

会员登录

用户名:

密码:

验证码: 9700

相关文章

- RNA干扰的实验方法及应用
- 鸡肝脏组织中防御素基因片段...
- 原生质体融合技术在饲料开发...
- 产纤维素酶芽孢杆菌的分离鉴...
- 白腐真菌和黑曲霉对甘蔗渣降...
- 利用产脲假丝酵母转化无机硒...
- 硅藻土共固定化淀粉酶和糖化...
- 利用双外流连续培养系统研究...
- 传统技术与现代分子生物学技...
- 饲用酶制剂中木聚糖酶嗜学性...
- 雨生红球藻规模化培养工艺的...
- 扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条...

合作伙伴



仔猪胃源格氏乳酸杆菌生物学特性的研究



作者:黄沧海 陈东晓

期号:2005年第2期

摘要 试验研究了一株从断奶后健康的仔猪胃粘膜分离到的格氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) 的一些重要生物学特性。在体外研究了格氏乳酸杆菌的生长曲线、耐酸存活率、耐热存活率、贮藏存活率等,同时采用均匀设计法优化发酵参数。结果表明,格氏乳酸杆菌的活菌浓度从开始的104 CFU/ml经过14h的培养迅速上升到1010 CFU/ml,到48h以后,细菌活菌浓度的数量级没有变化,但活菌浓度呈下降的趋势。pH2.0处理6h后的存活率为133%,75℃处理15min之后存活率为72%,经过一个月贮藏存活率为37.8%,优化的发酵参数为:时间20h,葡萄糖110g/l,蔗糖60g/l,胰蛋白胨30g/l,酵母浸粉30g/l,柠檬酸铵2g/l。

关键词 格氏乳酸杆菌;生物学特性;发酵参数;存活率
中图分类号 S816.3

乳酸杆菌是猪消化道前段的优势菌群(Ewing和Cole,1994),能抑制肠道腐败菌活动,乳酸杆菌产生的乳酸能够降低pH值,抑制其它微生物生长(康白,1988),消化道中乳酸杆菌的数量、种类和位置对于预防和控制疾病具有重要作用(Fuller,1989)。乳酸杆菌在胃肠道内能够产生细菌素,抑制病原菌的作用,而且乳酸杆菌属的细菌都是无毒副作用的,因此是一类很有前途的益生菌生产菌种(Ewing和Cole,1994)。在美国,益生菌工业上应用的产品57%含有乳酸杆菌属(李玲,1995)。国内对乳酸杆菌作为益生菌的饲养试验结果报道较多,而对菌种的生物学特性研究较少,尤其对格氏乳酸杆菌的生物学特性的研究则未见报道。该菌虽未列入GRAS菌种,但已作为一种人用的益生菌菌种在实际中应用。对其进行的研究主要集中在其对胃肠道黏膜的粘附和抑菌作用的分子机理。益生菌的生物学特性对菌种的发酵生产和进一步研究其在胃肠道的生长繁殖特性具有重要意义,本试验的目的是系统地研究了一株仔猪胃源格氏乳酸杆菌的生长曲线、抗逆特性(耐酸、耐热和贮藏存活率)和发酵参数,为生产发酵该菌株提供有用的数据。

1 材料与方法

1.1 生长曲线

MRS肉汤:蛋白胨10g;牛肉浸膏10g;酵母浸粉5g;磷酸氢二钾2g;枸橼酸二铵2g;葡萄糖20g;七水硫酸镁0.58g;四水硫酸锰0.25g;醋酸钠5g;蒸馏水1000ml,在500ml锥形瓶里装300ml MRS肉汤。按1%接种量接种格氏乳酸杆菌培养物,在前24h每隔1h,24h之后在第28、32、36、40、44、48h取样,取1ml培养液进行梯度稀释后,在10⁻²~10⁻⁶稀释度取0.3ml稀释液在MRS琼脂(pH5.2)上均匀涂布,每个梯度做3个平行样,平皿放置在37℃,5%CO₂的培养箱中,培养24h,取平皿中的菌落数50~150的稀释度作为计算用,每个梯度做3个平行样,以平均值表示结果。每毫升细菌浓度以对数值表示。

1.2 耐酸存活率

MRS肉汤:蛋白胨10g;牛肉浸膏10g;酵母浸粉5g;磷酸氢二钾2g;枸橼酸二铵2g;葡萄糖20g;七水硫酸镁0.58g;四水硫酸锰0.25g;醋酸钠5g;吐温-80 1g;蒸馏水1000ml;用冰醋酸调节pH至5.4,再用浓盐酸将pH调节至2.0。置于Hungates滚管中,每个管装20ml肉汤,制成厌氧无菌肉汤。凉下来后每管中加1ml格氏乳酸杆菌16h的培养物,在开始时、2h、4h、6h和8h分别取样,测定存活率。用无菌注射器取出1ml进行梯度稀释后,在10⁻⁴~10⁻⁷稀释度取0.3ml稀释液在MRS琼脂(pH5.2)上均匀涂布,每个梯度做3个平行样,平皿放置在37℃,5%CO₂的培养箱中,培养24h,取平皿中的菌落数50~150的平皿计数,以平均值表示结果。

存活率的计算公式为:

$$S_{酸} = nx / n0$$

式中: S_酸——经过pH2.0处理后不同时间的格氏乳酸杆菌存活率;

n₀——pH2.0处理前每毫升活菌数;

nx——pH2.0处理2、4、6、8 h后每毫升活菌数。

1.3 耐热存活率

MRS肉汤:蛋白胨10g;牛肉浸膏10g;酵母浸粉5g;磷酸氢二钾2g;枸橼酸二铵2g;葡萄糖20g;七水硫酸镁0.58g;四水硫酸锰0.25g;醋酸钠5g;吐温-80 1g;蒸馏水1000 ml;调节pH为6.7,置于Hungates滚管中,每个管装20ml肉汤,制成厌氧无菌肉汤。每管中加1ml格氏乳酸杆菌培养16h后的培养物,放置在37℃培养箱中16h后,取样进行活菌计数培养,同时将Hungates管迅速放置在75℃水浴中加热15 min,取样进行活菌计数。用无菌注射器取出1ml进行梯度稀释后,在10⁻⁴~10⁻⁷稀释度取0.3ml稀释液在MRS琼脂(pH5.2)上均匀涂布,每个梯度做3个平行样,平皿放置在37℃,5%CO₂培养箱中,培养24h,取平皿中的菌落数为50~150的平皿计数,以平均值表示结果。

存活率的计算公式为:

$$S_{热} = n1 / n0$$

式中: S_热——经过75℃处理后的格氏乳酸杆菌存活率;

n₀——加热处理前每毫升活菌数;

n₁——加热处理15min后每毫升活菌数。

1.4 贮藏存活率

MRS肉汤:蛋白胨10g;牛肉浸膏10g;酵母浸粉5g;磷酸氢二钾2g;枸橼酸二铵2g;葡萄糖20g;七水硫酸镁0.58g;四水硫酸锰0.25g;醋酸钠5g;吐温-80 1g;蒸馏水1000ml; pH为6.7,置于Hungates滚管中,每个管放置20ml的MRS肉汤,制成厌氧无菌肉汤后,每管中加1ml格氏乳酸杆菌培养16h的培养物,放置在37℃培养箱中16h后,取样1ml进行活菌计数。室温下放置1个月,取样1ml进行活菌计数培养。计数方法用无菌注射器取出1ml进行梯度稀释后,在10⁻⁴~10⁻⁷稀释度取0.3ml稀释液在MRS琼脂(pH5.2)上均匀涂布,每个梯度做3个平行样,平皿放置在37℃,5%CO₂的培养箱中,培养24h,取菌落数为50~150个的平皿计数,以平均值表示结果。

存活率的计算公式为:

$$S_{贮} = n1 / n0$$

式中: S_贮——经过1个月贮藏后的格氏乳酸杆菌存活率;

n₀——贮藏前每毫升活菌数;

1.5 发酵参数的优化

采用均匀设计方法对6个影响格氏乳酸杆菌发酵的因素进行优化，试验按照6因素6水平均匀设计表进行安排，组成6种发酵参数方案，培养基的微量元素含量按照MRS肉汤的推荐量添加。试验处理见表1，每个处理设3个重复。每种培养基用1000ml锥形瓶装600ml培养基，按5%接种量接种乳酸杆菌培养物，放置在37℃、5%CO₂培养箱。接种24h之后，取样测定不同培养基中的活菌浓度，活菌的测定采用厌氧滚管法，在试验结束时，每种培养基取出1ml培养液进行梯度稀释后，在10⁻⁴~10⁻⁸稀释度取0.3ml稀释液注入Hungates滚管中，轻轻摇匀，培养24h后，取菌落数为50~150的管计算，每个稀释度做3个平行样，以平均值表示结果。

表1 由均匀设计表确定的发酵参数的组成

项目	时间(h)	葡萄糖(g/l)	蔗糖(g/l)	蛋白胨(g/l)	酵母浸粉(g/l)	柠檬酸铵(g/l)
1	20	70	60	20	25	4
2	19	10	40	5	10	8
3	17	30	30	25	30	12
4	16	50	10	10	20	2
5	15	110	50	15	15	10
6	18	90	20	30	5	6

1.6 统计方法

发酵参数的优化采用中国均匀设计学会与香港浸会大学统计学研究和咨询中心共同开发的均匀设计软件4.0版，统计分析数据，用二次回归和逐步回归的方法对各因素的解进行最优化。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线

生长曲线主要反映一种微生物的生长特性，典型的微生物生长模型一般要经历延迟期、对数生长期、稳定期和衰亡期4个阶段。延迟期是微生物对新的生长环境的适应过程，在这一过程中，微生物表现为数量不变或下降，微生物对其自身的大分子和小分子的组成进行调整，同时也会产生特定的物质如酶等来适应新的环境。对数生长期是微生物对新的环境适应之后，菌体生长繁殖速度呈几何级数的阶段，是菌体数量增长最快的一个阶段，表现为菌体数量增加，菌体重量增加。但是到了对数期的末期，由于细菌的生长营养物质消耗以及细菌正常生理代谢产物的积累，细菌的生长繁殖速率下降。稳定期是细菌生长速率与死亡速率趋于平衡的阶段。衰亡期细菌数明显下降。格氏乳酸杆菌的生长曲线如图1所示，从图1可见，格氏乳酸杆菌的浓度从10⁴个数量级经过14h的培养迅速上升到10¹⁰个数量级，到48h，细菌的数量级没有变化，只是活菌数有下降的趋势，主要原因是培养基营养物质浓度下降，培养基中有害代谢产物增加引起菌体死亡，生长繁殖的菌体数量比死亡的菌体数量更多，导致总的活菌数量减少。益生菌产品的活菌数普遍偏低，在美国有一项调查表明81%的益生菌产品活菌数比标签上声明的数量要低得多(Fuller, 1999)，可能的原因之一是一些厂家为了降低生产成本，在制造时就没有按要求达到所规定的活菌数。从生长曲线可以看出，格氏乳酸杆菌的最佳收获期在培养后14~24h。在这一段时间收获菌体，可以减少获得单位活菌的成本。

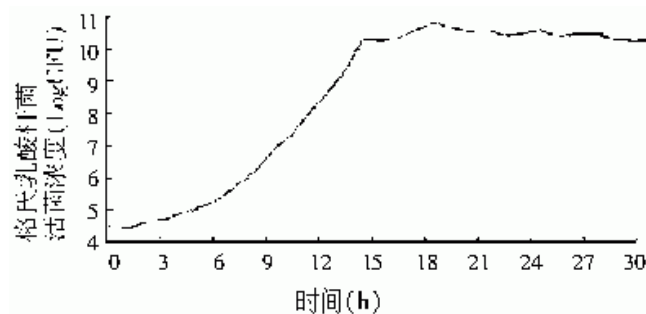


图1 格氏乳酸杆菌生长曲线

2.2 耐酸存活率

成年猪的胃pH值一般为1~2，断奶仔猪胃的pH值变异较大，一般为2.60~5.83(杨琳等, 2001)，胃环境对细菌的破坏是pH依赖的酸水解作用，pH小于2.5时杀菌作用很明显，胃是动物消除进入体内病原微生物的第一道屏障，当然正是这种胃的酸性环境对进入体内的有益微生物的活力会产生不利的影响。本试验在体外模拟仔猪胃内的酸度，考虑到断奶仔猪胃内还有其它的抑菌因素，采用比正常断奶仔猪胃内更低的酸度pH2.0的培养液测定不同处理时间格氏乳酸杆菌的活菌浓度，不同处理时间的活菌浓度见表2。

表2 pH2.0处理不同时间对格氏乳酸杆菌活菌浓度的影响

项目	时间(h)				
	0	2	4	6	8
活菌浓度(CFU/ml)	2.1×10 ¹¹	3.2×10 ¹¹	3.6×10 ¹¹	2.8×10 ¹¹	5.2×10 ¹⁰
存活率(%)	100	150	170	133	2

从表2可见，在pH2.0处理的前4h，格氏乳酸杆菌还有一定的生长，说明格氏乳酸杆菌的耐酸性能较好，但到了第6h活菌数开始下降，但也比起始活菌数高，只是到了第8h，活菌数才呈急剧的下降，与细菌的大量死亡有关。格氏乳酸杆菌是一株分离自断奶仔猪胃粘膜上皮细胞的乳酸杆菌，在仔猪饲料中添加的预期目标也是使其能够被仔猪摄食后在胃内定植、生长和繁殖，从而发挥抑制病原菌的益生作用。仔猪胃部的pH值范围一般为2.60~5.83，这说明格氏乳酸杆菌对胃的低pH环境完全可以耐受而且数量还可以有一定的增加。尤其是当胃部的pH值因断奶而上升时，格氏乳酸杆菌的生长速率势必加快，胃内格氏乳酸杆菌增加有利于保持胃内微生物菌群的平衡，形成正常的微生物菌群对抑制病原菌的繁殖和在胃粘膜的粘附具有重要作用，同时乳酸杆菌分泌的乳酸对降低胃内pH也有一定的补充作用，这对提高仔猪胃抑制病原菌的能力、提高胃蛋白酶原的活化和胃蛋白酶的活力将有很大益处。

2.3 耐热存活率

格氏乳酸杆菌经过75℃处理15min后的活菌浓度如下：

处理前: 5.7×10^9 CFU/ml, 75℃处理后 4.1×10^9 CFU/ml, 存活率为72%。一般仔猪饲料的调质和制粒温度为70~85℃之间, 饲料在调质腔和制粒机内总的时间为25~30s, 格氏乳酸杆菌经过75℃之后存活率能达到72%, 说明这一株乳酸杆菌在饲料制粒时可以耐受制粒时的高温, 作为饲料添加剂将会有很好的前途。这个存活率也比前人报道的高很多倍, 许多报道乳酸杆菌经过70℃以上的高温处理之后, 存活率几乎为零。而且耐高温之后存活率低也是乳酸杆菌作为饲料添加剂的主要限制性因素之一。从本试验的结果看格氏乳酸杆菌的耐热性能是良好的。

2.4 贮藏存活率

格氏乳酸杆菌的起始活菌浓度为每毫升 4.5×10^{10} CFU, 经过一月之后活菌浓度为每毫升 1.7×10^{10} CFU, 贮藏存活率为37.8%。从本试验的结果看, 含有该菌株的益生菌产品在体外的贮藏时间不宜太长, 最好在一个月之内使用完。一般的预混料的保质期是3~4个月, 使用格氏乳酸杆菌的益生菌产品应标明适当的保质期, 以保证仔猪在采食时能摄入足够数量的活菌。

2.5 发酵参数的优化

本试验考虑的影响格氏乳酸杆菌生长繁殖较大的因素主要有时间、碳源如葡萄糖和蔗糖、氮源有胰蛋白胍和柠檬酸铵以及生长促进物质酵母浸粉, 优化的组分主要以MRS培养基的组成成分为基准。试验结果见表3, 从表3可见, 用均匀设计法安排的6种不同发酵方案对格氏乳酸杆菌的活菌浓度有明显的差异。试验结果采用均匀设计软件4.0版中的二次回归和逐步回归的方法对各因素的解进行最优化, 同时对不同影响因素之间的相关系数也进行了考察, 不同影响因素的相关系数见表4, 优化结果见表5。从表4可以看出, 时间、葡萄糖和胰蛋白胍对格氏乳酸杆菌的生长具有正面效应, 而柠檬酸铵、酵母浸粉和蔗糖则呈现负效应, 尤其是柠檬酸铵, 在浓度高时对提高格氏乳酸杆菌的生长量是不利的。葡萄糖和蔗糖、胰蛋白胍有一定的协同作用, 而和酵母浸粉、柠檬酸铵有拮抗作用, 葡萄糖浓度高时, 延长发酵时间对菌体浓度是不利的。从表5可以看出格氏乳酸杆菌的发酵参数的优化组成, 为今后的发酵生产提供了一套重要的数据。

表3 不同处理组格氏乳酸杆菌的活菌浓度(10^8 CFU/ml)

项目	处理组					
	1	2	3	4	5	6
1	2.0	0.005 0	0.10	1.6	0.060	2.6
2	3.1	0.004 8	0.11	2.0	0.063	2.7
3	2.5	0.004 8	0.13	1.8	0.058	3.1

表4 变量间相关系数

项目	X1(时间)	X2(葡萄糖)	X3(蔗糖)	X4(胰蛋白胍)	X5(酵母浸粉)	X6(柠檬酸铵)	Y1(活菌浓度)
X1	1.000	-	-	-	-	-	-
X2	-0.371	1.000	-	-	-	-	-
X3	0.371	0.200	1.000	-	-	-	-
X4	0.086	0.429	-0.086	1.000	-	-	-
X5	-0.029	-0.257	0.200	0.086	1.000	-	-
X6	-0.257	-0.086	0.257	0.200	0.143	1.000	-
Y1	0.388	0.364	-0.187	0.457	-0.165	-0.748	1.000

表5 格氏乳酸杆菌发酵参数最优解

项目	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Y最大/Y最小	最优解 Yi
Y1	20.00	110.00	60.00	30.00	30.00	2.00	3.73	13.73
综合最优解 YY	20.00	110.00	60.00	30.00	30.00	2.00	-	-

3 小结

格氏乳酸杆菌在发酵后14~24h是合适的菌体收获期; 格氏乳酸杆菌的耐热存活率为72%, 耐贮藏存活率为37.8%, 耐酸存活率为133%; 不同氮源对格氏乳酸杆菌的发酵活菌浓度影响较大, 胰蛋白胍对其活菌浓度有正效应, 而铵盐对其生长有负效应。优化后的发酵参数为: 时间, 20h; 葡萄糖, 110g/l; 蔗糖, 60g/l; 胰蛋白胍, 30g/l; 酵母浸粉, 30g/l; 柠檬酸铵, 2g/l。

参考文献

- 1 Ewing, W. N., and D. J. A. Cole. The Living Gut: an Introduction to Micro-organisms in Nutrition. Context Publishing, 1994, 81~94
- 2 Fuller, R. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol, 1989, 66: 365~378
- 3 Fuller, R. Probiotics for farm animals. In: Tannock G. W. (ed.) Probiotics: a Critical Review. Horizon Scientific Press, Norfolk, 1999, 15~22
- 4 康白主编. 微生物学. 大连: 大连出版社, 1988, 78~169
- 5 李玲. 世界饲料添加剂的进展. 饲料工业, 1995, 16(11): 5~9
- 6 王传彬, 王永坤, 朱国强, 周继宏. 动物源乳酸杆菌筛选及生物学特性参数测定. 江苏农学院学报, 1997, 18(1): 1~5
- 7 杨琳, 张宏福, 李长忠, 顾宪红, 方路, 马永喜, 龚利敏, 冯广明. 不同断奶日龄仔猪消化道酸度和胃蛋白酶活性的动态变化. 畜牧兽医学报, 2001, 32(4): 299~304a

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽 ICP备05006846号

饲料工业杂志社地址:沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编:110036 投稿:E-mail:tg@feedindustry.com.cn 广告:E-mail:ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部:(024)86391926(传真) 编辑二部:(024)86391925(传真) 网络部、发行部:(024)86391237 总编室:(024)86391923(传真)