

仔猪源罗伊氏乳酸杆菌生物学特性的研究*

黄沧海¹, 谯仕彦², 李德发²

(1. 集美大学水产学院, 水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021;
2. 国家饲料工程技术研究中心, 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘要: 研究了罗伊氏乳酸杆菌的生物学特性包括生长曲线、耐热存活率、耐酸存活率、贮藏存活率以及发酵参数。采用均匀设计的试验设计对影响乳酸杆菌发酵较大的 6 个因素如碳源、氮源和时间进行优化。试验结果表明, 罗伊氏乳酸杆菌的浓度在开始时有所下降, 经过 2 h 之后从 1.0×10^3 数量级迅速上升, 到第 22 h 接近 1.0×10^{10} 数量级, 到 40 h 细菌的数量级开始缓慢下降。75 °C 处理 15 min 之后存活率为 31.3%, 经过 1 个月贮藏存活率为 85.5%, pH 2.0 处理 6 h 的存活率为 72%。优化的发酵参数为: 时间 20 h; 葡萄糖 10 g/L; 蔗糖 60 g/L; 胰蛋白胨 30 g/L; 酵母浸粉 5 g/L; 柠檬酸铵 12 g/L。试验表明了罗伊氏乳酸杆菌具有良好的抗逆性, 生长繁殖迅速, 可以用作益生菌生产菌种。

关键词: 罗伊氏乳酸杆菌; 生物学特性; 发酵参数; 抗逆性

中图分类号: S 182.117 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2004)06-0722-05

Study of Biological Characteristics of *Lactobacillus reuteri* Originated from Piglet

HUANG Cang-hai¹, QIAO Shi-yan², LI De-fa²

(1. Fisheries College & Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. National Feed Engineering and Technology Research Center, College of Animal Science and Technology,
China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The biological characteristics of the *L. reuteri* originated from weaning piglet were investigated and fermentation parameters was optimized by means of uniform design. Lactobacillus growth curve, survivability after 75 °C treatment for 15 min, pH 2.0 treatment for 6 h and storage for 1 month, respectively, were measured. The concentration of *L. reuteri* decreased slightly in the first hour and increased very quickly from 1.0×10^3 CFU/mL to about 1.0×10^{10} CFU/mL in 22 h, but fell down in 40 h. *L. reuteri* survivability after 75 °C, storage, and pH 2.0 treatment was 31.3%, 85.5%, 72%, respectively and optimized fermentation parameters were as follows: culture time 20 h, glucose 10 g/L, sucrose 60 g/L, peptone 30 g/L, yeast extract 5 g/L, and ammonium citrate 12 g/L. The lactobacillus showed excellent growth characteristics and good resistance to stress so it can be used in piglet feed as a probiotics bacterium.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; biological characteristics; fermentation parameters; survivability

猪肠道正常菌群中乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 菌种有: 嗜酸乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、罗伊氏乳酸杆菌 (*L. reuteri*)、短乳酸杆菌 (*L. brevis*)、纤维二糖乳酸杆菌 (*L. cellobiosus*)、发酵乳酸杆菌

* 收稿日期: 2004-04-19

基金项目: 国家“十五”攻关计划项目(2002BA514A-12)。

作者简介: 黄沧海(1974-), 男, 福建人, 博士, 讲师, 从事动物营养与饲料科学的研究。

(*L. fermentum*)、唾液乳酸杆菌(*L. salivarius*)^[1]。乳酸杆菌产生的乳酸能够降低胃肠道 pH 值,有利于抑制肠道腐败菌活动^[2]。乳酸杆菌产生细菌素,在胃肠道内能够抑制病原菌的作用^[3]。动物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^[4]。美国 FDA 和 AAFCO 在 1989 年公布的安全微生物菌种共 43 种,其中乳酸杆菌占 12 种^[5],中华人民共和国农业部 1999 年公布允许使用的 12 种饲用微生物中有 3 种是乳酸杆菌^[6]。在美国,益生菌工业上应用的产品 57% 含有乳酸杆菌属^[7]。乳酸杆菌属细菌都没有毒副作用,是一类很有前途的益生菌生产菌种^[3]。国内对乳酸杆菌作为益生菌饲料添加剂的饲养试验报道较多,而对益生乳酸杆菌菌种的生物学特性报道很少,只有王传彬等于 1997 年对动物源乳酸杆菌生物特性参数的研究^[8],王淑敏等(1995)对加拿大生产的益生菌 Pro-suis 中的 3 种菌种生物学特性参数的研究以及王士长等(1999)对芽孢杆菌生物学特性研究的报道^[9,10]。而对罗伊氏乳酸杆菌的生物学特性的研究则未见报道,国外对罗伊氏乳酸杆菌则主要集中在对其在胃肠道内粘附、细菌素和抑菌作用分子机理的研究。益生菌的生物学特性对菌种的发酵生产和进一步研究其特性具有重要意义,本试验的目的是系统研究罗伊氏乳酸杆菌耐酸存活率、生长曲线、耐热特性、贮藏特性以及发酵的最佳培养基组成,为生产含该菌株的益生菌提供有用的数据。

1 材料与方法

1.1 生长曲线

MRS 肉汤:蛋白胨,10 g;牛肉浸膏,10 g;酵母浸粉,5 g;磷酸氢二钾,2 g;枸橼酸二铵,2 g;葡萄糖,20 g;七水硫酸镁,0.58 g;四水硫酸锰,0.25 g;醋酸钠,5 g;蒸馏水,1 000 mL,在 500 mL 锥形瓶里装 300 mL MRS 肉汤。按 1% 接种量接种罗伊氏乳酸杆菌培养物,在前 24 h 每隔 1 h,24 h 之后在第 28,32,36,40,44 和 48 h 取样,取 1 mL 培养液进行梯度稀释后,在 $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ 稀释度取 0.3 mL 稀释液在 MRS 琼脂(pH 5.2)上均匀涂布,每个梯度做 3 个平行样,平皿放置在 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中,培养 24 h,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,10 g;牛肉浸膏,10 g;酵母浸粉,5 g;磷酸氢二钾,2 g;枸橼酸二铵,2 g;葡萄糖,20 g;七水硫酸镁,0.58 g;四水硫酸锰,0.25 g;醋酸钠,5 g;吐温-80,1 g;蒸馏水 1 000 mL;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 20 mL 肉汤,制成厌氧无菌肉汤。凉下来后每管中加 1 mL 罗伊氏乳酸杆菌 16 h 的培养物,在开始时 2,4,6 和 8 h 分别取样,测定存活率。用无菌注射器取出 1 mL 进行梯度稀释后,在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ 稀释度取 0.3 mL 稀释液在 MRS 琼脂(pH 5.2)上均匀涂布,每个梯度做 3 个平行样,平皿放置在 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中,培养 24 h,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:

$$S_{\text{酸}} = n_x / n_0$$

$S_{\text{酸}}$ 为经过 pH 2.0 处理后不同时间的罗伊氏乳酸杆菌存活率;

n_0 为 pH 2.0 处理前每 mL 活菌数;

n_x 为 pH 2.0 处理 2,4,6,8 h 后每 mL 活菌数。

1.3 耐热存活率

MRS 肉汤:蛋白胨,10 g;牛肉浸膏,10 g;酵母浸粉,5 g;磷酸氢二钾,2 g;枸橼酸二铵,2 g;葡萄糖,20 g;七水硫酸镁,0.58 g;四水硫酸锰,0.25 g;醋酸钠,5 g;吐温-80,1 g;蒸馏水,1 000 mL;调节 pH 为 6.7,置于 Hungates 滚管中,每个管装 20 mL 肉汤,制成厌氧无菌肉汤。每管中加 1 mL 罗伊氏乳酸杆菌培养 16 h 后的培养物,放置在 37 °C 培养箱中 16 h 后,取样进行活菌计数培养,同时将 Hungates 管迅速放置在 75 °C 水浴中加热 15 min,取样进行活菌计数。用无菌注射器取出 1 mL 进行梯度稀释后,在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ 稀释度取 0.3 mL 稀释液在 MRS 琼脂(pH 5.2)上均匀涂布,每个梯度做 3 个平行样,平皿放置在 37 °C,5% CO₂ 培养箱中,培养 24 h,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:

$$S_{\text{热}} = n_1 / n_0$$

$S_{\text{热}}$ 为经过 75 °C 处理后的罗伊氏乳酸杆菌存活率;

n_0 为加热处理前每 mL 活菌数;

n_1 为加热处理 15 min 后每 mL 活菌数。

1.4 贮藏存活率

MRS 肉汤: 蛋白胨, 10 g; 牛肉浸膏, 10 g; 酵母浸粉, 5 g; 磷酸氢二钾, 2 g; 枸橼酸二铵, 2 g; 葡萄糖, 20 g; 七水硫酸镁, 0.58 g; 四水硫酸锰, 0.25 g; 醋酸钠, 5 g; 吐温-80, 1 g; 蒸馏水, 1 000 mL; pH 为 6.7, 置于 Hungates 滚管中, 每个管放置 20 mL 的 MRS 肉汤, 制成厌氧无菌肉汤后, 每管中加 1 mL 罗伊氏乳酸杆菌培养 16 h 的培养物, 放置在 37 °C 培养箱中 16 h 后, 取样 1 mL 进行活菌计数。室温下放置 1 个月后, 取样 1 mL 进行活菌计数培养。计数方法用无菌注射器取出 1 mL 进行梯度稀释后, 在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ 稀释度取 0.3 mL 稀释液在 MRS 琼脂 (pH 5.2) 上均匀涂布, 每梯度做 3 个平行样, 平皿放置在 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中, 培养 24 h, 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:

$$S_{\text{贮}} = n_1/n_0$$

$S_{\text{贮}}$ 为经过 1 个月贮藏后的罗伊氏乳酸杆菌存活率;

n_0 为贮藏前每 mL 活菌数;

n_1 为贮藏 1 个月后每 mL 活菌数。

1.5 发酵参数的优化

试验采用均匀设计方法, 对 6 个影响罗伊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 种培养基配方, 培养基的微量元素含量按照 MRS 肉汤的推荐量添

加, 均匀设计表见表 1, 培养基成分和水平见表 2。试验的培养基组成见表 3, 每个处理设 3 个重复。每种培养基用 1 000 mL 锥形瓶装 600 mL 培养基, 按 5% 接种量接种乳酸杆菌培养物, 放置在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱。接种 24 h 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 1 mL 培养液进行梯度稀释后, 在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ 稀释度取 0.3 mL 稀释液注入 Hungates 滚管中, 轻轻摇匀, 培养 24 h 后, 取菌落数为 50 ~ 150 的管计算, 每稀释度做 3 个平行样, 以平均值表示结果。

表 1 6 水平 6 因素均匀设计表

6	4	6	4	5	2
5	1	4	1	2	4
3	2	3	5	6	6
2	3	1	2	4	1
1	6	5	3	3	5
4	5	2	6	1	3

表 2 培养基组成和水平

培养基成分	水 平					
时间/h	15	16	17	18	19	20
葡萄糖/(g·L ⁻¹)	10	30	50	70	90	110
蔗糖/(g·L ⁻¹)	10	20	30	40	50	60
蛋白胨/(g·L ⁻¹)	5	10	15	20	25	30
酵母浸粉/(g·L ⁻¹)	5	10	15	20	25	30
柠檬酸铵/(g·L ⁻¹)	2	4	6	8	10	12

表 3 由均匀设计表确定的发酵培养基的组成

Tab. 3 Composition of media decided by uniform design

培养基号	时间/h	葡萄糖/(g·L ⁻¹)	蔗糖/(g·L ⁻¹)	蛋白胨/(g·L ⁻¹)	酵母浸粉/(g·L ⁻¹)	柠檬酸铵/(g·L ⁻¹)
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 结果与分析

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。罗伊氏乳酸杆菌的生长曲线如图1所示,从图1可见,罗伊氏乳酸杆菌的浓度在开始时有下降的趋势,经过2h之后从 1.0×10^3 个数量级迅速上升,到第22h接近 1.0×10^{10} 个数量级,到40h,细菌的数量级开始缓慢下降,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自溶死亡增加,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。从生长曲线可以看出,罗伊氏乳酸杆菌的最佳收获期是在培养后20~28h,一是培养时间较短,二是收获的菌体数量较多。在这一段时间收获菌体,可以减少获得单位活菌的成本。

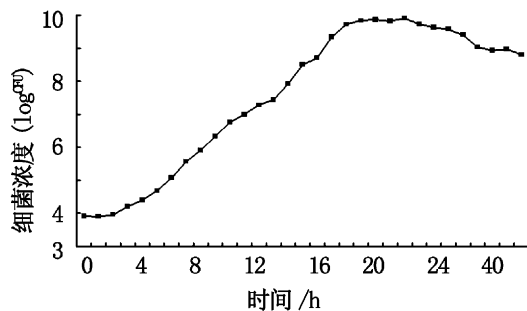


图1 罗伊氏乳酸杆菌生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Lactobacillus reuteri*

2.2 耐酸存活率

罗伊氏乳酸杆菌不同时间的菌体浓度见表4.

经过2h的盐酸处理,罗伊氏乳酸杆菌的数量几乎保持在100%的存活率,到第4h存活率下降为72%,第6h下降为34.4%,这个数值比王传彬等(1997)测定的分离自猪和鸡胃肠道的乳酸杆菌的存活率高。罗伊氏乳酸杆菌是1株分离自十二

指肠粘膜的菌种,这个存活率对于其耐过胃酸的抑制作用或杀灭作用应是较为理想的,也表明该菌株可以有足够数量的活菌数到达十二指肠。

表4 pH 2.0处理不同时间对罗伊氏乳酸杆菌活菌浓度的影响

Tab. 4 Effects of pH 2.0 treatment on *Lactobacillus reuteri* concentration at different time

项目	时间/h				
	0	2	4	6	8
活菌浓度	2.5×10^7	2.4×10^7	1.8×10^7	8.6×10^6	1.3×10^5
存活率		96.0	72.0	34.4	0.5

表5 不同培养基对罗伊氏乳酸杆菌活菌浓度的影响

Tab. 5 Effects of different media on *Lactobacillus reuteri* concentration

重复号	培养基					
	1	2	3	4	5	6
1	1.7	3.0	1.2	2.1	0.10	2.1
2	1.8	4.2	1.4	2.0	0.11	2.2
3	2.5	3.9	2.1	2.4	0.10	2.3

2.3 耐热存活率

罗伊氏乳酸杆菌经过75℃处理15min后的活菌浓度如下:

处理前: 3.1×10^9 ,75℃处理后 9.7×10^8 ,存活率为31.3%。一般仔猪饲料的制粒温度为70~85℃之间,罗伊氏乳酸杆菌经过75℃之后存活率能达到31.3%,这一数值比格氏乳酸杆菌低,但比报道的乳酸杆菌仍然高很多,根据Fuller总结前人所作的试验,乳酸杆菌经过75℃的高温处理10min之后基本上没有活菌,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。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。从本试验的结果看罗伊氏乳酸杆菌的耐热能力对于将其用于饲料添加剂中是足够的。

2.4 贮藏存活率

罗伊氏乳酸杆菌的起始活菌浓度为 6.2×10^{10} CFU/mL,经过1月之后活菌浓度为 5.3×10^{10} CFU/mL,贮藏存活率为85.5%。这一结果与生长曲线的

趋势看起来有一定的矛盾,可能原因是该菌株在贮藏时其浓度较高,细菌之间沉淀在试管底部形成自我保护的作用,从而减少了菌体死亡。

2.5 发酵参数的优化

本试验考虑的影响罗伊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、氮源有胰蛋白胨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础。试验结果见表 5 和表 6。

表 6 罗伊氏乳酸杆菌发酵参数最优解

Tab. 6 Optimal results for fermentation parameters of *Lactobacillus reuteri*

Y_i	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Y_{\max}/Y_{\min}	权 K_i	最优解 Y_i
Y_1	20.00	10.00	60.00	30.00	5.00	12.00	5.16	1	5.16
综合最优解 YY	20.00	10.00	60.00	30.00	5.00	12.00			

注: X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 和 X_6 分别代表时间、葡萄糖、蔗糖、胰蛋白胨、酵母浸粉和柠檬酸铵。

3 讨论

(1) 罗伊氏乳酸杆菌在发酵后 20 到 28 h 是合适的菌体收获期。

(2) 罗伊氏乳酸杆菌的耐热存活率为 31.3%, 耐贮藏存活率为 85.5%, 耐酸存活率如果按 72% 算, 则综合抗逆存活率为 19.3%。

(3) 除时间外, 不同因素对罗伊氏乳酸杆菌的发酵活菌浓度影响较大, 胰蛋白胨对其活菌浓度的影响最大, 而铵盐对其生长有负效应, 而且铵盐、葡萄糖和酵母浸粉浓度对其负效应的影响程度相似, 说明铵盐、葡萄糖和酵母浸粉浓度在培养基中不能太高, 否则不利罗伊氏乳酸杆菌达到更高的浓度。最佳的发酵参数为: 时间 20 h; 葡萄糖 10 g/L; 蔗糖 60 g/L; 胰蛋白胨 30 g/L; 酵母浸粉 5 g/L; 柠檬酸铵 12 g/L。

[参 考 文 献]

[1] KANDLER O, N WEISS. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: Sneath, P. H. A. (ed.) *Bergey's Manual of De-*

terminative Bacteriology [J]. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, 1 208 - 1 234.

[2] 康白主编. 微生物学 [M]. 大连: 大连出版社, 1988.

[3] EWING W N, COLE D J A. *The Living Gut: an Introduction to Micro-organisms in Nutrition* [M]. Context Publishing, 1994.

[4] FULLER R. Probiotics in man and animals [J]. *J. Appl. Bacteriol*, 1989, 66: 365 - 378.

[5] AAFCO. Official Publication. Association of American Feed Control Officials, Incorporated Nicholas [M]. J. President, Dept. of Agr. Ahrens, Wisconsin, 1989, 103.

[6] 国家质量技术监督局标准化司等合编. 饲料标签标准实施指南 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2000.

[7] 李玲. 世界饲料添加剂的进展 [J]. *饲料工业*, 1995, 16 (11): 5 - 9.

[8] 王传彬, 王永坤, 朱国强, 等. 动物源乳酸杆菌筛选及生物学特性参数测定 [J]. *江苏农学院学报*, 1997, 18 (1): 1 - 5.

[9] 王淑敏, 顾万钧, 田来明, 等. Pro-suis 益生菌种特性分析 [J]. *吉林农业大学学报*, 1995, 17(4): 57 - 59.

[10] 王士长, 徐菊芬, 张梅芳. 益生菌生产菌的生物学特性研究 [J]. *广西科学院学报*, 1999, 15(1): 11 - 14.