

菊糖及其酶解产物对长双歧杆菌的促生长作用

张建平¹, 张泽生², 王金菊²

(1. 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 研究了长双歧杆菌在分别以葡萄糖、菊糖和菊糖酶解所得低聚果糖为碳源的培养基中的生长情况,在这些培养基中,长双歧杆菌最高菌体质量浓度分别是 0.30、0.37、0.41 g/L,在以菊糖和低聚果糖为碳源的培养基中的增殖情况要好于以葡萄糖为碳源的培养基,通过原子力显微镜对长双歧杆菌的形态进行观察,发现在分别以菊糖和葡萄糖为碳源的培养基中其形态无明显差别。

关键词: 长双歧杆菌; 菊糖; 低聚果糖

中图分类号: TS245.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)02-0017-04

Promoting Effect of Inulin and Oligomerization Levulose on the Growth of *Bifidobacterium Longum*

ZHANG Jian-ping¹, ZHANG Ze-sheng², WANG Jin-ju²

(1. College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The growth instance of *Bifidobacterium longum* at part with glucose, inulin, oligomerization levulose for carbon source culture medium was studied. The supreme thallus concentration in these cultures part was 0.30, 0.37 and 0.41 g/L, the proliferation instance of *Bifidobacterium longum* at part with inulin and oligomerization levulose for carbon source culture medium was better than that which was cultured in the culture which carbon source was glucose can be found through the medium of date. Through the medium of AFM versus, it was found that the shape of *Bifidobacterium longum* at part with inulin and glucose for carbon source has no distinceness difference.

Keywords: *Bifidobacterium longum*; inulin; oligomerization levulose

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是1899年由法国学者 Tissier 从母乳营养儿的粪便中分离出的一种厌氧的革兰氏阳性杆菌,末端常常分叉,故名双歧杆菌,它具有维护肠道正常细菌菌群平衡、抑制病原菌的生长、防止便秘等功能^[1]。但双歧杆菌分布在胃肠的数量随年龄阶段的增长而减少^[2],所以,如何提高成人体的双歧杆菌活菌数成为现今最受关注的课题之一。研究^[3]发现,一些低聚果糖可以促进双歧杆菌的增殖。菊糖是由D-呋喃果糖分子以 β -(2,1)糖苷键连接生成的直链多糖^[4]。本实验研究菊糖和菊糖酶解所得的低聚果糖对长双歧杆菌生长和形态的影响,为找到更有效、成本更低的长双歧因子奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*),购于中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基

活化培养基:大豆蛋白胨 0.5 g,胰蛋白胨 0.5 g,酵母糖 1.0 g,葡萄糖 1.0 g,无机盐溶液 4 mL,蒸馏水 100 mL,半胱氨酸盐酸盐 0.05 g(培养基煮沸后加入),pH 7.0。此培养基在接种前煮沸驱氧后接种,于

厌氧环境下培养. 无机盐溶液: CaCl_2 (无水) 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.48 g, K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaHCO_3 10.0 g, NaCl 2.0 g. 混合 CaCl_2 和 MgSO_4 在 300 mL 蒸馏水中直至溶解, 加 500 mL 蒸馏水, 边搅拌边缓慢加入其他盐类至全部溶解, 加 200 mL 蒸馏水混匀, 4 °C 下保存备用.

菌体增殖培养基: 将葡萄糖碳源替换为实验用碳源适量.

上述各培养基均经 121 °C 灭菌 30 min 后使用.

1.2 方法

1.2.1 菊糖低聚果糖的制备^[5]

按本实验室建立的方法制备, 相对分子质量为 509, 聚合度为 2~3.

1.2.2 长双歧杆菌菌体活化和增殖培养

在 100 mL 三角瓶中装入 50 mL 活化培养基, 121 °C 灭菌 30 min 后趁热塞紧橡皮塞. 采用萃取法开启安瓿管, 利用无菌吸管吸取 5.0 mL 培养基至安瓿管, 充分洗涤冻干菌粉至三角瓶, 然后塞紧橡皮塞, 恒温 37 °C, 定时摇晃小三角瓶, 厌氧培养 36 h 得长双歧杆菌菌种母液.

在 10 mL 的具塞螺纹试管中加入 9 mL 菌体增殖培养基, 121 °C 灭菌 30 min 后趁热旋紧试管塞. 接入菌种母液 1.0 mL (接种量 10%). 恒温 37 °C 厌氧培养, 定时摇晃培养试管.

长双歧杆菌是厌氧菌, 需厌氧培养. 厌氧缸法是一种简便实用的厌氧培养方法, 适用于小规模厌氧菌培养. 厌氧缸是普通的干燥缸, 把接种好的长双歧杆菌液体培养基试管放入厌氧缸内, 然后在缸内点燃一支蜡烛, 盖好缸盖, 用凡士林封口, 蜡烛熄灭后, 缸内就形成了厌氧环境.

1.2.3 长双歧杆菌菌体浓度的测定

采用干质量法和比浊法相结合的方法^[6-7]: 在 620 nm 下测定长双歧杆菌菌种悬浊液吸光度, 再根据吸光度与菌体浓度之间的标准曲线, 可求得菌体浓度 (测菌体吸光度前, 需洗涤菌体培养液数次, 以除去培养液本身颜色).

1.2.4 长双歧杆菌生长曲线测定

实验中分别以菊糖、菊糖酶解所得低聚果糖代替活化培养基中的葡萄糖 (加入量为 1%), 初始 pH 7.0, 接种量 10%, 37 °C 培养 30 h, 每隔 6 h 测定 1 次长双歧杆菌菌体浓度, 绘制其生长曲线.

1.2.5 长双歧杆菌代谢产物分析

用酸度计测定代谢产物 pH, 采用苯酚硫酸法测定总糖浓度.

1.2.6 不同浓度的葡萄糖、菊糖及菊糖酶解低聚果糖对长双歧杆菌生长的影响

在以葡萄糖为碳源的培养基中, 加入葡萄糖的量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%, 在以菊糖为碳源的培养基中, 加入菊糖的量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%, 在以菊糖酶解低聚果糖为碳源的培养基中, 加入菊糖酶解低聚果糖的量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%, 测定在这些培养基中长双歧杆菌的生长情况.

1.2.7 长双歧杆菌形态观察

采用 JSPM-5200 型原子力显微镜 (日本 JEOL) 观察长双歧杆菌形态. 制片前将长双歧杆菌用清水多次洗涤, 离心, 除去培养基, 用蒸馏水稀释到适合倍数, 用毛细管滴在干净的盖玻片上, 常温常压下晾干, 备用. 原子力扫描采用轻敲模式.

2 结果与讨论

2.1 长双歧杆菌浓度标准曲线

在波长 620 nm 处测得长双歧杆菌培养液的吸光度与菌体质量浓度之间相关曲线如图 1 所示, 回归方程为 $y = 4.158x + 0.0823$, $R^2 = 0.9896$.

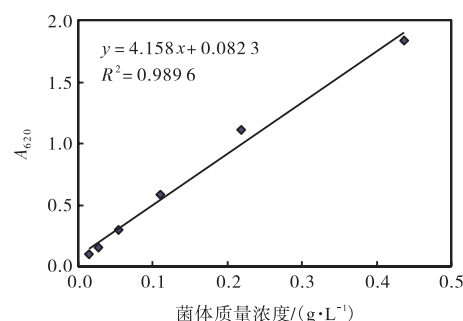


图1 长双歧杆菌菌体质量浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of concentration of *Bifidobacterium longum*

2.2 菊糖及其酶解产物对长双歧杆菌增殖影响的比较

2.2.1 对菌体质量浓度的影响

长双歧杆菌生长曲线如图 2 所示. 从图中可以看出: 在以低聚果糖作为碳源的培养基中, 长双歧杆菌生长最快, 最先达到生长对数期, 在 12 h 时菌体质量浓度达到最高, 为 0.41 g/L, 是初始菌体质量浓度的 4.5 倍; 在以菊糖为碳源的培养基中, 18 h 时达到顶峰, 菌体质量浓度为 0.37 g/L, 是初始菌体质量浓度的 4.1 倍, 之后出现缓慢下降; 在以葡萄糖为碳源的培养基中, 长双歧杆菌生长最慢, 菌体质量浓度也低, 在

24 h 时为 0.30 g/L, 是初始菌体质量浓度的 3.3 倍. 由此可见, 菊糖和低聚果糖对长双歧杆菌的增殖有促进作用, 其中低聚果糖的促进效果更为明显.

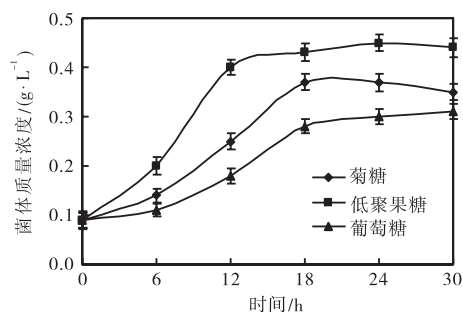


图 2 长双歧杆菌生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Bifidobacterium longum*

2.2.2 发酵过程中发酵液 pH 的变化

发酵液 pH 的变化如图 3 所示. 从图 3 可以看出: 各培养基的 pH 都是在 0~6 h 下降最快, 6 h 后下降速度趋于缓慢. 经过 6 h 培养, 以低聚果糖作为碳源的培养基的 pH 由初始的 7.0 下降到 5.5; 以菊糖为碳源的培养基 pH 由初始的 7.0 下降到 5.8; 以葡萄糖为碳源的最慢, pH 由初始的 7.0 下降到 6.0. pH 下降的这种现象是完全符合长双歧杆菌的生理特性的, 即它们在生长过程代谢产生大量的醋酸、乳酸或 B 族维生素等代谢产物^[8], 使培养基 pH 降低.

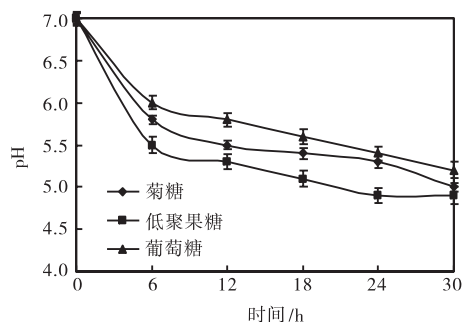


图 3 长双歧杆菌培养基 pH 变化

Tab.3 Change of pH in culture medium

2.2.3 发酵液中糖含量的变化

发酵液中总糖含量的变化如图 4 所示. 从图中可以看出: 培养 30 h 后, 低聚果糖的消耗量最多, 由最初的 9.20 mg/mL 下降到 4.18 mg/mL, 消耗率为 52.9%; 其次为菊糖, 由 9.20 mg/mL 下降到 4.70 mg/mL, 消耗率为 48.9%; 最后为葡萄糖, 由 9.20 mg/mL 下降到 5.12 mg/mL, 消耗率为 40.6%.

2.3 葡萄糖、菊糖及菊糖酶解低聚果糖浓度对长双歧杆菌生长的影响

长双歧杆菌增殖培养基中不同浓度的葡萄糖、菊

糖和菊糖酶解低聚果糖对长双歧杆菌增殖的影响如图 5—图 7 所示.

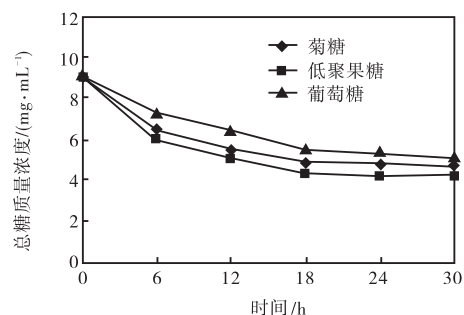
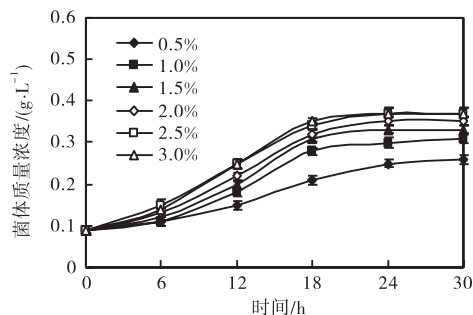
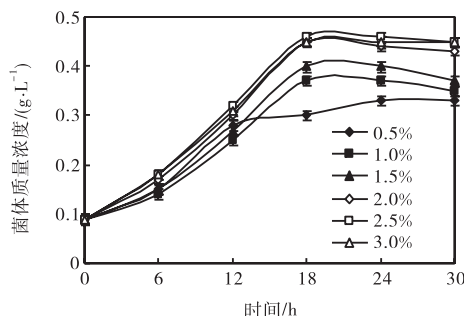


图 4 长双歧杆菌培养基总糖含量变化

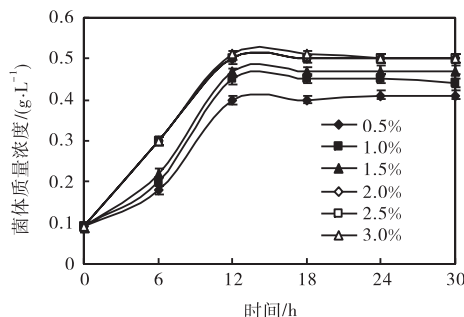
Fig.4 Change of concentration of deoxidization suger in culture medium



(a) 葡萄糖



(b) 菊糖



(c) 菊糖酶解低聚果糖

图 5 不同浓度葡萄糖、菊糖和低聚果糖对长双歧杆菌增殖的影响

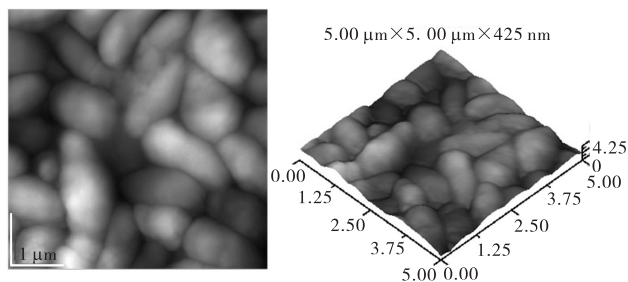
Fig.5 Effect of different concentration of glucose, inulin and oligomerization levulose on *Bifidobacterium longum* proliferation

从图 5(a)可以看出,培养基中葡萄糖浓度为 2.0% 时长双歧杆菌菌体质量浓度在培养 24h 达到 0.32 g/L,此后再增加葡萄糖的加入量,菌体质量浓度变化不大.从图 5(b)可以看出,培养基中菊糖浓度在 2.0% 时长双歧杆菌菌体质量浓度在培养 18h 达到 0.45 g/L,此后再增加菊糖的投入,菌体质量浓度变化不大.从图 5(c)可以看出,培养基中菊糖酶解低聚果糖浓度在 2.0% 时长双歧杆菌菌体质量浓度在培养 12h 达到 0.5 g/L,此后再增加低聚果糖的投入,菌体质量浓度变化不大.

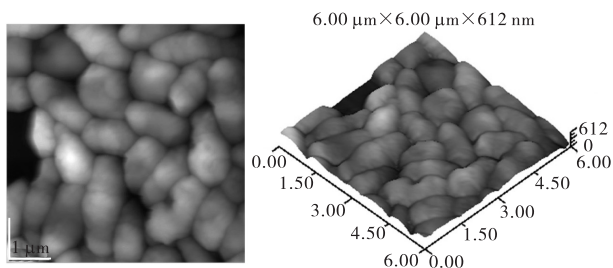
由此可见,长双歧杆菌在碳源为菊糖和菊糖酶解低聚果糖的培养基中生长旺盛,在碳源为葡萄糖的培养基中,长双歧杆菌达到最高菌体质量浓度 0.32 g/L 时葡萄糖加入量为 2.0%,但在以菊糖或低聚果糖为碳源的培养基中,达到相同的菌体质量浓度时,菊糖或低聚果糖的加入量仅为 0.5%,并且在加入低聚果糖培养 12h 后就可达到相同的菌体质量浓度.因此,得到相同数量的长双歧杆菌,菊糖或菊糖酶解低聚果糖的用量更少,培养时间更短,从而达到降低成本,提高经济效益的效果.

2.4 原子力显微镜下长双歧杆菌的形态

图 6 为长双歧杆菌在以菊糖和葡萄糖为碳源培养基中的菌体形态的原子力显微镜照片.



(a) 以葡萄糖为碳源



(b) 以菊糖为碳源

图 6 长双歧杆菌菌体形态

Fig.6 Thallus shape of *Bifidobacterium longum*

图 6 中右侧图片为显微镜照片的立体效果图.长双歧杆菌新分离菌株多呈 Y 或 V 型、刀状或棒状,经继代培养后常呈直或曲棒状,也可呈枝状^[9].由于观察到的是长双歧杆菌经过继代后的形态,因此,图中长双歧杆菌呈直棒状或曲棒状,长为 1~3 μm,宽为 0.5 μm,高为 0.4~0.7 μm.不同碳源的培养基中长双歧杆菌的形态无明显差别,说明菊糖在促进长双歧杆菌增殖的同时不会对长双歧杆菌的形态造成影响.

3 结 论

长双歧杆菌在以菊糖和低聚果糖为碳源的培养基中的增殖情况均好于以葡萄糖为碳源,得到相同数量的长双歧杆菌,菊糖或菊糖酶解低聚果糖的用量要少于葡萄糖的用量,培养时间也大大缩短,从而达到降低成本,提高经济效益的效果.长双歧杆菌在分别以菊糖和葡萄糖为碳源的培养基中形态无明显差别,说明菊糖在促进长双歧杆菌增殖的同时不会影响其菌体形态.

参考文献:

- [1] 张延坤,马燕. 双歧杆菌的生物特性及其保健功能[J]. 解放军预防医学杂志,2005,23(5):386-389.
- [2] 朱俊晨,李世敏,魏小青. 双歧杆菌对人体的生理作用及研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2000,12(1):53-55.
- [3] 项明洁,刘明,彭奕冰,等. 低聚果糖对双歧杆菌增殖效果及肠道菌群的影响[J]. 检验医学,2005,20(1):49-51.
- [4] 饶志娟,郑建仙,贾呈祥. 功能性食品基料:菊粉的研究进展[J]. 中国甜菜糖业,2002(4):26-30.
- [5] 张建平. 菊芋菊糖的提取纯化及其生物活性研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.
- [6] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997:55-60.
- [7] 罗珍兰,谢继志,王庆明,等. 双歧杆菌和乳酸菌在不同基质中混合发酵的情况比较[J]. 食品工业科技,1997(4):50-53.
- [8] 董贝磊,董贝森,陆晓滨. 双歧杆菌生长特性的研究[J]. 山东轻工业学院学报:自然科学版,1998,12(2):50-54.
- [9] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京:化学工业出版社,2004:213-215.