

一组鸡源乳酸菌产乳酸及其耐受特性研究*

刘虹 姚文 于卓腾 朱伟云**

(南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室 南京 210095)

摘要: 研究了12株(K9、D17、C1、C12、D11、D14、C2、D9、K6、C21、D1和D7)分离自肉鸡肠道的乳酸菌的产乳酸能力及其中3株产酸能力强的菌株的耐受特性。12株乳酸菌产乳酸结果表明:12h内,K6产乳酸速度最快,其次为K9和C1,24h时,D17乳酸浓度最高,48h时C1终乳酸浓度最高。K9、D17和C1的耐受试验结果表明:C1菌株耐酸能力最强,pH2时,C1菌株培养3h后还能检测到活菌,D17和K9菌株培养1h后就已经检测不到活菌。在胆盐浓度0.08%~0.40%范围内,C1、D17和K9均有一定的耐受能力,随着胆盐浓度的升高,C1、D17和K9的存活数呈现缓慢的下降趋势。3株菌中D17耐热能力最强,经80℃处理后仍有 $10^{4.9}$ /mL存活数,而K9和C1已检测不到活菌;C1对热最敏感,65℃处理后存活数由 10^8 /mL降为 10^3 /mL。

关键词: 乳酸菌, 乳酸浓度, 耐受特性, 肉鸡肠道

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0001-05

Lactic Acid Production and Tolerance Property of Lactic Acid Bacteria from Broiler Intestine*

LIU Hong YAO Wen YU Zhuo-Teng ZHU Wei-Yun**

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Lactic acid production of twelve strains of LAB isolated from broiler intestine and tolerance property of three strains were investigated. The results of lactic acid production showed that among all strains K6 exhibited the most rapid production during the first twelve hours, the seconds were K9 and C1; D17 exhibited the highest production of lactic acid by twenty-four hours, C1 exhibited the highest production of lactic acid by forty-eight hours. The pH values in three strains of K9, D17 and C1 culture showed the fast decline during the first twelve hours, with the final values significantly lower than those of other strains cultures. The results of tolerance property showed that the survival counts of C1 could be detected when pH value was at 2 after three hours, but the survival counts of D17 and K9 could not be detected after one hour. When pH value was at 2.5 after three hours, the survival counts of C1 declined from $10^{8.2}$ /mL to $10^{4.8}$ /mL, K9 from $10^{8.2}$ /mL to $10^{4.6}$ /mL, the survival counts of D17 could not be detected. 0.08% bile had few effects on the survival counts of three strains; when incubated in the medium with 0.40% bile, the survival counts of C1 declined from $10^{8.4}$ /mL to $10^{6.5}$ /mL, D17 from $10^{10.2}$ /mL to $10^{7.5}$ /mL, and K9 from $10^{8.8}$ /mL to $10^{7.7}$ /mL. When the group treated with 37℃ for 20 minutes was served as the control, the survival counts of C1 and K9 was not detected when treated with 80℃, but

* 国家杰出青年科学基金 (No. 30025034)

国家重点基础研究发展计划 (No. 2004CB117500-4)

** 通讯作者 Tel: 025-84395523, E-mail: hfling@public1.ptt.js.cn

收稿日期: 2005-11-04, 修回日期: 2006-03-16

the survival counts of D17 were $10^{4.9}$ /mL, when treatment with 65°C the survival counts of C1 and K9 decreased significantly.

Key words: Lactic acid bacteria, Lactic acid concentration, Tolerance property, Broiler intestine

益生菌是一类通过调控动物肠道微生物区系平衡从而有效地促进动物健康和生长的微生物活菌制剂。其中乳酸菌应用最早、最广泛,能促进动物生长、提高饲料报酬和减少发病率^[1,2]。但据 Simon 等对已有报道的统计分析,其在畜牧生产中的应用效果存在很大差异,所用菌株在动物肠道内难以存活定植是其中的一个重要原因^[2]。一方面宿主对外来菌株具有排异作用,同时肠道中,特别是胃中的酸性环境和十二指肠中的胆盐等对多种微生物的生长具有抑制作用;另一方面目前的应用菌株多为来源于土壤的需氧微生物,在动物胃肠道的厌氧环境中较难生长。因此筛选、研究动物肠道中的有益优势菌(如乳酸菌),利用其对胃肠道环境的高度适应性和在胃肠道中的高增殖能力,不失为开发新型高效益生菌的有效途径。

本试验通过研究源自肉鸡肠道的 12 株乳酸菌的产乳酸和耐受肠道因素和温度的能力,旨在探讨鸡源乳酸菌菌株作为益生菌的应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌株^[3]

乳酸菌菌株 K9 (嗜酸乳杆菌, *Lactobacillus acidophilus*)、D17 (德氏乳杆菌乳亚种, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*)、C1 (肠乳杆菌, *Lactobacillus intestinalis*)、C12 和 D11 (德氏乳杆菌德氏亚种, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *delbrueckii*)、D14 (嗜淀粉乳杆菌, *Lactobacillus amylovorus*)、C2 (果糖乳杆菌, *Lactobacillus fructosus*)、D9 (戊糖乳杆菌, *Lactobacillus pentosus*)、K6、C21、D1 和 D7 (粪肠球菌, *Enterococcus faecalis*) 均由本实验室分离自肉鸡肠道食糜。

1.2 产乳酸分析试验

12 株乳酸菌经蛋白-酵母 (PY) 液体培养基^[4]活化 24 h 后接种蛋白-酵母-葡萄糖 (PYG) 厌氧液体培养基,对照组接种 PY 厌氧液体培养基,每菌株设 3 个重复,37°C 条件下厌氧培养。培养一定时间后,测定培养基的 pH 值和乳酸浓度^[5]。

1.3 耐受试验

1.3.1 菌液的制备: 取新鲜的乳酸菌培养液接种 MRS 厌氧液体培养基,37°C 厌氧培养 24 h 后,取培养液于 4°C 下,3,500 r/min 离心 15 min,而后用 PBS (pH 7.2) 悬浮沉淀菌体,调至菌体浓度为 10^8 CFU/mL,放置备用。

1.3.2 不同 pH 值对乳酸菌 C1、D17 和 K9 存活的影响: 同上获得的菌液按 5% (v/v) 加入 pH 值分别为 2.0、2.5、3.5、4.0、6.4 的 PBS 中,以 pH 值为 6.4 的 PBS 缓冲液为对照,混匀后,置于 37°C 培养箱静置培养,在 0、0.5、1.0、2.0、3.0 h 分别无菌取出培养菌液 0.1 mL,进行平板菌落计数^[6]。

1.3.3 胆盐对乳酸菌 C1、D17 和 K9 存活的影响: 同上获得的菌液按 5% (v/v) 接种于胆盐浓度为 0.08%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40% (w/v) 的 PBS 中,以不加胆盐的 PBS 缓冲液为对照,在 37°C 条件下培养 10 min 后,取样进行平板菌落计数^[7,8]。

1.3.4 温度对乳酸菌 C1、D17 和 K9 存活的影响: 同上获得的菌液按 5% (v/v) 接种于 50°C (10min、20min)、65°C (10min、15min)、80°C (5 min、10min) 的 PBS 中,

培养相应的时间后, 取样进行平板菌落计数。以 37℃ 培养 20 min 培养后平板菌落计数结果为对照。

1.4 统计分析

实验数据均为 3 个重复的平均值, 数据经 Microsoft Excel 初步处理后, 利用 SPSS10.0 单因子多重比较中 LSD 法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同乳酸菌产乳酸的比较

12 株乳酸菌产乳酸比较见图 1a, 12 h 内, K6 产乳酸速度最快, 12 h 时浓度最高 (35.68mmol/L), 其次为 K9 和 C1 (33.03 和 32.05mmol/L); 12 到 24 h 之间, K6、K9 的乳酸浓度缓慢上升, 24 h 趋于稳定 (分别为 46.02 和 41.17mmol/L), D17、D11、D14、C21 和 C12 的乳酸浓度在 12 h 到 24 h 期间快速上升, 24 h 时均达 40mmol/L 以上, 其中 D17 最高, 为 52.44mmol/L, 48 h 时 C1 乳酸浓度最高, 为 62.94mmol/L。12 个菌株中, D9 的乳酸浓度在整个培养过程中均为最低。

这些菌株培养液的 pH 值随培养时间延长呈下降趋势 (图 1b); K9、D17 和 C1 下降最快, 终 pH 值最低 (3.5), 其次是 C21, 再次为 D11、C12、D14 和 K6; D9 下降最慢, 终 pH 值为 5.3。

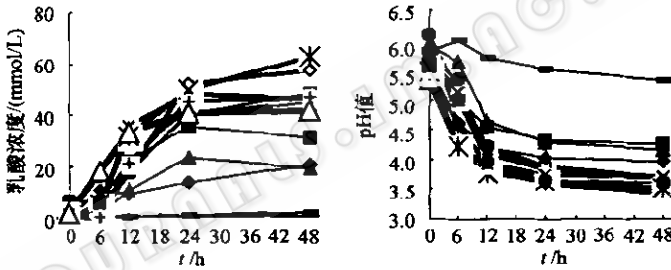


图1 12 株乳酸菌产乳酸浓度及 pH 值随时间变化图
 × K6, □ D11, ● C21, ▲ C2, △ K9, ◆ D7,
 ○ D14, — D9, + C12, ◇ D17, ■ D1, ▲ C1

2.2 pH 值对乳酸菌 C1、D17 和 K9 存活的影响

pH 值对 C1、D17 和 K9 存活影响见图 2、3、4。C1 菌株耐酸能力最强, pH2.0 时, 接种 3 h 后仍能检测到活菌; 其次为 K9, 对 pH2.0 的酸性环境非常敏感, 接种 1 h 后即检测不到活菌, 但能耐受 pH2.5 的酸性环境; 耐酸能力最弱的是 D17 接种 3 h 后仅能在 pH 值为 3.5 和 4.0 时检测到活菌。

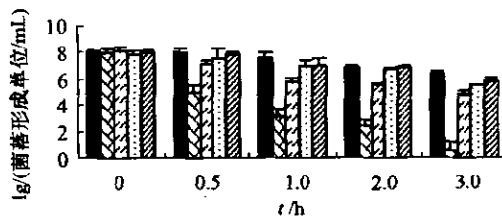


图2 C1 菌株在不同 pH 值条件下的存活
 ■ 对照, □ pH2, ▨ pH2.5, ▩ pH3.5, ▪ pH4

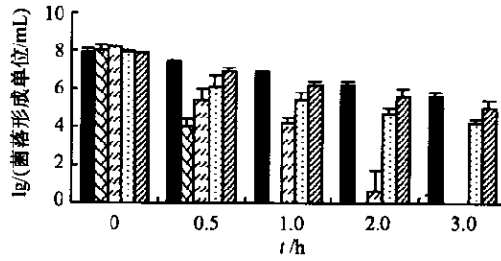


图3 D17 菌株在不同 pH 值条件下的存活数

■ 对照, ▨ pH2, ▩ pH2.5, ▪ pH3.5, ▫ pH4

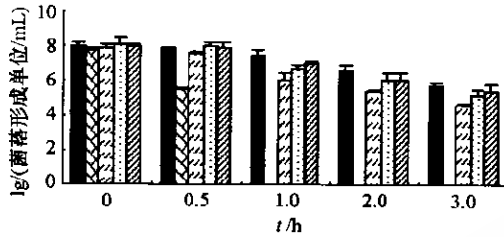


图4 K9 菌株在不同 pH 值条件下的存活数

■ 对照, ▨ pH2, ▩ pH2.5, ▪ pH3.5, ▫ pH4

2.3 胆盐对乳酸菌 C1、D17 和 K9 存活的影响

胆盐对 C1、D17 和 K9 存活影响见图 5。在胆盐浓度为 0.08% ~ 0.40% 范围内, C1、D17 和 K9 均有一定的耐受能力, 随着胆盐浓度的升高, C1、D17 和 K9 的存活数呈现缓慢的下降趋势。

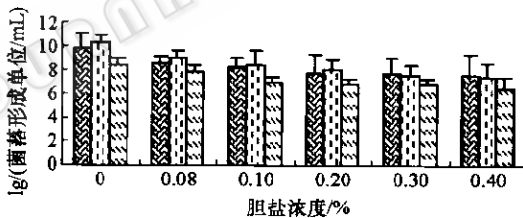


图5 不同胆盐浓度对 C1、D17 和 K9 存活数的影响

▨ K9, ▩ D17, ▫ C1

2.4 温度对乳酸菌 C1、D17 和 K9 存活的影响

由图 6 可见, 与对照组 (37℃ 培养 20 min) 相比, 50℃ 热处理对 C1、D17 和 K9 三菌株的存活无影响。D17 经 65℃ 培养 10 min 后存活数由 $10^{8.9}$ /mL 降为 $10^{7.0}$ /mL, 培养

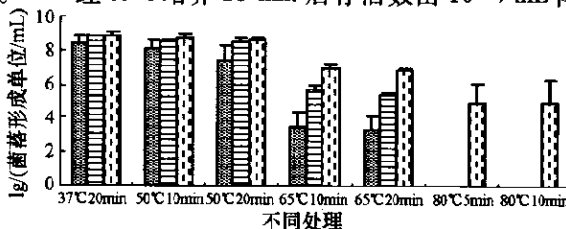


图6 不同温度、不同时间对 C1、D17 和 K9 存活数的影响

▨ K9, ▩ D17, ▫ C1

20 min 后存活数由 $10^{8.9}/\text{mL}$ 降为 $10^{6.8}/\text{mL}$, 经 80°C 热处理后仍有 $10^{4.9}/\text{mL}$ 存活数; K9 经 65°C 培养后存活数由 $10^{8.0}/\text{mL}$ 降为 $10^{5.0}/\text{mL}$, 经 80°C 处理后已检测不到活菌; C1 对温度最敏感, 经 65°C 处理后存活数由 $10^{8.0}/\text{mL}$ 降为 $10^{3.0}/\text{mL}$, 经 80°C 处理后已检测不到活菌。

3 讨论

本试验所用的乳酸菌菌株均有一定的产乳酸能力, 但各菌株之间存在明显差异。K9、D17 和 C1 三菌株培养液的终 pH 值约为 3.5, 显著低于其它菌株, 且三菌株培养液的 pH 值在 0 到 12 h 内迅速下降, 24 h 基本趋于稳定。

Smith^[9] 报道, pH1.2 的野兔胃内, 仅能检测到嗜酸乳杆菌。Conway 等^[10] 报道嗜酸乳杆菌在 pH1 的 PBS 缓冲液中培养 60 min 后, 仍能检测到活菌数 ($10^1 \text{CFU}/\text{mL}$)。说明乳酸杆菌比其它菌更能耐受较低的 pH 值。本研究选用的 3 株乳酸菌 C1、D17、K9 均有较强的耐酸能力, C1 菌株耐酸能力最强, pH2 时还能存活 3 小时; 其次是 K9 菌株, pH2 时能存活半小时; D17 菌株耐酸能力相对较弱。家禽嗉囊内容物的 pH 值一般为 5.0 左右, 胃内容物的 pH 值为 4.6 左右^[11], 因此, 本研究中的这 3 株菌过鸡胃效果理想, 可以考虑用作益生菌菌株。

对胆汁的敏感性也是筛选益生菌菌株的重要指标, 鸡消化道中的胆盐含量为 0.03% ~ 0.30%^[11]。有研究表明, 一些乳酸菌具有一定的胆盐耐受能力^[12,13]。本研究中的 3 株菌在胆盐浓度为 0.08% ~ 0.40% 范围内, 均有一定的耐受能力, 过胃后可在肠道中存活。

益生菌株在菌液浓缩或制作膨化、颗粒料时, 都要进行加热处理。所以我们对 C1、K9 和 D17 三菌株进行了热耐受试验。结果显示, 本研究中的 C1、K9 和 D17 三菌株都有一定的热耐受能力, 但耐受能力不强, 这可能是因为三菌株是兼性厌氧无芽孢杆菌, 在加热培养过程中, 除温度的影响外, 无法维持厌氧环境也是存活数少的原因之一。

综上所述, K9、D17 和 C1 不仅产酸速度快, 产酸能力强, 而且过鸡胃效果理想, 能耐受肠道内的胆盐环境, 因此这三株菌具有良好的开发前景。

参考文献

- [1] Kyriakis S C, Tsiloyianni V K, Vlemmas J, *et al.* *Research Veterinary Science*, 1999, **67**: 223 ~ 228.
- [2] Simon S, Jadamus A, Vahjen W. *J Animal Feed Science*, 2001, **10**: 51 ~ 67.
- [3] 凌代文主编. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999. 117 ~ 118.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1997. 422 ~ 428.
- [5] 钱存柔, 黄贞秀主编. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 176 ~ 182.
- [6] 甘肃农业大学主编. 兽医微生物学实验指导. 北京: 农业出版社, 1980.
- [7] Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. *Journal of Dairy Science*, 1987, **70**: 1 ~ 12.
- [8] Boever P D, Wouters R, Verstraete W. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, **33**: 420 ~ 424.
- [9] Smith W H. *Journal of Pathogenic Bacteria*, 1965, **89**: 95 ~ 122.
- [10] Conway P L, Gorbach S L, Goldin B R. *Journal of Dairy Science*, 1987, **70**: 1 ~ 12.
- [11] Kashket E R. *Review*, 1987, **46**: 233.
- [12] 顾瑞霞, 谭东兴. 微生物学通报, 1996, **23** (3): 144 ~ 146.
- [13] 赵瑞香, 李元瑞. 微生物学通报, 2002, **29** (2): 35 ~ 38.