

甘露寡糖对纯培养和共培养的乳酸杆菌 体外生长的影响

杭苏琴 戴兆来 朱伟云*

(南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室 江苏 南京 210095)

摘要: 三株(S、L和M)猪源乳酸杆菌以甘露寡糖(mannan-oligosaccharide, MOS)为碳源体外纯培养或与猪源致病性大肠杆菌共培养, 研究 MOS 对乳酸杆菌的选择性生长作用。结果表明, 纯培养时, 三株菌 MOS 组的 OD 值和乳酸浓度均高于对照, pH 均低于对照, 但菌株之间存在差异。共培养时, 乳酸杆菌和大肠杆菌都可利用 MOS 进行生长, 但乳酸杆菌的生长强于大肠杆菌, 产生较多的乳酸、显著降低 pH($P < 0.05$), 这种促生长作用在最初的 12 h 较明显。

关键词: 甘露寡糖, 乳酸杆菌, 大肠杆菌, pH, 乳酸浓度

Effects of Mannan-oligosaccharide on the Growth of *Lactobacillus* Pure Culture and Co-culture

HANG Su-Qin DAI Zhao-Lai ZHU Wei-Yun*

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

Abstract: Effects of mannan-oligosaccharide (MOS) on the growth of *Lactobacillus* were investigated by pure culture of three swine originated *Lactobacillus* strains or co-culture with swine pathogenic *E. coli*. The pure culture results revealed that OD values and lactic acid concentration of three *Lactobacillus* strains in the MOS supplemented cultures were higher than those of the control group without MOS supplementation, a lower pH was observed for MOS supplement compared with that of the control group. The co-culture results showed that MOS were utilized by both *Lactobacillus* strains and swine pathogenic *E. coli* strain. But *Lactobacillus* grew faster than the latter. A significant increase in lactic acid concentration ($P < 0.05$) and a significant decrease in pH ($P < 0.05$) were observed in the MOS supplemented co-cultures compared with those of the control group or pathogenic *E. coli* pure culture. Moreover, the changes in numbers of *Lactobacillus* strains and the pathogenic *E. coli* strain, the elevation of lactic acid concentration and the reduction of pH were observed to be obvious during the first 12 h fermentation.

Keywords: Mannan-oligosaccharide, *Lactobacillus*, *E. coli*, pH, Lactic acid concentration

肠道有益菌如乳酸杆菌和双歧杆菌等发挥有益作用的一个重要原因就是能产生乳酸和短链脂肪酸,

降低肠道内pH, 从而抑制病原性细菌如致病性大肠杆菌、沙门氏菌等的生长^[1,2]。有研究报道, 日粮中

添加甘露寡糖可导致仔猪结肠乳酸杆菌增加、大肠杆菌下降^[3],但体内试验费时、费力且成本较高,近年来体外发酵已成为筛选及评定寡糖等益生作用的有效手段之一。目前,体外研究多集中于人类保健品,如果寡糖、半乳糖和木聚糖等^[4],甘露寡糖的报道较少。为此,本试验拟以甘露寡糖为碳源、将乳酸杆菌纯培养或与猪源致病性大肠杆菌共培养,研究体外情况下甘露寡糖对乳酸杆菌和病原菌生长的影响,以评定甘露寡糖对菌株的选择性作用。

1 材料和方法

1.1 菌株及底物来源

三株自行分离的仔猪肠道乳酸杆菌 S (嗜淀粉乳杆菌, *Lactobacillus amylorous*)、L (德氏乳杆菌乳亚种, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)和 M (*Lactobacillus agilis*),活化后分别作为接种物进行纯菌培养或与猪源致病性大肠杆菌 K (*E. coli*, O8K88H19)共培养。底物为甘露寡糖(mannan-oligosaccharide, MOS),由南京 Alletch 公司提供。

1.2 培养基

乳酸杆菌的活化和平板计数用 MRS 培养基,大肠杆菌的活化用 Mueller Hinton 培养基,大肠杆菌的平板计数用麦康凯琼脂培养基,乳酸杆菌的纯培养或与大肠杆菌的共培养用基础培养基(Basal Medium)。

1.3 乳酸杆菌纯培养或与 *E. coli* 共培养试验设计
纯培养试验:分两组,对照组(基础培养基+乳酸杆菌)和试验组(基础培养基+乳酸杆菌+MOS, MOS 组)。

共培养试验:菌株组合为 S+K、L+K、M+K、K。试验分为两组,对照组(基础培养基+菌株组合)和试验组(基础培养基+菌株组合+MOS, MOS 组)。

上述试验每个处理 3 个重复,培养基体积为 100 mL,乳酸杆菌和大肠杆菌接种量均为 2%(V/V),培养基中 MOS 的添加量为 1%(W/V),37°C 连续培养 24 h。

1.4 指标的测定

1.4.1 pH 值测定:于接种后 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h 和 24 h pH 计测定纯培养或共培养发酵液的 pH 值。

1.4.2 乳酸浓度的测定:参照文献[5]的方法,取

0 h、3 h、6 h、9 h、12 h 和 24 h 的纯培养或共培养发酵液-20°C 保存,比色法测定乳酸浓度。

1.4.3 OD_{650} 值的测定:于接种后 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h 和 24 h 取纯培养或共培养发酵液测 OD 值,以未接种的培养基为空白对照调零。

1.4.4 乳酸杆菌和大肠杆菌的平板计数:取 0 h、12 h 和 24 h 发酵液,采用 10 倍梯度稀释法对其稀释,分别用 MRS 和麦康凯琼脂培养基以平板涂布法对乳酸杆菌和大肠杆菌进行计数。

1.5 数据分析

采用 SPSS(13.0)软件的 T 检验进行显著性分析,数据以平均值±标准差表示。

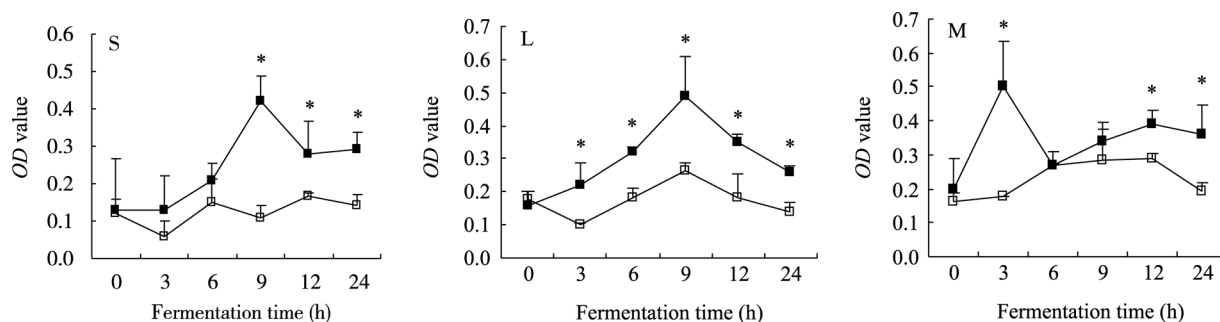
2 结果与分析

2.1 乳酸杆菌纯培养试验

2.1.1 在以 MOS 为碳源的培养基中乳酸杆菌 OD 值的变化:乳酸杆菌纯培养时发酵液 OD 值的变化见图 1。由图可见, MOS 组三株菌 OD 值均高于对照,说明 MOS 组菌株的生长快于对照组。但三株菌之间有差异,菌株 S 在 9 h、12 h 和 24 h 时, MOS 组 OD 值均显著高于对照($P<0.05$), 9 h 达到高峰,对照组无明显上升趋势;菌株 L 各时间点 MOS 组 OD 值均显著高于对照($P<0.05$);菌株 M 在 3 h、12 h 和 24 h 时, MOS 组 OD 值显著高于对照($P<0.05$)。

2.1.2 MOS 对乳酸杆菌发酵液 pH 值的影响:由图 2 可见,三株菌 MOS 组 pH 均低于对照组。但菌株之间有差异, 9 h、12 h 时,菌株 S MOS 组 pH 显著低于对照(5.77 vs 5.88 和 5.87 vs 6.15; $P<0.05$);菌株 L 在 12 h 时, MOS 组 pH 显著低于对照(6.03 vs 6.23; $P<0.05$);菌株 M 在 12 h、24 h 时, MOS 组的 pH 显著低于对照(5.89 vs 6.43 和 5.67 vs 5.89; $P<0.05$)。

2.1.3 MOS 对乳酸杆菌发酵液乳酸浓度的影响:由图 3 可见,三株菌 MOS 组发酵液乳酸浓度均高于对照组(菌株 M 24 h 时除外)。但菌株之间略有差异,菌株 S 各时间点 MOS 组乳酸浓度均高于对照组, 9 h 和 12 h 时显著高于对照($P<0.05$);菌株 L 各时间点 MOS 组乳酸浓度均高于对照组(12 h 除外), 6 h 和 24 h 时显著高于对照($P<0.05$);菌株 M 两组乳酸浓度变化不稳定, 3 h 时 MOS 组乳酸浓度显著高于对照(3.4 vs 1.77 mmol/L; $P<0.05$)。

图1 三株乳酸杆菌在含MOS培养基中 OD_{650} 变化曲线Fig. 1 Variations of OD_{650} value of three *Lactobacillus* strains incubated by MOS as substrate

注: □: 对照组; ■: MOS组; *: 同一时间点, 与对照组相比差异显著性($P < 0.05$).

Note: □: The control group; ■: The MOS group; *: At the same time point, significantly different from control ($P < 0.05$).

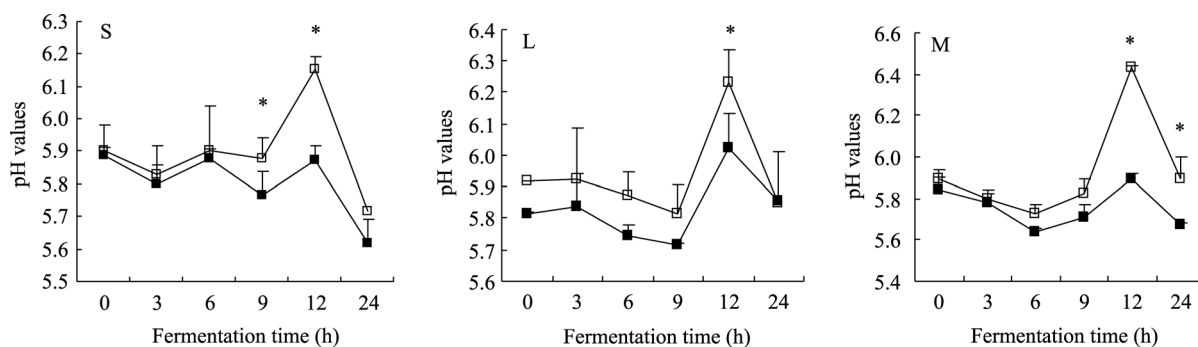


图2 MOS对三株不同乳酸杆菌发酵液pH值的影响

Fig. 2 Effects of MOS on pH values of three *Lactobacillus* strains culture

注: □: 对照组; ■: MOS组; *: 同一时间点, 与对照组相比差异显著性($P < 0.05$).

Note: □: The control group; ■: The MOS group; *: At the same time point, significantly different from the control ($P < 0.05$).

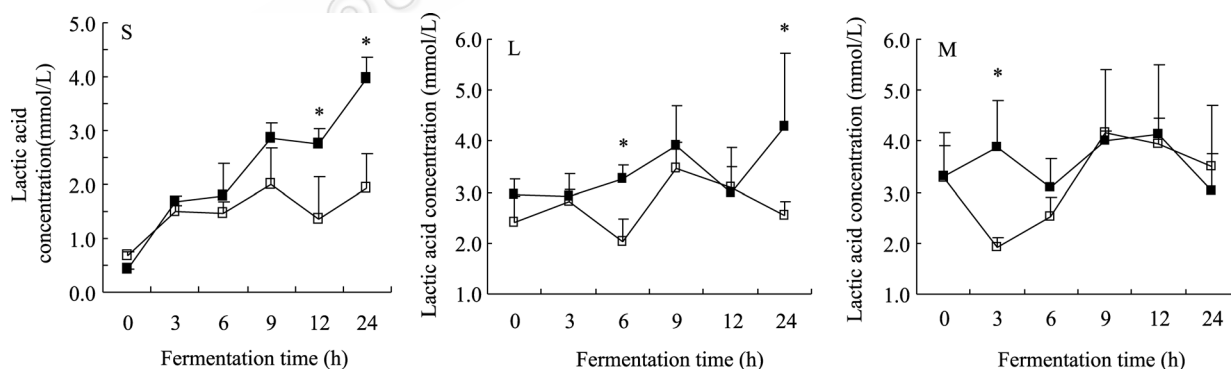


图3 MOS对三株乳酸杆菌发酵液乳酸浓度的影响

Fig. 3 Effects of MOS on lactic acid concentration of three *Lactobacillus* strains culture

注: □: 对照组; ■: MOS组; *: 同一时间点, 与对照组相比差异显著性($P < 0.05$).

Note: □: The control group; ■: The MOS group; *: At same time point, significantly different from the control ($P < 0.05$).

2.2 乳酸杆菌与 *E. coli* 共培养试验

2.2.1 MOS对不同菌株组合培养液pH的影响: 图4a可见, 发酵开始后, 所有菌株组合的对照组和MOS组pH均下降, 12h时MOS组pH下降多于对照组, 24h时除M+K和K MOS组pH略高于对照组

外, 其余各组合MOS组pH均低于对照组。图中还可见, *E. coli* 纯培养时MOS组和对照组pH也出现了不同程度的下降, 12h时MOS组pH下降多于对照组, 说明大肠杆菌也能利用MOS进行发酵。

对发酵12h pH降低值分析(图4b), 发现S+K

和 M+K MOS 组 pH 的降低值显著高于对照组 (1.42 vs 1.2、1.31 vs 1.1, $P < 0.05$), 所有共培养组合 pH 降低值均显著高于大肠杆菌纯培养 ($P > 0.05$)。

2.2.2 MOS 对不同菌株组合培养液乳酸浓度的影响: 由图 5a 可见, 发酵开始后, 除 *E. coli* 纯培养外, 所有组合的对照组和 MOS 组乳酸浓度均上升, 12 h

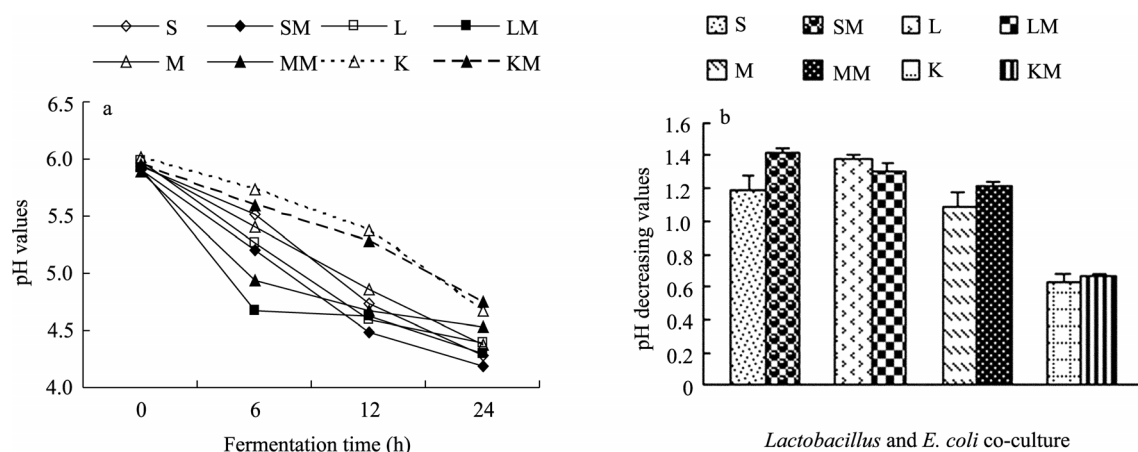


图 4 不同菌株组合培养液 pH 的变化(a)和 12 h 内 pH 降低值的比较(b)

Fig. 4 pH values of *Lactobacillus* and *E. coli* co-cultures (a) and comparison of the pH decreasing values after 12 h fermentation (b)

注: K: *E. coli* 的基础培养液; KM: 含 MOS 的 *E. coli* 培养液; S: S+K 的基础培养液; SM: 含 MOS 的 S+K 培养液; L: L+E 的基础培养液; LM: 含 MOS 的 L+K 培养液; M: M+K 的基础培养液; MM: 含 MOS 的 M+K 培养液; *: 与对照组相比差异显著性 ($P < 0.05$).
Note: K: Basal medium inoculated by *E. coli*; KM: Medium with MOS inoculated by *E. coli*; S: Basal medium inoculated by *Lactobacillus amyloporus* and *E. coli*; SM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus amyloporus* and *E. coli*; L: Basal medium inoculated by *Lactobacillus delbrueckii* and *E. coli*; LM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus delbrueckii* and *E. coli*; M: Basal medium inoculated by *Lactobacillus agilis* and *E. coli*; MM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus agilis* and *E. coli*; *: Significantly different from control ($P < 0.05$).

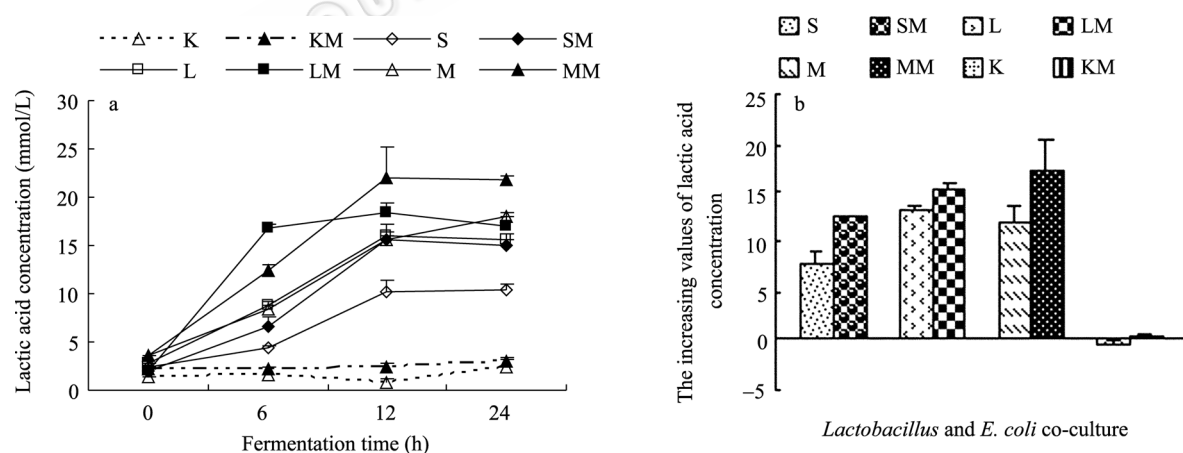


图 5 不同菌株组合培养液乳酸浓度的变化(a)和 12 h 内乳酸浓度上升值的比较(b)

Fig.5 Lactic acid concentrations of *Lactobacillus* and *E. coli* co-cultures (a) and comparison of the increasing values of lactic acid concentration after 12 h fermentation (b)

注: K: *E. coli* 的基础培养液; KM: 含 MOS 的 *E. coli* 培养液; S: S+K 的基础培养液; SM: 含 MOS 的 S+K 培养液; L: L+K 的基础培养液; LM: 含 MOS 的 L+K 培养液; M: M+K 的基础培养液; MM: 含 MOS 的 M+K 培养液; *: 与对照组相比差异显著性 ($P < 0.05$).
Note: K: Basal medium inoculated by *E. coli*; KM: Medium with MOS inoculated by *E. coli*; S: Basal medium inoculated by *Lactobacillus amyloporus* and *E. coli*; SM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus amyloporus* and *E. coli*; L: Basal medium inoculated by *Lactobacillus delbrueckii* and *E. coli*; LM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus delbrueckii* and *E. coli*; M: Basal medium inoculated by *Lactobacillus agilis* and *E. coli*; MM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus agilis* and *E. coli*; *: Significantly different from control ($P < 0.05$).

时乳酸浓度上升到最高, 之后变化很小, MOS 组乳酸浓度均高于对照组。图中还可见, 乳酸杆菌和 *E. coli* 共培养液乳酸浓度显著高于 *E. coli* 纯培养液 ($P < 0.05$)。

对发酵 12 h 乳酸浓度的上升值比较分析(图 5b), 发现 S+K、M+K 和 L+K MOS 组乳酸浓度分别上升了 12.56 mmol/L、17.36 mmol/L 和 15.26 mmol/L, S+K 和 M+K MOS 组乳酸浓度的上升值显著高于对照组 ($P < 0.05$)。 *E. coli* 纯培养时乳酸浓度显著低于共培养时 ($P < 0.05$)。

2.2.3 MOS 对不同菌株组合培养液乳酸杆菌和大肠杆菌数量的影响: 由图 6a 可见, 12 h 时, 所有共培养组合 MOS 组乳酸杆菌数均高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 24 h 时, 各组乳酸杆菌数均显著下降, 但 MOS 组仍高于对照组, 其中 S+KMOS 组显著高于对照 ($P < 0.05$)。

大肠杆菌数量变化见图 6b, 发酵 12 h 时, 纯培养时 *E. coli* MOS 组和对照组大肠杆菌数均高于共培养组合, 而共培养的 MOS 组大肠杆菌数均低于对照组, 菌株 S 两组差异显著 ($P < 0.05$); 24 h 时, 大肠杆菌数均出现不同程度下降, 但 *E. coli* 纯培养大肠杆菌数仍显著高于共培养组合 ($P < 0.05$); 共培养

时 MOS 组的大肠杆菌数均低于对照组, 其中 S+K 和 M+K 显著低于对照 ($P < 0.05$)。

3 讨论

仔猪断奶时因日粮转换、离母等常造成肠道微生物菌群失衡, 进而导致腹泻。寡糖如果寡糖、菊粉等因为可选择性地促进有益菌如乳酸杆菌等生长、产生乳酸、短链脂肪酸和降低 pH, 而常被用于仔猪的断奶调控^[6]。有关 MOS 对乳酸杆菌选择性作用的报道较少, 本试验将乳酸杆菌纯培养或与致病性大肠杆菌体外共培养, 研究 MOS 对乳酸杆菌的选择性作用。结果显示, 乳酸杆菌纯培养时, MOS 组三株菌的 OD 值和乳酸浓度均高于对照, pH 低于对照, 说明 MOS 具有促进乳酸杆菌生长、乳酸浓度增加和降低 pH 的作用, 但菌株对甘露寡糖的利用有所不同, 菌株 S 发酵期内 OD 值上升、pH 降低和乳酸浓度的上升均较平稳, 说明甘露寡糖和菌株之间存在选择性, 不同菌株对甘露寡糖的利用不一致, 菌株 S 利用甘露寡糖的能力相对较强。Sanders 等^[7]报道, 益生菌对动物健康的有益作用有属的或种的甚至是菌株的特异性的, 其原因可能与寡糖结构、纯度和溶解度有关^[8,9]。共培养的结果也显示, MOS

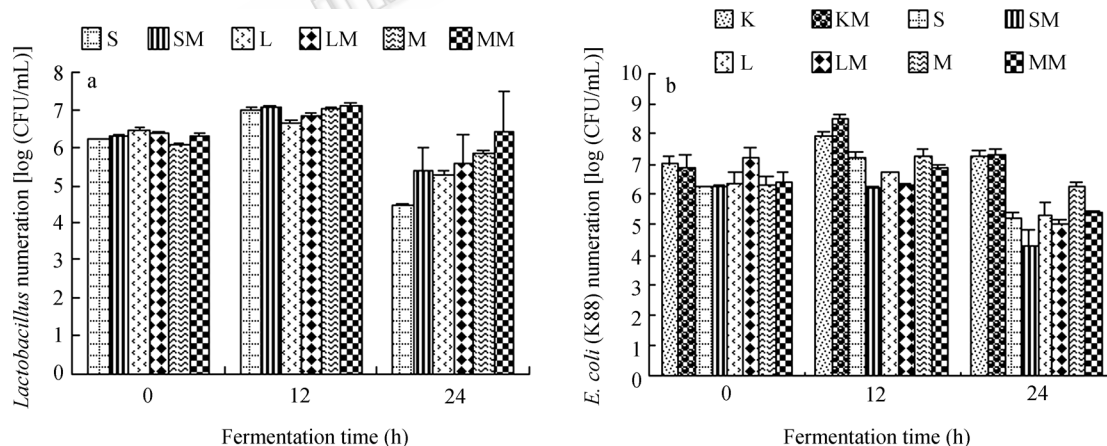


图 6 不同菌株组合培养液乳酸杆菌(a)和大肠杆菌数量的变化(b)

Fig. 6 *Lactobacillus* numeration (a) and *E. coli* numeration (b) from co-cultures

注: K: *E. coli* 的基础培养液; KM: 含 MOS 的 *E. coli* 培养液; S: S+K 的基础培养液; SM: 含 MOS 的 S+K 培养液; L: L+K 的基础培养液; LM: 含 MOS 的 L+K 培养液; M: M+K 的基础培养液; MM: 含 MOS 的 M+K 培养液; *: 与对照组相比差异显著性 ($P < 0.05$)。

Note: K: Basal medium inoculated by *E. coli*; KM: Medium with MOS inoculated by *E. coli*; S: Basal medium inoculated by *Lactobacillus amyloporus* and *E. coli*; SM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus amyloporus* and *E. coli*; L: Basal medium inoculated by *Lactobacillus delbrueckii* and K88; LM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus delbrueckii* and *E. coli*; M: Basal medium inoculated by *Lactobacillus agilis* and *E. coli*; MM: Medium with MOS inoculated by *Lactobacillus agilis* and *E. coli*; *: Significantly different from control ($P < 0.05$).

可促进乳酸杆菌生长、提高乳酸浓度和降低 pH, 同时大肠杆菌也能利用 MOS, 但其生长速度、乳酸产生量和 pH 的降低值均低于乳酸杆菌, 说明乳酸杆菌对 MOS 的利用强于大肠杆菌, 即 MOS 可选择性地促进共培养体系中乳酸杆菌的生长。结果还表明, 这种作用在最初的 12 h 培养期内更明显, 表明此阶段是细菌的快速生长期, 12 h 后细菌生长逐渐达到稳定, 再进入衰老期。这可能与体外培养时有限的营养、发酵液乳酸浓度上升及细菌自身的生长阶段有关。

有研究表明, 乳酸杆菌代谢的终产物是乳酸^[10], 本试验共培养组乳酸浓度上升与 pH 下降存在很强一致性, 说明 pH 下降确由乳酸引起, 而大肠杆菌纯培养时乳酸浓度变化很小, 说明大肠杆菌代谢产物不是乳酸而是其它酸。本结果中不含 MOS 的共培养体系也出现了 pH 的下降、乳酸浓度的上升和乳酸杆菌及病原菌数量的变化, 可能与基础培养基成分有关。

将纯培养与共培养结果比较, 发现共培养时乳酸杆菌的生长、乳酸产量和 pH 的降低作用均强于纯培养, 这可能与细菌之间的互作有关。动物胃肠道是一个复杂的微生态系统, 菌群之间互作的平衡是维持宿主健康的基础。

参 考 文 献

[1] Juven BJ, Meinersmann, Stern NJ. Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J Applied Bacteriology*, 1991, **70**: 95–103.

[2] Jin LZ, Marquardt RR, Baidoo SK. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* F4, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**: 619–624.

[3] 石宝明, 单安山, 佟建明. 寡聚糖对仔猪肠道菌群及生长性能影响的研究. 东北农业大学学报, 2000, **31**(3): 261–269.

[4] Houdik JGM, Bosch MW, Verstegen MWA, *et al.* Effects of dietary oligosaccharides on the growth performance and faecal characteristics of young growing pigs. *Animal Feed Science*, 1998, **71**: 35–48.

[5] 张龙翔, 张庭芳主编. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997, pp.90–95.

[6] Konstantinov SR, Awati A, Smidt H, *et al.* Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the gut of weaning piglets. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, **70**(7): 3821–3830.

[7] Sanders ME. Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Advance Food Nutrition Research*, 1993, **37**: 67–130.

[8] Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, *et al.* A comparative study of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharide. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, **91**: 878–887.

[9] Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA. Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe*, 2003, **8**: 287–292.

[10] Macfarlane GT, Gibson GR. Carbohydrate fermentation, energy, transduction and gas metabolism in the human large intestine. In: *Gastrointestinal Microbiology*, Vol 1: *Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*, Mackie RI, White BA (Eds), Chapman and Hall, London, 1997, pp.269–318.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 $S E$ 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。