

# 鸡源乳酸杆菌 M8 最佳培养条件的确定及培养基优化

张董燕<sup>1,2</sup>, 季海峰<sup>1</sup>, 王雅民<sup>1</sup>, 黄建国<sup>1</sup>, 单达聪<sup>1</sup>

(1. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097; 2. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001)

**摘要:** 从北京油鸡盲肠黏膜中分离得到 1 株戊糖乳酸杆菌 M8, 在通气和密闭培养条件下对生长 OD<sub>600nm</sub> 值和 pH 值进行了测定。结果显示: M8 在通气培养条件下 OD<sub>600nm</sub> 最高值为 1.011, pH 值最低为 4.40, 而密闭培养条件下 OD<sub>600nm</sub> 达 2.049, pH 降至 3.42, 确定密闭培养为最佳培养条件。密闭培养条件下, 在培养基中添加不同比例的菊粉(1%, 2%, 3%, 4%), 探讨菊粉对菌株生长情况的影响, 结果发现: 当菊粉添加量为 3% 时效果最佳, 其 OD<sub>600nm</sub> 最高达 2.937, pH 最低降至 3.40。

**关键词:** 乳酸杆菌; 培养条件; 培养基; 菊粉

中图分类号: Q939.11<sup>+</sup>7; S816.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0171-04

## Selecting of the Best Culture Condition of Poultry's Lactobacilli M8 and Optimizing the Culture Medium

ZHANG Dong-yan<sup>1,2</sup>, JI Hai-feng<sup>1</sup>, WANG Ya-min<sup>1</sup>, HUANG Jian-guo<sup>1</sup>, SHAN Da-cong<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. Animal Science and Technology College, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** In the experiment, we isolated 1 strain lactobacilli which was defined as *Lactobacillus Pentosus* (M8) from blind intestine of healthy Beijing You fowl. We got its growth curves and best culture condition in breezy and sealed bottles. The result showed: OD<sub>600nm</sub> reached to 1.011 and pH reached to 4.40 in breezy bottles. On the other hands, in the sealed bottles, OD<sub>600nm</sub> reached to 2.049 and pH reached to 3.42. Therefore, its optimum culture condition was in sealed bottles. We also got the growth OD<sub>600nm</sub> and pH in sealed bottles with different levels of inulin. The result was that the best percent of inulin was 3%, and the OD<sub>600nm</sub> reached to 2.937 and pH reached to 3.40.

**Key words:** *Lactobacillus*; Culture condition; Culture medium; Inulin

Roberfroid<sup>[1]</sup>认为, 益生菌能够抑制肠道病原菌, 合成 B 族维生素, 降低血中氨水平, 减少胆固醇的吸收, 抑制肿瘤形成等。Kung 等<sup>[2]</sup>把乳酸菌用于玉米等饲料的青贮发酵, Yang 等<sup>[3]</sup>将人类浪费的食物用乳酸菌发酵制成猪饲料, Pietres 等<sup>[4]</sup>报道, 乳酸菌作为饲料添加剂具有增重、提高饲料转化率、预防疾病、降低死亡率等效果。目前用作饲料添加剂的乳酸菌大多分离于动物的肠道食糜, 而从肠道黏膜中分离的较少<sup>[5-7]</sup>。一般认为, 从肠道黏膜分离的菌株更有利于在动物肠道的定殖。笔者从北京油鸡肠

道黏膜分离得到 1 株戊糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus pentosus*) M8, 在不同培养条件下测定其生长情况, 筛选出最佳培养条件, 并在培养基中添加菊粉, 探讨菊粉对 M8 生长情况的影响, 为提供优质禽用益生菌制剂奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 戊糖乳酸杆菌: 北京市农林科学院畜牧兽医研究所动物营养与繁育实验室分离菌种 M8,

收稿日期: 2006-09-28

作者简介: 张董燕(1981-), 女, 河北邯郸人, 在读硕士, 主要从事动物营养与饲料科学研究工作

通讯作者: 季海峰(1963-), 男, 山东平度人, 研究员, 主要从事动物营养与繁育研究工作。

其生化鉴定和糖发酵试验符合《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[8]</sup> 中的描述。

1.1.2 液体培养基(MRS 培养基) 蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 三水合乙酸钠 5.0 g, 柠檬酸二氨 2.0 g, 吐温(Tween) 80 1.0 mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.58 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.19 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 为 6.5, 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.1.3 菊粉 菊粉从内蒙古亿利生物技术有限公司购买。菊粉含量 ≥90%, 单糖含量 ≤10%, 干物质 ≥95%, 蛋白质 ≤3%, 大肠杆菌为 0, 细菌总数 ≤5 000 cfu/g, 颜色微黄。

1.1.4 主要仪器 H6000 型生物显微镜、ZHWY-2102 型全温震荡培养箱、pH213 型酸度计、101A-2 型电热鼓风干燥箱、UV-4802 型紫外可见分光光度计、YMQ-L31-400 型立式压力蒸汽灭菌锅、洁净工作台等。

## 1.2 方法

1.2.1 最佳培养条件的筛选 采用 MRS 液体培养基, M8 接种量为 10%, 37 ℃ 下采用三角瓶通气振荡(加棉塞)培养和密闭静置(封口)培养, 分别在培养的第 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 h, 取一定量菌液测定 OD<sub>600nm</sub> 和 pH 值。

1.2.2 培养基的改良 总体上使培养基中单糖比例为 2% 不变, 改变原有培养基(MRS)的碳源成分, 以菊粉替代部分葡萄糖, 使培养基碳源占 2%, 共分为 4 组: I 组菊粉 1%, 葡萄糖 1.9%; II 组菊粉 2%, 葡萄糖 1.8%; III 组菊粉 3%, 葡萄糖 1.7%; IV 组菊粉 4%, 葡萄糖 1.6%。

1.2.3 数据分析 采用 SPSS(11.5) 软件进行数据分析, 数据以平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 最佳培养条件的确定

采用 MRS 液体培养基, 测定通气和密闭培养条件下 M8 的 OD<sub>600nm</sub> 和 pH 值(表 1、图 1 和图 2)。在通气和密闭培养条件下, M8 均在 20 h 后进入稳定生长期, 在 32 h 时, M8 在通气培养条件下 OD<sub>600nm</sub> 达最高, 为 1.011, 而此时在密闭条件下可达 2.049; 从 pH 值变化情况来看, 在通气培养条件下, M8 生长到 52 h 时 pH 值为 4.48, 而在密闭条件下为 3.57。由此可知, M8 在密闭培养条件下生长较好。另外, 从图 1 也可以看出, M8 生长 44 h 后有下降趋势, 说明培养基中的营养成分已满足不了 M8 的生长需要, M8 开始衰亡。

表 1 通气和密闭培养条件下 M8 生长 OD<sub>600nm</sub> 和 pH 值  
Tab 1 OD<sub>600nm</sub> and pH of *lactobacilli* M8 in

培养时间/h Cultivate time	breezy and sealed bottles			
	通气培养 Cultivate in breezy bottles		密闭培养 Cultivate in sealed bottles	
	OD <sub>600nm</sub>	pH	OD <sub>600nm</sub>	pH
0	0.661±0.042	5.64±0.05	0.728±0.055	5.64±0.05
20	0.917±0.086	4.62±0.09	1.960±0.032	3.99±0.39
32	1.011±0.009	4.40±0.05	2.049±0.047	3.42±0.12
52	0.889±0.102	4.48±0.06	1.896±0.040	3.57±0.10

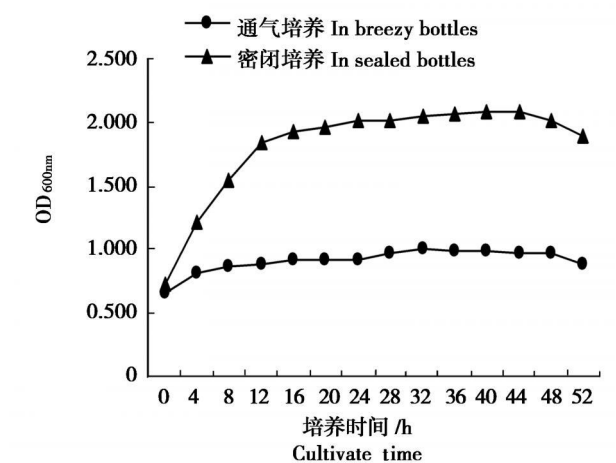


图 1 通气和密闭培养条件下 M8 生长的 OD<sub>600nm</sub> 值  
Fig 1 OD<sub>600nm</sub> of *lactobacilli* M8 in breezy and sealed bottles

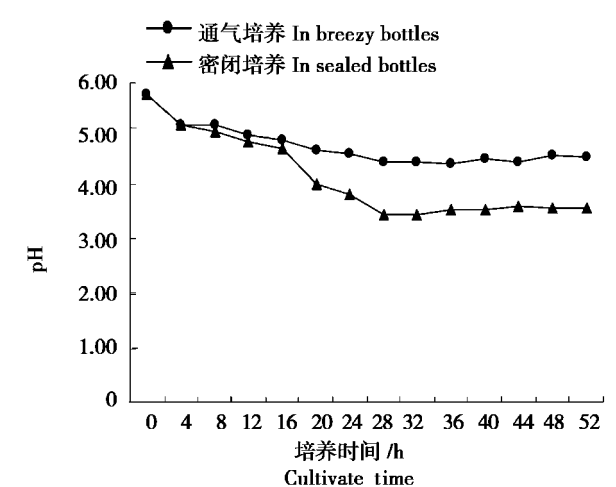


图 2 通气和密闭培养条件下 M8 生长的 pH 值  
Fig 2 pH of *lactobacilli* M8 in breezy and sealed bottles

### 2.2 培养基的优化

在 MRS 培养基的基础上添加不同比例的菊粉, 采用密闭培养条件, 测定 M8 OD<sub>600nm</sub> 和 pH 的值, 结果见表 2、图 3 和图 4。

由表 2 和图 3 可知, I, II, III, IV 组中, M8 均在 20 h 进入稳定生长期, 28 h OD<sub>600nm</sub> 达最高值, 分别为 2.712, 2.544, 2.937, 2.802, 4 组添加菊粉组 OD<sub>600nm</sub> 均高于不加菊粉组, 其中, 效果最好的为 3% 菊粉添加量。由图 3 的 pH 变化情况来看, 与不加菊粉组 (3.57) 相比, 4 组添加菊粉组 52 h 时 pH 分别为 3.45

(1%), 3.62(2%), 3.40(3%), 3.37(4%)。并且由图3可以看出, 添加3%菊粉时, M8生长到52 h未

出现下降趋势, 这说明添加菊粉后其营养物质能够满足 M8 的生长需要, 从而维持较长的生长稳定期。

表 2 密闭培养条件下添加菊粉后 M8 生长 OD<sub>600nm</sub>和 pH 值

培养时间/h Cultivate time	I 组(1% 菊粉) Group I (1% inulin)		II 组(2% 菊粉) Group II (2% inulin)		III 组(3% 菊粉) Group III (3% inulin)		IV 组(4% 菊粉) Group IV (4% inulin)	
	OD <sub>600nm</sub>	pH	OD <sub>600nm</sub>	pH	OD <sub>600nm</sub>	pH	OD <sub>600nm</sub>	pH
0	0.913±0.075	5.77±0.11	0.906±0.097	5.67±0.05	0.962±0.036	5.81±0.16	0.903±0.073	5.95±0.07
20	2.481±0.076	4.15±0.09	2.300±0.099	4.35±0.12	2.790±0.083	4.13±0.10	2.525±0.064	4.56±0.24
28	2.712±0.043	3.74±0.10	2.544±0.013	3.87±0.17	2.937±0.052	3.52±0.13	2.802±0.146	3.65±0.07
52	2.542±0.114	3.45±0.10	2.440±0.190	3.62±0.02	2.871±0.150	3.40±0.03	2.517±0.218	3.37±0.02

Tab 2 OD<sub>600nm</sub> and pH of *lactobacilli* M8 in sealed bottles with inulin

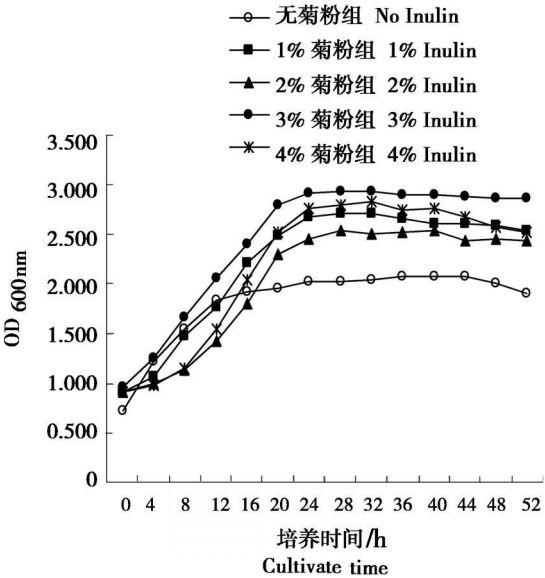


图 3 添加菊粉密闭培养条件下 M8 生长的 OD<sub>600nm</sub>值  
Fig 3 OD<sub>600nm</sub> of *lactobacilli* M8 in sealed bottles with inulin

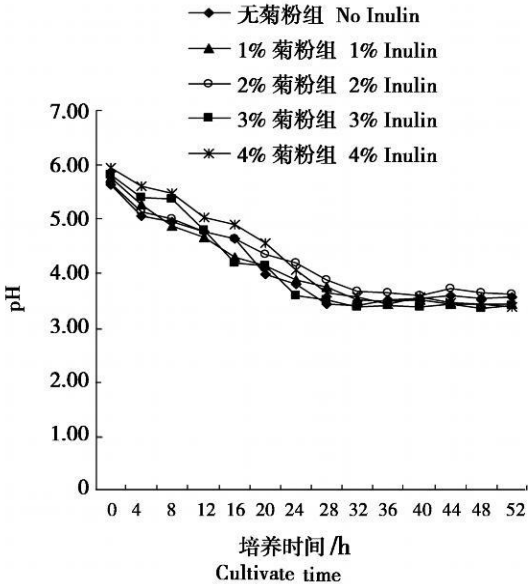


图 4 添加菊粉密闭培养条件下 M8 生长的 pH 值  
Fig 4 pH of *lactobacilli* M8 in sealed bottles with inulin

3 讨论

刘丽英<sup>[9]</sup>对乳酸菌采用了密闭静置和通气振荡

2 种条件的培养, 结果发现, 长期驯化的乳酸菌喜好通气震荡培养, 而在本试验中, M8 则在密闭培养条件下生长较好, 这可能是由于 M8 长期处于肠道封闭环境中的缘故。王世荣等<sup>[10]</sup>从 SPF 鸡嗦囊和盲肠内容物中分离得到的乳酸杆菌 S2-2, S3-1, C3-1, C3-2 产酸后 pH 分别为 3.9, 3.8, 3.9, 3.9; 洗琼珍等<sup>[11]</sup>从健康仔猪肠道内分离得到的乳酸杆菌 G2, 其 pH 最低可降到 4.35。在本试验中, 未加菊粉密闭静置培养时 M8 的 pH 可以降到 3.42。可见, 本试验分离的 M8 产酸性能更好。

碳源是细菌生长所需的 5 种营养物质之一, 其中, 葡萄糖能被大部分细菌所利用, 满足其生长需要<sup>[12]</sup>, 果聚糖能够促进乳酸菌的生长, 抑制有害菌的生长<sup>[13]</sup>。Kleessen, Roberfroid 等<sup>[14, 15]</sup>发现菊粉可显著促进人大肠中双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌的繁殖, 同时抑制梭菌、拟杆菌、大肠杆菌等有害菌的生长。顾宪红等<sup>[16]</sup>在断奶仔猪日粮中添加 1% 菊粉能够促进仔猪盲肠内乳酸杆菌生长 ( $P < 0.05$ )。Eduard 等<sup>[12]</sup>测定了乳酸杆菌 TA43、肠球菌 PS99 以及 4 株指示菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌、荧光假单胞菌)对菊粉的发酵能力, 分别在各自培养基中加入 0%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 的菊粉, 结果表明, 菊粉能够促进 PS99 和 TA43 的生长, 其 OD<sub>600nm</sub> 值随着菊粉含量的增加而增加, 2% 时达到最高值, 而菊粉对 4 株指示菌的生长没有显著影响。本试验增加了菊粉的添加比例, 结果发现, 不是菊粉添加越多越好, 当添加到 3% 时效果最好, OD<sub>600nm</sub> 和 pH 值分别达到 2.937 和 3.40, 其深入机制还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Roberfroid M B. Prebiotics and Probiotics: Are they functional food? [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2000, 71(6): 1682- 1687.  
[2] Kung Jr L, Chen JH, Kreck EM, et al. Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating

- dairy cows[J]. J Dairy Sci, 1993(76): 3763– 3770.
- [ 3] Yang S Y, Ji Ks, Baik Y H, *et al.* Lactic acid fermentation of food waste for swine feed [ J]. Bioresource Technology, 2006(97): 1858– 1864.
- [ 4] Pietres M, SKraba B. Effect of environmental factors on the quality of animal product [ J]. Roczniki Naukowe Zootechniki, 2000( 6): 357– 361.
- [ 5] 于卓腾. 鸡肠黏膜乳酸菌的分离鉴定及益生特性研究 [ D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [ 6] Anke J W, Vanien O, Simon. Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broilers chicken and piglets[ J]. Architech Animal Nutrition, 2001 ( 54): 1– 17.
- [ 7] Kontula P, Suhko M L, Suortti T, *et al.* The isolation of lactic acid bacteria from human colonic biopsies after enrichment on lactose derivatives and rye arabinoxyle-oligosaccharides [ J]. Food Microbiology, 2000( 17): 13– 22.
- [ 8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [ 9] 刘丽英. 乳酸菌的抗逆性及其微胶囊化包被工艺参数研究 [ D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [ 10] 王世荣, 张树华, 岳寿松. SPF 鸡嗦囊和盲肠内容物乳酸菌的分离与鉴定[ J]. 山东家禽, 2004(2): 8– 9.
- [ 11] 洗琼珍, 马春会, 梁丽敏, 等. 猪源益生菌的分离筛选及部分生物学特性研究[ J]. 动物医学进展, 2006, 27 ( 2): 86– 89.
- [ 12] Eduard D, Elena S, Monica T, *et al.* Preservation of porcine blood quality by means of lactic acid bacteria[ J]. Meat Sci, 2006(73): 386– 393.
- [ 13] Kaplan H, Hutkins R, Wang X, *et al.* Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria [ J]. Applied and Environment Microbiology, 2000, 66 ( 6): 2682– 2684.
- [ 14] Kleessen B, Sykura B, Zunft B, *et al.* Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons[ J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1997( 65): 1397– 1402.
- [ 15] Roberfroid M B. Prebiotics and synbiotics concepts and nutritional properties[ J]. Br J Nutr, 1998, 80( 4): 197– 202.
- [ 16] 顾宪红, 张名涛, 杨琳, 等. 菊粉对断奶仔猪大肠微生物区系及生产性能的影响[ J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 333– 336.