

## 论著

## 乳酸菌 ATCC367 菌株在不同培养条件下的生长特性差异

钟 凯 何庆华 吴永宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**目的 通过分析乳酸菌 ATCC367 在不同 pH 环境下的生长曲线和 pH 值曲线的差异,探讨乳酸菌的生长规律。方法 配制不同成分、不同 pH 值的培养基,分别进行菌株培养并测定  $A_{600}$  和 pH 值,获得生长曲线和 pH 变化曲线。结果 乳酸菌 ATCC367 菌株在 pH 3.5 和添加壳寡糖的培养基上生长受到抑制,适宜生长的 pH 值环境为 3.5~6.5,添加葡萄糖能促进其指数生长,添加 30 g/L 的氨基酸可能不利于生长。结论 ATCC367 菌株可能根据生长环境和能量来源的不同,动态调节不同代谢途径,以获得最佳生长状态。

**关键词:** 乳杆菌属;氢离子浓度;培养基;生长曲线

**Characteristics of *Lactobacillus Brevis* (ATCC367) in Different Media**

ZHONG Kai, HE Qing-hua, WU Yong-ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** **Objective** Growth patterns of ATCC367 strain under the conditions of six different media were discussed according to growth curves and pH curves. **Methods** six media with different ingredients or pH value were prepared and ATCC367 strain cultures were harvested from each medium. Culture samples were collected and  $A_{600}$  and pH values were determined thereafter. Growth curves and pH curves were constructed according to these data. **Results** Growth curves were different between ATCC367 strain cultures. In MRS + aa pH 3.5 and MRS + aa + COS pH 6.5 media, strain growth were suppressed. pH 3.5~6.5 was suitable for its growth, glucose could extend its log phase while high concentration of amino acid maybe harmful. **Conclusions** ATCC367 strain may have the ability of dynamic metabolic regulation to accommodate different culture environment or energy source.

**Key words:** *Lactobacillus*; Hydrogen-Ion Concentration; Culture Media; Growth Curve

乳酸菌广泛存在于自然界,是一种常用的食品工业用菌,在乳制品、发酵食品、酒类、青贮饲料中的应用非常广泛。乳酸菌发酵可赋予食品特殊风味和质地,但某些乳酸菌产生的生物胺不仅影响产品品质,还可能对人或畜禽的健康产生负面影响<sup>[1-4]</sup>,因此采取何种工艺措施实现控制乳酸菌生长与代谢的目的成为很多研究者关注的问题。细菌的生长常常受到营养来源、环境 pH 值、温度、厌氧环境等诸多因素影响。乳酸菌是兼性厌氧菌,通过对乳酸杆菌属产生物胺模式菌株 ATCC367 在不同培养条件下的生长特性差异的研究,考察其环境适应性以及生长规律,为合理的生产工艺控制提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

基金项目:国家自然科学基金(30571572)

作者简介:钟 凯 男 博士生

通讯作者:吴永宁 男 研究员

**菌种** 短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*, ATCC367, 购自美国 ATCC)为产生物胺的模式菌株,已知其能产生酪胺,不产尸胺、腐胺、组胺<sup>[5]</sup>。

**培养基** 培养基 1 为 MRS 培养基,以 52 g/L 浓度将 MRS 干粉溶解于蒸馏水中,调节 pH 值为 6.5。培养基 2 为 MRS 培养基中添加 10 g/L 的组氨酸、赖氨酸和鸟氨酸以及 1 g/L 的酪氨酸,调节 pH 值为 6.5。培养基 3 为培养基 2 中添加 20 g/L 的葡萄糖,调节 pH 值为 6.5。培养基 4 和 5 分别为培养基 2 调节 pH 值为 3.5 和 5.0。培养基 6 为培养基 2 中添加 0.5 g/L 的壳寡糖(COS),调节 pH 值为 6.5。调节 pH 值的试剂为 1 mol/L 氢氧化钠和 1 mol/L 盐酸,以上所有培养基均 121 ℃,高压灭菌 15 min 备用。

**主要试剂** MRS 肉汤培养基(德国 OXOID);分析纯组氨酸(美国 Sigma);分析纯赖氨酸、鸟氨酸、酪氨酸、壳寡糖和葡萄糖等(上海生工生物工程有限公司)。

**主要仪器** 全自动预真空高压灭菌锅(西班牙 SELECTA CJ.P.SELECTA)、低温培养箱(法国 MMM)、酸度计(意大利 HANNA)、分光光度计(德国

Eppendorf)、生物安全柜(美国 LABCONCO)、分析天平(德国 Sartorius)、BX51 显微镜(日本 OLYMPUS)、漩涡振荡器(江苏其林贝尔)、全自动回旋接种仪(英国 DON whitley)。

## 1.2 方法

**生长曲线及 pH 值曲线测定** ATCC367 菌株在 MRS 平板培养基上复苏,挑取单菌落接种至 MRS 肉汤培养基,之后每 12h 接种一次,连续接种 2 次后扩大培养作为种子液。测定种子液 600 nm 吸光度值,并经螺旋涂布计数确定种子液浓度,再按照  $10^6$  CFU/ml 的接种量分别接种于 100 ml 上述 6 种培养基,混匀并分装为 5 ml/管,每种培养基共计 20 管,置于 37℃ 静置培养,在第 0、2.5、4.5、6.5、8.5、10.5、12.5、14.5、16.5、18.5、20.5、22.5、24.5、26.5、28.5、31、34、36、38、41、43.5、46.5、49.5、52.5、55.5、58.5、61.5、64.5、68、74 h 各取 1 管置于 4℃ 冰箱作为生长曲线的采样点,培养结束后一起测定吸光度值 ( $A_{600}$ ) 和 pH 值。测定吸光度值时均以相应的空白培养基为零点对照,样品浓度较大的可用对应空白培养基稀释后测定,使测定值在 1.0 以下,结果乘以稀释倍数作为吸光度值。

**数据处理** 在 Origin pro7.5 软件中以时间为 X 轴,吸光度值和 pH 值为 Y 轴作图(双 Y 轴),以生长曲线中相邻两点连线的斜率表征较晚时间点细菌增殖速度。

## 2 结果

ATCC367 各生长阶段的时间点根据生长曲线及经验判断,不同培养条件下的生长曲线和 pH 值曲线的相互关系如图 1 和表 1 所示。由图 1 可见,ATCC367 菌株对培养基的适应能力较强,在接种后很快进入指数生长期,并随后进入相对稳定的静止期,只有在培养基 4 中表现得生长缓慢。培养基 1 与加氨基酸底物的培养基 2 相比,更晚进入静止期且静止期 pH 值低于培养基 2, A 峰值高于培养基 2。两种添加糖的培养基相比,培养基 3 进入静止期比培养基 6 晚,静止期 pH 值也较低, A 峰值较高。两种低 pH 培养基相比,培养基 4 较晚进入静止期,静止期 pH 值也较低,而 A 峰值也较低。综合来看,培养基 2 和 6 的静止期较早出现,培养基 4 最迟,其余无明显差异。静止期 pH 值并无显著差异,而培养基 1 的 A 峰值最大,培养基 4 最小。培养基 4 由于曲线较粗糙,无法确定最大斜率的点,培养基 5 最早达到生长高峰,培养基 6 的生长高峰较培养基 1、2 和 3 略早。

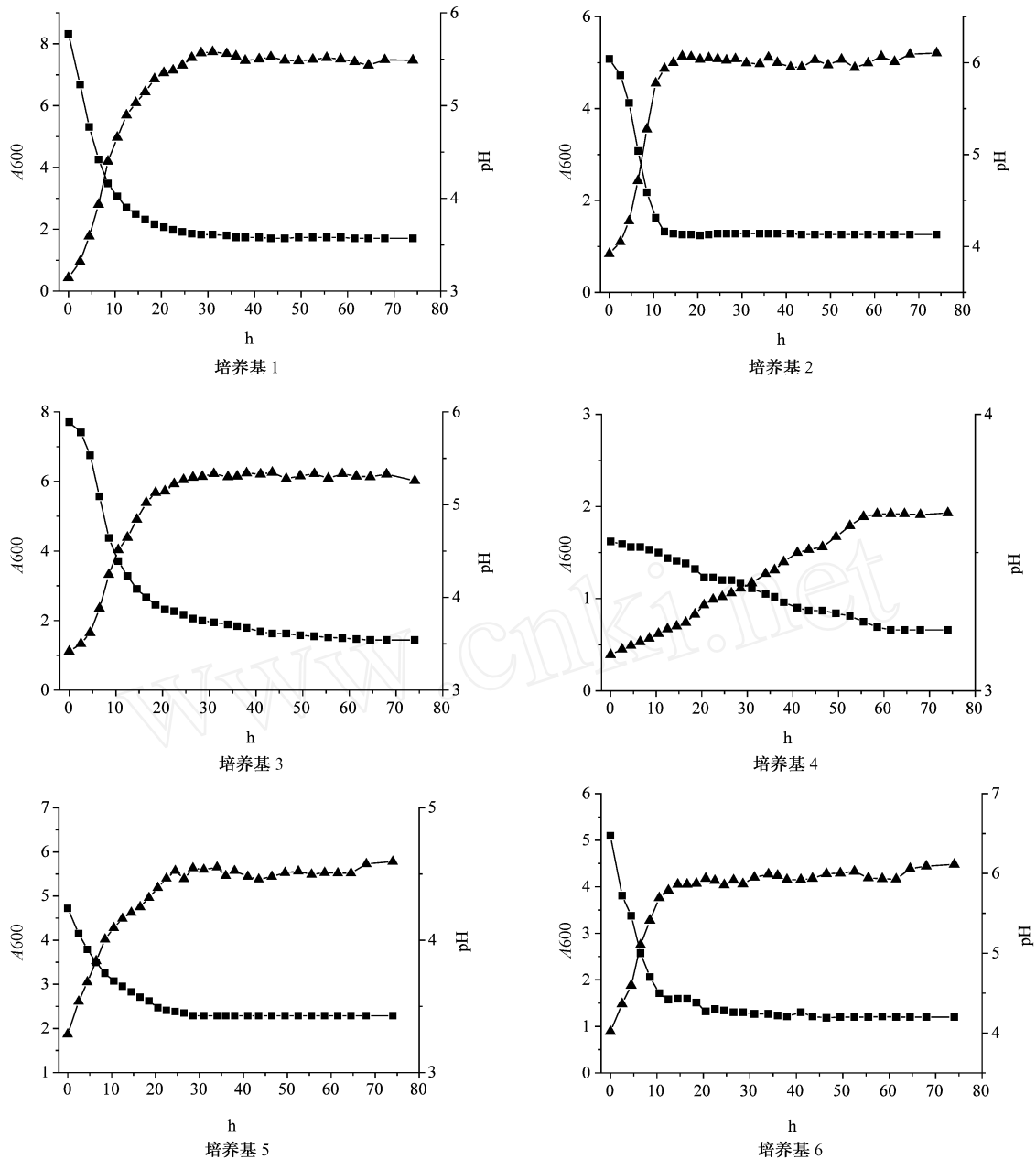
## 3 讨论

本研究中不同培养基下的初始 A 值存在一定差异,除接种菌量的差异外,可能原因还包括酪氨酸结晶的析出以及细菌形态的差异等。值得注意的是,通过镜检我们发现,ATCC367 菌株并不一定呈现典型的短乳杆菌特征,往往还存在近似椭圆形和长杆形。该菌株对于环境的耐受性较好,表现在接种后迅速开始指数生长而不需要长时间的迟滞期适应。即使在 pH 3.0 环境下,细菌生长速度明显放慢,但仍然很快开始指数生长。所有添加高浓度氨基酸的培养基都比培养基 1 的 A 峰值低,说明高浓度氨基酸可能不利于细菌生长。但加入高浓度葡萄糖后,培养基 3 的菌株明显延长了指数生长的时间, A 峰值也高于其他添加氨基酸的培养基。这可能与葡萄糖提供细菌生长的能量和碳源有关,但它同时增加了培养基的渗透压,可能影响细菌生长,因此培养基 3 的 A 峰值不及培养基 1。

添加壳寡糖的培养基 6 比不添加的培养基 2 的 A 峰值较小,静止期 pH 值较高,这可能是壳寡糖在一定程度上抑制了菌株的生长与代谢。然而研究表明,寡糖作为益生素的一种,能被肠道乳酸菌利用并促进乳酸菌生长或产生有益的生物效应<sup>[6,7]</sup>。国内一项研究也表明壳寡糖能促进乳酸菌生长<sup>[8]</sup>,但另一研究则认为壳寡糖能与细胞体内带有负电荷的细胞质结合,扰乱细胞的正常生理活动,改变了细胞膜的选择透过性,从而抑制嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌生长繁殖<sup>[9]</sup>。生物效应的这种不一致性提示寡糖等益生素可能是通过打破固有菌群平衡发挥效应,而非单纯的促进乳酸菌生长或抑制杂菌生长。

6 种培养基的 pH 值呈单边下降趋势,提示该菌株利用酪氨酸脱羧产酪胺的能力有限,无法以这一代谢通路中和环境 pH 值,这可能也与酪氨酸的溶解度较小有一定关系。培养基 5 的最大生长时间点最早,可能意味着该菌株最适宜的生长 pH 值在 5.0 左右。而更低的 pH 值则很大程度上抑制了乳酸菌的生长。从几种 pH 6.5 的培养基静止期 pH 值来看,生长旺盛的 pH 值可达到 3.5 左右,生长略差的可达到 4.2 左右。因此可以推测该菌株适宜的生长 pH 值范围大致在 6.5 和 3.5 之间,高浓度氨基酸不利于菌株生长,而加入适量葡萄糖能有效延长菌株的指数生长。

本研究的结果一定程度上反映了 ATCC367 菌株的生长规律,但仍需要基因组、蛋白组和代谢组等系统生物学手段揭示其中的机制,这也是后续研究的方向。



注:图中  $\blacktriangle$  代表 pH 值,  $\blacksquare$  代表  $A_{600}$

图 1 ATCC367 在不同培养条件下的生长曲线和 pH 值曲线

表 1 ATCC367 在不同培养条件下的生长情况

培养基	静止期起点 (h)	静止期 pH 值	$A_{600}$ 峰值	最大生长速度 时间点 (h)
1	22.5	3.57	7.71	8.5
2	12.5	4.14	5.14	8.5
3	18.5	3.54	6.27	8.5
4	55.5	3.22	1.92	-
5	24.5	3.43	5.78	2.5
6	12.5	4.2	4.48	6.5

注:表中“-”为无法确定。

参考文献

[1] COTON E, COTON M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine and tyramine-producing bacteria [J]. J Microbiol Methods, 2005, 63 (3) :296-304.  
 [2] NISHINO N, HATTORI H, WADA H, et al. Biogenic amine

production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri* [J]. J Appl Microbiol, 2007, 103 (2) :325-332.  
 [3] NOVELLA-RODRIGUEZ S, VECIANA-NOGUES M T, ROIG-SAGUES A X, et al. Comparison of biogenic amine profile in cheeses manufactured from fresh and stored (4 degrees C, 48 hours) raw goat's milk [J]. J Food Prot, 2004, 67(1) :110-116.  
 [4] SPARO M, NUNEZ G G, CASTRO M, et al. Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT17121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages [J]. Food Microbiol, 2008, 25 (4) :607-615.  
 [5] MORENO-ARRIBSA V, LONVAUD-FUNEL A. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC367 [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 180(1) :55-60.

论著

# 大豆异黄酮对大鼠内分泌干扰作用研究

张文众 王伟 张晓鹏 宋雁 刘兆平 李宁  
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**目的 探索大豆异黄酮(SIF)经口摄入后,在体内的抗雄激素作用机制和剂量-反应关系。方法 选用4~5周雄性SD大鼠做HERSHBERGER试验,分别经灌胃给与0.2、0.5、1.5和4.5 g/kg BW的SIF,以3.0 mg/kg BW的氟他胺为阳性对照,0.4 mg/kg 睾酮对照(TP组)和空白对照组,除空白对照其余各组均给予睾酮,所有剂量组连续灌胃10天。试验结束称量腹侧前列腺、精囊和凝精腺、肛提肌加球海绵体肌、阴茎头和尿道球腺重量,并测定促黄体激素和睾酮。结果 和TP组比较,大豆异黄酮0.50、1.50和4.5 g/kg BW剂量组的体重和增重明显降低( $P < 0.05$ ),1.50和4.5 g/kg BW剂量组的阴茎头/肾脏和尿道球腺/肾脏的比值降低( $P < 0.05$ ),4.5 g/kg BW剂量组的肛提肌/肾脏比值降低( $P < 0.05$ ),1.5 g/kg BW组的LH/T比值升高( $P < 0.05$ )。结论 大剂量(1.5 g/kg BW和更高)的大豆异黄酮经口摄入产生抗雄激素作用,这种抗雄激素作用可能是一种间接效应。

**关键词:**异黄酮类;激素拮抗药;内分泌干扰物

## Study on Endocrine Disruptor Effects in the rat of Soy Isoflavones

ZHANG Wen-zhong, WANG Wei, ZHANG Xiao-peng, SONG Yan, LIU Zhao-ping, LI Ning  
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the androgen antagonists mechanisms in the rat of soy isoflavones *in vivo*, and also to study the relationship of dose-response. **Method** HERSHBERGER assay was carried out in immature male SD rats at the age of 4-5 weeks old, 0.2, 0.5, 1.5 and 4.5 g/kg soy isoflavones, and 3.0 mg/kg flutamide as positive control, 0.4 mg/kg Testosterone Propionate (TP), which was given to every groups, as negative control, vehicle as blank control, all groups were administered orally for 10 consecutive day. In the end of test, animals were anesthetized, weight of ventral Prostate, seminal vesicles together with coagulating gland, levator ani bulbocavernous muscles, glans penis, bulbourethral glands were measured, testosterone (T) and luteinizing hormone (LH) levels were measured. **Results** In compariton with TP control, body weight decreased in the groups of 0.50, 1.50 and 4.5 g/kg of soy isoflavones. The weights of glans penis and bulbourethral glands weights were found to be significantly decreased in the groups of 1.50 and 4.5 g/kg soy isoflavones ( $P < 0.05$ ). The weights of levator ani muscles decreased in the group of 4.5 g/kg soy isoflavones ( $P < 0.05$ ); LH and ratio of LH/T increase in the group of 1.5 g/kg soy isoflavones ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** At the level of high dose soy isoflavones had androgen antagonist effects *in vivo*, and the effect may be caused indirectly.

**Key words:** Soy Isoflavones; Hormones Antagonists; Endocrine Disruptor

[6] 张帆,王建华,刘立恒,等. 菊粉寡糖促进嗜酸乳杆菌生长的研究[M]. 食品与发酵工业,2004,30(4):49-51.

[7] LIU P, PIAO X S, KIM S W, et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs [J]. J Anim Sci, 2008, 86(10): 2609-2618.

[8] 阎春玲,刘兵,刘万顺. 壳寡糖及其衍生物对糖尿病大鼠糖耐量及肠道微生态平衡的影响[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(11):1202-1207.

[9] 曹维强,王静,张英春,等. 壳寡糖对酸乳后酸化抑制效果的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(8):115-118.

[收稿日期:2009-01-24]

中图分类号:R15;R117;Q935;Q939.117 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)03-0225-04

基金项目:国家“十五”科技攻关重大项目(2006BAK02A07)

作者简介:张文众 男 助理研究员