

文章编号:1002-2090(2011)01-0063-03

## 猪用复合微生态制剂制备及保存期内活菌数研究

张军<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1,2</sup>, 朱战波<sup>1</sup>, 杨焕民<sup>1</sup>

(1.黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319; 2.黑龙江省兽医科学研究所)

**摘要:**为了确定两种猪肠道益生菌的固体发酵效果,以及复合微生态制剂在不同保存条件下的活菌数变化。对猪肠道益生菌干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌进行固体发酵,测定其活菌数,然后按照一定比例将两种益生菌与液体发酵的纳豆芽孢杆菌冻干菌粉混合制成复合微生态制剂;测定该制剂在4℃和室温保存状态下14 d内及半年内益生菌活菌数量的变化。保存14 d内的微生态制剂,室温条件下活菌数先增加后逐渐减少,而4℃保存的制剂活菌数缓慢减少。室温保存状态下的微生态制剂活菌数半年内迅速减少,4℃保存的微生态制剂益生菌死亡的速度比室温保存的略微缓慢,但差异不显著( $p>0.05$ )。半年后对4℃和室温保存状态下保存的益生菌活菌数计数结果分别为 $1.3\times 10^9$  CFU·g<sup>-1</sup>、 $1.5\times 10^9$  CFU·g<sup>-1</sup>,微生态制剂活菌数仍能超过 $3\times 10^8$  CFU·g<sup>-1</sup>,可以继续使用。研究表明复合微生态制剂中的乳酸菌在4℃和室温条件下均能保持活性半年以上。

**关键词:**猪;微生态制剂;干酪乳杆菌;罗伊氏乳酸杆菌;纳豆芽孢杆菌;保存期

中图分类号:S482

文献标识码:A

## The Preparation of Compound Probiotics and the Number of Living Bacterium Research in Keeping Time for Swine

Zhang Jun<sup>1</sup>, Liu Yu<sup>1,2</sup>, Zhu Zhanbo<sup>1</sup>, Yang Huanmin<sup>1</sup>

(1.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, 163319;  
2.Veterinary Research Institute in Heilongjiang Province)

**Abstract:** In order to determine the effect of the pig intestines probiotics II solid-state fermentation, and the effect of compound probiotics preservation conditions on different living bacterium number, pig intestines probiotics *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri* fermentation were solidified, the number of bacteria, and then live in certain proportion will be two kinds of probiotics and liquid fermentation of freeze-drying *Bacillus natto* sieved flour into composite probiotics, determination of the preparation room in 4 degrees and preservation condition within 14 days and half years probiotic bacteria living quantity changed. Within 14 days of probiotics, temperature conditions living bacterium number increased, and gradually decreased beyond four degrees of preparations for preservation living bacterium slowly decreased. Temperature preservation condition of probiotics living bacterium, 4℃ and preservation of degrees of probiotics death rate than the temperature preservation slightly slower, but the difference was not significant ( $P>0.05$ ). After six months of two ways to save the probiotic bacteria living bacterium number count results respectively  $10^9$  CFU/g,  $1.3\times 10^9$  CFU/g,  $1.5\times 10^9$  CFU/g live probiotics bacterium more than  $3\times 10^8$  CFU/g, can were still in use. Research showed that the compound of probiotics at 4 degrees Celsius temperature and lactobacillus conditions can retain activity for more than six months.

**Key words:** swine; probiotics; *Lactobacillus casei*; *Lactobacillus reuteri*; *Bacillus natto*; keeping time

抗生素作为饲料添加剂在防治畜禽疾病、促进动物生长等方面发挥着重大作用,但抗生素同时具有药物残留及长期使用导致耐药菌株逐渐增多从而

使抗生素失效等缺点;而微生态制剂具有无药物残留、能够调整生态平衡、增强机体免疫力等优点<sup>[1-3]</sup>,通过使用微生态制剂能够改变饲喂动物的健康状

收稿日期:2010-05-25

基金项目:黑龙江省农垦总局科技计划课题(HNKXIV-08-03-06);黑龙江省科技厅国际科技合作项目(WB06B06)。

作者简介:张军(1982-),男,黑龙江八一农垦大学2007级硕士研究生。

通讯作者:朱战波,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:zhanbozhu@163.com。

况,降低动物腹泻率,从而降低生产成本,可见研究使用微生态制剂饲喂动物是当今的发展趋势和研究热点<sup>[4]</sup>。微生态制剂的生产可以分固体发酵法和液体发酵法,Ashok Pandey 等对固体发酵法生产微生态制剂原料的前处理及规模化生产做了研究<sup>[5-6]</sup>,固体发酵法生产纳豆激酶及益生菌已有报道<sup>[7-10]</sup>,固体发酵具有设备简单,操作方便等特点,已逐渐被广泛采用于科研和生产<sup>[11-12]</sup>。

通过对猪肠道益生菌干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌进行固体发酵,测定其活菌数,然后按照一定比例将2种益生菌与液体发酵的纳豆芽孢杆菌冻干粉混合制成复合微生态制剂研究不同保存状态下不同时间内的活菌数变化。

## 1 材料

### 1.1 菌种

猪肠道益生菌-干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌、纳豆芽孢杆菌均为实验室鉴定保存。

### 1.2 培养基

MRS 琼脂、MRS 液体培养基、BL 琼脂培养基、营养肉汤和营养琼脂均由北京陆桥技术有限责任公司生产。

## 2 方法

### 2.1 固体发酵法培养干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌

#### 2.1.1 一级种子繁殖和鉴定

挑取干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌菌粉分别溶于少量的生理盐水中,涂布接种到 BL 平板上,37℃厌氧培养20 h。对 BL 平板上的菌落进行形态观察,合格后挑取 BL 平板上的单菌落划线接种到另一个平板上,37℃厌氧培养20 h。

#### 2.1.2 二级种子培养

对平板上的菌落进行革兰氏染色,经鉴定合格后挑取单个菌落到装有3 mL MRS 液体培养基的试管中,37℃厌氧培养20 h。经检验纯粹后,即可作为种子液,2~4℃保存<sup>[11]</sup>。

#### 2.1.3 固体发酵及检验

取干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌菌液,按照2%的接种量分别接种到含有2 000 mL MRS 液体培养基的锥形瓶中,37℃,静止厌氧培养20 h,将其作为固体发酵的种子液;将粉末状的麸皮等培养物加入到物料预混合机中,再加入2 000 mL 的菌液,二者的物料比为10:1,进行充分混合。将混合好的物料装入固体发酵罐中密封,然后进行固体发酵,在发酵

4 d 后对各发酵产物取样,染色镜检、菌落计数。

### 2.2 液体发酵培养纳豆芽孢杆菌

挑取纳豆芽孢杆菌菌粉接种到营养琼脂平板中,37℃、170 rpm 培养12~24 h,重新活化一次;接单菌落于含有3 mL 营养肉汤试管中,37℃、170 rpm 培养18 h 将其作为种子液体。

将种子液按照2%的接种量接种于含有50 L 营养肉汤培养基的发酵罐中进行液体发酵,发酵条件为温度37℃,转速100 rpm,16 h 后终止发酵;无菌取出2 mL 发酵液用于测定纳豆芽孢杆菌芽孢数,剩余发酵液传送到离心机中离心分离菌泥,然后将菌泥放入烘箱中烘干、称重、粉碎。

### 2.3 复合微生态制剂制备和检验

计算每克干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌物料中活菌数<sup>[7]</sup>,然后按照一定比例与纳豆芽孢杆菌菌粉混合,制备粉状活菌制剂。取制备完的活菌制剂1 g,按国标 GB/T 4789.35-2003 方法<sup>[14]</sup>测定每克制剂中3种益生菌的活菌数,稀释液为灭菌生理盐水。

### 2.4 微生态制剂不同存放时间内活菌数变化

#### 2.4.1 微生态制剂取样

将新配制的复合微生态分别保存于4℃冰箱和常温阴凉干燥处,并密封保存。从第0 d 之后每隔1 d 取微生态制剂样品一次,至14 d 为止;然后从第1个月开始,每月取样一次到第6个月为止。

#### 2.4.2 微生态活菌数检测

采用平板计数法对不同存放时间、不同保存方法的微生态制剂活菌数进行计数。具体做法为:取1 g 微生态制剂,用灭菌生理盐水做10倍梯度稀释,分别取稀释度为 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 的稀释液0.1 mL 均匀涂布于 MRSA 固体培养上,37℃厌氧培养24~48 h 后计数;以每个平板上生长30~300个菌落为宜,每个稀释度做3个重复,求算数平均值。

## 3 结果

### 3.1 微生态制剂的检验结果

经检验干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌镜检存粹,符合各自细菌形态特征,微生态制剂中各益生菌活菌数均在 $3 \times 10^9$  CFU·g<sup>-1</sup>以上。

### 3.2 14 d 内活菌数检测

从表1可以看出,0~14 d 内4℃保存的微生态

制剂数量减少,但减少缓慢,可能是因为低温使微生态制剂处于休眠状态,其代谢缓慢,活菌衰亡的数量缓慢下降;常温保存的微生态制剂在存放 14 d 内常活菌数是先增加后减少,并在第 2 d 达到最高值( $1.51 \times 10^{11}/\text{mL}$ ),随后活菌数逐渐降低,可能是刚配好的微生态制剂仍然在生长繁殖,然后进入稳定期,逐渐进入衰亡期。

表 1 保存 14 d 内的微生态制剂活菌数变化

Table 1 The variation of probiotic living bacterium number in 14 days

保存时间 /d	微生态制剂活菌数 / $\times 10^{10}\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$	
	4 ℃	常温
0	6.3	6.3
2	6.1	15.1
4	5.9	14.7
6	5.7	14.5
8	5.7	13.6
10	5.4	13.4
12	5.3	12.8
14	4.9	12.6

### 3.3 半年内活菌数检测

从表 2 可以看出,4℃保存半年内的微生态制剂活菌数减少由最初的  $3.7 \times 10^{10} \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,减少到  $1.1 \times 10^9 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 。半年内常温保存的微生态制剂活菌数量减少,保存 1 个月的活菌数为  $6.3 \times 10^{10} \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,而保存半年后其活菌数为  $1.3 \times 10^9 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,可以继续使用。

表 2 半年内微生态制剂活菌数变化

Table 2 The variation of probiotic living bacterium number in half year

保存时间 /m	微生态制剂活菌数 / $\times 10^{10}\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$	
	4 ℃	常温
1	3.7	6.3
2	1.4	1.8
3	0.93	1.1
4	0.62	0.64
5	0.41	0.37
6	0.15	0.13

## 4 讨论

经固体发酵法生产干酪乳杆菌、罗伊氏乳酸杆菌的活菌数均达到  $3 \times 10^9 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  以上,与国内工艺探讨报道的张磊<sup>[13]</sup>优化干酪乳杆菌培养基从而得到发酵培养物中活菌数达到  $1.65 \times 10^{10} \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,说明固

体发酵生产这两种益生菌能够满足制备微生态制剂的要求。4 ℃存放的微生态制剂半个月其活菌数逐渐减少,而常温保存的微生态制剂活菌数先是增加后缓慢减少,可能是益生菌尚处于对数生长期,而后由于营养成分被逐渐消耗殆尽,微生态制剂进入稳定期,部分益生菌衰老、死亡。半年内 4 ℃保存的微生态制剂活菌数减少 96%,而常温保存的微生态制剂活菌数减少 98%,因此 4 ℃低温保存更有利于益生菌的存活,但二者差异不显著( $P>0.05$ ),从经济上考虑常温保存更能节约成本,所以可以常温保存微生态制剂。

微生态制剂作为活菌制剂,其所含有的益生菌数是影响使用效果的主要因素,蔡辉益<sup>[9]</sup>指出益生菌一般要求  $3 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,每天要达到  $10^8$ 、 $10^9$  个菌体的菌量才能有效。试验结果表明半个月保存期内 4 ℃和常温保存的益生菌活菌数量相对稳定,活菌仍能够达到  $10^{10} \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,半年内两种保存方式的活菌数量逐渐下降,益生菌数量减少,但益生菌数仍能够达到  $10^9 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,远大于  $3 \times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ,因此不影响其使用效果。但随着时间的延长可酌情考虑增大微生态制剂的添加量,以提高其使用效果。由于纳豆芽孢杆菌在不利生长条件下可以以芽孢体状态保持生命力,试验没有进行相关检测,有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 刘宇.猪用乳酸杆菌、双歧杆菌、纳豆芽孢杆菌复合活菌制剂的研制[D].大庆:黑龙江八一农垦大学, 2008.
- [2] 李建华,赵银丽,李国喜,等.微生态制剂存放期内菌群活性检测[J].安徽农业科学, 2008, 36(6):2195-2196.
- [3] 孙明梅,李兴龙.动物微生态制剂的研究进展[M].科技动态, 2006, (3):28-29.
- [4] 李春丽,李建华,崔淑贞.微生态制剂在室温存放过程中的活菌数变化规律[J].中国微生态学杂志, 2009, (2):133-134.
- [5] Ashok Pandey. New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products [J]. Process Biochemistry. 2000, 35: 1153-1169.
- [6] Ashok Pandey. New Developments in Solid State Fermentation: II.Rational Approaches to the Design, preparation and Scale-up of Bioreactors [J].Process Biochemistry, 2000, 35: 1211-1225.
- [7] 黄沧海,谯仕彦,李德发.仔猪源罗伊氏乳酸杆菌生物学特性的研究[J].云南农业大学学报, 2004, 19(6):722-725.

(下转第 87 页)

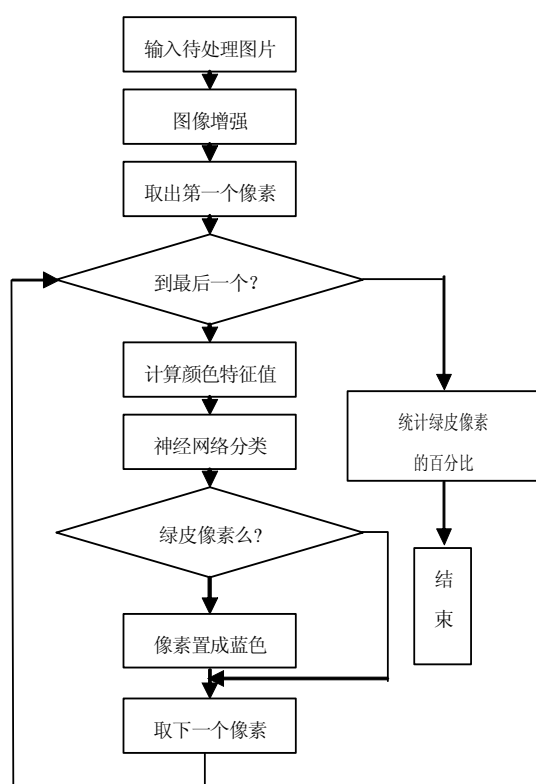


图6 绿皮缺陷检测流程图

Fig.6 Flow chart of green area detection

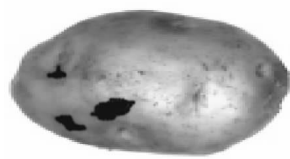


图7 绿皮缺陷分割效果

Fig.7 Result of green area segmentation

## 参考文献:

- [1] 史云鹏,朱蕾,华树东,等.植物生长调节剂对马铃薯块茎品质的影响[J].黑龙江八一农垦大学学报,2009,21(3): 42- 45.
- [2] 霍权恭,范璐.储藏条件对马铃薯品质的影响[J].河南工业大学学报(自然科学版),2005,26(6):47- 49.
- [3] 顾波,邱道尹.基于彩色转换的水果分类系统设计[J].农机化研究,2007(5):105- 107.
- [4] Noordam J C, Timmermans A J M. A color vision system for high speed sorting of potatoes [J]. Agricultural engineering, 2000:2- 7.
- [5] Tao Y, Heinemann P H, Varghese Z, et al. Machine vision for color inspection of potatoes and apples [J]. Trans of the ASAE,1995,38(5):1555- 1561.
- [6] 应义斌,饶秀勤,马俊福.柑橘成熟度机器视觉无损检测方法研究[J].农业工程学报,2004,20(2):144- 147.
- [7] Rafael C. Gonzalez, Richard E.Woods, Steven L. Eddins. Digital Image Processing Using Matlab [M].Beijing:Electronics Industry Press,2006:144- 154.
- [8] 许东,吴铮.基于MATLAB6.x的系统分析与设计:神经网络[M].西安:西安电子科技大学出版社,2002:23- 25.

(上接第 65 页)

- [8] R.E.布坎南 N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版.北京:科学出版社,1984.
- [9] 蔡辉益,霍启光,崔启光.饲用微生物添加剂研究与应用进展[J].饲料工业,1993(4):7-8.
- [10] 王刚.纳豆激酶的固体发酵、分离纯化及应用研究[D].吉林:吉林农业大学,2005.
- [11] 刘颖. 黑曲霉 9813X<sub>8</sub> 株的选育及其固态发酵条件的优化研究 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2000, 12(4):

61-65.

- [12] 刘冠军, 许平. 纤维素酶固体发酵培养基优化的研究 [J].2007,19(1):48-51.
- [13] 张磊, 张和平. 益生菌 *Lactobacillus casei* zhang 固态发酵培养基及发酵条件的优选[J].工艺探讨, 2009(2): 68-71.
- [14] 中华人民共和国卫生部, GB/T 4789.35-2003. 食品卫生微生物学检验乳酸菌饮料中乳酸菌检验 [M]. 北京: 中国标准出版社,2003.

(上接第 68 页)

- [8] Nguyen L P, Hamr J, Parker G H. Nest site characteristics of Eastern Wild Turkeys in Central Ontario [J]. Northeastern Naturalist, 2004, 11: 255.

- [9] 刘胜龙,蔡勇军,许青,等. 扎龙自然保护区白翅浮鸥繁殖生物学研究[J].东北林业大学学报,1999(5): 71-73.
- [10] 张旭,佟春玉,王秀娟.黑龙江省青年水库鸟类资源初步调查[J].黑龙江八一农垦大学学报,2005(1):32-33.