

猪源乳酸菌产乳酸及其抑菌特性研究*

吴惠芬 毛胜勇 姚文 朱伟云**

(南京农业大学消化道微生物研究室 南京 210095)

摘要: 研究了 5 株 (L1、L2、L3、L5 和 L7) 分离自仔猪肠道的乳酸菌的产乳酸能力及抑菌特性。结果表明: L5 菌株产乳酸的速度最快, 培养液中乳酸含量最高, L5 菌株培养液 pH 值的下降速度最快, 终末 pH 值最低, 而 L1 菌株产乳酸的速度最慢, 培养液乳酸含量最低。5 株乳酸菌对大肠杆菌 K88、K99、987P、O141 和大肠杆菌 E1 及金黄色葡萄球菌均有不同程度的抑制作用; 排除酸的影响后仍有 22% ~ 53% 抑菌效果; 经热处理后保持有 92% 以上的抑菌效果; 蛋白酶处理后保持 85% 以上的抑菌效果。

关键词: 乳酸菌, 乳酸产量, 抑菌特性, 仔猪肠道

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0079-06

Lactic Acid Production and Antagonistic Effect of Lactic Acid Bacteria from Piglet Intestine*

WU Hui-Fen MAO Sheng-Yong YAO Wen ZHU Wei-Yun**

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

Abstract: Lactic acid production and antagonistic property of five strains of LAB isolated from piglet intestine were investigated. The results showed that among all strains L5 exhibited the most rapid production and highest amount of lactic acid in the culture. Consequently, the pH in L5 culture showed the fast decline, with the final value significantly lower than those of other cultures. Strain L1 showed the least production of lactic acid and highest pH among all strains. Culture supernatants of the five strains showed different degrees of antagonistic effect against pathogenic *E. coli* K88, K99, 987P, O141, E1, and *S. aureus*. When taking out the effect of the acid, the culture supernatants still showed 22% ~ 53% inhibitory effect, suggesting that the bacteria produced other inhibitory substances apart from lactic acid. The inhibitory effect of the culture supernatant was above 92% after heat treatment and above 85% when treated with proteases.

Key words: Lactic acid bacteria, Lactic acid production, Antagonistic property, Piglet intestine

乳酸菌是动物肠道正常菌群中的优势菌, 其保健作用业已被认识。在畜牧生产中, 以乳酸菌为主的益生菌产品日益增多, 也有不少关于益生菌促进动物增重、提高饲料报酬和减少发病率的报道^[1,2]。但是据 Simon 等从各种报道的统计分析看, 益生菌在畜牧生产中的应用效果不显著, 其中的一个重要原因是所用微生物菌株在动物肠道中难以存活^[2]。目前, 生产上应用的绝大多数益生菌菌株来自土壤、水等环境, 这种环境与动物肠道内的生理环境有着本质上的差异。在肠道内, 胆盐和酸性环境等能抑制很多微生物的生长, 而且动物机体本身具有排外作用。再者, 很多需氧微生物本身可能

* 国家自然科学基金项目 (No. 30005005),
国家杰出青年科学基金 (No. 30025034),

** 联系人 Tel: 86-25-84395380, Fax: 86-25-84395314, E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com

收稿日期: 2004-04-27, 修回日期: 2004-07-19

较难在相对厌氧的肠道环境中生长。相反,在肠道内固有的微生物经过长期的选择和适应,可以较好地 在肠道环境中生长和增殖。

本文所用 5 株乳酸菌均分离自仔猪肠道,本研究通过分析这 5 株菌的产乳酸能力、抑菌能力及其所产生的抑菌物质特性,探讨这些乳酸菌菌株作为益生素的应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌种

乳酸菌株 L1 (多粘芽孢杆菌, *Bacillus polymyxa*)、L2 (干酪乳杆菌, *Lactobacillus casei*)、L3 (乳球菌, *Lactococcus sp.*)、L5 (芽孢乳杆菌, *Sporolactobacillus sp.*) 和 L7 (德氏乳杆菌德氏亚种, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) 均由本实验室分离自仔猪肠道食糜。指示菌为猪源产肠毒素型大肠杆菌 K88、K99、987P 和 O141,分离自仔猪肠道食糜大肠杆菌 E1,以及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。大肠杆菌 O141 和金黄色葡萄球菌来源于本校动物医学院微生物实验室,其他菌株均由本实验室保存。

1.2 产乳酸分析试验

5 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℃ 条件下厌氧培养。培养一定时间后,测定培养液的 pH 值和乳酸含量^[5]。

1.3 抑菌试验

培养液直接抑菌:取新鲜乳酸菌培养液接种 MRS 液体培养基,37℃ 厌氧培养 24 h 后离心,测定上清液 pH 值。上清液通过管碟法进行抑菌试验,测定抑菌圈^[6]。指示菌培养用普通营养肉汤,双碟制备用营养琼脂。

排除酸对乳酸菌抑菌效果的影响:用乳酸溶液调 MRS 液体培养基至与 5 菌株培养上清液各自相同的 pH 值,作为对照,分别测定乳酸菌 24 h 培养液 (未经任何处理) 和对照液的抑菌圈。

1.4 抑菌物质的特性研究

抑菌物质的热稳定性试验:同上获得的 5 株乳酸菌上清液分别用 70℃ 30 min、100℃ 30 min、121℃ 15 min 加热处理,测定其抑菌圈大小,并以未经任何处理的乳酸菌培养液为对照。

蛋白酶对抑菌效果的影响:上清液分别加入蛋白酶 K、胃蛋白酶、胰蛋白酶,蛋白酶终浓度为 1mg/mL,于 37℃ 水浴中温育 2 h 后进行抑菌试验,对照为未经任何处理的乳酸菌培养液。

1.5 统计分析

实验数据均为 3 个重复的平均值,数据经 Microsoft Excel 初步整理后,利用 SPSS10.0 单因子方差分析中 LSD 法进行统计分析。

2 结果

2.1 不同乳酸菌乳酸产量的比较

不同乳酸菌乳酸产量见图 1。由图 1a 可见, L5 菌株培养液的乳酸产量呈持续快速

上升趋势, 在 5 株乳酸菌中 L5 产乳酸速度最快, 终浓度最高, 为 74.15 mmol/L。L2、L3 菌株培养液的乳酸产量在 12 h 达到最高, 然后随培养时间增加而下降, 这可能是由于乳酸菌的衰老, 培养能力下降, 继而出现所产生的乳酸为乳酸菌本身代谢所利用, 乳酸含量下降。L7 菌株在 48h 时的乳酸含量仅次于 L5。在 5 个菌株中, L1 菌株的乳酸产量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); L5 菌株培养液的 pH 值下降最快, 终 pH 值最低 (3.40), 其次是 L7 菌株; L1 菌株培养液的 pH 值下降最慢, 终 pH 值最高 (4.75)。

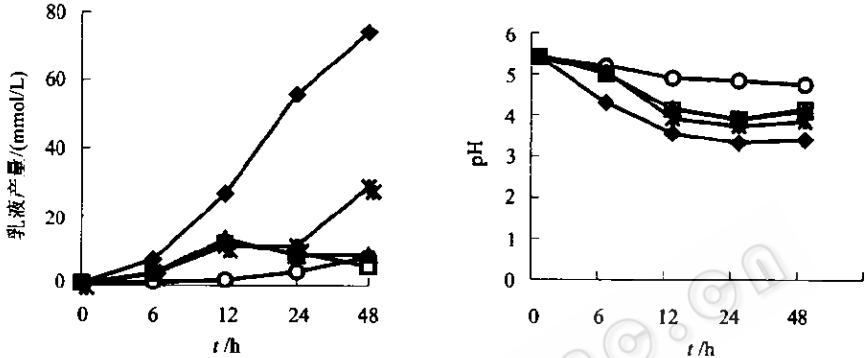


图 1 5 株乳酸菌产乳酸含量及 pH 值随时间变化图

○—L1, ■—L2, ▲—L3, ◆—L4, *—L5

2.2 不同乳酸菌培养液抑菌效果比较

不同乳酸菌培养液抑菌效果见表 1。表 1 显示, 对大肠杆菌 K88, L5、L7 菌株抑菌效果较好, L5、L7 之间无显著差异; 对大肠杆菌 K99, L7 菌株抑菌效果较好; 对大肠杆菌 O141, L5 菌株抑菌效果最好; 对大肠杆菌 987P, L3 菌株的抑菌效果较好, 但与 L5、L7 差异不显著; 对大肠杆菌 E1, L7 菌株抑菌效果最好, 显著高于其他 4 个乳酸菌株; 对金黄色葡萄球菌, L7 菌株的抑制效果较好, 但与 L2、L5 差异不显著。

表 1 乳酸菌原液抑菌圈直径平均值 (mm)

菌株	L1	L2	L3	L5	L7
K88	13.0 ± 0.3 ^{Cb}	13.4 ± 0.3 ^{Cc}	14.9 ± 0.3 ^{Bab}	15.8 ± 0.2 ^{Aa}	15.9 ± 0.3 ^{Aa}
K99	13.0 ± 0.1 ^{Cb}	13.2 ± 0.3 ^{Cc}	14.5 ± 0.2 ^{Bb}	14.8 ± 0.3 ^{ABbc}	15.1 ± 0.4 ^{Ab}
O141	13.9 ± 0.4 ^{Ba}	14.0 ± 0.2 ^{Bb}	14.7 ± 0.4 ^{Ab}	15.0 ± 0.1 ^{Abc}	14.7 ± 0.3 ^{Ab}
987P	13.6 ± 0.4 ^{Ba}	13.4 ± 0.3 ^{Bc}	14.9 ± 0.2 ^{Ab}	14.8 ± 0.3 ^{Abc}	14.7 ± 0.3 ^{Ab}
E1	13.0 ± 0.2 ^{Cb}	13.3 ± 0.3 ^{Cc}	15.3 ± 0.3 ^{Ba}	15.2 ± 0.4 ^{Bb}	15.8 ± 0.3 ^{Aa}
S. a	11.8 ± 0.2 ^{Bc}	14.8 ± 0.3 ^{Aa}	11.6 ± 0.4 ^{Bc}	14.7 ± 0.4 ^{Ac}	15.1 ± 0.4 ^{Ab}

注: 同行肩列大写字母 (ABC) 相同者表示差异不显著, 不同者表示差异显著 ($P < 0.05$); 同列肩列小写字母 (abc) 相同者表示差异不显著, 不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 排除酸对乳酸菌抑菌效果的影响

排除酸对乳酸菌抑菌效果见表 2。由表 2 可见, 与相同 pH 值的 MRS 对照培养液相比, 各乳酸菌原液的抑菌圈直径比对照大 22% ~ 53% (除金黄色葡萄球菌为指示菌时, L3、L5、L7 菌株原液抑菌圈直径与对照差异为 8% ~ 36%), 差异显著 ($P < 0.05$)。

表2 排除酸对乳酸菌抑菌效果的影响(抑菌圈直径 mm)

菌株	处理	L1	L2	L3	L5	L7
K88	原液	13.0±0.3 ^a	13.4±0.3 ^a	14.9±0.3 ^a	15.8±0.2 ^a	15.9±0.3 ^a
	对照	7.2±0.2 ^b	8.8±0.3 ^b	8.4±0.4 ^b	12.1±0.2 ^b	10.0±0.1 ^b
K99	原液	13.0±0.1 ^a	13.2±0.3 ^a	14.5±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	15.1±0.4 ^a
	对照	6.3±0.3 ^b	7.3±0.1 ^b	7.1±0.1 ^b	8.8±0.2 ^b	7.8±0.3 ^b
O141	原液	13.9±0.4 ^a	14.0±0.2 ^a	14.7±0.4 ^a	15.0±0.1 ^a	14.7±0.3 ^a
	对照	7.2±0.1 ^b	8.3±0.3 ^b	7.5±0.4 ^b	11.7±0.3 ^b	9.6±0.4 ^b
987P	原液	13.6±0.4 ^a	13.4±0.3 ^a	14.9±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	14.7±0.3 ^a
	对照	7.1±0.1 ^b	8.2±0.2 ^b	7.7±0.6 ^b	10.3±0.2 ^b	9.1±0.2 ^b
E1	原液	13.0±0.2 ^a	13.3±0.3 ^a	15.3±0.3 ^a	15.2±0.4 ^a	15.8±0.3 ^a
	对照	6.4±0.1 ^b	7.5±0.2 ^b	7.2±0.2 ^b	8.7±0.3 ^b	8.0±0.1 ^b
S. a	原液	11.8±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	11.6±0.4 ^a	14.7±0.4 ^a	15.1±0.4 ^a
	对照	7.5±0.3 ^b	11.5±0.5 ^b	10.6±0.3 ^b	13.6±0.3 ^b	13.2±0.3 ^b

注:同一乳酸菌株同一指示菌同列数据肩标字母相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著($P<0.05$)。

2.4 抑菌物质的热稳定性

抑菌物质热稳定性见表3。由表3可见,5株乳酸菌培养液经70℃ 30 min、100℃ 30 min、121℃ 15 min加热处理后,残留抑菌效果(热处理菌液抑菌圈直径除以原液抑菌圈直径)均在92%(数据未列出)以上。

表3 抑菌物质的热稳定性实验结果(抑菌圈直径 mm)

		L1	L2	L3	L5	L7
K 88	原液	13.0±0.3 ^a	13.4±0.3 ^a	14.9±0.3 ^a	15.8±0.2 ^a	15.9±0.3 ^a
	70℃	13.0±0.1 ^a	12.8±0.3 ^b	14.8±0.3 ^a	14.9±0.1 ^b	16.0±0.5 ^a
	100℃	12.9±0.4 ^a	12.9±0.2 ^{ab}	14.7±0.2 ^a	15.1±0.5 ^b	15.6±0.6 ^{ab}
	121℃	12.7±0.2 ^a	12.7±0.3 ^b	14.6±0.3 ^a	15.0±0.1 ^b	15.1±0.1 ^b
K 99	原液	13.0±0.1 ^a	13.2±0.3 ^a	14.5±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	15.1±0.4 ^a
	70℃	12.9±0.4 ^a	13.1±0.4 ^a	14.4±0.2 ^a	14.7±0.5 ^a	14.8±0.3 ^a
	100℃	12.9±0.1 ^a	12.7±0.4 ^a	14.5±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	14.8±0.3 ^a
	121℃	12.8±0.2 ^a	12.8±0.3 ^a	14.2±0.1 ^a	14.4±0.5 ^a	14.6±0.2 ^a
987 P	原液	13.6±0.4 ^a	13.4±0.3 ^a	14.9±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	14.7±0.3 ^a
	70℃	13.5±0.5 ^a	13.0±0.2 ^{ab}	14.8±0.4 ^a	14.1±0.4 ^b	14.6±0.2 ^a
	100℃	13.4±0.5 ^a	12.7±0.3 ^b	14.7±0.3 ^a	13.7±0.3 ^b	14.5±0.4 ^a
	121℃	13.3±0.4 ^a	12.4±0.4 ^b	14.7±0.2 ^a	14.2±0.3 ^b	14.5±0.5 ^a
S. a	原液	11.8±0.2 ^a	14.8±0.3 ^{ab}	11.6±0.4 ^a	14.7±0.4 ^{ab}	15.1±0.4 ^a
	70℃	11.6±0.4 ^a	14.9±0.2 ^a	11.4±0.4 ^a	15.2±0.3 ^a	14.0±0.4 ^b
	100℃	11.6±0.3 ^a	14.4±0.4 ^{bc}	11.3±0.3 ^a	14.6±0.4 ^b	14.2±0.3 ^b
	121℃	11.4±0.5 ^a	14.3±0.3 ^c	11.3±0.3 ^a	14.4±0.2 ^b	14.3±0.3 ^b

注:同一乳酸菌株同一指示菌同列数据肩标字母相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著($P<0.05$)。

2.5 蛋白酶对乳酸菌抑菌效果的影响

蛋白酶对乳酸菌抑菌效果的影响见表4。由表4可见,经3种蛋白酶处理后,5株乳酸菌的抑菌效果均有不同程度的降低,但经蛋白酶处理后残留抑菌效果(蛋白酶处理菌液抑菌圈直径除以原液抑菌圈直径)均在85%以上。

表4 蛋白酶对乳酸菌抑菌效果的影响(抑菌圈直径 mm)

		L1	L2	L3	L5	L7
K 99	原液	13.0±0.1 ^a	13.2±0.3 ^a	14.5±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	15.1±0.4 ^a
	蛋白酶K	12.8±0.3 ^a	13.2±0.3 ^a	13.9±0.4 ^{ab}	14.1±0.2 ^b	14.1±0.1 ^b
	胃蛋白酶	12.5±0.5 ^a	13.3±0.3 ^a	13.5±0.4 ^b	14.0±0.1 ^b	14.5±0.5 ^b
	胰蛋白酶	12.8±0.4 ^a	13.4±0.6 ^a	13.4±0.5 ^b	13.9±0.5 ^b	14.3±0.3 ^b
O 141	原液	13.9±0.4 ^a	14.0±0.2 ^a	14.7±0.4 ^a	15.0±0.1 ^a	14.7±0.3 ^a
	蛋白酶K	13.1±0.3 ^b	13.2±0.3 ^b	14.2±0.6 ^a	14.6±0.4 ^a	14.0±0.2 ^b
	胃蛋白酶	12.2±0.2 ^c	13.1±0.2 ^b	14.1±0.4 ^a	14.7±0.3 ^a	14.0±0.2 ^b
	胰蛋白酶	12.9±0.4 ^b	13.1±0.1 ^b	14.3±0.4 ^a	14.9±0.1 ^a	13.9±0.1 ^b
S. a	原液	11.8±0.2 ^a	14.8±0.3 ^a	11.6±0.4 ^a	14.7±0.4 ^a	15.1±0.4 ^a
	蛋白酶K	11.7±0.2 ^a	14.0±0.1 ^b	10.3±0.6 ^b	14.5±0.5 ^a	14.1±0.2 ^b
	胃蛋白酶	11.7±0.1 ^a	14.1±0.2 ^b	9.9±0.1 ^b	14.±0.6 ^a	14.1±0.1 ^b
	胰蛋白酶	11.8±0.2 ^a	13.8±0.3 ^b	10.1±0.3 ^b	14.7±0.3 ^a	14.1±0.2 ^b

注:同一乳酸菌株同一指示菌同列数据肩标字母相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著($P < 0.05$)

3 讨论

本文的乳酸菌株均分离自仔猪肠道食糜,均有较高的产乳酸能力,但各菌株之间存在明显差异。在试验的5个菌株中,L5菌株产乳酸速度最快,乳酸含量最高,其培养液的pH值降速最快。菌株L7的产酸能力和pH下降速度仅次于L5。较其它几个菌株,L5、L7菌株对大肠杆菌K88、K99、987P、O141和大肠杆菌E1等指示菌具有较强的抑菌效果,因此这两株乳酸菌具有良好的应用前景。

本研究显示,这些乳酸菌株在产乳酸能力和抑菌效果上呈现高度一致的趋势。研究表明,乳酸菌产生的有机酸能降低肠道内的pH和Eh(氧化还原电势),使肠道处于酸性环境,从而抑制病原性细菌如沙门氏菌、志贺氏菌、致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌等的生长^[7]。但本研究还表明,排除酸的抑菌影响后,乳酸菌对大肠杆菌还有22%~53%的抑菌效果,对金黄色葡萄球菌还有8%~36%的抑菌效果,说明其抑菌效果一半以上是由乳酸产生的,其余的抑菌效果则来源于乳酸菌产生的其它抑菌物质。同时也有报道表明,乳酸菌除有机酸外,可能还有其它代谢产物具有抑菌作用,如过氧化氢、细菌素等^[8]。

乳酸菌产生的抑菌物质具有一定的热稳定性。Reid等报道,乳杆菌(*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GR-1)培养液经80℃2h热处理后,仍对大肠杆菌有抑制作用^[6]。张辉华等也报道6株鸡源乳酸菌经100℃15min热处理后对鸡大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果不变^[9]。本研究中乳酸菌培养上清液经70℃30min、100℃30min、121℃15min加热处理后,其抑菌效果均为处理前的92%以上,说明这5株乳酸菌产生的抑菌物质对热较稳定。

研究表明,乳酸菌抑菌物质对蛋白酶部分敏感^[10]。本研究中乳酸菌培养上清液经蛋白酶K、胃蛋白酶、胰蛋白酶处理后,5株乳酸菌的抑菌效果均有不同程度的降低,但处理后抑菌效果仍为处理前的85%以上。因此,酸影响排除后的抑菌活性(22%~53%),只有部分对蛋白酶敏感。因此,本研究的5株猪源乳酸菌产生的抑菌物质具有

一定的抗蛋白酶降解作用。已有文献报道一些泌细菌素乳酸菌分泌的抑菌物质具有热稳定性和抗蛋白酶活性^[10]，但是本文的乳酸菌产生的抑菌物质与之是否为同类物质，还有待于今后进一步进行抑菌物质的分离、鉴定和理化性质研究。

参 考 文 献

- [1] Kyriakis S C, Tsilyianni V K, Vlemmas J, *et al.* Res Vet Sci, 1999, **67**: 223 ~ 228.
- [2] Simon S, Jadamus A, Vahjen W. J Anim Feed Sci, 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. 生化实验发方法和技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1997. 422 ~ 428.
- [5] 钱存柔, 黄仪秀主编. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 176 ~ 182.
- [6] Reid G, McGroarty J A, Angotti R, *et al.* Can J Microbiol, 1988, **34**: 344 ~ 351.
- [7] Ogawa M, Shimizu K, Nonoto K, *et al.* Int J Food Microbiol, 2001, **68**: 135 ~ 140.
- [8] Jin L Z, Marquardt R R, Baidoo S K. J Sci Food Agric, 2000, **80**: 619 ~ 624.
- [9] 张辉华, 曹永长, 毕英佐, 等. 中国兽医杂志, 2001, **37**: 8 ~ 10.
- [10] Daba H, Pandian S, Gosselin J F, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 3450 ~ 3455.