

脂肪酶对三丁酸甘油酯抑菌效果的影响研究

郭锡钦¹, 刘金松², 曾新福², 李慧², 韩乾杰¹, 杨彩梅^{1,2*}

(1. 浙江农林大学动物科技学院, 浙江临安 311300; 2. 浙江惠嘉生物科技股份有限公司, 浙江安吉 313307)

摘要: 本试验旨在研究脂肪酶处理对不同浓度三丁酸甘油酯抑制大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌能力的影响。选用的脂肪酶浓度为3、6、9 mg/mL, 三丁酸甘油酯浓度为20、40、60 mg/mL, 抑菌效果以抑菌圈直径表示, 抑菌圈直径越大表明抑菌效果越强。结果表明: 三丁酸甘油酯本身不具备明显的抑菌能力, 在被脂肪酶酶解后, 其抑菌能力增强; 当三丁酸甘油酯浓度为20 mg/mL时, 酶解后其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径由7.9 mm增大至11.6 mm ($P < 0.05$); 对大肠杆菌的抑菌直径由10.0 mm增大至12.7 mm ($P < 0.05$); 当三丁酸甘油酯浓度为40 mg/mL或60 mg/mL时, 酶解后其对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果由低度或中度敏感提高至高度敏感, 且脂肪酶浓度对抑菌效果无显著影响。结果显示, 脂肪酶酶解能增强三丁酸甘油酯对大肠杆菌、沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌的抑菌能力。

关键词: 三丁酸甘油酯; 脂肪酶; 酶解; 抑菌

中图分类号: S816

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.2018-09-124

三丁酸甘油酯是一种由3分子丁酸和1分子甘油组成的短链脂肪酸酯, 其化学式为 $C_{15}H_{26}O_6$, 相对分子量302.36。三丁酸甘油酯可在动物肠道内被脂肪酶酶解成丁酸和甘油。丁酸有一定的抑菌作用^[1], 而且能为肠道提供能量, 结肠细胞代谢中约75%氧消耗来自于丁酸代谢^[2]。丁酸钠是最常用的丁酸制剂, 其具有提高禽畜生长性能^[3-4]、缓解肠道炎症反应、调节肠道菌群等作用^[5], 是一种很有前景的抗生素替代品^[6-7]。然而, 丁酸钠具有特殊臭味, 且在胃液中易被置换成丁酸而被胃和小肠快速吸收, 使其无法到达起作用的关键部位——结肠。相较而言, 三丁酸甘油酯不溶于胃液, 能保证丁酸有效地为结肠供能^[8]。因此, 三丁酸甘油酯作为禽畜饲料添加剂较丁酸钠更具有优势。三丁酸甘油酯是否具有类似丁酸的抑菌作用目前未见报道。本试验通过研究脂肪酶酶解前后三丁酸甘油酯对大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 以及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 3种常见的肠道致病菌的抑菌能力, 为三丁酸甘油酯在畜牧生产上的应

用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 三丁酸甘油酯由浙江万方生物科技有限公司提供; 脂肪酶含量10 000 U/g, 市购。大肠杆菌 K88 由浙江大学实验室提供, 金黄色葡萄球菌 (ATCC6538)、鸡白痢沙门氏菌 (CVCC1791) 购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.2 样品制备 三丁酸甘油酯乳化液的配制: 由于三丁酸甘油酯不溶于水, 本试验采用聚乙烯醇 (PVA) 作为溶剂制备三丁酸甘油酯乳化液。用水浴法配制2% PVA溶液, 准确称取一定量三丁酸甘油酯样品溶于2% PVA中, 用超声波清洗仪震荡20 min后定容至50 mL。

脂肪酶溶液的配制: 配制pH=7.5的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液作为溶剂, 准确称取一定量脂肪酶溶于50 mL的Tris-HCl缓冲液中超声震荡20 min, 然后3 500 r/min离心10 min取上清即得到脂肪酶溶液。

LB培养基的配制: 准确称取胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠10 g, 用去离子水定容至950 mL, 用HCl和NaOH调节pH至7.0, 再用去离子水定容至1 L, 121℃灭菌30 min备用。

1.3 抑菌试验

1.3.1 三丁酸甘油酯的抑菌试验 配制20、40、60 mg/mL

收稿日期: 2018-03-23; 修回日期: 2018-05-14

资助项目: 浙江省重点研发项目 (2017C02005)

作者简介: 郭锡钦 (1994-), 男, 浙江人, 硕士研究生, 主要从事动物营养研究, E-mail: 1054228756@qq.com

* 通讯作者: 杨彩梅, E-mail: yangcaimei2012@163.com

的三丁酸甘油酯乳化液进行牛津杯抑菌试验。将 80℃ 的 LB 培养基倒入玻璃培养皿中，每个培养皿 15 mL 左右，待其冷却凝固；将菌液接种至 45℃ 的 LB 培养基，浓度 10⁶ CFU/mL，迅速用移液管将其转移至装有已凝固 LB 培养基的培养皿中，每个培养皿 7 mL，待其冷却凝固；用无菌镊子夹取牛津杯平稳放置于培养皿上，添加样本液，使液面高度与杯口持平。

1.3.2 脂肪酶酶解三丁酸甘油酯的抑菌试验 配制 3、6、9 mg/mL 的脂肪酶，加入到 3 种不同浓度的三丁酸甘油酯乳化液中，按 3×3（三丁酸甘油酯×脂肪酶）2 因子 3 水平有重复试验设计，制成 9 组反应液，放入 37℃ 恒温培养箱中反应 4 h 后取出，加入 95% 乙醇终止反应。

1.3.3 抑菌圈直径计算 使用菌落分析仪查看并计算每个培养皿中抑菌圈的大小，结果以抑菌圈的直径表示，抑菌圈直径大于 20 mm 为极度敏感，直径 15~20 mm 为高度敏感；直径 10~15 mm 为中度敏感；直径 7~10 mm 为低度敏感；抑菌圈直径 <7 mm 为不敏感；直径越大，抗菌活性越强。

1.4 统计分析 将所得数据用 IBM SPSS Statistics V21.0 进行单因素方差（One-Way ANOVA）分析，使用 LDS 法进行多重比较，结果以均值 ± 标准差表示，以 P<0.05 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 三丁酸甘油酯的抑菌效果 由表 1 和图 1 可见，20 mg/mL 的三丁酸甘油酯对大肠杆菌低度敏感，对沙门氏菌中度敏感；40 mg/mL 和 60 mg/mL 的三丁酸甘

表 1 三丁酸甘油酯对 3 种致病菌的抑菌圈直径 mm

三丁酸甘油酯	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄色葡萄球菌
20 mg/mL	9.988±0.342 ^a	13.204±0.396	7.917±0.233 ^a
40 mg/mL	10.068±0.560 ^a	12.974±0.942	9.249±0.189 ^b
60 mg/mL	12.280±0.422 ^b	14.243±0.878	8.477±0.763 ^a

注：同列数据肩标不同字母表示差异显著（P<0.05），无字母或相同字母表示无显著差异（P>0.05）。

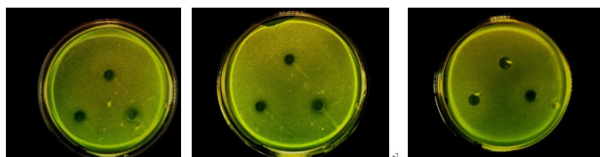


图 1 三丁酸甘油酯对 3 种致病菌的抑菌效果图

油酯对大肠杆菌和沙门氏菌中度敏感；3 种浓度的三丁酸甘油酯对金黄色葡萄球菌均低度敏感。

2.2 脂肪酶酶解后的三丁酸甘油酯对大肠杆菌的抑菌效果 如表 2 和图 2 所示，当三丁酸甘油酯浓度为 20 mg/mL 时，添加 3 mg/mL 或 6 mg/mL 脂肪酶酶解后，其对大肠杆菌中度敏感；当三丁酸甘油酯浓度为 40 mg/mL 或 60 mg/mL 时，酶解后的三丁酸甘油酯对大肠杆菌均高度敏感，脂肪酶浓度对抑菌效果无显著影响（P>0.05）。

表 2 酶解三丁酸甘油酯对大肠杆菌的抑菌圈直径 mm

三丁酸甘油酯	酶解液		
	3 mg/mL	6 mg/mL	9 mg/mL
20 mg/mL	10.191±2.556 ^a	12.773±1.391 ^{ab}	8.136±0.073 ^b
40 mg/mL	15.265±3.514	15.46±0.586	16.272±1.32
60 mg/mL	19.147±0.602	18.516±1.113	19.454±0.642

注：同行数据肩标不同字母表示差异显著（P<0.05），无字母或相同字母表示无显著差异（P>0.05）。下表同

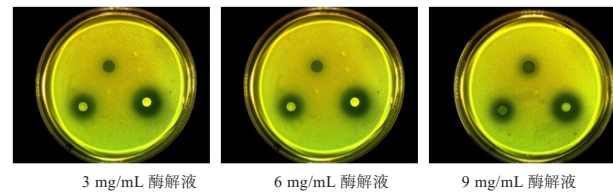


图 2 酶解三丁酸甘油酯对大肠杆菌的抑菌效果图

2.3 脂肪酶酶解后的三丁酸甘油酯对沙门氏菌的抑菌效果 如表 3 和图 3 所示，当三丁酸甘油酯浓度为 20 mg/mL 时，酶解后的三丁酸甘油酯对沙门氏菌均中度敏感；添加 6 mg/mL 脂肪酶其抑菌效果显著优于添加 3 mg/mL 或 9 mg/mL 脂肪酶（P<0.05）；当三丁酸甘油酯浓度为 40 mg/mL 或 60 mg/mL 时，酶解后的三丁酸甘油酯对沙门氏菌均高度敏感，酶解液浓度对抑菌效果无显著影响（P>0.05）；60 mg/mL 三丁酸甘油酯添加 9 mg/mL 脂肪酶酶解后，其抑菌圈直径达到 20 mm 以上，表明其对沙门氏菌的抑菌效果达到极度敏感水平。

2.4 脂肪酶酶解后的三丁酸甘油酯对金黄色葡萄球菌的抑菌效果 如表 4 和图 4 所示，当三丁酸甘油酯浓度为 20 mg/mL 时，添加 9 mg/mL 脂肪酶对金黄色葡萄球菌中度敏感，抑菌能力显著优于添加 3 mg/mL 或 6 mg/mL 脂肪酶组（P<0.05）；当三丁酸甘油酯浓度为 40 mg/mL 或 60 mg/mL 时，酶解后的三丁酸甘油酯对金黄色葡萄球菌均高度敏感，酶解液浓度对抑菌效果无显著影响（P>0.05）。

表3 酶解三丁酸甘油酯对沙门氏菌的抑菌圈直径 mm

三丁酸甘油酯	酶解液		
	3 mg/mL	6 mg/mL	9 mg/mL
20 mg/mL	10.414±1.34 ^a	13.542±0.417 ^b	10.037±0.582 ^a
40 mg/mL	17.294±1.932	16.819±0.922	17.317±0.744
60 mg/mL	18.192±1.641 ^a	19.838±0.868 ^a	20.751±1.174 ^b

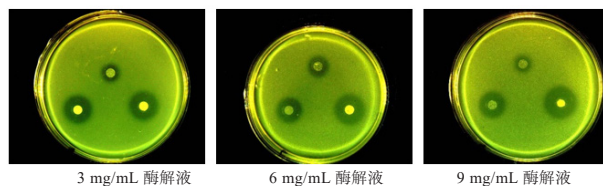


图3 酶解三丁酸甘油酯对沙门氏菌的抑菌效果图

表4 酶解三丁酸甘油酯对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径 mm

三丁酸甘油酯	酶解液		
	3 mg/mL	6 mg/mL	9 mg/mL
20 mg/mL	7.625±0.203 ^a	7.834±0.162 ^a	11.628±0.542 ^b
40 mg/mL	16.077±1.791	15.564±0.773	15.506±1.395
60 mg/mL	16.814±1.17	15.822±0.713	15.942±1.036

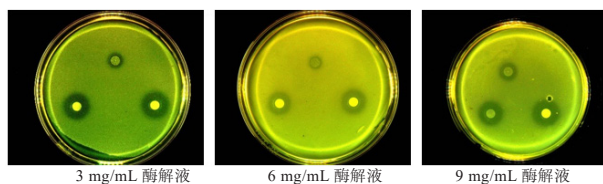


图4 酶解三丁酸甘油酯对金黄色葡萄球菌的抑菌效果图

3 讨论

三丁酸甘油酯是一种良好的丁酸供体,由丁酸和甘油乳化而成。研究表明,三丁酸甘油酯具有提高禽畜免疫力、缓解幼畜断奶造成的应激及腹泻、维持肠道稳定的作用^[9-12]。相比丁酸钠等丁酸盐制剂,三丁酸甘油酯的优势在于其不具有刺激性气味且不与胃液反应^[13],研究表明,三丁酸甘油酯在肠道被脂肪酶解产生丁酸和甘油,随后丁酸被肠道上皮细胞吸收,在线粒体中进行 β 氧化产生乙酰CoA,乙酰CoA与草酰乙酸结合生成柠檬酸从而启动三羧酸循环,为肠上皮细胞供能^[14],此外三丁酸甘油酯进入肠道酶解成丁酸后,丁酸的弱酸性能有效抑制肠道中的有害菌生长,对耐酸性的乳酸菌及其他有益菌无明显影响^[15-16],在饲料中添加三丁酸甘油酯能显著降低仔猪粪便中大肠杆菌和双歧杆菌数量^[17]。大量动物试验研究表明,三丁酸甘油酯通过改

善肠道结构、提高机体免疫、释放丁酸^[18-19]等形式调节仔猪肠道菌群平衡。本研究结果表明,三丁酸甘油酯对3种肠道有害菌的抑菌能力较弱,而酶解后其抑菌能力得到显著增强,当三丁酸甘油酯浓度较低(20 mg/mL)时,添加较高浓度(6 mg/mL)的脂肪酶后其对大肠杆菌、沙门氏菌抑菌能力提高;添加9 mg/mL脂肪酶酶解后其对金黄色葡萄球菌抑菌能力提高;当三丁酸甘油酯浓度较高(40 mg/mL或60 mg/mL)时,酶解后三丁酸甘油酯对3种菌的抑菌效果均显著增强。本试验结果表明,脂肪酶提高了三丁酸甘油酯的抑菌效果,可能是三丁酸甘油酯酶解后产生的丁酸发挥了抑菌作用,但本试验未使用丁酸和甘油作为对照比较,因此还需要进行更多的研究来说明酶解改善三丁酸甘油酯抑菌作用的机理。本研究采用的最低脂肪酶浓度为3 mg/mL,更低浓度的脂肪酶添加量对三丁酸甘油酯的抑菌效果的影响也需要进一步的研究论证。

4 结论

本研究结果表明,三丁酸甘油酯对金黄色葡萄球菌低度敏感、对沙门氏菌中度敏感、40 mg/mL以上浓度对大肠杆菌中度敏感。脂肪酶酶解后的三丁酸甘油酯抑菌效果显著增强,当三丁酸甘油酯浓度为20 mg/mL时,酶解液对大肠杆菌和沙门氏菌中度敏感;当三丁酸甘油酯浓度为40 mg/mL或60 mg/mL时,酶解液对3种菌均高度敏感。

参考文献:

- [1] 王腾浩,宗鑫,宋德广,等.产抑菌蛋白的丁酸梭菌的筛选和鉴定及体外益生功能研究[J].中国畜牧杂志,2015,51(13):75-81.
- [2] 邹杨,杨在宾,杨维仁,等.不同剂型丁酸钠与抗生素对肉仔鸡生产性能、肠道pH及挥发性脂肪酸含量的影响[J].动物营养学报,2010,22(3):675-681.
- [3] 彭丽莎,孙健栋,史艳云,等.三丁酸甘油酯对肉鸡生长性能、养分表观消化率、屠宰性能、肠道形态及微生物菌群的影响[J].动物营养学报,2014,26(2):466-473.
- [4] 钟翔,黄小国,陈莎莎,等.丁酸钠对断奶仔猪生长性能和肠道消化酶活性的影响[J].动物营养学报,2009,21(5):719-726.
- [5] 李丹丹,冯国强,钮海华,等.丁酸钠对断奶仔猪生长性能及免疫功能的影响[J].动物营养学报,2012,24(2):307-313.
- [6] Cresci G, Nagy L E, Ganapathy V. Lactobacillus GG and tributyrin supplementation reduce antibiotic-induced intestinal injury[J]. Jpn J Parenter-Enteral Nutr, 2013, 37(6):763-774.
- [7] Leonel A J, Alvarez-Leite J I. Butyrate: implications for intestinal function[J]. Curr Opin Clin Nutr, 2012, 15(5):474.
- [8] 余东游,孙健栋,麻剑雄,等.三丁酸甘油酯的生物学功能及

- 其在畜牧生产中的应用[J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(17): 91-95.
- [9] 杨玲. 三丁酸甘油酯对断奶仔猪生长性能、肠道结构和血液生化指标的影响[J]. 饲料工业, 2012(s1): 184-184.
- [10] Hou Y Q, Liu Y L, Hu J, *et al.* Effects of lactitol and tributyrin on growth performance, small intestinal morphology and enzyme activity in weaned pigs[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2006, 19(10): 1470-1477.
- [11] Tropkaya N S, Kislyakova E A, Popova T S. Effect of tributyrin on electrical activity in the small intestine during early postoperative period[J]. *Bulletin of Exp BioMed*, 2015, 160(2): 219-222.
- [12] Dong L, Zhong X, He J, *et al.* Supplementation of tributyrin improves the growth and intestinal digestive and barrier functions in intrauterine growth-restricted piglets[J]. *Clin Nutr*, 2016, 35(2): 399-407.
- [13] 原清会, 彭艳. 三丁酸甘油酯的消化吸收及其在猪生产中的应用[J]. 饲料工业, 2017, 38(17): 20-22.
- [14] Donohoe D R, Wali A, Brylawski B P, *et al.* Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46589.
- [15] 王萌, 黄铁军, 张勇. 三丁酸甘油酯对断奶仔猪生长性能及肠道健康的调控[J]. 饲料工业, 2016, 37(12): 56-58.
- [16] P. Guilloteau, L. Martin, V. Eeckhaut, *et al.* From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate[J]. *Nutr Res Rev*, 2010, 23(2): 366.
- [17] 张勇, 王萌, 李方方, 等. 三丁酸甘油酯和牛至油对断奶仔猪生长性能、血清生化指标和营养物质表观消化率的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(9): 2786-2794.
- [18] Piva A, Prandini A, Fiorentini L, *et al.* Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs[J]. *J Anim Sci*, 2002, 80(3): 670.
- [19] Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms[J]. *Int J Food Microbio*, 1999, 50(1-2): 1.

Effects of Lipase on Bacteriostatic Ability of Glyceryl Tributyrate

GUO Xi-qin¹, LIU Jin-song², ZENG Xin-fu², LI Hhui², HAN Qian-jie¹, YANG Cai-mei^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Zhejiang Linan 311300, China;

2. Zhejiang Huijia Bio-technology Co, Ltd, Zhejiang Anji 313307, China)

Abstract: This experiment aimed to analyze the bacteriostatic ability of glyceryl tributyrate with lipase on *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. The lipase concentration used in the experiment was 3, 6, 9 mg/mL, and glyceryl tributyrate concentration was 20, 40, 60 mg/mL. The higher diameter of bacteriostasis circle was, the stronger bacteriostatic ability was. The results showed that glyceryl tributyrate did not have obvious antibacterial ability. The bacteriostatic ability of glyceryl tributyrate was obviously enhanced when the lipase was added. The diameter of bacteriostasis circle to *Staphylococcus aureus* increased from 7.9 mm to 11.6 mm, and the diameter of bacteriostasis circle to *Escherichia coli* increased from 10.0 mm to 12.7 mm when the concentration of glyceryl tributyrate was 20mg/mL with lipase ($P < 0.05$). The bacteriostatic abilities to *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* were significantly increased with the enzymatic hydrolysis when the glyceryl tributyrate concentration was 40mg/mL and 60mg/mL ($P < 0.05$), the concentration of lipase had no significant effect on bacteriostatic action. The results show that enzymatic hydrolysis could enhance the bacteriostatic ability of glyceryl tributyrate to *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Glyceryl tributyrate; Lipase; Enzymatic hydrolysis; Bacteriostatic ability