

# 一株猪源乳酸杆菌的分离鉴定及其微胶囊化研究\*

韩亚超<sup>1</sup>, 张新红<sup>1</sup>, 何永高<sup>2</sup>, 宁豫昌<sup>3</sup>

(1. 阜阳职业技术学院, 安徽 阜阳 236031; 2. 安徽江中中邦生物制药有限公司, 安徽 淮南 232008;  
3. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450011)

**【摘要】**乳酸杆菌是目前应用的微生态制剂中最重要的有益菌组成成分之一。本研究从健康猪小肠中分离了1株耐酸和耐胆盐能力较强的乳酸杆菌,命名为乳酸杆菌L5株。进一步地,通过微胶囊化研究,提高了其耐贮存性以及模拟胃液中的存活率。

**【关键词】**乳酸杆菌;猪;分离鉴定;微胶囊化

**【中图分类号】**S852.6 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2011)02-0009-04

由于长期大量使用抗生素和化学药物的弊端日益明显,使得微生态制剂在畜牧养殖业的应用成为必然。微生态制剂进入肠道可以通过与肠道有害菌群的竞争占位、夺氧等竞争性抑制或分泌抗性物质、酶和有机酸等作用使得肠道内有益菌群成为优势种群,进而调整肠道微生态平衡,达到有利于消化、健康的作用。因此,在仔猪饲料中添加微生态制剂,可明显降低仔猪肠道疾病的发病率、提高仔猪成活率和生长率<sup>[1]</sup>。我国是养猪大国,微生态制剂的应用是发展绿色养猪业的关键。目前微生态制剂应用较多的主要有乳酸菌类制剂、芽孢杆菌类制剂、双歧杆菌类制剂、光合细菌类制剂和真菌类制剂等。乳酸杆菌(*Lactobacillus*)是动物机体内正常的生理菌群之一。乳酸杆菌在肠道中生长繁殖,可以产生乳酸和乙酸,降低肠道pH值,抑制有害菌生长,能够合成共轭亚油酸(*Conjugated linoleic acid*, CLA)来提高动物的生产性能和免疫力<sup>[2]</sup>;同时,乳酸杆菌可粘附于肠道粘膜细胞上,一方面对肠道粘膜有占位性保护作用,另一方面可刺激肠道局部的免疫反应。

但是,由于乳酸杆菌不产芽孢,对营养条件要求相对较高,对氧较为敏感等特点,使其产品在常温贮存和运输过程中,活菌含量下降迅速。此外,当乳酸杆菌活菌制剂进入动物消化道后受到胆汁和胃酸等作用,导致到达肠道的活菌数量大为减少,限制了乳酸杆菌益生作用的发挥<sup>[3]</sup>。目前,利用微胶囊包埋技术保护益生菌是国内外研究的热点<sup>[4]</sup>,这项技术可显著提高益生菌抗热、抗压、抗胆汁和抗胃酸能力,使其以活性状态到达动物肠道,进而发挥相应的益生功效。本试验以脱脂奶粉和乳糖为冻干保护剂,以海藻酸钠作为壁材,对试验分离的猪源乳酸杆菌L5株进行微胶囊制备,提高了乳酸杆菌的耐贮存性以及模拟胃液中的存活率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源 健康的15日长白猪。

1.1.2 基础培养基、生化培养基和生化试剂 试验所使用的乳酸杆菌选择性培养基按照陈天寿的《微生物培养基的制造与应用》配制<sup>[5]</sup>。试验所使用的各种生化培养基和生化试剂均按照赵斌的《微生物学实验》配制<sup>[6]</sup>。

1.1.3 模拟胃液:2.0g/L NaCl溶液加入胃蛋白酶10g,用HCl调节pH为2.0。模拟肠液:9mL HCL加入1000mL水中,取出750mL再加入250mL 0.2mol/L  $KH_2PO_4$ 溶液和胰酶10g,调节pH=6.8。

1.1.4 其它试剂 海藻酸钠、脱脂奶粉、乳糖、 $CaCl_2$ 、胃蛋白酶、胰酶;磷酸盐缓冲液(pH=7.0):1mol/L  $Na_2HPO_4$  57.7mL, 1mol/L  $NaH_2PO_4$  42.3mL,混合后加水稀释至1000mL,121℃灭菌20min,备用。

1.1.6 主要仪器设备 PHSJ-3F型酸度计(上海雷磁仪器总厂);722分光光度计(上海奥谱勒仪器有限公司);GL-21M型高速冷冻离心机(长沙骏逸实验仪器有限公司);FD-1A-50台式冻干机(北京博医康实验仪器有限公司);20L机械搅拌全自动发酵罐(镇江中恒生物工程设备有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 乳酸杆菌的分离 将健康的15日龄仔猪麻醉处死,无菌操作刮取小肠黏膜1g,经适当稀释后分别涂布在MRS琼脂平板上,37℃厌氧培养。48h后挑取大小,颜色,边缘,形状,在培养基表面位置各异的单菌落,并通过在MRS琼脂培养基上划线得到纯培养,革兰氏染色镜检,挑选染色结果为革兰氏阳性,不产芽孢的杆状菌株,留作后续试验的菌种。

1.2.2 乳酸杆菌的鉴定 将挑选出来的菌种依次按《伯杰氏细菌鉴定手册》(第8版)从形态、理化特性、

收稿日期:2011-04-23

\*基金项目:2010年度安徽省高校省级教学质量与教学改革工程项目《微生物技术实训中心》(皖教高[2010]28号)资助项目。

作者简介:韩亚超(1978-),男,安徽阜阳人,硕士,讲师,主要从事应用微生物学研究。

代谢产酸等方面进行鉴定<sup>[7]</sup>。

1.2.3 乳酸杆菌的耐酸性试验 菌液接种于 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、6.8(对照)的 MRS 培养液中, 37℃ 分别处理 1h、2h、3h, 通过保温前后活菌计数结果计算出细菌存活率。

1.2.4 乳酸杆菌的胆盐耐受性试验 菌液接种于胆盐浓度分别为 0(对照)、0.05%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%的 MRS 培养液中, 在 37℃ 条件下处理 3h 后, 平板菌落计数, 筛选出对酸和胆盐耐受能力均较强的菌株进行后续的试验。

1.2.5 乳酸杆菌菌液的制备 将保存于试管斜面的乳酸杆菌 L5 株菌种接种于经优化后的乳酸杆菌液体发酵培养基中, 38℃ 培养 26h 后将菌液在 4000r/min 离心 20min, 取菌泥, 用灭菌生理盐水对菌泥进行适当稀释, 利用 MRS 平板进行活菌计数。

1.2.6 乳酸杆菌微胶囊的制备和包埋效率的测定 在乳酸杆菌悬液中加入质量分数为 4% 的脱脂奶粉和 6% 的乳糖乳化 10min, 与 3% 海藻酸钠溶液(115℃, 灭菌 10min)混合, 然后滴入 2% 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液, 同时以 150 r/min 进行搅拌, 静止固化 30 min, 清洗过滤, 冷冻干燥 20h 即得乳酸杆菌微胶囊。

包埋效率 = (1-微胶囊表面活菌数)/加入的活菌数 × 100%

微胶囊表面活菌数测定: 直接用生理盐水洗涤微胶囊表层菌体, 进行活菌计数。

1.2.7 微胶囊耐胃酸性能测定 取 1.2.6 中制备的乳酸杆菌微胶囊 0.1g 置于盛有 50mL, pH2.0 模拟胃液中的三角烧瓶中, 37℃、160r/min 振荡培养, 处理 0h、1h、2h、3h 时取样测定其活菌数和存活率。

1.2.8 微胶囊肠溶性测定 取 1.2.6 中制备的乳酸杆菌微胶囊 0.1g 置于盛有 50mL, pH6.8 模拟肠液的三角烧瓶中, 于 37℃ 恒温摇床中, 170r/min 进行崩解, 分别于 0min、15min、30min、45min、60min 时取样测其透光率, 根据其透光率变化分析微胶囊在模拟肠液中的溶出情况。

1.2.9 微胶囊室温贮存稳定性的测定 取冷冻干燥后的微胶囊在室温下贮存 60d, 每隔 15d 取样测定其存活率。

## 2 结果

### 2.1 乳酸杆菌分离和菌落形态观察

经厌氧培养 48h 后, 从 MRS 平板上分离菌株 62 株, 经过染色镜检, 从中筛选出革兰氏阳性、无芽孢杆菌 12 株, 分别编号为 L1-L12。这 12 株菌的菌落特征为乳白色、圆形、表面光滑凸起、边缘整齐、直径 0.5~2.0 mm, 菌体杆状, 多排列成长短不一的链状, 也有单个分散排列。

### 2.2 乳酸杆菌的生理生化鉴定结果

乳酸杆菌的鉴定结果见表 1。根据《伯杰细菌鉴定手册》, 判定所选的 12 株菌为乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)。

表 1 乳酸杆菌属的鉴定结果

| 菌株  | 运动性 | 接触酶 | 硝酸盐还原 | 明胶液化 | 产生吲哚 | 硫化氢 | V-P 试验 | 代谢产酸 |
|-----|-----|-----|-------|------|------|-----|--------|------|
| L1  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L2  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L3  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L4  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L5  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L6  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L7  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L8  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L9  | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L10 | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L11 | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |
| L12 | -   | -   | -     | -    | -    | -   | -      | a.L  |

### 2.3 乳酸杆菌的耐酸、耐胆盐筛选试验结果

乳酸杆菌的耐酸筛选试验结果见表 2。根据表中的统计结果, 挑选在 pH2.0、耐受 2 小时和耐受 3 小时条件下, 耐酸性较强的 L1、L2、L5、L6、L11 进行了耐胆盐试验。

乳酸杆菌的耐胆盐筛选试验结果见表 3。由表 3 可见, 胆盐对乳酸杆菌的生长有明显抑制作用。随着胆盐浓度升高, 5 种乳酸杆菌菌株的存活数均明显下降。

综合待测菌株对酸和胆盐的耐受情况, 选择 L5 菌株进行后续的试验。

表2 不同pH值对乳酸杆菌存活率的影响

| 存活率(%) | L1 | L2   | L3   | L4   | L5   | L6   | L7   | L8   | L9   | L10  | L11  | L12  |      |
|--------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| pH2.0  | 1h | 65.7 | 81.9 | 57.8 | 53.5 | 83.4 | 77.5 | 52.1 | 63.5 | 35.9 | 53.2 | 87.3 | 55.1 |
|        | 2h | 73.9 | 83.7 | 47.9 | 46.4 | 80.5 | 77.6 | 41.2 | 56.1 | 32.4 | 50.2 | 82.6 | 44.6 |
|        | 3h | 75.7 | 77.7 | 42.3 | 40.5 | 75.5 | 80.9 | 31.5 | 53.5 | 27.3 | 48.9 | 75.9 | 30.9 |
| pH3.0  | 1h | 68.9 | 87.5 | 56.3 | 57.1 | 84.2 | 83.0 | 62.7 | 72.0 | 62.4 | 56.1 | 92.2 | 64.3 |
|        | 2h | 76.9 | 81.8 | 44.6 | 38.2 | 78.2 | 80.1 | 58.7 | 70.7 | 53.5 | 53.3 | 85.1 | 55.8 |
|        | 3h | 78.1 | 80.4 | 24.7 | 30.8 | 79.3 | 83.5 | 65.9 | 65.5 | 46.2 | 56.5 | 81.3 | 78.9 |
| pH4.0  | 1h | 79.1 | 88.1 | 71.2 | 69.4 | 88.9 | 94.4 | 73.1 | 87.4 | 70.9 | 69.5 | 85.8 | 75.2 |
|        | 2h | 83.9 | 92.0 | 60.2 | 56.9 | 90.4 | 85.8 | 77.8 | 82.8 | 65.5 | 65.7 | 86.9 | 77.6 |
|        | 3h | 85.8 | 90.2 | 44.2 | 41.6 | 92.8 | 75.2 | 81.3 | 78.9 | 58.7 | 58.8 | 93.6 | 81.8 |

表3 不同胆盐浓度对乳酸杆菌存活数的影响

| 菌株  | 0%                 | 0.05%              | 0.10%              | 0.20%              | 0.30%              | 0.40%              |
|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| L1  | $3.81 \times 10^6$ | $1.62 \times 10^5$ | $7.23 \times 10^3$ | $9.36 \times 10^2$ | $0.78 \times 10^2$ | 0                  |
| L2  | $2.65 \times 10^6$ | $6.98 \times 10^5$ | $3.24 \times 10^4$ | $4.87 \times 10^3$ | $0.83 \times 10^2$ | 0                  |
| L5  | $2.68 \times 10^6$ | $1.65 \times 10^6$ | $3.07 \times 10^5$ | $6.57 \times 10^4$ | $2.15 \times 10^3$ | $1.56 \times 10^2$ |
| L6  | $6.56 \times 10^5$ | $1.78 \times 10^5$ | $5.71 \times 10^3$ | $8.52 \times 10^2$ | $1.06 \times 10^2$ | 0                  |
| L11 | $4.87 \times 10^6$ | $4.25 \times 10^5$ | $7.14 \times 10^4$ | $6.78 \times 10^4$ | $3.38 \times 10^3$ | $0.24 \times 10^2$ |

## 2.4 乳酸杆菌微胶囊包埋效率的测定结果

制得的乳酸杆菌微胶囊呈圆形颗粒状,直径约为0.5~1.0mm,测得其包埋效率为90.3%。

## 2.5 微胶囊耐胃酸性能测定结果

由图1可见,随时间延长乳酸杆菌微胶囊在模拟胃液中的存活率呈逐渐降低趋势,但处理3h后微胶囊化的乳酸杆菌存活率仍然达到60%,而未进行微胶囊化的乳酸杆菌在模拟胃液中处理1h后即全部死亡,说明本试验制得的乳酸杆菌微胶囊可以耐受胃液的破坏。

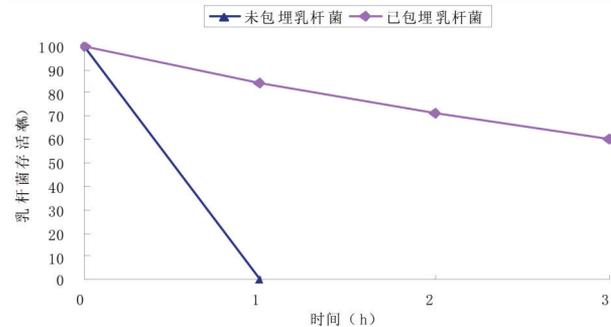


图1 微胶囊在模拟胃液中的菌体存活率

## 2.6 微胶囊肠溶性测定结果

微胶囊肠溶性的试验结果如图2所示。由图2可见,溶液透光率在30min后稳定在80%左右,且通过肉眼观察,在模拟肠液中已经基本不含固体颗粒,可以确定乳酸杆菌微胶囊在模拟肠液中处理30min后已经基本崩解。说明本试验制备的乳酸杆菌微胶囊具有良好的肠溶性。

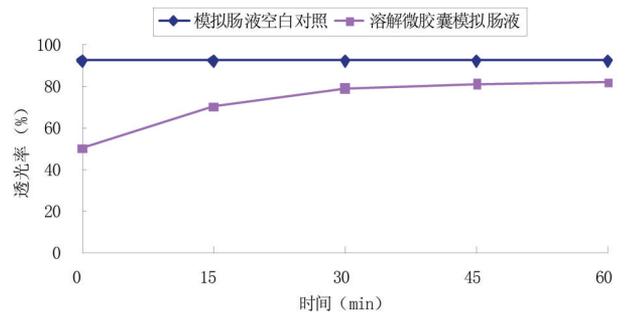


图2 微胶囊在模拟肠液中的溶出情况

## 2.7 微胶囊室温贮存稳定性的测定结果

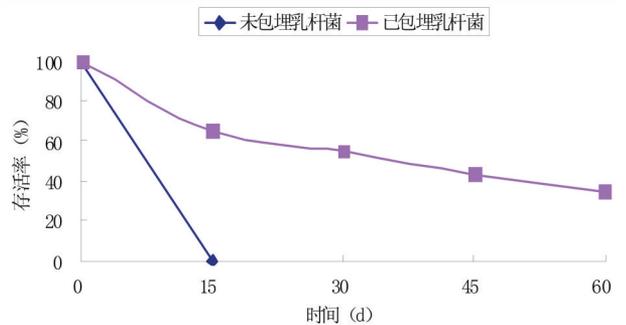


图3 室温下贮存对微胶囊化乳酸杆菌存活率的影响

乳酸杆菌微胶囊在室温下贮存稳定性的试验结果如图3所示。由图3可知,微胶囊化的乳酸杆菌在贮存的前15d内存活率下降较快,第15d的存活率为65%,这说明干燥对微胶囊化的乳酸杆菌的存活率影响较大。这可能与海藻酸钠是一种多孔性材料易造成过度失水有关;同时,干燥后凝胶的硬度较大,在局部范围内会对乳酸杆菌产生挤压,

从而使得乳酸杆菌的存活率出现比较明显的下降。而在15d以后的贮存过程中,乳酸杆菌存活率的下降幅度相对减小,贮存60d后乳酸杆菌存活率仍为35%以上,而未进行微胶囊化的乳酸杆菌在室温下贮存15d后其存活率为0,说明微胶囊化能够增强乳酸杆菌在室温下贮存的稳定性。

### 3 小结

益生菌的菌株具有较强的针对性和特异性,在其被制作成活菌制剂后也有一定的专一性,因此本研究直接从健康的仔猪肠道中进行乳酸杆菌的分

离。由于乳酸杆菌不产芽孢,对环境的抗性较差,不易通过胃酸和胆汁环境,因此在进行乳酸杆菌的筛选时,模拟了宿主体内低pH值、高胆盐浓度的环境,筛选出了具有较强抗逆性的菌株L5。

经过微胶囊化包被以后,能够显著提高乳酸杆菌的耐酸性和室温下贮存的稳定性,且试验制得的乳酸杆菌微胶囊也具有很好的肠溶性。由此可见,利用微胶囊技术增强乳酸杆菌对不良环境的抗性,提高乳酸杆菌在加工、利用过程中的存活率是可行的。

### 注释及参考文献:

[1]何明清,倪学勤.我国动物微生态制剂研究、开发和应用动态[J].饲料广角,2002(21):1-7.  
 [2]Julia B Ewaschuk, John W Walker, Hugo Diaz, et al. Bioproduction of Conjugated Linoleic Acid by Probiotic Bacteria Occurs In Vitro and In Vivo in Mice[J]. American Society for Nutrition J Nutr, 1996(136):1483-1487.  
 [3]Dave R I, Shah N P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, 1997(7):31-41.  
 [4]刘瑛华,赵进宝,吕秀芳.微胶囊包埋技术在益生菌制品中的应用[J].食品与机械,2004,20(2):58-60.  
 [5]陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995:33-34.  
 [6]赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002:143-159.  
 [7]R·E布坝南,N·E吉本斯等著.伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组译.北京:科学出版社,1984:793-820.

## Isolation and Identification of Lactobacillus from Swine and Study on its Microencapsulation

HAN Ya-chao<sup>1</sup>, ZHANG Xin-hong<sup>1</sup>, HE Yong-gao<sup>2</sup>, NING Yu-chang<sup>3</sup>

(1. Fuyang Vocational-technical College, Fuyang, Anhui 236031; 2. Anhui Jiangzhong-gobo Biopharmaceutical Co., LTD, Huainan, Anhui 232008; 3. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, Henan 450011)

**Abstract:** Lactobacillus is the most important one of the beneficial bacterium component in the current application probiotics. In this study, one Lactobacillus strain which displayed stronger acid and bile salts resistance was isolated and named Lactobacillus strain L5. In addition, the storage stability and the survival rate in artificial gastric and intestinal succus of the isolated strain were enhanced by microencapsulation.

**Key words:** Lactobacillus; Swine; Isolation and identification; Microencapsulation