

益生菌生产菌——乳链球菌 SB900 的分离及生物特性研究*

孔 健 马桂荣 刘 稳 任红卫

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

摘 要 从泡菜中分离到一株产乳酸力强的菌株 SB900, 经鉴定为乳链球菌 (*Streptococcus lactis*)。其乳酸产量达 1.73%, 且耐酸性好, 在 pH2 的盐酸溶液 (0.02 mol/L) 中 37℃ 保温 1 h, 细菌存活率为 46.6%。该菌株制剂具有一定的抑菌作用, 可不受胃蛋白酶和胰蛋白酶的影响, 对临床上治疗腹泻的常用药物有耐受性, 胆汁能促进其生长。以上特性表明, SB900 菌株是一株优良的生产益生菌的乳链球菌。

关键词 乳链球菌, 益生菌, 活菌制剂

在畜牧业, 由于抗生素的广泛使用, 除杀死致病菌外, 肠道正常生理性菌群也遭到破坏, 致使动物免疫功能下降, 同时抗菌素存在残留和抗药性等问题, 作为畜禽促生长作用的饲料添加剂受到了严格的限制, 取而代之的益生菌在畜牧业应运而生。益生菌 (probiotics) 是一种能够参与调节动物肠道微生态平衡的微生物活菌制剂。国外在益生菌的研究和生产应用上已有十几年的时间^[1], 目前国内正涉足这个领域的开发研究, 新的产品也将陆续上市。益生菌作为饲料添加剂, 对防治幼畜腹泻及其增重方面已取得一定效果^[2,3]。“SL 益生菌”是我所研制的、系多株乳酸菌经厌氧培养后制得的活菌制剂, 对体液免疫和细胞免疫有一定的促进作用^[4]。有文献报道, 一个好的益生菌生产菌应是肠道中占优势的菌群, 且具有繁殖速度快, 产酸能力强, 对胆酸有抵抗能力等特点^[5]。根据上述要求, 作者从泡菜中分离到一株乳链球菌 SB900, 作为“SL 益生菌”生产菌对其生物特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 样品来源

四川泡菜、家制泡菜。

抑菌力检验用菌系从山东省卫生防疫站购得。

1.2 培养基

1.2.1 BCP 培养基(%): 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.25, 溴甲酚紫 0.04, 琼脂 2, pH6.8~7.0。

1.2.2 BCP-CaCO₃ 培养基: 在 BCP 培养基中加入 0.5% CaCO₃。

* 本研究项目为国家“八五”课题的一部分。
本文于 1994 年 5 月 16 日收到。

1.2.3 MRS 培养基: 参考文献[6]配制。

1.3 分析方法

1.3.1 乳酸的定性分析: 采用气相色谱法。

1.3.2 乳酸的定量分析: 按照文献[7]的方法。

1.3.3 DNA 中 G + C mol% 含量测定: 采用 Tm 法^[4]。

1.3.4 pH 值的测定: 用 ORION RESEARCH model 221 型酸度计。

1.3.5 抑菌实验: 管碟法。将各供试菌培养到对数期, 取 0.1 ml 涂布平板, 取 0.2 ml SB900 菌株培养液放入牛津杯, 平板培养 12 h, 用游标卡尺测抑菌圈直径。

1.3.6 细菌数的测定: 用血球计数板计数和平板统计菌落数 (CFU/ml)。

2 结 果

2.1 益生菌生产菌的筛选

取不同来源的泡菜汁, 采用 10 倍稀释法, 选适宜稀释度, 涂布 BCP 平板, 放入厌氧培养罐中, 37℃ 培养 48 h, 挑选使培养基变黄范围较大的菌落, 得到 36 株菌。再将其在 BCP-CaCO₃ 培养基中复筛, 得到 5 株溶钙圈较大的菌株, 分析其培养液的乳酸含量, 得一乳酸产量较高的菌株 SB900。

2.2 SB900 菌株的鉴定

2.2.1 形态及生长特征: 细胞球形, 大小为 0.6~0.7 × 1.0~1.2 μm, 单个或短链状。革兰氏阳性, 无芽孢, 不运动。菌落圆形, 边缘整齐, 光滑, 菌落直径 0.8~1.2 mm, 乳白色, 不透明。液体培养, 具有贴壁生长现象, 不形成菌膜。兼性厌氧。10℃ 生长, 45℃ 不生长, 0.1% 次甲基蓝生长, 40% 胆汁生长, 血琼脂平板生长但不产溶血素。

2.2.2 生理生化特性: 联苯胺、过氧化物酶阴性。葡萄糖的 O/F 测定为发酵型产酸, 终产物为乳酸, 少量乙酸, 为同型发酵。从果糖、甘露糖、甘油、阿拉伯糖、花楸糖、半乳糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、纤维二糖、棉子糖、松三糖、山梨醇、七叶灵产酸。精氨酸产氨, 马尿酸钠、淀粉水解、明胶液化阴性。

DNA 中 G + C 含量为 39.3 mol%。

根据 SB900 菌株的形态特征及生理生化特性, 参照《伯杰细菌鉴定手册》(第八版), 鉴定为乳链球菌 (*Streptococcus lactis*)。

2.3 菌株的生长及产酸情况

为了解 SB900 菌株在培养液中的生长情况及制备最高菌数的制剂, 做了生长曲线和乳酸产量的测定。将 SB900 菌株以 2% 接种量接种到 200 ml MRS 的 250 ml 注射盐水瓶中, 37℃ 厌氧培养, 每隔 4 h 取样一次, 测定含菌量、pH 及乳酸产量(表 1)。

表 1 结果表明, SB900 菌株繁殖速度很快, 培养 8 h 细菌数显著上升, 12~16 h 进入最高峰, 16 h 后基本进入稳定期。随着菌体的生长, 培养液 pH 降低, 乳酸产量增加, 最高产量为 1.73%。随着 pH 的降低, 抑制了菌的生长, 由此菌的最佳收获期为 16~20 h, 此时菌数多且活力高。

2.4 耐酸性实验

将一定量的 SB900 菌体置于 pH12 的盐酸溶液 (0.02mol/L) 中, 37℃ 保温, 每隔

1h 取样一次,用稀释涂平板法统计活菌数(表 2)。

表 1 SB900 菌株在 MRS 中的生长曲线及产酸变化

Table 1 The growth curve of SB900 strain and lactic acid yield in MRS

| 培养时间 Cultural time (h) | 菌落数/ml CFU/ml | pH | 乳酸产量 Lactic acid yield (%) |
|------------------------------|-------------------|------|----------------------------------|
| 0 | 5.0×10^7 | 5.58 | 0.26 |
| 4 | 6.0×10^8 | 4.03 | 0.76 |
| 8 | 1.9×10^9 | 3.45 | 1.12 |
| 12 | 2.3×10^9 | 3.30 | 1.60 |
| 16 | 2.8×10^9 | 3.12 | 1.62 |
| 20 | 2.8×10^9 | 3.07 | 1.68 |
| 24 | 2.7×10^9 | 3.05 | 1.71 |
| 28 | 2.8×10^9 | 3.00 | 1.73 |
| 32 | 2.7×10^9 | 3.00 | 1.73 |

表 2 SB900 菌株对 pH2 盐酸 (0.02mol/L) 的耐受力

Table 2 Resistance of SB900 strain to 0.02mol/L HCl at pH2,37℃

| 保温时间 Cultural time (h) | 菌落数/ml CFU/ml | 存活率 Survival rate (%) |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| 0 | 2.09×10^6 | 100 |
| 1 | 9.65×10^6 | 46.60 |
| 2 | 1.10×10^4 | 0.52 |
| 3 | 0 | 0 |

表 2 结果表明,该菌株在 pH2 的盐酸溶液中总菌数中近一半保持活性,随着时间延长,活菌数逐渐减少,表明在短时间内该菌对酸有一定的耐受力,具有在胃的酸性环境中存活的能力。

2.5 制剂的抑菌谱及处理后的抑菌活性

将 SB900 菌株接种到 MRS 中 37℃ 厌氧培养 20 h, 所得的培养液为 SB900 菌株制剂。测定其对微生物的抑制作用, 再将部分该菌制剂经胰蛋白酶和胃蛋白酶 (0.5mg/ml) 37℃ 处理 1 h, 测定抑菌情况, 并与前者比较(以 pH3 的乳酸溶液作对照)。

由表 3 结果可知, SB900 菌株制剂能抑制细菌的生长, 而对酵母菌没有作用。该制剂经胰蛋白、胃蛋白酶处理后, 其抑菌作用不改变, 说明该制剂的抑菌作用不受胰蛋白酶和胃蛋白酶的影响。这种抑菌作用比 pH3 的乳酸溶液强, 表明该制剂中还存在着其它具有抑菌作用的活性物质, 这项工作正在进行深入研究。

2.6 耐药性实验

将土霉素、青霉素、氯霉素、庆大霉素(按 1000 u/ml)和一定量的痢特灵、黄连素、吡嗪酸 (PPA) 分别加入 MRS 培养基中, 接种 SB900 菌株, 培养 16h, 观察生长情况。

实验结果表明, 除氯霉素和庆大霉素能抑制该菌生长外, 菌株对其他药物则表现出耐

表 3 SB900 制剂及经胃蛋白酶、胰蛋白酶处理后对微生物的抑制作用
(抑菌圈直径 cm)

Table 3 The inhibitory effect of SB900 preparation and preparation treated by pepsin and trypsin on test-organisms (inhibitory diameter cm)

| 菌株 Strains | pH3 的乳酸溶液 Control | SB900 制剂 SB900 preparation | 经胰酶处理的 SB900 制剂 SB900 preparation treated by trypsin | 经胃酶处理的 SB900 制剂 SB900 preparation treated by pepsin |
|--|----------------------|----------------------------------|---|--|
| 鼠伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhimurium</i> | 1.84 | 2.25 | 2.43 | 2.53 |
| 丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i> | 1.01 | 1.91 | 1.90 | 1.91 |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.34 | 1.58 | 1.58 | 1.56 |
| 埃希氏大肠菌 <i>Escherichia coli</i> | 1.36 | 1.88 | 1.86 | 1.84 |
| 枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> | 1.18 | 1.71 | 1.73 | 1.74 |
| 酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | — | — | — | — |
| 产脲假丝酵母 <i>Candida utilis</i> | — | — | — | — |

注: —不抑制 No inhibitory.

受性。对于临床上常用治疗腹泻的药物,尤其是在痢特灵和黄连素存在下,菌体生长比不含药物时还旺盛,说明这两种药物对菌株生长有促进作用。所以 SB900 菌株生产的“SL 益生菌”作为饲料添加剂,可以不受腹泻药物的影响,并可与之协同作用,发挥药物的最佳疗效。

2.7 胆汁对菌株生长的影响

SB900 菌株在肠道中是否定植和存活,与对胆汁的抵抗能力有关。SB900 菌株在 BCP 培养基中的生长略次于 MRS 培养基,为计数方便,将 SB900 菌株接种到含有 40% 和 70% 猪胆汁的 BCP 培养基中,培养不同时间,测定细菌数(图 1)。

由图 1 结果可知,胆汁在 40% 浓度时,对 SB900 菌株生长有促进作用;胆汁在 70% 浓度时,培养的前 4 h,生长较慢,低于正常生长速度,表现出胆汁对菌株生长的抑制作用,4 h 后,菌株摆脱抑制而迅速生长。当培养到 12 h 时,菌体数达 2.83×10^9 CFU/ml,而在正常的培养基上,细菌数仅为 1.6×10^8 CFU/ml,表明胆汁对菌株的促生长作用。

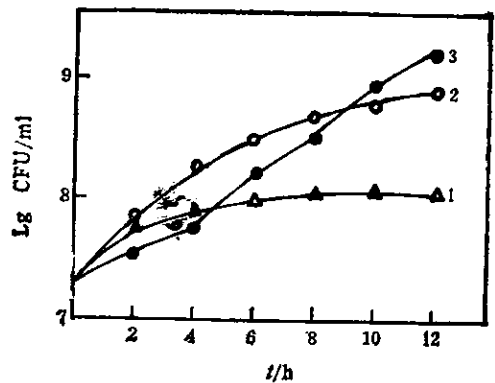


图 1 猪胆汁对 SB900 菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of the bile of swine on SB900 strain growth

1. 无胆汁 0% Bile; 2. 40% 胆汁 40% Bile; 3. 70% 胆汁 70% Bile.

3 讨 论

本实验仅包括在体外对益生菌生产菌主要特征如对胃酸的耐受力、对胆汁的抵抗力及对微生物的抑制作用等进行研究,没有考虑其它影响因素,但上述情况可能在动物肠道中发生。Colle 等曾报道,饲喂酸奶的幼兔,肠道中乳酸菌数量增加,大肠杆菌数大量减少^[9]。也有文献报道:小鼠口服乳酸杆菌后,对肠道厌氧菌群的生长有扶持作用,对需氧菌群的生长则起限制作用^[10]。乳链球菌是世界公认的可直接饲喂的菌株,并且 SB900 菌株符合益生菌生产菌的要求,具有在胃的酸性条件下存活的能力,胆汁能促进其生长,产生的乳酸,能使肠道 pH 降低,对肠道病原菌有竞争性抑制和排斥作用,由此表明,SB900 为一株优良的生产益生菌的乳酸菌。

参 考 文 献

- [1] Fuller R. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989, 66 (5):365~378.
- [2] 姜范策,庞明波. 饲料工业, 1994,15(11): 32~33.
- [3] 罗世明,陈教明. 中国微生态学杂志, 1989,1(2): 79~83.
- [4] 马桂荣,郑宝旭,陈志科,等. 中华微生物和免疫学杂志, 1994,14(1): 32.
- [5] 王世荣. 中国微生态杂志, 1990,2(2): 82~85.
- [6] 郝士海. 现代细菌学培养基和生物试剂手册. 北京: 中国科学技术出版社,1992. 404.
- [7] 内蒙古轻工科学研究所. 乳品工业. 北京: 轻工业出版社, 1989. 54.
- [8] 林万明,李银太,郭兆彪. 细菌分子遗传学分类鉴定法, 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 85~92.
- [9] Colle C B, Fuller R. *Journal of Applied Bacteriology*, 1984, 56 (3):495~498.
- [10] 蔡访勤,薛乐勋,罗 豫,等. 中国微生态学杂志, 1989,1(1): 25~29.

SCREENING AND STUDING ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A STRAIN OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* SB900, PROBIOTIC PRODUCER

Kong Jian Ma Guirong Liu Wen Ren Hongwei
(*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100*)

Abstract A strain SB900 of probiotic producer was isolated from sauerkraut fermentation, and identified as *Streptococcus lactis*. Studies on biological characteristics revealed that it produced 1.73% lactic acid and resistant to low pH. The survival rate of the cells was 46.6% incubated at 37°C for 1h at pH 2. The ferment preparation of SB900 exhibited a broad inhibitory spectrum against various bacteria, and the inhibitory activity was uneffected by pepsin and trypsin. SB900 could grow well in the medium containing the antibiotics for diarrhoea used in clinical medicine. Growth stimulation was observed with the bile swine. It was suggested that *Streptococcus lactis* SB900 fulfill the characteristics of a good probiotics.

Key words *Streptococcus lactis*, Probiotics, Biogen