

新型微生态益生菌凝结芽孢杆菌研究进展

董惠钧, 姜俊云, 郑立军, 庞俊星
(鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276005)

摘要: 凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)是近年来益生菌领域的后起之秀, 其除具有乳酸菌和双歧杆菌等保健功效外, 还具有耐高温、耐酸和耐胆盐等高抗逆性, 且具有较强的抑制肠道致病菌能力。在国外已广泛应用于保健、医疗、食品和畜牧等领域, 但在我国关于凝结芽孢杆菌的研究和开发起步不久, 而且发展缓慢。本文从凝结芽孢杆菌特性、益生作用及机理、发酵培养和临床研究方面概括和总结国内外的研究进展。

关键词: 益生菌; 凝结芽孢杆菌; 发酵; 临床研究

Research Advances of Novel Microecologic Probiotics *Bacillus coagulans*

DONG Hui-jun, JIANG Jun-yun, ZHENG Li-jun, PANG Jun-xing
(Lunan Pharmaceutical Group Inc. Ltd., Linyi 276005, China)

Abstract: *Bacillus coagulans*, which belongs to *Bacillus* and exerts similar function to *Bacillus acidilactici* and *Bacillus bifidus* in healthcare, is characterized by strong resistance to heat, acid and bile salt. In addition, it has capabilities of inhibiting pathogenic bacteria in intestine. *Bacillus coagulans* has been applied in many aspects of healthcare, medicine, food and prologue abroad. Although the research and development on *Bacillus coagulans* have carried out for about ten years at home, the level falls behind in the world. In this paper, the characteristics, probiotic mechanisms, fermentation performance and clinical research of *Bacillus coagulans* are summarized in detail.

Key words: probiotics; *Bacillus coagulans*; fermentation; clinical research

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)01-0292-03

益生菌(probiotics)是指能够促进人和动物肠道中微生物群平衡(即微生态平衡)的微生物制剂或其他物质, 从而赋予寄主许多有益的作用。益生菌广泛地应用于医药、保健、食品、畜牧和水产等行业。其具有调节肠道功能紊乱、维持肠道内菌群平衡和提高机体免疫水平。目前国内外广泛应用的益生菌有乳酸杆菌类、双歧杆菌类、芽孢杆菌类和酵母菌等, 但乳酸杆菌和双歧杆菌的抗胃酸、抗胆盐和抗高温能力差。近年来, 由于凝结芽孢杆菌由于具有抗逆性强、耐高温高压、易贮藏等独特优点, 成为益生菌中研究的热点。本文对国内外关于凝结芽孢杆菌特性、益生作用和机理、发酵培养和临床研究进行总结和概括。

1 凝结芽孢杆菌的性状、生理功能和作用机理

1.1 凝结芽孢杆菌性状

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)呈杆状, 两端钝圆, 革兰氏阳性菌, 过氧化氢酶阳性, 芽孢端生, 无

鞭毛。最适生长温度为 45~50℃, 最适 pH 值为 6.6~7.0。其能分解糖类生成 L- 乳酸, 为同型乳酸发酵菌。凝结芽孢杆菌除具有和乳酸菌及双歧杆菌同样的保健功效外, 还具有耐酸、耐热、耐盐、容易培养和保存的特点。凝结芽孢杆菌经 90℃, 60min 湿热处理和 120℃, 60min 干热处理, 其活菌数只下降了一个数量级; 将其置于 pH 值大于 2.42 的酸性溶液中, 存放一年后, 其存活率仍高达 10⁵; 凝结芽孢杆菌在 1%~7% NaCl 溶液中均可存活 4 周以上, 其在 8% NaCl 溶液中能存活一个月^[1]。但凝结芽孢杆菌在低 pH 值条件下, 其抗逆性会下降。例如在酸性条件下(pH4.0), 凝结芽孢杆菌孢子对热几乎没有耐受性, 而且生长受到抑制^[2]。此外, Cerrutti 等^[3]也发现在 pH 值小于 4.5 和水活度 0.96 条件下, 凝结芽孢杆菌的生长受到抑制。

1.2 凝结芽孢杆菌生理功能

凝结芽孢杆菌芽孢经口服进入胃后, 在胃液环境下开始萌发生长, 芽孢衣膨胀, 芽孢形状增大, 水含量

收稿日期: 2009-02-24

作者简介: 董惠钧(1977—), 男, 工程师, 博士, 研究方向为生物制药。E-mail: dhjjjy@gmail.com

增加,从芽胞衣上长出突起。进入十二指肠时,孢子已萌发形成营养细胞,随后进入小肠,并开始大量繁殖,倍增时间约为30min。凝结芽孢杆菌为兼性厌氧菌,进入肠道后会消耗游离氧,并进行肠道繁殖,有利于厌氧微生物乳酸菌和双歧杆菌的生长,从而调节肠道内微生物的菌群平衡,提高机体免疫和抗病能力,减少肠道疾病的发生;凝结芽孢杆菌在肠道内繁殖会分泌淀粉酶和蛋白酶,帮助对营养物质的消化和吸收;其产生的维生素、氨基酸、短链脂肪酸等物质能增加小肠蠕动速度,改善肠道消化功能;另外凝结芽孢杆菌在代谢过程中能产生抑菌物质-凝结素^[4],因此对胃肠道炎症有一定治疗作用。

1.3 凝结芽孢杆菌作用机理

人体肠道中固有乳酸杆菌和双歧杆菌等有益菌,它们通过产生细菌素、有机酸和过氧化氢等物质抑制致病菌,减少胺类有害物质的产生,促进肠道相关淋巴组织提高免疫能力。凝结芽孢杆菌并非肠道固有的微生物,其在肠道中所起的生理调节功效是其分泌多种有益物质以及与肠道其它益生菌协同作用的结果,并非某种物质起作用,而且到目前为止还未见有关于凝结芽孢杆菌生理作用机制的确切报道。首先凝结芽孢杆菌是兼性厌氧菌,在有氧及无氧环境下都可生长,能适应低氧的肠道环境;对酸和胆汁有高耐性,能够进行乳酸发酵,产生的L-乳酸能降低肠道pH值,抑制有害菌,并能够促进双歧杆菌等益生菌的生长繁殖。由于其能够形成芽胞,所以较之不产乳酸的芽孢杆菌更易于恢复胃肠道微生态平衡^[5]。另外,路福平等^[6]发现凝结芽孢杆菌对大肠埃希氏菌、沙门氏菌、志贺氏菌和变形杆菌等常见肠道病原菌有一定抑制作用,经实验推测抑菌物质是乳酸和一些低分子量一级胺类混合物,而非过氧化氢和有机酸。类似别的芽孢杆菌,凝结芽孢杆菌能够分泌抗菌肽物质-凝结素。凝结素由44个氨基酸残基组成,中间氨基酸形成 α -螺旋结构,两端为无规则卷曲(图1),是由质粒pI4 DNA编码,与乳酸片球菌分泌的片球菌素(pediocin)相似,而仅在C末端存在一个氨基酸差异,能穿透细胞的细胞膜^[4]。凝结素经60℃处理90min, pH4~8的条件下仍保持稳定,而且不受 α -淀粉酶、酯酶和有机溶剂(10%, V/V)的影响,对肠球菌、明串珠球菌、李斯特菌和小球菌等有抑制作用^[7]。

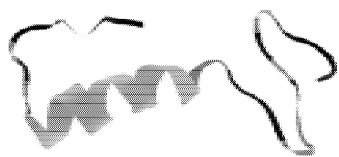


图1 凝结素蛋白结构

Fig. 1 Protein structure of coagulin

2 凝结芽孢杆菌的发酵研究

2.1 凝结芽孢杆菌的分离筛选

凝结芽孢杆菌属于芽孢杆菌属,在自然界中广泛存在。分离筛选遵循无机盐丰富,特别是不能缺少锰盐,高温(80℃)短时处理,低pH值和高胆盐等原则。分离样品来源多样,包括奶制品、土壤和动物粪便等,常采用MRS培养基进行筛选^[8]。参照《伯杰氏细菌手册》和《常见细菌系统鉴定手册》,从形态、生理生化指标、代谢特征和16S rDNA等方面进行鉴定^[9]。

2.2 凝结芽孢杆菌发酵和成孢培养

益生菌凝结芽孢杆菌发酵是为了获得大量菌体和抗逆性高的芽孢,因此发酵工艺不存在复杂的代谢调控和次级代谢,发酵周期短。目前,发酵研究的重点主要集中在如何用低廉易得的培养基获得高密度菌体和如何提高芽孢形成率。葛风情等^[10]对液体深层培养凝结芽孢杆菌进行了优化,培养基为麸皮4%、豆粕粉1.5%、NaCl 0.5%、K₂HPO₄ 4.0%和MnSO₄ 30.8 mg/L, pH7.2~7.4。37℃培养56 h,生物量OD_{600nm}达到19.68,芽孢形成率80%。崔东良等^[11]利用玉米粉、豆粕粉、玉米浆和无机盐作为凝结芽孢杆菌工业化发酵的培养基配方,在pH7.0~7.2和40℃条件下,培养36h可使活菌数达到 9.3×10^9 CFU/mL。刘鑫磊等^[12]采用补料分批发酵方式大幅度提高了菌体浓度和芽孢形成率,菌体浓度达到 4.5×10^9 CFU/mL,芽孢浓度达到 1.2×10^9 CFU/mL,分别是分批发酵的5.9倍和3.8倍。

凝结芽孢杆菌在培养过程中会产生乳酸,乳酸的积累会抑制菌体生长,无法获得高浓度的细胞。因此,只有将乳酸等代谢阻遏物去除,才能获得高密度细胞发酵液。戚薇等^[13]采用中空纤维超滤装置进行凝结芽孢杆菌的高密度培养。在对数后期,当乳酸质量浓度达到15 g/L时,开始过滤培养。过滤培养阶段持续6h,培养过程中平均过滤速率和培养基的流入速率为1 L/h,平均稀释率为0.4/h,菌体浓度和芽孢浓度分别可达到 1.6×10^{10} CFU/mL和 1.2×10^{10} CFU/mL。

益生菌凝结芽孢杆菌的功效是通过其在体内的一系列生理活动来实现的。其最终效果与食入活菌的数量密切相关。若数量不足,在体内不能形成优势菌群,难以起到益生作用。另外,由于胃酸低pH值和肠道的高胆盐环境,营养细胞无法长时间存活,更谈不上繁殖,具有高抗逆性的芽孢才能适应这样的环境。研究发现,凝结芽孢杆菌芽孢有很强的抗逆性,在100℃高温下10 min存活率可达96.4%;在pH 2.0的酸性条件下6h存活率可达48.2%;能耐受高胆盐浓度,0.9%条件下24h存活率达78.3%,0.3%条件下存活率达84.3%^[14]。芽孢是芽孢杆菌属细菌在生长后期,由于环境发生改变而在胞内形成的抗逆性休眠体,例如缺乏营养物质、温度和pH值发生改变等。碳源是影响芽孢形成的重要因素,高浓度碳源会抑制芽孢的形成^[12]。另外,无机盐在调控芽孢形成中发挥重要作用。Mn²⁺对芽孢的形成起到显著

作用,当浓度在0.005%~0.1%范围内,对芽孢的形成有促进作用,当浓度大于0.10%时,对菌体生长有抑制作用。 PO_4^{3-} 也有利于芽孢的形成,而 K^+ 和 Na^+ 对凝结芽孢杆菌芽孢的形成无明显促进作用,无机盐的作用遵循“适量促进、过量抑制”的原则^[15]。除了培养基中碳源和无机盐影响凝结芽孢杆菌芽孢形成外,王进华等^[16]研究发现高温对芽孢的形成有明显影响。50℃条件下芽孢的形成率可以达到57.7%,而且减少通气量有助于芽孢的形成。王天云等^[17]则在培养细胞后期加入固体介质可以促进芽孢的形成,例如木屑、碎布屑和玉米芯。而且芽孢形成率达95%以上,通常在添加后静置培养48h后芽孢就可以形成。

3 凝结芽孢杆菌的临床研究

凝结芽孢杆菌除了在维持肠道微生态平衡中的保健作用外,其对常见肠道疾病如慢性结肠炎、腹泻和便秘等有明显疗效,还具有调节血糖血脂和提高免疫力的功效。

万阜昌等^[18]研究表明凝结芽孢杆菌活菌片对氨苄青霉素钠诱发的小鼠腹泻有明显止泻作用,加速肠道菌群的恢复。对引起肠道炎症疾病的致病菌如大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、变形杆菌、伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌等有抑制作用,能够改善肠黏膜损伤^[19-20]。国内外研究证明服用凝结芽孢杆菌活菌能缓解习惯性便秘,降低肠道pH值,减少臭气,同时能够显著增加肠道内双歧杆菌数量和减少产气荚膜梭菌数量^[21-22]。

尽管还只是动物实验,但凝结芽孢杆菌在调节血脂血糖方面的功效令人鼓舞。房志仲等^[23-24]用凝结芽孢杆菌TQ33喂食糖尿病病理模型大鼠,发现TQ33可降低糖尿病大鼠的血糖水平,对糖耐量的Cmax有明显的降低作用,使耐糖量减低现象好转,另外,他们还发现TQ33能显著增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能和NK细胞活性,同时对脏器系数没有显著影响,具有明显的免疫调节作用。王文杰等^[25]研究也发现摄入凝胶芽孢杆菌能够降低血脂,防止动脉粥样硬化;降低血糖水平;增强NK细胞活性;降低肠道氨值,减少蛋白质有害代谢产物的堆积,保护机体。此外,Czaczyk等^[26]研究发现凝结芽孢杆菌对镰刀菌属病原真菌有明显抗性,显著抑制麦角固醇类物质的合成,麦角固醇则是真菌细胞膜的重要组分,但起抗性作用的物质是什么还有待进一步研究。

4 展望

与双歧杆菌、乳酸菌等益生菌相比,凝结芽孢杆菌在口服后能顺利通过胃酸和消化酶的双重关口并进入肠道“定居”。它们在那里能快速复苏,重新成为活菌,从而开始发挥其肠道保健作用。在国外,利用凝

结芽孢杆菌生产的保健品以及微生态生药已畅销多年,而在我国相关的研发和生产才刚刚起步。但随着人们对凝结芽孢杆菌临床研究的进一步深入,以及其本身对环境高抗逆性的特性,已经出现了多种应用于人体保健和医疗的凝结芽孢杆菌产品。例如由天津科技大学开发的凝结芽孢杆菌TQ33口服液和胶囊以及青岛东海药业开发的微生态药品爽舒宝-口服凝结芽孢杆菌活菌片剂。相信在不久的将来,我国的凝结芽孢杆菌保健品和药品能够惠及国人,保障人们的健康。

参考文献:

- [1] 赵虎山,陈莹,王艳萍,等.一种新的功能性食品添加剂-TQ33凝结芽孢杆菌粉的研究[J].中国食品添加剂,1997(4):10-13.
- [2] PALOP A, RASO J, PAGAN R, et al. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods[J]. Int J Food Microbiol, 1999, 46(3): 243-249.
- [3] CERRUTTI P, ALZAMORA S M, de HUERGO M S. Inhibition of *Bacillus coagulans* growth in laboratory media and in fruit purees[J]. Rev Argent Microbiol, 2000, 32(2): 71-76.
- [4] LE MARREC C, HYRONIMUS B, BRESSOLIER P, et al. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* 14[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(12): 5213-5220.
- [5] 曹钰,孙玲玲,陆健.酸与胆汁耐性芽孢益生菌的筛选[J].饲料研究,2006,12:31-34.
- [6] 路福平,戚薇,王进华,等.凝结芽孢杆菌TQ33所产抗菌物质及特性[J].中国乳品工业,1997,25(4):15-24.
- [7] HYRONIMUS B, LE MARREC C, URDADI M C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14[J]. J Appl Microbiol, 1998, 85(1): 42-50.
- [8] 戴青,赵述森,谢树贵,等.一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及生物学特性研究[J].饲料工业,2008,29(12):36-38.
- [9] 曹钰,孙玲玲,陆健.酸与胆汁耐性芽孢益生菌的筛选[J].饲料研究,2006,12:31-34.
- [10] 葛风情,孙玲玲,曹钰.益生凝结芽孢杆菌AHU1366的液体深层发酵培养[J].饲料研究,2007(7):63-66.
- [11] 崔东良,佟建明,王云山,等.凝结芽孢杆菌工业化发酵培养基初步研究[J].食品与发酵工业,2007,33(12):73-75.
- [12] 刘鑫磊,肖春明,许延涛,等.补料分批法高密度培养凝结芽孢杆菌[J].生物技术,2001,11(6):21-23.
- [13] 戚薇,刘鑫磊,王建玲,等.中空纤维过滤法高密度培养凝结芽孢杆菌TQ33[J].食品与发酵工业,2003,29(4):15-18.
- [14] 王金果,莫云,赵雁青,等.产乳酸凝结芽孢杆菌N001抗逆性研究[J].中国微生态学杂志,2007,19(6):489-491.
- [15] 王金果,莫云,张玟华,等.产乳酸凝结芽孢杆菌N001发酵参数的优化[C].中国畜牧兽医学会动物微生物生态学会第四届第九次学术研讨会论文集(上),2008:413-419.
- [16] 王进华,戚薇,陈莹,等.凝结芽孢杆菌芽孢形成液体培养基的研究[J].杭州食品科技,2003(4):5-10.
- [17] 王天云,陈振凤,王福源.一种促使乳酸芽孢杆菌大量生成芽孢的方法[J].工业微生物,2001,31(3):13-18.
- [18] 万阜昌,崔云龙,闫述翠.凝结芽孢杆菌活菌片对实验性腹泻小鼠的治疗作用[J].中国微生态学杂志,2005,17(6):415-418.
- [19] 陈莹,戚薇.芽孢乳酸杆菌抑菌物质特性的研究[J].食品研究与开发,2008,29(5):32-34.
- [20] 王霖,王文杰,刘洋,等.凝结芽孢杆菌TBC-169菌株治疗抗原诱导大鼠结肠炎的实验研究[J].胃肠病学,2008,13(6):349-353.
- [21] 崔云龙,万阜昌,李长龄,等.凝结芽孢杆菌(TBC169)片治疗便秘的实验研究和临床疗效[J].中国微生态学杂志,2006,18(4):264-269.
- [22] KATSUTOSHI A, SHINICHI M, TADASI H, et al. Effect spore-bearing lactic acid-forming bacteria (*Bacillus coagulans* SANK 70258) administration on the intestinal environment, defecation frequency, fecal characteristics and dermal characteristics in humans and rats[J]. Microb Ecol in Health Dis, 2003, 14(1): 4-13.
- [23] 房志仲,杨金荣,李璐,等.凝结芽孢杆菌对大鼠降糖作用的实验研究[J].中国微生态学杂志,2001,13(5):257-259.
- [24] 房志仲,李璐,杨金荣,等.凝结芽孢杆菌对免疫功能影响的实验研究[J].中国微生态学杂志,2005,17(4):263-265.
- [25] 王文杰,刘洋,彭珊瑛,等.凝结芽孢杆菌对小鼠免疫功能和粪便胺含量及肠道中氨含量的影响[J].中国微生态学杂志,2006,18(1):6-8.
- [26] CZACZYK K, TROJANOWSKA K, MUELLER A. Antifungal activity of *Bacillus coagulans* against *Fusarium* sp.[J]. Acta Microbiol Pol, 2002, 51(3): 275-283.