

林龙镇, 邹卫玲, 李安章, 等. 产酸、耐酸乳酸菌的分离鉴定及益生特性[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(2): 95-102.

产酸、耐酸乳酸菌的分离鉴定及益生特性

林龙镇, 邹卫玲, 李安章, 朱红惠

(广东省微生物研究所/省部共建华南应用微生物国家重点实验室/广东省菌种保藏与应用重点实验室/
广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070)

摘要:【目的】分离筛选高效产酸的乳酸菌 *Lactobacillus* spp., 并进行功能评价, 为乳酸菌在饲料行业的应用提供物质基础。【方法】以酸性风味食品为样品来源, 以溶钙圈大小为指标进行初筛, 以耐酸能力为指标进行复筛, 并进一步研究了筛选得到的乳酸菌的产酸性能、生长特性、耐酸、耐胆盐以及抑制病原菌的能力。【结果】获得了 10 株可在 pH 3.0 生长的乳酸菌。其中, 菌株 SC3A 和 DJ3 被鉴定为戊糖乳杆菌 *L. pentosus*, 菌株 SC15、SC16、DJ9B、DJ10C、SC8、DJ8A、DJ8B 和 DJ9A 为发酵乳杆菌 *L. fermentum*。戊糖乳杆菌 DJ3 和 SC3A 的产酸能力、发酵生长速率和抑制病原菌的能力显著优于发酵乳杆菌。而发酵乳杆菌 DJ8A 和 DJ9B 的耐酸和耐胆盐能力较强。【结论】从酸性风味食品分离得到了 10 株具有较强的产酸、耐酸和抑菌能力的乳酸菌, 在食品和饲料工业中具有应用潜力。

关键词: 乳酸菌; 分离鉴定; 产酸; 抑菌活性; 耐酸; 耐胆盐
中图分类号: S816.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)02-0095-08

Isolation, identification and probiotic characteristics of acid-producing and acid-resistant *Lactobacillus* strains

LIN Longzhen, ZOU Weiling, LI Anzhang, ZHU Honghui
(Guangdong Institute of Microbiology/State Key Laboratory of Applied Microbiology South China/Guangdong
Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application/Guangdong Open Laboratory
of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: 【Objective】To isolate, screen and evaluate *Lactobacillus* strains with excellent acid-producing ability, and offer materials for application of *Lactobacillus* in feed industry. 【Method】Using acid flavor food as samples, we isolated and screened *Lactobacillus* strains, initially according to the size of calcium dissolving zone and subsequently according to acid tolerance. The acid-producing abilities, growth characteristics, low-pH and bile salt tolerance, and antibacterial activities of *Lactobacillus* strains screened out were further studied. 【Result】Ten *Lactobacillus* strains capable of growing at pH 3.0 were obtained. Strain SC3A and DJ3 were identified as *L. pentosus*, and strain SC15, SC16, DJ9B, DJ10C, SC8, DJ8A, DJ8B and DJ9A were identified as *L. fermentum*. The acid-producing abilities, fermentation growth rate and antibacterial activities of *L. pentosus* strains DJ3 and SC3A were significantly superior to those of the *L. fermentum* stains. The *L. fermentum* strains DJ8A and DJ9B showed higher tolerance to acid environment and bile salt. 【Conclusion】Ten *Lactobacillus*

收稿日期: 2017-05-16 优先出版日期: 2018-01-17
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180117.1559.014.html>
作者简介: 林龙镇 (1991—), 男, 硕士, E-mail: 578199316@qq.com; 通信作者: 朱红惠 (1970—), 女, 研究员, 博士, E-mail: zhuhh@gdim.cn
基金项目: 广东省科技创新领军人才项目 (2015TX01N036); 广东省科学院科研平台环境与能力建设专项 (2016GDASPT-0302); 广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项 (2017GDASCX-0402)

strains obtained from acid flavor food have strong acid-producing ability, acid tolerance and antibacterial activity, and have application potential in food and feed industries.

Key words: *Lactobacillus*; isolation and identification; acid production; antibacterial activity; acid tolerance; bile salt tolerance

乳酸菌 *Lactobacillus* spp. 是一类能发酵碳水化合物产生乳酸的革兰阳性、无芽孢细菌的统称^[1]。近年来,随着许多国家限制乃至禁止使用抗生素添加剂,乳酸菌作为一种公认的安全性较高、益生效果良好的益生菌,在饲料行业有着广阔的应用前景^[2,3]。

产酸能力是乳酸菌的一个重要特性。近年来,产酸这一益生机制日益受到重视^[4-5]。乳酸菌代谢产生的有机酸,如乳酸、乙酸、丙酸、柠檬酸和琥珀酸等,不仅能降低胃肠道 pH,抑制、杀死肠道病原菌,调节肠道菌群平衡^[6-7],同时还能提高胃肠道消化酶活性,促进矿物质吸收,缓解胃肠功能紊乱,降低腹泻发病率和死亡率^[8-9],从而整体提高禽畜生长性能。此外,乳酸菌发酵产有机酸还有助于改善饲料产品口感和风味,提高饲料适口性以及防霉保质、延长饲料贮存期^[10]。因此,在实际生产中,产酸能力强的乳酸菌具有更高的应用价值。

目前,在食品和保健品行业,乳酸菌的产酸能力已被广泛研究。然而,尽管大量研究表明乳酸菌产生的有机酸在饲料和养殖行业具有显著应用效果^[11-12],但以产酸能力为指标筛选乳酸菌的研究鲜见报道。为此,本研究以产酸性能为主要指标,从酸性风味食品中筛选鉴定产酸性能优良的耐酸乳酸菌,并对其生长特性、耐受性以及抑制病原菌能力进行研究,以期在乳酸菌在饲料行业中的进一步应用提供优良菌种和技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

- 1.1.1 样品来源 酸菜、酸豆角购自广州市先烈中路肉菜市场;梅菜由福建省上杭县古田镇农户腌制(1 年陈)。
- 1.1.2 指示菌 大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC 8739,金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,均保藏于广东省微生物菌种保藏中心。
- 1.1.3 培养基 1) MRS 液体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母粉 4 g,磷酸氢二钾 2 g,柠檬酸三铵 2 g,乙酸钠 5 g,葡萄糖 20 g,吐温-80 5 mL,硫酸镁 0.2 g,硫酸锰 0.05 g,超纯水定容至 1 L,调 pH 至 7.2,分装试管后添加适量的石蜡,121℃ 条件

下灭菌 20 min;2) MRS 琼脂培养基:配方同 MRS 液体培养基,添加琼脂粉 15 g·L⁻¹;3) 含碳酸钙的 MRS 琼脂培养基 (CaCO₃-MRS):MRS 琼脂培养基中添加质量浓度为 20 g·L⁻¹ 的碳酸钙;4) NA 液体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,调 pH 至 7.3,121℃ 条件下灭菌 20 min。5) NA 琼脂培养基:配方同 NA 液体培养基,添加琼脂粉 15 g·L⁻¹。

1.1.4 仪器与试剂 仪器设备:高压蒸汽灭菌器 HVE-50(Hirayama, 日本);洁净工作台 SW-CJ-2FD(苏净安泰, 苏州);PHS-3C 型 pH 计(雷磁, 上海);梯度 PCR 仪 GSX1(Eppendorf, 德国);超纯水机 RM-220(先河, 湖州);离心机 5424(Eppendorf, 德国);电泳仪(六一, 北京);超低温保存箱 MDF-682 (Panasonic, 日本);生化培养箱 LRH-250(浦东荣丰, 上海);紫外可见分光光度计 Ultrospec 6300 pro (GE Healthcare, 英国);凝胶成像系统 (BIO-RAD, 美国);显微镜 DM6(Leica, 德国)。

主要试剂:2×*Taq* Master Mix 即用型 PCR 预混液 (Microanalysis, 美国);细菌 16S rRNA 通用引物:上游引物 (27F):5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3';下游引物 (1492R):5'-TACGGYTACCTTGTTACG-ACTT-3'。引物由上海美吉生物医药科技有限公司合成;牛胆盐购自广东环凯微生物科技有限公司;乳酸、石蜡和过氧化氢等均为分析纯,购自广东广试试剂科技有限公司;其他常规试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化乳酸菌 取样品,加适量 8.5 g·L⁻¹ 的生理盐水研磨。将研磨液按倍比稀释法稀释至不同浓度,取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 梯度的菌液涂布 CaCO₃-MRS 平板,37℃ 厌氧培养 48 h。挑取溶钙圈较大的菌落在 MRS 平板上划线分离,反复纯化。将纯化后的菌落进行革兰染色、镜检及 H₂O₂ 接触酶试验,挑出无芽孢、接触酶阴性的革兰阳性菌株,置于 φ 为 10% 的甘油中,-80℃ 保存备用。

1.2.2 筛选耐酸乳酸菌 用 6 mol·L⁻¹ 的盐酸分别调节 MRS 液体培养基 pH 至 4.0、3.0 和 2.5。将分离纯化获得的乳酸菌进行活化并培养至对数生长

期后, 按 φ 为 1% 的接种量分别接种至 pH 为 4.0、3.0 和 2.5 的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧培养 24 h, 以未接种的相应 pH 的培养基为空白对照, 于 600 nm 下测各组菌液的光密度, 选取耐酸性能较好的乳酸菌进行后续试验。

1.2.3 筛选耐胆盐乳酸菌 取培养至对数生长期的耐酸乳酸菌新鲜菌液, 按 φ 为 1% 的接种量分别转接至含 0、1、2 和 3 g·L⁻¹ 牛胆盐的 MRS 液体培养基, 37 ℃ 厌氧条件下培养 24 h, 于 600 nm 下测各组菌液的光密度。

1.2.4 菌种鉴定 形态学鉴定: 将筛选获得的菌株涂布于 MRS 平板上, 37 ℃ 厌氧条件下培养 24 h 后, 观察其菌落特征; 取单菌落涂片, 革兰染色, 显微镜下观察其细胞形态。

16S rRNA 基因分子鉴定: 采用 CTAB 法^[13]提取待鉴定菌株的基因组 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 扩增体系及程序参见文献^[14]。扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。将测序结果提交 Genbank 进行 Blast 比对分析, 并选取同属内近缘种的 16S rRNA 基因序列, 采用 MEGA6.0 软件构建系统发育树。

1.2.5 测定产酸能力 选取可在 pH 3.0 生长的菌株重新活化培养 48 h, 挑取单菌落分别接种至灭菌后 pH 为 6.60 的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧条件下培养 24 h, 4 ℃ 条件下 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 用 pH 酸度计直接测定发酵上清液 pH。同时, 参照国标 GB/T5413.34-2010^[15]的方法测定滴定酸度, 并以吉尔涅尔度 (°T) 表示乳酸菌发酵液的酸度, 即每 100 mL 发酵液消耗 1 mL 浓度为 0.1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液相当于 1 °T, 每组滴定试验重复 3 个平行^[16]。

1.2.6 测定抑菌性能 以大肠埃希菌 ATCC 8739 和金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 为指示菌, 以 NA 培养基作为指示菌培养基, 使用牛津杯打孔法进行抑菌试验。按 φ 为 1% 的接种量重新转接大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌, 28 ℃ 条件下 180 r·min⁻¹ 振荡培养 17 h, 使其菌体浓度约为 10⁷ cfu·mL⁻¹。取 2 mL 上述大肠埃希菌或金黄色葡萄球菌菌液与 200 mL 经融化后保持在 50 ℃ 左右的 NA 培养基混匀, 在无菌平板上放置 4 个无菌牛津杯, 用无菌移液管吸取 20 mL 的乳酸菌发酵上清液, 以调至相应 pH 的 MRS 空白培养基为对照, 每组重复 3 个平行试验, 37 ℃ 条件下培养 20 h, 测定抑菌圈直径。

1.2.7 绘制生长曲线及产酸曲线 活化菌种, 制备

种子液, 按 φ 为 1% 的接种量接种到 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 条件下培养。每间隔 2 h 取 5 mL 发酵液测 $D_{600\text{ nm}}$ 及 pH, 分别以 $D_{600\text{ nm}}$ 和 pH 为纵坐标, 以时间为横坐标, 绘制菌株生长曲线及产酸曲线。

1.2.8 耐酸、耐胆盐性能研究 配制 pH 为 2.0 和 2.5 的 MRS 液体培养基以及 pH 6.6 且含 3 g·L⁻¹ 牛胆盐的 MRS 液体培养基。将已在 37 ℃ 厌氧条件下培养 20 h 的待考察乳酸菌菌液, 按 φ 为 1% 的接种量分别转接至 pH 2.0、2.5 或含 3 g·L⁻¹ 牛胆盐的 MRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧条件下培养 3 和 6 h, 取合适的稀释倍数进行涂布平板, 每组重复 3 个平行试验, 37 ℃ 条件下培养 48 h 后, 选择菌落数 30~300 范围的平板进行菌落计数, 并依据稀释倍数计算活菌数, cfu·mL⁻¹。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离和筛选

从酸菜、酸豆角及梅菜等样品中, 共分离到 81 株溶钙圈较大、接触酶阴性、无芽孢的革兰阳性菌株, 初步判断为乳酸菌。筛选发现, 48 株乳酸菌可在 pH 4.0 的 MRS 液体培养基中生长, 10 株乳酸菌能够在 pH 3.0 条件下生长, 其中 SC16、DJ8A、DJ9B 和 DJ10C 菌株的耐酸能力相对较强, 在 pH 3.0 条件下长势较好; 所有菌株均无法在 pH 2.5 条件下生长。此外, 对 10 株可在 pH 3.0 环境下生长的乳酸菌进行耐胆盐试验, 结果如表 1 所示, 除菌株 SC15 不能耐受质量浓度为 1 g·L⁻¹ 的牛胆盐外,

表 1 各乳酸菌在不同 pH 和牛胆盐质量浓度下的生长情况¹⁾
Tab. 1 The growth of *Lactobacillus* strains under different pH and bile salt concentrations

菌株编号	样品来源	pH			ρ (牛胆盐)/(g·L ⁻¹)			
		4.0	3.0	2.5	0	1	2	3
DJ3	酸豆角	+++	+	-	+++	+	-	-
DJ8A	酸豆角	+++	++	-	+++	+	-	-
DJ8B	酸豆角	+++	+	-	+++	+	-	-
DJ9A	酸豆角	+++	+	-	+++	+	-	-
DJ9B	酸豆角	+++	++	-	+++	+	-	-
DJ10C	酸豆角	+++	++	-	+++	+	-	-
SC3A	酸菜	+++	+	-	+++	+	-	-
SC8	酸菜	+++	+	-	+++	+	-	-
SC15	酸菜	+++	+	-	+++	-	-	-
SC16	酸菜	+++	++	-	+++	+	-	-

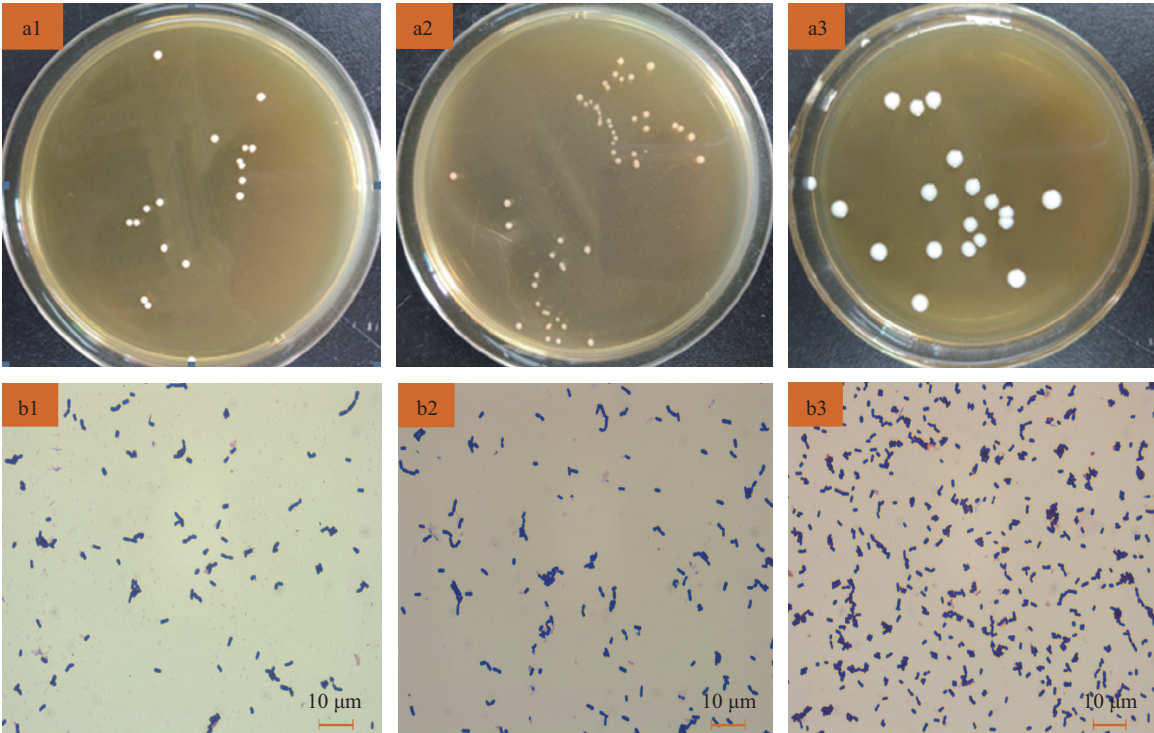
1) +++: 生长良好; ++: 生长一般; +: 生长较弱; -: 不生长

其余 9 株乳酸菌均可在质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的牛胆盐中生长,但均不能在质量浓度为 2 或 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的牛胆盐中生长。上述结果表明,风味酸性食品获得的乳酸菌耐酸能力普遍较强,但对牛胆盐的耐受能力相对较差。

2.2 耐酸乳酸菌鉴定

对上述 10 株可在 pH 3.0 条件下生长的乳酸菌进行菌落形态及细胞形态观察。结果显示,菌株 DJ3 和 SC3A 的菌落形态为圆形,乳白色、不透明、

凸起、有光泽、表面光滑湿润、直径 $0.5\sim1.5\text{ mm}$;菌株 DJ9B、DJ10C、SC15 和 SC16 的菌落为圆形、灰白色、半透明、扁平、无光泽、表面光滑湿润、直径 $0.5\sim1.5\text{ mm}$;菌株 DJ8A、DJ8B、DJ9A 和 SC8 的菌落为圆形、乳白色、不透明、扁平、有光泽、表面光滑湿润、直径 $2.0\sim3.0\text{ mm}$ 。然而,虽然这 10 株乳酸菌有 3 种明显不同的菌落形态特征,但其细胞形态均没有明显差异,主要为短杆状,单个、成对或成链排列,无芽孢,革兰氏阳性,具体形态特征如图 1 所示。



a1、a2 和 a3 分别为菌株 DJ3、DJ9B 和 DJ8A 的菌落形态图, b1、b2 和 b3 分别为菌株 DJ3、DJ9B 和 DJ8A 的细胞形态图

图 1 部分乳酸菌的菌落形态和细胞形态图

Fig. 1 The colony morphology and cell morphology of *Lactobacillus* strains

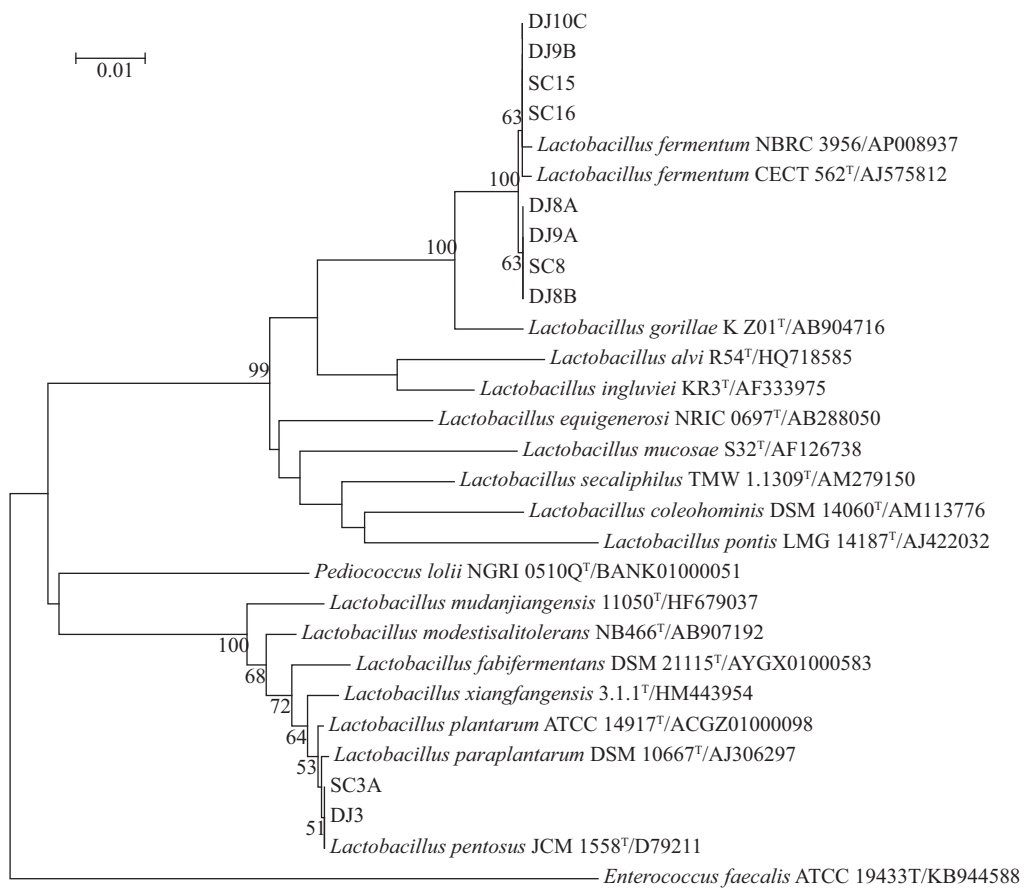
对这 10 株乳酸菌的 16S rRNA 基因序列进行分析、比对,选取同属内近缘种的 16S rRNA 基因序列,采用 MEGA6.0 软件分析,以 Kimura-2 模型计算遗传距离,以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树,Bootstrap 自展 1 000 次检验进化树拓扑结构置信区间,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,菌株 SC3A 和 DJ3 与 *Lactobacillus pentosus* JCM 1558^T 的 16S rRNA 基因序列相似性达到 100%,因此初步鉴定其为戊糖乳杆菌 *L. pentosus*。而菌株 SC15、SC16、DJ9B、DJ10C、SC8、DJ8A、DJ8B 及 DJ9A 与 *L. fermentum* CECT 562^T 和 *L. fermentum* NBRC3956 的 16S rRNA 基因序列相似性均达到 99.65% 以上,因此初步认定这 8 株乳酸菌为发酵乳杆菌 *L. fermentum*。此外,菌株

SC15、SC16、DJ9B 及 DJ10C 之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%,而菌株 SC8、DJ8A、DJ8B 及 DJ9A 之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%,这与乳酸菌的形态学特征分类相符,说明上述 8 株发酵乳杆菌分别属于 2 个不同的种。

2.3 耐酸乳酸菌的产酸能力及抑菌作用考察

对 10 株可在 pH 3.0 条件下生长的乳酸菌,进行产酸能力研究,并研究其对大肠埃希菌以及金黄色葡萄球菌的抑菌作用,结果如表 2 所示,菌液 pH 与菌液酸度呈极显著负相关 (两者的 Pearson 相关系数为 0.929, $P=0.000$),戊糖乳杆菌 DJ3 和 SC3A 相对于其余 8 株发酵乳杆菌,菌液 pH 明显较低,酸度较高,说明其产酸能力较强,而其余 8 株发酵乳杆菌之间的产酸能力差距不大。此外,10 株乳



SC3A、DJ3、DJ8A、SC16、SC15、SC8、DJ10C、DJ9B、DJ9A 和 DJ8B 这 10 株乳酸菌的 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号分别为 MF455206–MF455215

图 2 基于 16S rRNA 基因序列的乳酸菌系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Lactobacillus* strains based on 16S rRNA gene sequences

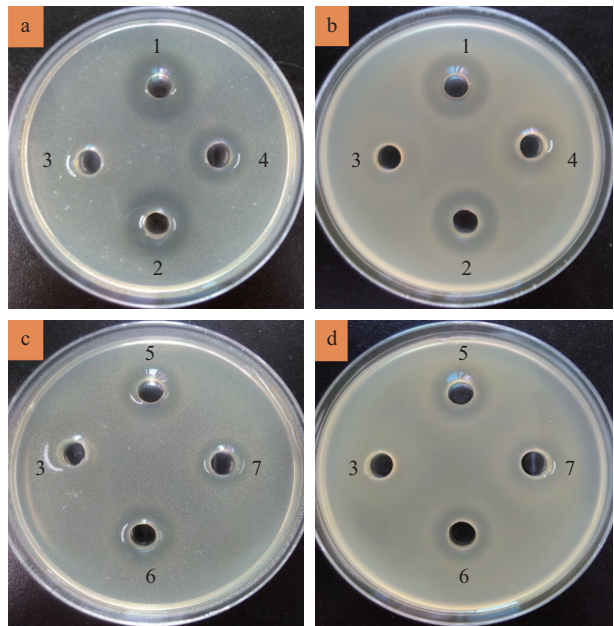
表 2 各乳酸菌的产酸能力及抑菌作用¹⁾

Tab. 2 Acid-producing ability and antibacterial activity of *Lactobacillus* strains

样品编号 ²⁾	pH	酸度/°T	抑菌圈直径/mm	
			大肠埃希菌(G ⁻)	金黄色葡萄球菌(G ⁺)
DJ3	3.69±0.02a	179.1±0.1h	22.68±0.24d	21.33±0.11d
SC3A	3.77±0.01b	164.0±0.0f	21.53±0.13d	20.28±0.35d
DJ8A	4.30±0.01c	109.7±0.3de	17.78±0.48bc	17.32±0.53bc
DJ8B	4.30±0.02c	110.6±0.4e	17.74±0.39bc	16.43±0.76bc
DJ9A	4.31±0.03c	108.2±0.9bcd	16.86±0.47bc	16.53±0.83bc
DJ9B	4.32±0.00c	108.1±0.3bcd	17.62±0.34bc	16.10±0.65bc
DJ10C	4.34±0.02c	108.8±0.6cde	17.72±0.57bc	16.58±0.74bc
SC8	4.34±0.04c	106.4±1.7b	16.96±1.22bc	15.94±1.08bc
SC15	4.34±0.00c	107.3±0.1bc	17.52±0.30bc	16.79±0.65bc
SC16	4.35±0.02c	108.0±0.5bcd	16.92±0.74bc	16.08±0.89bc
乳酸3.72 ^I	3.72±0.00ab	174.4±0.0g	18.37±0.21c	17.92±0.46c
乳酸4.32 ^{II}	4.32±0.00c	109.1±0.2cde	16.44±0.42b	15.69±0.60b
空白对照 ^{III}	6.60±0.03d	15.4±0.6a	8.64±0.14a	8.64±0.14a

1)表中数据为3次重复的平均值±标准误, 同列数据后凡是具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著($P>0.05$, Duncan's法); 2) I: 用乳酸调MRS培养基至pH 3.72, II: 用乳酸调MRS培养基至pH 4.32, III: MRS培养基以及pH调至6. 60的各乳酸菌发酵上清液

酸菌的发酵上清液对大肠埃希菌以及金黄色葡萄球菌均有明显抑菌效果,其中戊糖乳杆菌 DJ3 和 SC3A 的抑菌作用明显优于其余 8 株发酵乳杆菌(图 3)。另外,用乳酸调节 MRS 空白培养基至 pH 3.72 或 4.32,其对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌也具有明显抑菌作用,但抑菌作用均不如相应 pH 的乳酸菌发酵上清液,而未接种的 MRS 培养基以及 pH 调至 6.60 的各乳酸菌发酵上清液对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌基本无抑菌作用(图 3)。因此推测,一方面,乳酸对测试所用大肠埃希菌以及金黄色葡萄球菌具有明显的抑菌效果,另一方面,除乳酸外,上述乳酸菌还产生了其他抑菌物质,但这些抑菌物质在 pH 接近中性时,抑菌活性极弱,不足以形成较明显的抑菌圈。



a 和 c 的指示菌为大肠埃希菌 ATCC 8739, b 和 d 的指示菌为金黄色葡萄球菌 ATCC 6538; 样品 1、2、5 和 6 分别为菌株 DJ3、SC3A、DJ8A 和 DJ9B 的发酵上清液, 样品 3 为 MRS 培养基, 样品 4 和 7 分别为用乳酸调 pH 至 3.72 和 4.32 的 MRS 培养基

图 3 部分乳酸菌的发酵液对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Fig. 3 Inhibitory effect of the fermentation broth of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

2.4 耐酸乳酸菌的生长和产酸特性研究

根据表 1 和表 2 的分析测试结果, 选取在 pH 3.0 条件下生长较好的发酵乳杆菌 SC16、DJ8A、DJ9B、DJ10C 及产酸能力较强的戊糖乳杆菌 DJ3、SC3A 进行生长曲线和产酸速率研究。如图 4 所示, 戊糖乳杆菌 DJ3 和 SC3A 生长速度最快, 发酵乳杆菌 DJ9B 次之, 而发酵乳杆菌 SC16、DJ10C 及 DJ8A 最差。上述 6 株乳酸菌的生长趋势和产酸趋

势存在对应关系: 0~2 h 为延滞期, 菌体浓度没有明显增加, pH 变化不大; 2 h 后进入对数生长期, 菌体生长代谢旺盛, 快速消耗碳源, 产生大量有机酸, pH 迅速下降; 12 h 左右达到生长稳定期, 菌体浓度逐渐趋于稳定, pH 也逐步趋于稳定, 其中戊糖乳杆菌 DJ3 和 SC3A 菌液最终 pH 为 3.7 左右, 而发酵乳杆菌菌液最终 pH 为 4.3 左右。

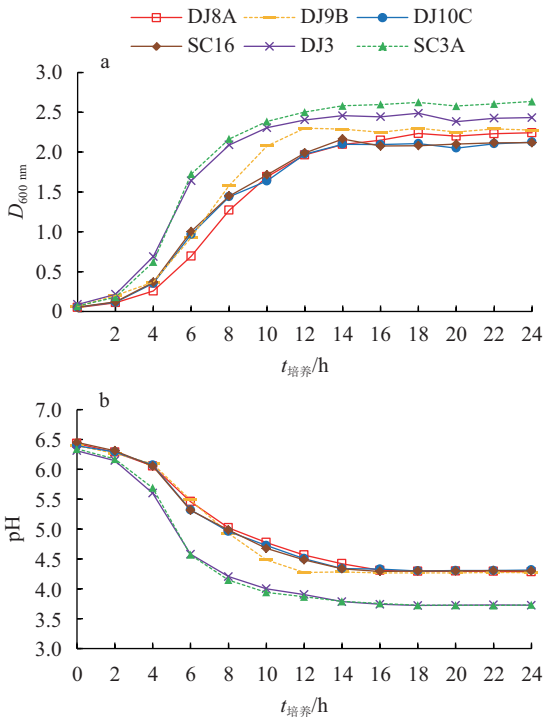


图 4 乳酸菌培养过程中菌液 pH 及 $D_{600\text{ nm}}$
Fig. 4 pH and $D_{600\text{ nm}}$ during the culture of *Lactobacillus* strains

2.5 菌株 DJ3、SC3A、DJ8A 及 DJ9B 的耐酸和耐胆盐能力考察

据“2.2”节的分析结果可知, 菌株 SC16 和 DJ10C 与菌株 DJ9B 的形态学特征和 16S rRNA 基因序列基本一致, 且其生长性能和产酸性能均明显不如 DJ9B。结合表 1 和图 4, 选取生长性能和产酸性能较优的戊糖乳杆菌 DJ3、SC3A 以及耐酸性能相对较强的发酵乳杆菌 DJ8A、DJ9B 作为受试菌, 进一步考察其对 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛胆盐质量浓度、pH 2.5 以及 pH 2.0 的耐受性, 结果如表 3 所示。

结果表明, 戊糖乳杆菌 DJ3 和 SC3A 对 pH 2.5 的酸性环境具有较强的耐受性, 在 pH 2.5 环境处理 6 h, 活菌数仍大于 $10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 但在 pH 2.0 或 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛胆盐浓度下耐受性极差, 此条件下处理 6 h, 活菌数均小于 $100\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, 说明 pH 2.0 或含 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛胆盐的环境可能已超过了菌株

SC3A 及 DJ3 的生存耐受范围, 导致其在此条件下耐受性极差。然而, 与 DJ3 和 SC3A 相比, 发酵乳杆菌 DJ8A 和 DJ9B 的耐酸和耐胆盐能力明显较强, 其在 pH 2.0 或含 3 g·L⁻¹ 牛胆盐浓度的环境下处理 3 h, 活菌数仍可达 10⁶ cfu·mL⁻¹, 处理 6 h, 活菌数仍大于 10⁵ cfu·mL⁻¹。

表 3 菌株 DJ3、SC3A、DJ8A 和 DJ9B 在不同培养条件下的存活能力¹⁾
Tab. 3 The viabilities of DJ3, SC3A, DJ8A and DJ9B strains under different culture conditions

菌株	0 h、pH 6.6 (对照)	3 h			6 h		
		pH 2.5	pH 2.0	3 g·L ⁻¹ 牛胆盐	pH 2.5	pH 2.0	3 g·L ⁻¹ 牛胆盐
DJ3	10.22±0.08b	9.65±0.13a	<2.00a	<2.00a	8.48±0.06a	<2.00a	<2.00a
SC3A	11.03±0.06c	9.49±0.11a	<2.00a	<2.00a	8.34±0.15a	<2.00a	<2.00a
DJ9B	9.61±0.16a	9.39±0.23a	8.08±0.10b	6.54±0.15b	9.11±0.33a	6.04±0.10b	5.46±0.18b
DJ8A	9.92±0.05b	9.37±0.06a	9.18±0.10c	7.03±0.05c	8.97±0.19a	7.81±0.07c	6.30±0.11c

1)表中数据为活菌数的lg值, 为3次重复的平均值±标准误, 同列数据后凡是具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ($P>0.05$, Duncan's法)

3 讨论与结论

乳酸菌是动物肠道菌群的重要组成成分, 具有改善胃肠道功能、提高动物免疫力、提高动物生产性能等益生作用。乳酸菌代谢产生的有机酸是重要的益生机制之一, 近年来日益受到重视。

本研究从酸性风味食品中共分离到 81 株溶钙圈较大的乳酸菌。筛选发现, 其中 48 株乳酸菌可在 pH 4.0 的 MRS 液体培养基中生长, 10 株乳酸菌能够在 pH 3.0 条件下生长。对这 10 株乳酸菌的产酸性能以及对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用进行考察, 结果表明 10 株乳酸菌发酵上清液对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的均有明显抑菌作用, 而且其产生的有机酸可能是主要抑菌成分。此外, 研究发现, 戊糖乳杆菌 SC3A 及 DJ3 产酸速度较快, 发酵 2 h 后迅速产生大量有机酸, 发酵 12 h 后 pH 趋于稳定, 达到 3.7 左右, 其产酸性能不但优于同批筛选获得的 8 株发酵乳杆菌, 也普遍优于目前文献报道的常用产酸乳酸菌, 如保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、植物乳杆菌及乳酸片球菌等^[17-18]。这说明不同的乳酸菌产酸能力存在差异, 戊糖乳杆菌的产酸能力值得深入研究和开发。

此外, 由于动物体内胃液具有强酸性, pH 一般维持在 2.5~3.5 之间^[19], 且十二指肠胆盐含量高, 一般在 0.3~3.0 g·L⁻¹ 之间^[20]。因此, 在益生菌开发和使用过程中, 筛选耐酸、耐胆盐的菌株同样具有重要意义, 是益生菌充分发挥作用的前提。本研究在保证样品来源丰富度和菌种多样性前提下, 选取生长性能和产酸性能较优的戊糖乳杆菌 DJ3、SC3A 以及耐酸性能相对较强的发酵乳杆菌 DJ8A、

DJ9B 作为受试菌, 进一步考察其对 3 g·L⁻¹ 牛胆盐质量浓度、pH 2.5 以及 pH 2.0 的耐受性。结果表明, 4 株乳酸菌在 pH 2.5 条件下均具有良好的耐受性。其中, 发酵乳杆菌 DJ8A 和 DJ9B 耐酸和耐胆盐能力相对较强, 甚至能在一定程度上耐受 pH2.0 及 3g·L⁻¹ 牛胆盐质量的严苛条件。但是, 戊糖乳杆菌 SC3A 和 DJ3 的生长速度、产酸能力以及拮抗病原菌的能力更强, 具有良好的应用潜力。因此, 如何通过菌株驯化、剂型保护等方法提高 SC3A 和 DJ3 对胃肠道环境的耐受性, 值得深入研究。

据 Stuart 等^[21]研究发现, 用胆盐选择性驯化乳杆菌的胆盐耐受性是有效的, 经过几代胆盐驯化后, 得到的乳杆菌耐胆盐的能力比亲代乳杆菌强。由于本试验的样品来源于酸性风味食品, 因此和以胃肠道或动物粪便作为筛选来源的研究报道相比, 本试验所获得的乳酸菌产酸能力和耐酸能力相对较强, 对胆盐耐受能力相对较弱, 说明菌株的抗逆性能力可能与其特殊生存环境密切相关^[22-25]。因此, 本研究后续将对筛选获得的优良乳酸菌作进一步的胆盐驯化试验, 以提高其整体性能。

近年来, 乳酸菌类微生态制剂作为一种安全性较高的新型绿色功能性饲料添加剂, 其产生和发展顺应了当前高新技术产业化和注重健康环保的主流, 应用前景广阔。目前, 虽然我国在乳酸菌制剂的研究和应用方面取得了一定的成绩, 但还是比较薄弱, 尤其是优良菌种资源方面, 明显匮乏, 严重阻碍了其在生产实践中的应用。为此, 本研究筛选具有优良性能的乳酸菌并进行功能评价, 对提高乳酸菌类产品的市场竞争力以及促进畜牧业的迅速健康发展都非常有意义。

参考文献:

[1] BAO Q, LIU W, YU J, et al. Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China[J]. J Gen Appl Microbiol, 2012, 58(2): 95-105.

[2] 李培培, 王建华, 张宝, 等. 饲用乳酸菌及其在养猪生产中的研究与应用[J]. 国外畜牧学 (猪与禽), 2016, 36(10): 37-40.

[3] SUKEGAWA S, IHARA Y, YUGE K, et al. Effects of oral administration of heat-killed *Enterococcus faecium* strain NHRD IHARA in post-weaning piglets[J]. J Anim Sci, 2014, 85(4): 454.

[4] AKANJI B T, ALAKE A B. Evaluation of organic acids, anti-*Salmonella* activities of lactic acid bacteria isolated from Nigerian grown salad vegetables[J]. Br Biotechnol J, 2016, 11(1): 1-10.

[5] MAKRAS L, LDE V. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids[J]. Int Dairy J, 2006, 16(9): 1049-1057.

[6] PANIGRAHI P, BRAILEANU G T, CHEN H, et al. Probiotic bacteria change *Escherichia coli*-induced gene expression in cultured colonocytes: Implications in intestinal pathophysiology[J]. World J Gastroentero, 2011, 13(47): 6370-6378.

[7] 陈星. 乳酸菌在动物生产中的应用研究现状[J]. 当代畜牧, 2014(33): 20-22.

[8] FOOLADI A A I, FOROOSHAI M C, SAFFARIAN P, et al. Antimicrobial effects of four lactobacilli strains isolated from yoghurt against *Escherichia coli* O157:H7[J]. J Food Safety, 2014, 34(2): 150-160.

[9] 刘宇, 李阳, 刘通, 等. 乳酸菌益生特性及在猪生产中应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2016, 37(6): 87-90.

[10] YAHAYA M S, GOTO M, YIMITI W, et al. Evaluation of fermentation quality of a tropical and temperate forage crops ensiled with additives of fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria[J]. Asian Austral J Anim, 2004, 17(7): 942-946.

[11] 马玉莲, 王爽, 张鹏宇, 等. 饲用有机酸的益生特性及其在猪生产中应用研究进展[J]. 猪业科学, 2016, 33(4): 40-42.

[12] 王巧丽, 季海峰, 韩向敏, 等. 饲用乳酸菌的主要代谢产物及其作用[J]. 饲料研究, 2012(10): 22-24.

[13] YANG Q, FRANCO C M, ZHANG W. Sponge-associated actinobacterial diversity: Validation of the methods of actinobacterial DNA extraction and optimization of 16S rRNA gene amplification[J]. Appl Microbiol Biot, 2015, 99(20): 8731-8740.

[14] 冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 等. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(3): 439-442.

[15] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准: 乳和乳制品酸度的测定: GB/T5413.34—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[16] 缙敬轩, 吕嘉枋, 张智维, 等. 泡菜中益生性乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 中国酿造, 2008, 27(6): 22-24.

[17] 马春丽, 张兰威. 高产酸性能乳酸菌的筛选及产酸机理研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 189-190.

[18] 张慧杰, 玉柱, 王林, 等. 青贮饲料中乳酸菌的分离鉴定及优良菌株筛选[J]. 草地学报, 2011, 19(1): 137-141.

[19] HOLZAPFEL W H, HABERER P, SNEL J, et al. Overview of gut flora and probiotics[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 41(2): 85-101.

[20] 吴祖芳, 洪松虎, 沈锡权, 等. 乳酸菌高抗氧化活性菌株的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报, 2010, 10(1): 73-78.

[21] STUART M R, CHOU L S, WEIMER B C. Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(2): 665-673.

[22] 孙宏, 卢志超, 吴逸飞, 等. 猪源乳酸菌的筛选、体外益生效果评价及对小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(19): 66-70.

[23] 冯会贤, 梅星星, 蒋瑞瑞, 等. 禽用乳酸菌的筛选与功能鉴定[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2016, 44(9): 35-41.

[24] 高擎燊, 李平华, 黄瑞华, 等. 猪源乳酸菌的抗逆性及益生性研究[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(10): 41-46.

[25] 曹珂, 林丽萍, 陈于陇, 等. 一株健康仔猪肠道乳酸菌的筛选鉴定与饲喂安全性的研究[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(6): 1325-1331.

【责任编辑 庄 延】