力

Fig.6 Tolerance of NCU116 to sodium chloride

从图 6 可以看出,培养 24h 后,活菌数随 NaCl 质量浓度增加而稍有降低,质量浓度为 8g/100mL 时菌体仍然能够生长,活菌数仍在  $10^8$ CFU/mL 以上。由此可见,植物乳杆菌 NCU116 耐渗透压的效果比较好,具有较强的耐盐能力,可在人体内较好地生存。

### 3 结 论

植物乳杆菌 NCU116 对人工胃液具有较强的耐受力,在 pH1.5 和 pH2.5 的人工胃液中,经过 3h 培养,存活率分别达到了 32.62% 和 45.76%,在 pH3.5 和 4.5 的人工胃液中均能保持很高的存活率,且在 600nm 波长处的透光率也基本保持平稳,稍有增长趋势。植物乳杆菌 NCU116 对人工肠液亦有较强的耐受力,经过 4h 培养后,存活率仍达到了 49.63%,在 600nm 波长处的透光率也基本保持平稳,稍有下降。植物乳杆菌 NCU116 对胆盐的耐受力较强,培养 24h 后,活菌数随牛胆盐的质量浓度增加而降低,在 0.30g/100mL 的牛胆盐中活菌数

还保持在  $10^8$ CFU/mL 以上,即使在 1.00g/100mL 的牛胆盐中也能够生长,活菌数仍在  $10^7$ CFU/mL 以上。植物乳杆菌 NCU116 在 NaCl 质量浓度为 8g/100mL 的高盐环境下仍生长良好,活菌数仍在  $10^8$ CFU/mL 以上,有较强的耐高渗透压能力。因此,本实验中的植物乳杆菌 NCU116 在功能性食品的研究和开发中具有一定应用潜力。

### 参考文献:

- [1] QUIGLEY E M. Prebiotics and probiotics: modifying and mining the microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2010, 61(3): 213-218.
- [2] HOLZAPFEL W H, HABERER P, SNEEL J, et al. Overview of gut flora and probiotics[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 41(2): 85-101.
- [3] TUOHY K M, PROBERT H M, SMEJKAL C W, et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health[J]. *Drug Discovery Today*, 2003, 8(15): 692-700.
- [4] 赵立彬,刘凌,童军茂,等. 泡菜乳酸菌筛选鉴别及耐受性和促益生菌增殖的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(10): 28-35.
- [5] 熊涛,徐立荣,范铺,等. 蔬菜发酵专用乳酸菌的菌体高密度培养[J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 345-350.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国药典[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995: 附录 64.
- [7] 辛玲,郭本恒,吴正钧. 3 株乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究[J]. *中国乳品工业*, 2005, 33(5): 15-17.
- [8] 熊涛,王韵,曾哲灵,等. 一种改良的乳酸菌活菌数快速测定方法[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(10): 132-134.
- [9] 崔琴,负建民,张丽,等. 甘南州牧区优良乳酸菌耐受特性的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(3): 216-219.
- [10] 杨桂梅,张永红,苏娜,等. 2 株猪源益生菌对酸和胆盐及热的耐受性研究[J]. *北京农学院学报*, 2008, 23(4): 29-32.
- [11] 孟丽,唐善虎,杨蓉生,等. 干酪乳杆菌在模拟人体消化道环境及高盐环境中生长活力的研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(4): 46-49.
- [12] 王记成,郭壮,闫丽雅,等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 与商业益生菌对胃肠转运耐受性及发酵特性的比较[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(5): 14-23.
- [13] LIONG M T, SHAH N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(1): 55-66.
- [14] PAN Xiaodong, CHEN Fenqin, WU Tianxing, et al. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT [J]. *Food Control*, 2009, 20(6): 598-602.
- [15] 陆艳琦,孙志红. 漫谈渗透现象和渗透压[J]. *郑州铁路职业技术学院学报*, 2006, 18(1): 65-67.