

嗜酸乳杆菌在模拟胃肠环境中抗性的研究

赵瑞香^{1,2} 李元瑞¹ 孙俊良² 郭洋³

(西北农林科技大学食品科学与工程学院 杨凌 712100)¹

(河南职业技术师范学院食品科学与工程系 新乡 453003)²

(郑州第四职业中专 郑州 450007)³

摘要: 采用 MRS 培养基, 模拟胃肠环境, 即低 pH 值 (1.5 ~ 4.5)。高胆汁盐 (0.1% ~ 0.4%) 对嗜酸乳杆菌抗性进行了研究。同时对肠道中致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的拮抗特性以及服用抗生素后嗜酸乳杆菌的耐药性进行了研究。结果表明, 嗜酸乳杆菌在 pH2.5 ~ 4.5 时具有较强的生存能力, 6h 活菌数仍达 10^7 cfu/mL 以上, pH1.5 条件下仍有部分存活。在 0.1% ~ 0.3% 胆汁盐条件下 4h 活菌数仍达 10^6 cfu/mL 以上, 且能在 0.4% 胆汁盐中存活。同时, 对致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显的抑菌作用, 且对青霉素、罗红霉素具有中敏和耐药特性。

关键词: 嗜酸乳杆菌, 胃肠环境, 抗性, 抑菌, 耐药

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0035-04

STUDIES ON THE ANTAGONISTIC PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* IN THE IMITATIVE GASTROENTERIC ENVIRONMENT

ZHAO Rui-Xiang^{1,2} LI Yuan-Rui¹ SUN Jun-Liang² GUO Yang³

(College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, YangLing 712100)¹

(Henan Vocation-Technical Teachers College, XinXiang 453003)²

(Zhengzhou Number Four Secondary Vocational School, ZhengZhou 450007)³

Abstract: Using MRS medium, as imitating gastroenteric environments, such as low pH (1.5 ~ 4.5) and high bile salt (0.1% ~ 0.4%), the antagonistic properties of *Lactobacillus acidophilus* were studied. At the same time, the antimicrobial activities on pathogenic *E. coli* and *S. aureus* in the intestinal tract and antibiotic tolerance of *Lactobacillus acidophilus* were also studied. The results indicated that *Lactobacillus acidophilus* survived at pH 2.5 ~ 4.5 after 6h culture and the living bacterial number could reach 10^7 cfu/mL. One strain even survived at pH 1.5; that living bacterial number were above 10^6 cfu/mL at the 0.1% ~ 0.3% bile salt and a strain survived in 0.4% after 4h culture; that antimicrobial activities to the pathogenic *E. coli* and *S. aureus* were obvious; and that the tolerance to Penicillin and Roxithromycin was medium and power.

key words: *Lactobacillus acidophilus*, Gastroenteric environment, Antagonistic property, Antimicrobe, Medicine tolerance

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 是人体肠道中的重要微生物, 与人的健康息息相关。当其达到一定数量时, 它能改善调节人体肠道微生物菌群的平衡, 增强机体的免疫力, 降低胆固醇水平, 缓解乳糖不耐症以及抑制肿瘤细胞的形成等等, 即起到健康促进效果 (probiotic effects)^[1,2]。近几年来, 随着人们健康意识的逐步增强, 微生物制剂及生物活性食品市场十分活跃, 品种也越来越多, 然而食入人体微生物存活

能力的高低直接关系到该产品能否发挥其健康促进作用,也是检验产品质量的关键指标之一。嗜酸乳杆菌是目前乳酸菌家族中极为重视研究与开发的益生菌,被视为第三代酸乳发酵剂菌种^[3],因此,对其能否顺利通过胃肠环境定植于肠道的研究是极具意义的。本项研究以 MRS 培养基,模拟正常人体胃液低 pH 和十二指肠高胆汁盐的状态以探讨 *Lactobacillus acidophilus* Ind-1 和 *Lactobacillus acidophilus* Lakcid 在其中的存活能力,同时对肠道中存有的致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的拮抗能力以及对人们常服用的抗生素(如青霉素和严迪)的耐药性也进行了研究,从而为嗜酸乳杆菌能否在肠道中发挥健康作用打下了理论基础,也为产品的开发提供了可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *Lactobacillus acidophilus* Ind-1 (简称 La-1) 和 *Lactobacillus acidophilus* Lakcid (简称 La-2), 本实验室保藏。致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌购于新乡市卫生防疫站。

1.1.2 MRS 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 牛肉膏 10g, 葡萄糖 20g, 乙酸钠 5g, 柠檬酸二铵 2g, 吐温 80 1mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, K_2HPO_4 2g, 水 1000mL, 调 pH 6.2 ~ 6.4, 于 1×10^5 Pa 灭菌 15min。

1.2 方法

1.2.1 活菌计数: 将经过两次活化的菌种接种于 pH 值分别调至 1.5、2.5、3.5、4.5 及胆汁盐分别调至 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 的 MRS 培养基中, 37℃ 培养, 每隔一定时间采用无菌生理盐水以 10 倍递减依次稀释进行平板菌落计数^[4]。

1.2.2 抑菌圈大小观察: 采用营养琼脂培养基分别接种大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 37℃ 培养 1h, 固定菌落, 然后于无菌室超净工作台分别于每个平板中打 3 个直径 3mm 左右的小孔, 于孔中分别接入 La-1, La-2 菌液一滴, 再于 37℃ 培养 24h, 观察抑菌圈大小, 并照相。

1.2.3 耐药试验: 采用 1977 年 WHO 在日内瓦召开的国际会议上推荐的 Kirby-Bauer (K-B) 方法^[5]。

2 结果与分析

2.1 低 pH 值条件下嗜酸乳杆菌的存活能力

胃液 pH 的大小根据饮食结构不同而波动很大, 通常 pH 值为 3 左右, 空腹或食用酸性食品可达 1.5, 食用碱性食物可达 4 ~ 5, 且食物(尤其是流体)通过胃的时间相对较短, 一般 1 ~ 2h^[6]。因此, 将 MRS 培养基用 0.1mol/L HCl 调至 pH 值分别 1.5、2.5、3.5、4.5, 并接种活化好的 10% 嗜酸乳杆菌, 于 37℃ 经过 6h 培养, 嗜酸乳杆菌在 pH 3.5、4.5 时其活菌数不但没有下降, 而且有明显上升, 活菌数达 10^8 cfu/mL 以上, pH 2.5 时 La-1 存活率为 10.48%, La-2 为 12.23%, 且活菌数均达 10^7 cfu/mL 以上。pH 1.5 时经过 6h 培养虽然大部分死亡, 但仍有部分细菌存活下来, 且 2h 活菌数仍达 10^4 cfu/mL 以上。图 1 为 6h 时嗜酸乳杆菌的活菌数, 从图 1 可以明显看出 La-1、La-2 具有较强的耐酸能力, 其能够顺利通过胃酸环境而达到肠内。

2.2 高胆汁盐条件下嗜酸乳杆菌的存活能力

人体小肠中胆汁盐含量以 0.03% ~ 0.3% 而波动着^[7], 用猪胆汁盐将 MRS 培养基调

至胆汁盐含量分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%，接种活化好的 10% 嗜酸乳杆菌，37℃ 培养，分别于 0~4h 测得活菌的变化情况。La-1 在 0.1%、0.2% 胆汁盐条件下，4h 培养活菌数不但没有下降，反而明显上升，在 0.3% 条件下 4h 培养存活率虽为 0.32%，但活菌数仍达 10^6 cfu/mL 以上。La-2 在 0.1%、0.2% 虽略有下降，但活菌数仍达 10^9 cfu/mL 以上，在 0.3% 达 10^6 cfu/mL 以上。同时在 0.4% 胆汁盐条件下，La-1、La-2 均有部分存活。图 2 为嗜酸乳杆菌 4h 时存活情况。从图 2 可以看出，嗜酸乳杆菌具有较强的抗胆汁盐能力，其能顺利通过小肠而到达大肠。

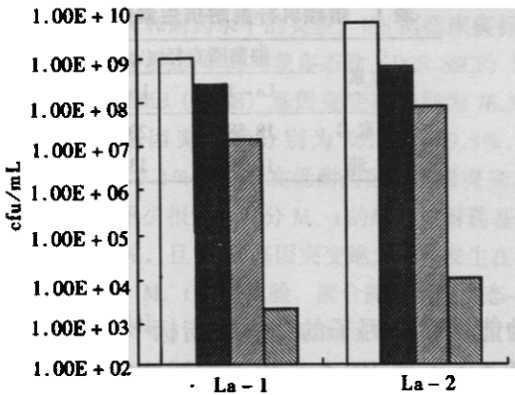


图 1 6h 嗜酸乳杆菌耐酸能力
□ pH4.5, ■ pH3.5, ▨ pH2.5, ▩ pH1.5,

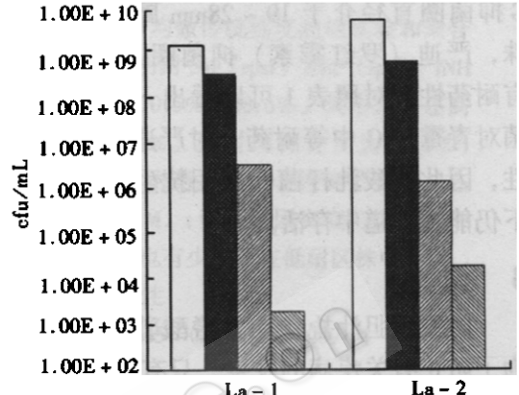


图 2 4h 嗜酸乳杆菌耐胆汁盐能力
□ 0.1%, ■ 0.20%, ▨ 0.30%, ▩ 0.40%

2.3 抑菌作用

致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌是人体肠道中的常见菌，由于嗜酸乳杆菌在生长中可以产生一些抑菌物质，如有机酸、细菌素及类细菌素，其可以抑制肠道中有害微生物的生长繁殖，起到平衡肠道菌群的作用。图 3、图 4 分别为 La-1 对致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制情况。从图 3、图 4 可以看出，La-1 对致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有明显的抑菌作用，其抑菌圈直径均在 17mm 以上。同样，La-2 对致病性大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有抑制作用，其抑菌圈直径也在 17mm 以上。

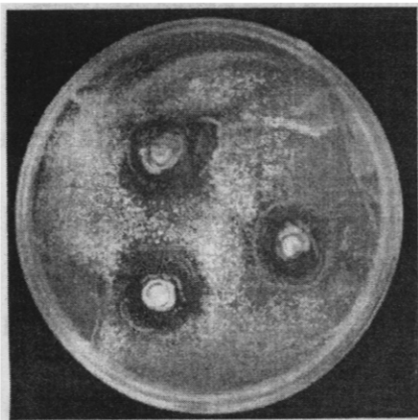


图 3 La-1 对 *E. Coli* 的拮抗性

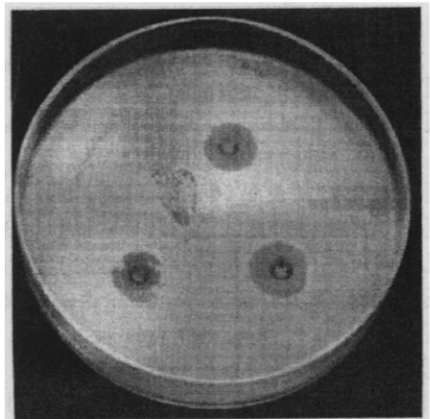


图 4 La-1 对 *S. aureus* 的拮抗性

2.4 耐药性

青霉素和严迪（主要成分罗红霉素）是目前临床上常用抗生素，服用后一定时间内可在肠道形成峰浓度。根据药物纸片琼脂扩散法选择新华 1 号滤纸制成直径为 6mm 圆纸片，于 1×10^5 Pa 灭菌 2h，分别浸入 2000U/mL 和 3000 μ g/mL 的青霉素 G 和严迪溶液中，纸片浸透后于 37℃ 干燥 2h，将已接种嗜酸乳杆菌的 MRS 琼脂平板表面贴上纸片，纸片间距约 30mm，于 37℃ 培养 24h，测得抑菌圈大小见表 1。

根据革兰氏阳性标准菌株对照青霉素 G 抑菌圈直径介于 19 ~ 28mm 属于中敏菌株，严迪（罗红霉素）抑菌圈 ≤ 18 mm 具有耐药性。对照表 1 可以看出，嗜酸乳杆菌对青霉素 G 中等耐药，对严迪具有耐药性，因此嗜酸乳杆菌在服用抗生素的情况下仍能在肠道中存活。

表 1 嗜酸乳杆菌耐抗生素能力

抗生素	抑菌圈直径 (mm)	
	La-1	La-2
青霉素 G	18.58	20.37
严迪	11.36	13.22

3 讨论

耐酸耐胆汁盐特性是嗜酸乳杆菌作为功能性食补因子的一重要指标^[8]。据报道，为了防止有关疾病的发生，只有摄入含有 10^6 cfu/mL 或 10^6 cfu/g 以上的活性嗜酸乳杆菌才能充分发挥其健康促进特性^[8]。胃酸和胆汁盐具有抗菌性，嗜酸乳杆菌被食入后菌体首先必须通过恶劣的胃液，同时要抵抗来自胰腺的胆汁盐，试验结果表明，嗜酸乳杆菌菌株 La-1 和 La-2 具有较强的耐酸耐胆汁盐能力，虽然细菌减少了 100 倍，但活菌数仍达 10^6 cfu/mL 以上，并且对青霉素和罗红霉素具有中敏和耐药性，因此嗜酸乳杆菌具有抗逆性，这在很大程度上与其细胞壁结构有关，同时可能与菌体代谢中产生某些物质使抗生素结构或作用发生改变而致。另外，嗜酸乳杆菌代谢中能够产生一种以上的抑菌物质，使机体具有广谱抑菌特性，结果嗜酸乳杆菌就可以在肠道内成为优势菌，抑制肠道中致病菌的生长繁殖，充分发挥其健康促进特性。总之，嗜酸乳杆菌作为功能性食补因子具有巨大的发展潜力。有关其代谢中功能成分的产生正在研究之中。

参考文献

[1] Fuller R. Gut, 1991, 32: 439 ~ 442.
[2] Alm I. The therapeutic effects of various cultures-an overview. In Therapeutic Properties of Fermented Milks, New York: Elsevier Applied Science, 1991, 45 ~ 64.
[3] 赵瑞香, 孙俊良. 中国乳品工业, 1999 (6): 26 ~ 28.
[4] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
[5] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
[6] Hunger W, Peitersen N. New technical aspects of the preparation of starter cultures, Bulletin of the IDF 277, 1992: 17 ~ 21.
[7] Kashket E R. Rew, 1987 (46): 233.
[8] Sandine W. Food Prot, 1979 (42): 259.