

## 耐消化道逆环境双歧杆菌优良菌株的筛选

江志杰 李平兰 孙成虎

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘要** 为筛选耐消化道逆环境的优良双歧杆菌菌株,以来源于母乳婴儿粪便、未断奶仔猪粪便、市售双歧杆菌制剂和本实验室保存的双歧杆菌为出发菌株,采用改良 MRS 液体培养基,模拟人体胃肠道逆环境,对其耐消化道逆环境特性进行了研究。通过耐酸(pH3 的 PBS)、耐胆汁酸盐(质量浓度 1~20 mg/mL)试验对初筛得到的 14 株菌株进行复筛,得 6 株菌株,它们在 pH3 条件下作用 120 min 后存活率均 > 93%,活菌数均 >  $10^8$  cfu/mL;在含 5 mg/mL 牛胆酸钠的改良 MRS 液体培养基中作用 24 h 后活菌数仍 >  $10^6$  cfu/mL,除 J12 和 B03 外,其他 4 株在含 20 mg/mL 牛胆酸钠的改良 MRS 液体培养基中作用 24 h 仍有活菌被检出(活菌数 >  $10^4$  cfu/mL)。在此基础上,采用胃蛋白酶和胰蛋白酶模拟胃肠液得 3 株耐消化道酶菌株 A03、A04 和 L-1,在含 5 mg/mL 胃蛋白酶的 PBS 培养基(pH3)作用 120 min 后其活菌数均高达约  $10^8$  cfu/mL,而在含 10 mg/mL 胰蛋白酶的改良 MRS 液体培养基作用 24 h 后,其活菌数均高达约  $10^9$  cfu/mL;这 2 种消化道酶对其几乎没有抑制作用。研究结果表明,双歧杆菌 A03、A04 和 L-1 菌株耐受消化道逆环境的能力最好,可用做微生态制剂菌株。

**关键词** 双歧杆菌; 消化道; 耐性; 筛选

**中图分类号** Q 939.117; R 978.1

**文章编号** 1007-4333(2005)02-0006-05

**文献标识码** A

## Isolation of novel Bifidobacterium strains with tolerance of gastrointestinal environment

Jiang Zhijie, Li Pinglan, Sun Chenghu

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract** A large culture collection of bifidobacteria (61 strains) was screened or activated from infant fecal samples, unweaned pig fecal samples, biotechnological preparations and Bifidobacterium strains conserved in the lab. Using CMRS medium, the intolerance ability of Bifidobacterium strains was studied in imitating gastroenteric environments. Fourteen strains were gained by the first screening; whereas only six obtained by the second screening (pH3 PBS, 1-20 mg/mL bile salt concentration). Their survivability was above 93% and the living bacterial number was above  $10^8$  cfu/mL after in pH3 condition and above  $10^6$  cfu/mL after 24 h in 5 mg/mL bile salt CMRS. Furthermore, B02, A03, A04 and L-1 could survive at 2 g/kg bile salt (>  $10^4$  cfu/mL). Ultimately A03, A04 and L-1 show more longanimous to pepsin and pancreatin than others. The living bacterial number was about  $10^8$  cfu/mL after 1.5 h in simulative gastric juice containing 5 mg/mL pepsin, and was about  $10^9$  cfu/mL after 24 h in simulative intestinal juice containing 1% pancreatin. The result shows that gastrointestinal tract tolerance ability of different Bifidobacterium strains was different; the tolerances of A03, A04 and L-1 were excellent ones among the tested strains, which have a latent ability as the strains of Microbial Ecological Agents.

**Key words** Bifidobacterium; gastrointestinal tract; tolerance ability; isolation

双歧杆菌是人类肠道的正常菌群之一,是母乳喂养的健康婴儿肠道中的优势菌,对人体具有多种

收稿日期: 2004-09-23

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2002AA248041)

作者简介: 江志杰,硕士研究生;李平兰,副教授,通讯作者,主要从事乳酸菌及活性代谢产物的研究, Tel: 010-62737664, E-mail: plli@sohu.com

生理功能<sup>[1]</sup>;但随着年龄增长、环境污染、抗生素的使用或疾病的影响,双歧杆菌在人体肠道内的数量呈下降趋势,导致肠道内微生态平衡的破坏。向肠道内补充双歧杆菌最直接的途径就是体外培养同源双歧杆菌,以活菌制剂作为保健食品或药品使用<sup>[2]</sup>。双歧杆菌的数量及其活性直接关系到这些产品的质量,因而被作为检验产品质量的重要指标。双歧杆菌对酸很敏感,在胃酸作用下很容易失去活性。肠液中的胆汁酸盐对其活性也有一定的影响,因为胆汁酸盐改变了菌体外膜的通透性,对双歧杆菌具有抑制和杀灭作用<sup>[3]</sup>。国内外学者对双歧杆菌耐消化道逆环境特性进行了研究,但结果存在许多不足之处,如:起始活菌数仅约  $10^7$  cfu/mL<sup>[4]</sup>;胆汁酸盐的浓度偏低<sup>[5]</sup>;菌的耐受能力低,即存活率低<sup>[2]</sup>;等等。为此,本研究拟通过体外模拟消化道试验筛选出耐消化道的双歧杆菌菌株。

## 1 试验材料

1) 菌种。从母乳婴儿粪便、未断奶仔猪粪便以及市场上双歧制剂中分离的双歧杆菌,本试验室保存的双歧杆菌(大多来自于广西巴马长寿老人肠道)。

2) 培养基。MRS 液固培养基<sup>[6]</sup>和改良 MRS 液固培养基(本试验室配方)。分离培养基:在固体改良 MRS 培养基里加入 5 mg/mL  $\text{CaCO}_3$ 。

3) 主要试剂。胃蛋白酶(800 ~ 2 500 u/mg)、胰蛋白酶(4 ~ 6 u/mg)和牛胆酸钠,均购自 Sigma 公司,其他试剂为国产分析纯。

4) 主要仪器设备。722s 分光光度计(上海棱光有限公司)、超净工作台(北京赛伯乐实验仪器有限公司)、高压灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂)、电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)和恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂)等。

## 2 试验方法

1) 双歧杆菌的筛选。无菌称取 1 g 双歧杆菌制剂,根据标示的活菌数量,用灭菌稀释液将其 10 倍梯度稀释至活菌数  $10^{-6}$  ~  $10^{-8}$  cfu/mL;或无菌称取粪便 25 g,迅速放入 225 mL 稀释液中,再将其 10 倍梯度稀释至活菌数  $10^{-6}$  ~  $10^{-10}$  cfu/mL。吸取 0.2 mL 进行滚管,放于 37 °C 恒温箱培养 48 ~ 72 h,挑选光滑、凸圆、边缘整齐、乳白色或微带黄色、质地柔软而且周围有透明圈的中小菌落接种于改良

MRS 液体培养基,厌氧培养 24 ~ 48 h,进行革兰氏染色。挑选具有双歧杆菌形态特征的菌落,再进行需氧和厌氧培养,选取仅在厌氧培养条件下生长的菌落,再一次在显微镜下观察其形态,然后进行双歧杆菌特异酶(果糖-6-磷酸激酶)及生化鉴定。

2) 初步筛选。把改良 MRS 液体培养基的 pH 调到 3.0,121 °C 15 min 灭菌后按 2.5%(体积分数,下同)的接种量接入已活化 2 代的液体培养扩增物,37 °C 厌氧培养 24 h,测定其吸光度的变化量  $D_{600}$ ;在改良 MRS 培养基中添加 3 mg/mL 的牛胆酸钠,121 °C 15 min 灭菌后按 2.5%的接种量接入已活化 2 代的液体培养物,37 °C 厌氧培养 24 h 后测定其  $D_{600}$ 。

3) 耐酸性试验<sup>[7-9]</sup>。以 pH7.0 的 PBS 缓冲液为基础,用体积分数 37%的盐酸将其分别调至 pH3.0,121 °C 15 min 灭菌后按 10%(体积分数,下同)接种量接入已活化 2 代的液体培养物,37 °C 厌氧培养,分别于 0、30、60、90 和 120 min 取样测定活菌数。

4) 胆汁酸盐耐受性试验<sup>[10]</sup>。菌种活化 2 代后的液体培养物按 2%接种量接入含牛胆酸钠分别为 1、2、3、5 和 20 mg/mL 的改良 MRS 液体培养基中,在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后取样测定活菌数;同时以不含胆汁酸盐的改良 MRS 液体培养基作为对照。

5) 耐酶试验。以 pH7.0 的 PBS 缓冲液为基础,用体积分数 37%的盐酸将其分别调至 pH3.0,再加入 5 mg/mL 胃蛋白酶作为模拟胃液,处理方式同 3),分别于 0 和 120 min 取样测定活菌数;以 1/15 mol/L, pH 6.98 磷酸缓冲液为基础,加入 10 mg/mL 胰蛋白酶作为模拟肠液,按 2.5%的接菌量无菌接入菌液,37 °C 厌氧条件下作用,分别于 0 和 24 h 取样测定活菌数。

6) 活菌数<sup>[11]</sup>。采用 Hungate 厌氧培养技术,数据均为 3 次试验的平均值。

## 3 结果与分析

### 3.1 双歧杆菌的筛选

从母乳婴儿粪便、仔猪粪便及双歧杆菌制剂中筛选出 45 株双歧杆菌,加上本实验室已有的共 61 株。通过耐消化道初步筛选(在 pH3 改良 MRS 液体培养基中作用 24 h 菌体的  $D_{600} > 0.18$ ,在含 3 mg/mL 牛胆酸钠的改良 MRS 液体培养基中作用

24 h, 菌体的  $D_{600} > 0.25$ ) 得到双歧杆菌 T-1、Y53、Y23、Y46、A02、A03、A04、A05、J12、B01、B02、B03、S-1 和 L-1, 共 14 株。

### 3.2 耐胃酸试验

模拟胃酸环境(pH3.0)下培养 0~120 min 双歧杆菌的活菌数变化情况见图 1(a), 存活率见图 1(b)。可以看出, 上述 14 株初筛菌株对酸均有一定

的耐受能力, 但在 pH3 条件下, 作用时间 120 min 内, T-1、Y53、Y23 和 Y46 活菌数下降迅速, 尤其是 T-1, 30 min 后存活率仅为 77.34%, 120 min 后仅为 59.80%。其余菌株 90 min 后活菌数均  $> 10^5$  cfu/mL; 120 min 后, 除 T-1、A02、Y53、Y23 和 Y46 存活率低于 85% 外, 其余菌株均高于 95%, 活菌数均  $> 10^8$  cfu/mL, 最低的 Y23 存活率为 53%。

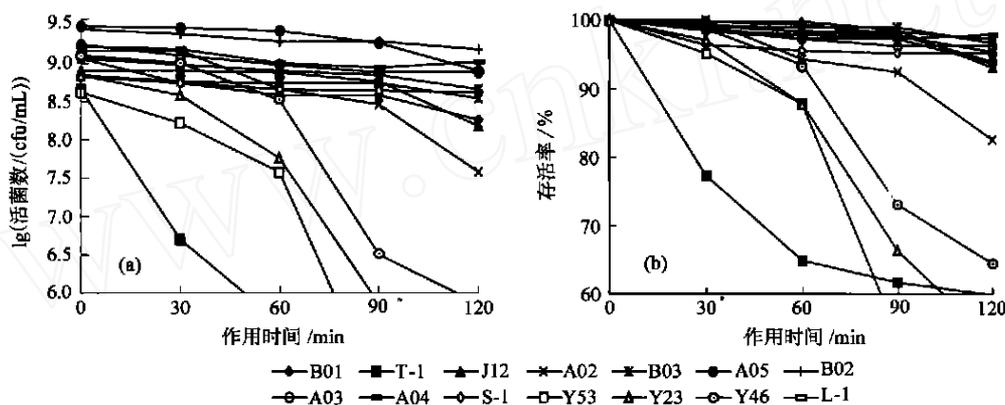


图 1 pH3.0 条件下作用时间与不同菌体活菌数(a)和存活率(b)的关系

Fig. 1 Effect of pH3.0 on survivability (a) and survival rate (b) of different strains

### 3.3 耐胆汁酸盐试验

图 2 示出牛胆酸钠质量浓度对不同菌株生长的影响。可以看出, 不同质量浓度的牛胆酸钠对双歧杆菌均有抑制作用, 质量浓度增加抑制作用随之增强, 而且在不同菌体之间表现出一定的差异。当牛胆酸钠质量浓度为 1 mg/mL 时, 培养 24 h 后, 试验菌株活菌数尽管比对照有所降低, 但比培养前均有一定增长; 当牛胆酸钠质量浓度为 2 mg/mL 时, 只有 A02、B02、A03 和 L-1 活菌数比培养前略高; 当牛胆酸钠的质量浓度达到 3 mg/mL 时, 对 A02、B01、Y46、Y23 和 S-1 的抑制作用非常明显, 活菌数比培

养前下降  $10^1 \sim 10^2$  cfu/mL; 当牛胆酸钠质量浓度为 5 mg/mL 时, L-1、A03、B02、A04、J12、B03 和 A05 表现出很好的耐受能力, 尽管活菌数比培养前有所下降, 但 24 h 后仍然  $> 10^5$  cfu/mL; 而 20 mg/mL 的牛胆酸钠质量浓度对所有菌株均有强烈的抑制作用, 24 h 后仅 T-1、A05、A04、B02、A03 和 L-1 还有活菌被检出。最终选定具有一定耐酸、耐牛胆酸钠的菌株 A04、A03、L-1、B03、J12 和 B02, 它们在 pH3 条件下作用 120 min 后存活率均高于 93%, 活菌数  $> 10^8$  cfu/mL; 在含牛胆酸钠 5 mg/mL 的改良 MRS 液体培养基作用 24 h 后, 活菌数  $> 10^6$  cfu/mL; 除 J12 和

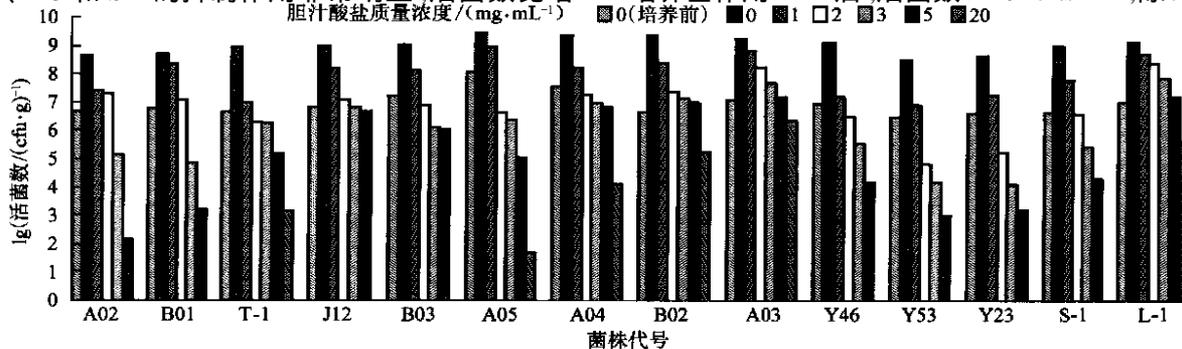


图 2 胆汁酸盐质量浓度对不同菌株生长的影响(培养 24 h)

Fig. 2 Effect of different bile concentrations on survivability of different strains

B03 外,其他 4 株在含牛胆酸钠 20 mg/mL 的改良 MRS 液体培养基作用 24 h 后活菌数  $> 10^4$  cfu/mL。为此,以这 6 株双歧杆菌为出发菌株,模拟胃肠道环境,进一步筛选相对耐胃蛋白酶和胰蛋白酶的菌株。

### 3.4 耐酶试验

图 3 示出胃蛋白酶和胰蛋白酶对不同菌株生长的影响。可以看出, A04、A03、L-1、B03、J12 和 B02

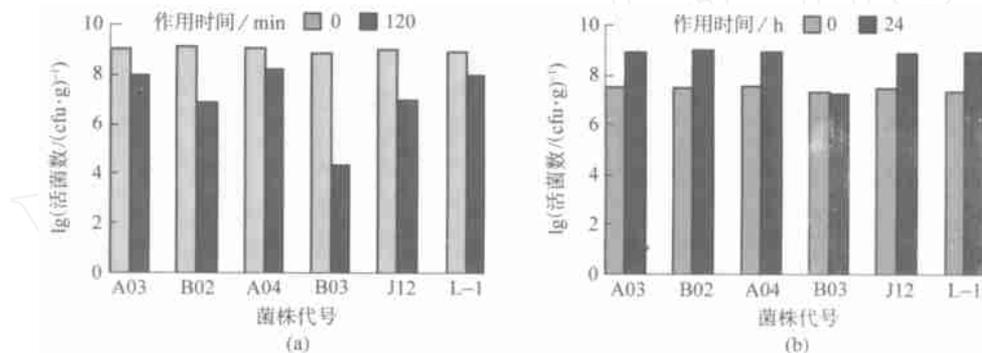


图 3 胃蛋白酶(a)和胰蛋白酶(b)对不同菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of pepsin (a) and trypsin (b) on different strains

有很强的耐受能力。在含 10 mg/mL 胰蛋白酶的改良 MRS 液体培养基中作用 24 h 后,只有 B03 的数量级低于作用前数量级,其他菌株均明显高于接种前的数量级且最终活菌数量级均高于 8.5。

## 4 讨论

活菌能否顺利通过胃,体外 HCl 耐受能力是一个关键因素。胃液 pH 因饮食结构不同波动很大,通常约为 3.0,空腹或食用酸性食品时可达 1.5,食用碱性食物时可达 4.0~5.0;食物在胃中停留的时间为 1~2 h<sup>[12]</sup>。除了胃酸对菌体存活有影响外,肠道中的胆汁酸盐对其也有毒性作用。已知人体小肠中含有胆汁酸盐 0.3~3.0 g/kg,其含量是不断变化的,一般认为其平均含量为 0.3 g/kg<sup>[13]</sup>。Gilliland 等<sup>[9]</sup>把 0.3 mg/mL 胆汁酸盐质量浓度作为筛选耐胆汁酸盐菌体的标准,Erkkia<sup>[10]</sup>等人通过试验也得到同样的结论。从本研究结果也可看出,1 和 2 mg/mL 胆汁酸盐质量浓度对菌体的影响很小,当其达到 3 mg/mL 时,菌体的耐受能力就各异;因此 3 mg/mL 胆汁酸盐质量浓度可作为菌株初步筛选的标准。

胃肠道内主要靠低 pH 和高胆汁酸盐(人体消化道正常 pH 为 2~8,正常胆汁酸盐质量浓度为

耐受胃蛋白酶的能力不同。其中,A03、A04 和 L-1 的耐受能力比其他菌体均高,在含 5 mg/mL 胃蛋白酶的改良 MRS 液体培养基中作用 24 h 后,存活率分别为 87.8%,89.9%和 89.4%,活菌数约为  $10^8$  cfu/mL;B02 和 J12 的耐受能力相对比较差,存活率分别为 75.5%和 77.1%;B03 耐受能力最差,存活率只有 48.9%,活菌数  $< 10^5$  cfu/mL。

由图 3 可知,除 B03 外,其他菌株对胰蛋白酶具

0.5~3 mg/mL<sup>[2]</sup>起杀菌作用。Chung 等<sup>[4]</sup>从成人粪便中筛选出耐胃酸、耐胆汁酸盐双歧杆菌菌株 H30 和 SI31,它们在 pH3 条件下作用 120 min 活菌数下降 10%(起始活菌数约为  $10^7$  cfu/mL),在含 1.5 mg/mL 胆汁酸盐的 MRS 培养基中比其他菌体生长都好( $P < 0.05$ )。王建业等<sup>[5]</sup>从健康猪肠道和粪便中共分离到 90 株细菌,根据微生物生态学关键指标,筛选出 10 株双歧杆菌,这些菌株能够耐受 8~10 mg/mL 的胆汁酸盐,在 pH3.5 的 BS 肉汤中 37 下保温 2 h,存活率在 40%以上。顾瑞霞等<sup>[2]</sup>的研究表明,嗜热链球菌、保加利亚杆菌和双歧杆菌在低 pH(pH 3.0)条件下,采用 MRS 培养基,于最适生长温度培养 60 min,3 种菌的存活率几乎为 0,而在 pH 2.0 时,20~40 min 3 种菌便全部死亡。对照本试验结果,A03、A04 和 L-1 的耐消化道能力与上述菌相比更有优势。此外,孙纪录等<sup>[14]</sup>还初步研究了不同物质对双歧杆菌胆汁酸盐耐受性的影响,结果表明,果糖或葡萄糖可以显著改善双歧杆菌 Bbm 菌株的胆汁酸盐耐受性,而菊糖和菊芋粉对改善双歧杆菌 Bbm 菌株的胆汁酸盐耐受性有不利影响;因此果糖和葡萄糖作为双歧杆菌的优良碳源可以减轻胆汁酸盐对双歧杆菌的毒性,但是这种作用在双歧杆菌的不同菌种之间存在差异,其机理有待进一步研究。

## 5 小结

A03、A04 和 L-1 对酸、牛胆酸钠以及酶的综合耐受能力最好,在 pH3.0 作用 120 min 后存活率分别为 96.21%、97.94%和 95.47%,而在含 5 mg/mL 牛胆酸钠的改良 MRS 液体培养基(起始 pH 7.0)中培养 24 h 后活菌数依次为  $1.62 \times 10^7$ 、 $6.76 \times 10^6$  和  $1.66 \times 10^7$  cfu/mL;它们对胃蛋白酶和胰蛋白酶也有很好的耐受能力,而且当活菌体与其他食物混合食用时,双歧杆菌受到保护,菌体受胃酸、胆汁酸盐及酶的抑制程度有所下降。因此,A03、A04 和 L-1 具有较强的耐胆汁酸盐能力和在低 pH 下的存活能力,能抵御体外模拟的胃肠道逆环境的影响,可作为益生菌。与之相关的研究还在进行之中。

## 参 考 文 献

- [1] 徐营,李霞,杨利国. 双歧杆菌的生物学特性及对人体的生理功能[J]. 微生物学通报,2001,28(6):94-96
- [2] 顾瑞霞,谭东兴,郭久和,等. 胆汁酸盐和低 pH 值对乳酸菌活性的影响[J]. 微生物学通报,1996,23(3):144-146
- [3] 孟祥晨,霍贵成. 双歧杆菌抗消化道逆环境特性的研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(10):6-10
- [4] Chung H S, Kim Y B, Chun S L, et al. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999,47:25-32
- [5] 王建业,王永坤,朱国强,等. 猪源双歧杆菌筛选及生物特性参数测定[J]. 扬州大学学报(自然科学版),2000,3(8):21-25
- [6] 杨洁彬,郭兴华,张,等. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.78
- [7] Barbara J O, Edmund A Z. Relationship between bile tolerance and the presence of a ruthenium red staining layer on strains of *Lactobacillus acidophilus*[J]. J Dairy Sci,1991,74:1196-1200
- [8] Jaya P, Harsharanjit G, John S, et al. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics[J]. Int Dairy Journal,1998,8:993-1002
- [9] Gilliland S, Staley T, Bush L. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct[J]. Journal of Dairy Science, 1984,67:3045-3051
- [10] Erkkia S, Petaja E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use[J]. Meat Science,2000,55:297-300
- [11] 李平兰,张. 利用亨盖特厌氧滚管技术检测双歧杆菌制品中的活菌数[J]. 食品科学,1999(2):68-69
- [12] Hunger W, Peitersen N. New technical aspects of the preparation of starter culture[J]. Bulletin IDF, 1992,277:17-21
- [13] Sjoval J. On the concentration of bile acids in the human intestine during absorption bile acids and steroids 74[J]. Acta Physiologia Scandinavia,1959,46,339-345
- [14] 孙纪录,贾英民,田洪涛,等. 不同物质对双歧杆菌胆汁酸盐耐受性的影响研究[J]. 中国微生态学杂志,2003,4(8):216-217

## 科研简讯

### “堆肥接种剂及其在养殖场固废生物处理中的应用”通过成果鉴定

2005年3月17日,我校资源与环境学院李季教授主持完成的“堆肥接种剂及其在养殖场固废生物处理中的应用”通过教育部组织的专家鉴定,该项目认为具有前瞻性,其堆肥复合发酵菌剂的研制和产业化达到了国际先进水平。

课题组完成了7种不同功能的微生物菌株的筛选与驯化,研制出稳定的堆肥接种剂,完成了不同发酵规模的小试和中试研究,取得了规模化生产的工艺参数,为该产品的产业化奠定了基础。该堆肥接种剂为自主知识产权产品,已获得农业部微生物菌剂登记,目前实现了从原菌到年产500t商品菌的生产规模,已带动国内50多家有机肥生产企业。课题组以养殖业的畜禽粪便资源为堆肥原料,深入研究了堆肥接种剂的优化发酵条件及发酵机理,并进行了不同作物的肥效试验,增产幅度显著、品质明显改善,为大面积推广提供了科学依据。

(科学技术处供稿)