

2 株鲤鱼源乳酸菌体外抗逆性研究

单晓枫¹, 孙烨林², 张洪波^{1,3}, 张喜宏¹, 钱爱东^{1,3}

(1. 吉林农业大学预防兽医学学科, 吉林 长春 130118 2 长春市动检站, 吉林 长春 130118

3 吉林农业大学动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林 长春 130118)

摘要:对 2 株鲤鱼源乳酸菌作为益生菌候选菌株进行体外抗逆性试验。通过耐受胆盐、耐受 pH 值、耐受蛋白酶和耐高温等试验, 对这 2 株乳酸菌进行研究。其中在胆盐耐受性试验中, YL-1 和 YL-7 在胆盐浓度 0.4%、培养 4 h 时仍有 30% 以上的存活率; 在 pH 值耐受性试验时, 2 株乳酸菌均可在一定的酸性和碱性条件下存活; 胰蛋白酶对 2 株菌的存活率没有影响; 在 70℃ 的高温中, 2 株乳酸菌均有一定的耐受性。

关键词: 鲤鱼; 乳酸菌; 抗逆性

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2008)02-0124-04

在国内, 有关益生菌的研究大都集中在人类和畜禽业方面, 在水产养殖业则相对较少; 而在其筛选和应用上, 也不能简单的把陆生动物的菌种应用在水生动物上。因此, 有专家提出了“最好的菌种来源是分离自同种动物的胃肠道”的观点 (Fuller R, 1989), 而这些菌株也必须能耐受动物自身胃肠道的不利因素。基于此, 本研究将从鲤鱼的肠黏膜上分离到的 2 株益生菌候选菌株作为试验菌株, 在体外进行抗逆性试验, 旨在为筛选鲤鱼的高效益生菌株提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 2 株鲤鱼源乳酸菌由吉林农业大学预防兽医学实验室提供。

1.1.2 培养基 MRS 肉汤培养基, MRS 培养基, 按廖延雄 (1995) 的方法配制。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的活化 将分离到的乳酸菌接种于 MRS 肉汤中, 进行活化 (李妍, 2002)。活化二代后, 取培养液于 4℃、4 000 r/min 离心 15 min 后, 用无菌 PBS (pH 7.2) 悬浮沉淀菌体, 调菌体含量为一定浓度, 备用。

1.2.2 胆盐耐受性试验 取活化好的菌液, 按 5% (V/V) 接种于胆盐浓度为 0%、0.1%、0.2%、0.3%、

0.4% (W/V) 的 MRS 肉汤中, 在 30℃ 厌氧条件下, 培养 0.1、2、3、4 h 后, 取上述菌液 0.1 mL, 用平板计数估算其菌体含量, 每个样本做 3 个重复。

1.2.3 pH 值对乳酸菌的影响 用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 调节 MRS 肉汤, 使其 pH 值分别为 2、3、4、5、7、8、9、10, 并将未调 pH 值的 MRS 肉汤 (pH 6.2) 设为对照。取活化好的乳酸菌, 按 5% (V/V) 接种于上述培养基中, 30℃ 厌氧条件下培养, 在接种 0.1、2、3、4 h 后, 取上述处理菌液 0.1 mL, 进行平板计数, 观察其对酸碱的耐受情况。

1.2.4 蛋白酶对乳酸菌存活率的影响 取活化好的乳酸菌, 按 5% (V/V) 接种于浓度为 1% 的胰蛋白酶 PBS 溶液中, 以未加蛋白酶的 PBS 溶液作为对照, 于 30℃ 厌氧培养, 分别在 0.1、2、3、4 h 时取处理样进行平板计数, 观察蛋白酶对乳酸菌存活率的影响。

1.2.5 耐高温能力的测定 取活化好的乳酸菌, 按 5% (V/V) 接种于 MRS 肉汤中, 30℃ 厌氧条件培养 4 h 后, 取菌液进行高温处理, 50℃、70℃、90℃ 各 2 min、5 min、10 min, 以未经热处理的菌液作为对照。用平板计数估算菌液浓度, 观察其耐高温的能力。

2 结果

2.1 胆盐对乳酸菌的影响

2 株乳酸菌 (YL-1 YL-7) 对不同胆盐浓度的耐受情况如表 1 和表 2 所示。

通过表 1 和表 2 可以看出, 2 株乳酸菌对胆盐均有一定的耐受性。在 0.1% 胆盐的浓度条件, 其存活状况均未受到影响, 且随时间的增加, 其菌体浓度也在增加; 但从 0.2% 胆盐浓度开始, 2 株乳酸菌

收稿日期: 2007-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471286)。

通讯作者: 钱爱东, 1960 年生, 男, 博士生导师, 教授。

作者简介: 单晓枫, 1977 年生, 男, 吉林长春人, 硕士, 实验师, 主要从事水产微生物和鱼类免疫学研究。E-mail: sx1997@163.com

的生长都不同程度的受到抑制;尤其在 0 4%胆盐的浓度条件下,其存活率都相对较低,表明这 2株乳酸菌对胆盐仍有一定的耐受力。比较而言,YL- 7较为耐受胆盐,其在胆盐浓度为 0 4%,培养 4 h后仍有 39 0%左右的存活率,而 YL- 1为 34. 5%。

表 1 不同胆盐浓度对 YL- 1存活率的影响 log(cfu/mL)

Tab 1 Effect of Different Bile Concentration on the Survival of YL- 1					
培养时间 /h	胆盐浓度 /%				
Time	0	0. 1	0. 2	0. 3	0. 4
0	7. 32	7. 18	7. 23	5. 81	4. 51
1	7. 26	7. 04	7. 11	5. 63	3. 02
2	7. 36	7. 20	7. 23	4. 91	2. 91
3	7. 54	7. 32	6. 77	3. 72	2. 76
4	7. 61	7. 57	6. 51	3. 32	2. 63

2. 2 不同 pH对乳酸菌的影响

表 3 不同 pH值对 YL- 1存活率的影响 log(cfu/mL)

Tab 3 Effect of Different pH on the Survival of Strains of YL- 1

培养时间 /h	pH值								
Time	2. 0	3. 0	4. 0	5. 0	6. 2	7. 0	8. 0	9. 0	10. 0
0	5. 04	5. 32	6. 60	7. 32	7. 36	7. 36	7. 18	7. 25	7. 00
1	3. 04	3. 30	6. 32	7. 17	7. 26	7. 18	7. 00	7. 04	6. 70
2	2. 90	3. 00	6. 48	7. 23	7. 45	7. 30	7. 18	7. 15	6. 30
3	2. 70	3. 48	6. 65	7. 40	7. 59	7. 49	7. 28	7. 23	5. 78
4			6. 76	7. 58	7. 71	7. 65	7. 43	7. 40	5. 04

表 4 不同 pH值对 YL- 7存活率的影响 log(cfu/mL)

Tab 4 Effect of Different pH on the Survival of Strains of YL- 7

培养时间 /h	pH值								
Time	2. 0	3. 0	4. 0	5. 0	6. 2	7. 0	8. 0	9. 0	10. 0
0	5. 21	5. 41	6. 67	7. 28	7. 21	7. 30	7. 18	7. 20	7. 01
1	3. 52	3. 91	6. 47	7. 18	7. 21	7. 25	7. 10	7. 05	6. 82
2	3. 01	3. 21	6. 52	7. 25	7. 23	7. 28	7. 21	7. 19	6. 52
3	2. 87	3. 58	6. 86	7. 39	7. 39	7. 40	7. 30	7. 30	5. 98
4	2. 85	3. 92	6. 91	7. 51	7. 48	7. 47	7. 39	7. 34	5. 31

2. 3 蛋白酶对乳酸菌存活率的影响

通过表 5可知,蛋白酶对乳酸菌的存活率没有影响,各时间点的数据差异不显著($P>0. 05$)。

表 5 胰蛋白酶对 YL- 1、YL- 7存活率的影响 log(cfu/mL)

Tab 5 Effect of Trypsin on the Survival of Strains of YL- 1 and YL- 7					
菌株	作用时间 /h				
Strains	0	1	2	3	4
YL- 1	7. 38	7. 40	7. 49	7. 45	7. 46
YL- 7	7. 43	7. 49	7. 40	7. 43	7. 45

2. 4 高温对乳酸菌存活的影响

通过表 6、表 7可以看出,YL- 1、YL- 7乳酸菌在 90℃、2 min时间点上已检测不到菌体;而在 50℃各时间点上,菌体浓度差异不显著($P>0. 05$)。表明 2株乳酸菌均可耐受 50℃的温度,而对于 70℃,2

通过表 3和表 4可以看出,YL- 1、YL- 7在 pH 2的点上存活率呈下降趋势;而当 pH>3时,YL- 1、YL- 7的存活率是先下降后上升,表明 YL- 1、YL- 7都可以在 pH 3的环境中存活;而在碱性环境中,YL- 1、YL- 7的存活率都在 50%以上,说明 YL- 1和 YL- 7可以在鲤鱼中肠的碱性条件下生存。

表 2 不同胆盐浓度对 YL- 7存活率的影响 log(cfu/mL)

Tab 2 Effect of Different Bile Concentration on the Survival of YL- 7					
培养时间 /h	胆盐浓度 /%				
Time	0	0. 1	0. 2	0. 3	0. 4
0	7. 21	7. 22	7. 23	6. 21	4. 91
1	7. 15	7. 17	7. 19	5. 75	4. 07
2	7. 23	7. 23	7. 13	5. 22	3. 83
3	7. 35	7. 32	7. 01	4. 21	3. 53
4	7. 51	7. 49	6. 75	3. 87	2. 95

株菌均表现一定的耐受性。

表 6 YL- 1菌株的热稳定性 log(cfu/mL)

Tab 6 Heat Stability of Strain of YL- 1				
作用温度 /℃	作用时间 /min			
Temperature	0	2	5	10
50	7. 46	7. 45	7. 50	7. 48
70	7. 48	2. 60	1. 30	< 1
90	7. 47	< 1	< 1	< 1

表 7 YL- 7菌株的热稳定性 log(cfu/mL)

Tab 7 Heat Stability of Strain of YL- 7				
作用温度 /℃	作用时间 /min			
Temperature	0	2	5	10
50	7. 48	7. 43	7. 51	7. 47
70	7. 47	2. 85	1. 02	< 1. 00
90	7. 49	< 1. 00	< 1. 00	< 1. 00

3 讨论

优良的益生菌必须耐受消化道的低 pH 值、高胆盐等各种不利因素,才可能进入动物的肠道、定植于其特定部位发挥益生作用。吴惠芬等(吴惠芬等, 2005)发现,猪源的乳酸菌 L5、L7 可以耐受 0.2% 的胆盐浓度;而李太元等(2005)的研究结果表明,在 60 g/L 胆盐浓度的情况下,其犬源的 2 株菌 D1-3、D4-3 仍可以良好生长,而当胆盐浓度为 7.0 g/L 以上时,生长受到抑制。本试验的结果表明,在分离出的 2 株乳酸菌中,YL-1、YL-7 在 0.4% 的胆盐浓度情况下,仍有 30% 以上的存活率,说明它们可以耐受鲤鱼肠道的高胆盐环境,在其特定部位生存。

鲤鱼无胃,但其前肠具有一部分胃的功能,如 pH 值偏酸性等,而益生乳酸菌所要定植的中肠又偏碱性。所以综合考虑,本试验设计 pH 值分别从 2.0 ~ 10.0 以筛选耐受广泛 pH 值的益生乳酸菌菌株。试验结果表明,YL-1、YL-7 乳酸菌分别在酸性和碱性环境中都有一定的存活,说明这 2 株乳酸菌在经过鲤鱼偏酸性的前肠后,又可以在偏碱性的中肠内存活。

益生菌除了具有一定的耐酸碱、耐胆盐特性之外,还应该具有耐受各种消化酶的能力,尤其是蛋白酶。由于鲤鱼胃的不存在,在消化道中就没有胃蛋白酶。因此,本试验只做了胰蛋白酶对益生乳酸菌候选菌株存活率影响的试验。结果表明,2 株候选菌株对胰蛋白酶均有相当的耐受性,可以在肠道中胰蛋白酶的侵袭下存活并繁殖。而在 4 h 之内,2 株

菌的菌体浓度却没有什麼变化,可能是由于试验所用的 PBS 作为载体, PBS 成分匮乏,并不能提供菌体生长所必需的营养,菌体只能存活并不生长。

益生菌作为添加剂加入颗粒饵料时,在加工的过程中,高温会造成菌活力的下降或丧失。王福强(2004)报道,酵母菌在 70℃ 制粒过程中损失 99% 以上,肠杆菌损失 90% 以上;而对于芽孢乳杆菌,在 80℃ 热处理 5 min 时存活率也小于 0.02%。本试验的 2 株乳酸菌,在 70℃ 处理 5 min 时仍有少量的存活,但在 90℃ 则检测不到活菌体。说明这 2 株乳酸菌对热有一定的敏感性。而在加工颗粒饲料时,成粒的温度一般在 90℃ 左右。综合以上可以得出,2 株乳酸菌都不能直接与饲料混合加工,否则将使菌体失活。

参考文献:

- 李太元,刘伟铭,金鑫,等. 2005 健康犬肠道乳酸杆菌某些生物学特性的研究[J]. 吉林农业大学学报, 27(6): 667-670
- 廖延雄. 1995 兽医微生物实验诊断手册[M]. 北京: 中国农业出版社.
- 李妍. 2002 益生菌的筛选及功能特性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- 吴惠芬,毛胜勇,姚文,等. 2005 2 株猪源乳酸菌对低 pH 值和胆盐耐受性及热稳定性研究[J]. 华中农业大学学报, 24(3): 265-268
- 王福强. 2004 牙鲈肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究[D]. 北京: 中国农业大学.
- Fuller R. 1989 A review probiotics in man and animals[J]. J Appl Bacteriol 66: 365-378

(责任编辑 万月华)

Study on Resistance of Two Carp *Lactobacillus* in *Vitro*

SHAN Xiao-feng¹, SUN Ye-lin², ZHANG Hong-bo^{1,3}, ZHANG Xi-hong¹, QIAN Ai-dong^{1,3}

(1. Subject of Preventive Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118 China

2. Changchun Animal Quarantine Station, Changchun 130118 China

3. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education of the People's Republic of China, Changchun 130118 China)

Abstract Resistance of two carp-source *Lactobacillus* was performed, which were the candidate probiotic strain. They were researched through the test of tolerance of chocolate, tolerance of pH, tolerance of protease, tolerance of high temperature and so on. Among all the tests, over 30% of YL-1 and YL-7 could survive after culture 4 hours and in 0.4% concentration in tolerance of chocolate test. And in tolerance of pH test, 2 strains of Lactic Acid Bacteria could survive both in acid environment and alkaline environment. Trypsin did not affect the survival of them. Moreover, they showed certain tolerance in the megatemperature of 70°C.

Key words carp, *Lactobacillus*, resistance