

文章编号: 1003-8701(2015)02-0105-05

益生元低聚糖对发酵乳杆菌 CH4 的促生长作用

牛春华, 赵玉娟, 张健, 马爽, 李盛钰*

(吉林省农业科学院农产品加工研究所/国家乳品加工技术研发分中心 长春 130033)

摘要: 内蒙古奶豆腐中分离的一株优良益生特性的乳杆菌菌株 CH4 经 API 50 CHL 和 16S rDNA 序列分析鉴定为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)。本研究分析了益生元对 CH4 生长的促进作用。单因子试验表明, 棉籽糖对 CH4 的促生长能力最强, 添加量为 1.5%, 培养时间为 10 h 有利于菌株 CH4 的生长。利用正交试验进行验证, 最终确定发酵乳杆菌 CH4 的生长条件为: 培养基中添加 1.5% 棉籽糖, 培养 11 h, 发酵乳杆菌 CH4 的活菌数达到 8.65×10^{10} CFU/mL, 与未添加低聚糖培养时相比提高 40 倍。

关键词: 发酵乳杆菌; 低聚糖; 促生长

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.02.027

Effect of Prebiotic Oligosaccharides on Promoting Growth of *Lactobacillus fermentum* CH4

NIU Chun-hua, ZHAO Yu-juan, ZHANG Jian, MA Shuang, LI Sheng-yu*

(Institute of Agro-Food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences / National R&D Center for Milk Processing, Changchun 130033, China)

Abstract: Potential probiotic characterization of *Lactobacillus* strains CH4 isolated from Inner Mongolia Hu-rud cheese was identified as *L. fermentum* by API 50 CHL and 16S rDNA sequence analysis. In this study, the effects of prebiotics types, added volume, and incubation time for this strain were explored by single factor and orthogonal experiments. Results showed viable count of *L. fermentum* CH4 was 8.65×10^{10} CFU/mL in medium with 1.5% raffinose addition and 11h incubation and increased 40-fold compared to culturing without oligosaccharides.

Key words: *Lactobacillus fermentum*; Oligosaccharides; Growth promotion

乳酸菌对人类的健康具有促进作用, 正是由于乳酸菌所特有的益生功能使得由其发酵的食品越来越受到国人的青睐, 因此分离筛选性能优良的乳酸菌菌种是近年来国内学者研究的热点。奶豆腐, 蒙古语称“胡乳达”, 是蒙古族牧民家利用牛奶、羊奶、马奶等自制的自然发酵奶制品, 是具有中国特色的传统发酵食品, 不仅营养丰富, 还蕴含着不同种属的乳酸菌, 如干酪乳杆菌^[1]、嗜热链球菌^[2]、发酵乳杆菌^[2]、植物乳杆菌^[3]、瑞士乳杆

菌^[4]等。本试验从内蒙古牧民自制的“奶豆腐”中分离得到乳杆菌 CH4, 前期试验结果表明菌株 CH4 具有良好的益生特性和功能特性, 如耐酸、耐胆盐、粘附性、降胆固醇、抗氧化等。

利用益生元 (Prebiotics) 促进乳酸菌的生长已有很多报道, 如低聚异麦芽糖^[5]、低聚葡萄糖^[6]、菊粉^[7]、低聚半乳糖^[8]、低聚果糖^[9]、水苏糖^[9]等均已被证实可促进双歧杆菌和乳酸菌的生长。这类低聚糖因其具有较高的稳定性, 难以被消化道的酶系分解而直达大肠, 为双歧杆菌等有益菌提供营养从而促进其增殖, 但不能被有害菌所利用, 因此这种选择性增殖可维持消化道的微生态平衡, 同时为人体带来更多的健康效应。为筛选能被乳杆菌 CH4 所利用的低聚糖, 本文利用单因素和正交试验对影响菌株生长的低聚糖的种类、添加量等因素进行分析研究, 以期为该菌株后续的产品开发和产业化生产提供数据支撑。

收稿日期: 2014-10-15

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助 (CARS-37); 国家自然科学基金青年科研基金 (31201394); 吉林省农业科学院重大项目 (C42070302); 吉林省农业科技创新工程项目 (C42070303)

作者简介: 牛春华 (1964-), 女, 助理研究员, 主要从事乳品微生物与乳品工艺研究。

通讯作者: 李盛钰, 男, 博士, 副研究员, E-mail: lisy720@126.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株 CH4 经表型和生理生化试验初步鉴定为乳杆菌,为本实验室保存菌种。菌种在 30%甘油中于-80℃冻存。使用前接种于 MRS 液体培养基,37℃连续活化 2 次。

溶菌酶(鼎国)、蛋白酶 K(TaKaRa,日本)、Ex taq 酶(TaKaRa,日本)和 DNA 胶回收试剂盒(Bio Basic InC.,加拿大)等均购自上海生物工程技术服务有限公司。引物的合成与序列测定由北京华大基因公司完成。棉籽糖、低聚果糖、乳果糖和菊粉均购自郑州市鸿程化工产品有限公司。其他试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

Evolution RC 高速冷冻离心机(美国 Thermo Sorvall);BX51 显微镜(日本 Olympus);Cary300 紫外可见分光光度计(美国 Varian);PCR 仪(德国 Eppendorf);电泳仪(北京六一);凝胶成像分析系统(美国 Alpha Innotech)。

1.3 试验方法

1.3.1 API 50 CHL 鉴定

利用生物梅里埃公司的 API 50 CHL 鉴定试纸条对乳杆菌的碳水化合物发酵试验进行分析,按试剂盒说明书进行操作,将结果记录形成试验菌株的生化图谱,利用 API LAB PLUS(BioMérieux, France)软件进行判定^[10]。

1.3.2 16S rDNA 序列扩增和比对分析

将菌株 CH4 在 MRS 液体培养基中 37℃培养至稳定期,参照 Bouazzaoui 和 Lapointe 方法^[11]进行菌体基因组的提取。采用 Jung-Hoon Yoon 等人^[12]设计的引物(16 sF:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'; 16 sR:5'-AGAAAGGAGGTGATC-

CAGC-3'),以乳杆菌 CH4 的基因组为模板,PCR 扩增目的基因序列。PCR 反应体系和扩增程序均参照赵玉娟等方法^[13]进行。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测、DNA 胶回收试剂盒回收纯化,北京华大基因公司测序。获得菌株的 16S rDNA 序列通过 BLAST 程序与 GenBank 库中已知菌株的序列信息进行同源性比对分析,鉴定待测菌株。以 16S rDNA 的序列同源性大于 99%为标准进行属种归类。

1.3.3 单因素筛选

为了分析益生元种类、添加量和培养时间对发酵乳杆菌 CH4 生长的影响,过夜培养的 CH4 菌株按 3%接种于添加 1.5%不同益生元(菊粉、低聚果糖、低聚果糖和棉籽糖)的 MRS 液体培养基中,37℃培养 10 h 后,倍比稀释涂布于 MRS 琼脂平板,37℃培养 48 h 后菌落计数。

将优选的益生元按不同浓度(0.5%~4%)添加到 MRS 液体培养基中,37℃培养 10 h,涂布 MRS 琼脂平板计数法测定发酵液中活菌数确定最佳的添加量。向 MRS 液体培养基中按最佳添加量添加优选益生元后接入发酵乳杆菌 CH4,37℃培养,分别在培养 6~13 h,期间每隔 1 h 取样利用平板计数法测定发酵液中的活菌数,确定最佳的培养时间。

1.3.4 正交试验

通过单因子试验确定影响发酵乳杆菌 CH4 生长的因素为益生元的种类、添加量和培养时间。采用 $L_{16}(4^4)$ 正交试验确定促进乳杆菌生长益生元的最适培养条件,以 MRS 为基础培养基,接种量 3%,培养温度为 37℃,接种后静置培养,稀释涂布于 MRS 琼脂平板,37℃培养 48 h 后菌落计数。正交试验因子及水平如表 1。

表 1 正交试验设计方案

| 水平 | A | B | C | D | E |
|----|------|--------|------|---------|------|
| | 益生元 | 添加量(%) | 空列 1 | 培养时间(h) | 空列 2 |
| 1 | 菊粉 | 1.5 | 1 | 9 | 1 |
| 2 | 乳果糖 | 2.0 | 2 | 10 | 2 |
| 3 | 低聚果糖 | 2.5 | 3 | 11 | 3 |
| 4 | 棉籽糖 | 3.0 | 4 | 12 | 4 |

2 结果与分析

2.1 菌株 CH4 的鉴定

API 50 CHL 菌种鉴定试纸条((bioMérieux ,

Marcy I'Etoile, France)用于乳酸菌和相关菌的鉴定,是一种简易、微量、快速、准确的鉴定方法,依据菌株的碳水化合物(包括各种糖苷、醇类和糖醛酸)发酵反应来鉴定细菌的种属。通过 API 发

酵结果可以看出,乳杆菌CH4能利用D-核糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-乳糖、D-蜜二糖、D-蔗糖、D-海藻糖、D-棉籽糖和葡萄糖酸钾,与API数据库现存的数据进行比对发现该菌株为发酵乳杆菌,属于极好的鉴定(%id≥99.9)。

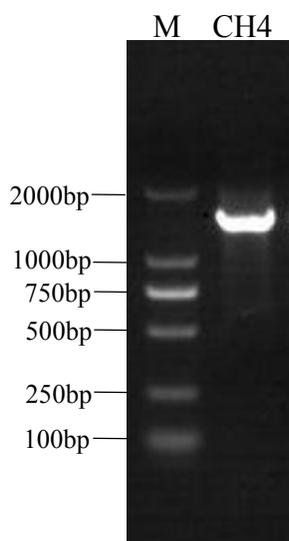


图1 PCR扩增16S rDNA产物电泳图

M: DNA marker; CH4: 发酵乳杆菌CH4 16S rDNA PCR产物

采用1%琼脂糖对乳杆菌CH4的16S rDNA PCR扩增产物进行凝胶电泳,如图1所示,所扩增样品的片段在1500bp左右,条带清晰,为目的扩增片段。产物经DNA胶回收试剂盒纯化并测序,将所获得的序列信息经NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST软件在线分析进行相似性比对,结果表明该菌株与发酵乳杆菌的同源性达到99%,因此初步判定菌株CH4为发酵乳杆菌。

结合API 50 CHL和16S rDNA序列分析结果,乳杆菌CH4鉴定为发酵乳杆菌(*L. fermentum*)。

2.2 益生元对发酵乳杆菌CH4发酵过程中活菌数的影响

2.2.1 益生元种类

四种益生元对发酵乳杆菌CH4的促生长作用如表2所示,向MRS培养基中添加1.5%的益生元,在一定程度上提高了发酵乳杆菌CH4的活菌数,尤其是棉籽糖对发酵乳杆菌CH4的促生长能力最强,活菌数是对照组的2.35倍,其次是菊粉和乳果糖。

棉籽糖被认为是“抗营养因子”,属于 α -半乳

表2 益生元种类对活菌数的影响

| 益生元 | 棉籽糖 | 菊粉 | 低聚果糖 | 乳果糖 | MRS |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 活菌数(Log CFU/mL) | 9.67±0.59 | 9.50±0.96 | 9.26±0.67 | 9.36±1.34 | 9.29±0.83 |

糖苷类寡糖,由于人体内缺乏水解这类寡糖的水解酶(α -半乳糖苷酶),棉籽糖在小肠中既不被降解也不被吸收,只有到达大肠后才能被双歧杆菌或其他乳酸菌所利用,因此是益生菌极好的营养源和有效的增殖因子。本研究结果与其他学者相一致,魏爱彬^[14]利用乳酸菌*L. casei* Zhang和*L. plantarum* IMAU10120对豆粕进行发酵,结果表明发酵后大豆低聚糖的含量整体下降,尤其是水苏糖和棉籽糖的水平降低显著,说明豆粕中的棉籽糖和水苏糖被乳酸菌所利用;豆荚类植物中含有大量的棉籽糖,Fredslund^[15]研究证实一些含有棉籽糖族低聚糖(RFOs)豆荚类植物可以显著地促进乳酸菌的生长。AlazzeH等^[16]研究表明,棉籽糖可以显著地提高罗伊氏乳杆菌 α -半乳糖苷酶的活性,达到10.55 U/mL,同时促进了乳酸菌的生长。

2.2.2 添加量

为考察不同浓度棉籽糖对发酵乳杆菌CH4生长的影响情况,分别向MRS液体培养基中按添加量为0.5%~4.0%添加棉籽糖,结果如图2所示。当棉籽糖浓度在0~2.5%之间时,收获期活菌数

与浓度呈依赖关系,浓度越高活菌数越多,浓度为2.5%时活菌数为 5.8×10^9 CFU/mL,当浓度超过2.5%时,活菌数有下降的趋势。万荣峰等^[17]研究低聚糖对乳酸菌体外增殖的影响时发现当低聚糖的浓度超过3%时,乳酸菌的生长受到抑制,与本研究结果相似。分析原因可能是因为高浓度的低聚糖在培养基中形成了较高的渗透压,对细菌产生了一定的脱水作用,反而抑制其生长。

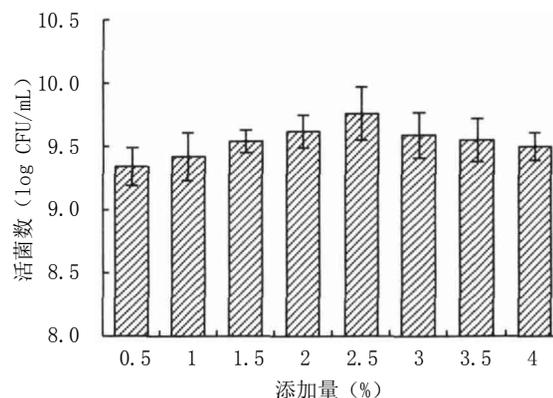


图2 不同浓度棉籽糖对活菌数的影响

2.2.3 培养时间

培养时间对活菌数的影响结果如图3,培养

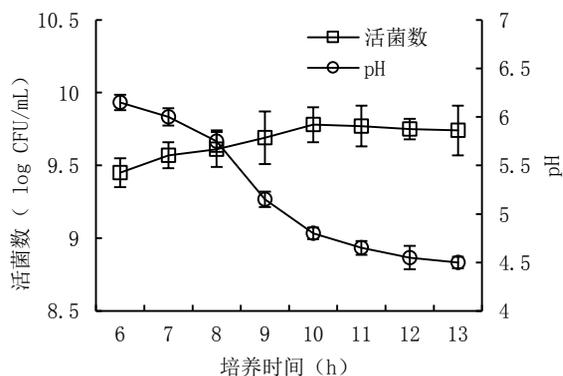


图3 培养时间对活菌数的影响

时间为10 h时收获期活菌数能够达到最大值 6×10^9 CFU/mL,在培养10 h之后,随着培养时间的

延长活菌数有降低的趋势,分析原因可能是由于发酵液中营养物质消耗过多以及代谢产物过多导致乳酸菌的活菌数下降。

2.2.4 正交试验

采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验确定最适培养条件。结果见表3,通过极差分析可看出对发酵乳杆菌生长影响最大的因素依次为:益生元的添加量、种类、培养时间。

理论上 $A_4B_1D_3$ 的组合为最优条件,但在16个试验号中都没有出现,正交表中 $A_4B_4D_3$ 的活菌数在16个试验中最高,其次是 $A_1B_1D_1$ 。因此,对 $A_4B_1D_3$ 、 $A_4B_4D_3$ 和 $A_1B_1D_1$ 组合,重复3次试验进行验证,结果表明 $A_4B_1D_3$ 活菌数最高,为 8.65×10^{10} CFU/mL。因此确定发酵乳杆菌的培养条件为向培养基中添加1.5%棉籽糖,培养时间为11 h。

表3 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素水平及结果分析

| 试验号 | 益生元 | 添加量 | 空列1 | 培养时间 | 空列2 | 活菌数 ($\times 10^{10}$ CFU/mL) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------------|
| | A | B | C | D | E | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6.04 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3.34 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.52 |
| 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2.93 |
| 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 4.51 |
| 6 | 2 | 2 | 1 | 4 | 3 | 4.18 |
| 7 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 4.86 |
| 8 | 2 | 4 | 3 | 2 | 1 | 2.35 |
| 9 | 3 | 1 | 3 | 4 | 2 | 5.91 |
| 10 | 3 | 2 | 4 | 3 | 1 | 4.74 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 2 | 4 | 3.84 |
| 12 | 3 | 4 | 2 | 1 | 3 | 2.52 |
| 13 | 4 | 1 | 4 | 2 | 3 | 6.02 |
| 14 | 4 | 2 | 3 | 1 | 4 | 3.95 |
| 15 | 4 | 3 | 2 | 4 | 1 | 3.04 |
| 16 | 4 | 4 | 1 | 3 | 2 | 8.56 |
| k1 | 3.707 | 5.620 | 5.655 | 4.434 | 4.043 | |
| k2 | 3.975 | 4.053 | 3.353 | 3.887 | 5.668 | |
| k3 | 4.253 | 3.565 | 3.683 | 5.082 | 3.810 | |
| k4 | 5.393 | 4.090 | 4.638 | 4.015 | 3.808 | |
| R | 1.686 | 2.055 | 2.302 | 1.195 | 1.860 | |

因素主次: B>A>D
最佳组合: $A_4B_1D_3$ (1.5%棉籽糖、培养时间11 h)

3 讨论

国内外学者对于低聚糖对乳酸菌的促生长作用进行了验证,结果均表明不同种类的低聚糖对双歧杆菌和乳酸菌具有促生长作用。本文利用四

种不同的低聚糖对发酵乳杆菌CH4的促生长作用进行研究,结果发现棉籽糖对发酵乳杆菌CH4的促生长能力最强,与Fredslund^[15]等学者的研究结果相一致。但是关于低聚糖对乳酸菌促生长作用机制方面的研究较少,目前普遍被接受的是低

聚糖在消化道中被益生菌分解利用产生大量的短链脂肪酸等酸性物质^[18],这类物质可直接作为营养物质被机体吸收,同时通过降低肠道pH抑制病原菌的生长繁殖,从而起到选择性增殖的作用。

目前,低聚糖主要是作为益生元添加到食品中,如婴幼儿奶粉、发酵乳制品等。本研究目的是筛选到乳酸菌可以分解利用的低聚糖,结果证实棉籽糖可以有效地促进发酵乳杆菌CH4的生长,因此在后续的产品开发中,考虑将棉籽糖应用于产品的发酵过程中,一方面棉籽糖可以促进菌株CH4的增殖,提高发酵食品中益生菌的活菌数,同时强化产品的营养价值,另一方面棉籽糖随产品进入人体肠道中继续发挥其生理功能,这种功能发酵食品必将有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 张和平,孟和毕力格,王俊国,等.分离自内蒙古传统发酵酸马奶中*L.casei* Zhang潜在益生特性的研究[J].中国乳品工业,2006,34(4):4-10.
- [2] 王炜洪.蒙古国传统发酵乳制品中乳酸菌的分离鉴定[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
- [3] 张雪,李达,赵玉娟,等.内蒙古奶豆腐中产胞外多糖乳酸菌的分离筛选[J].食品科学,2010,31(1):141-144.
- [4] 赵蕊,霍贵成.新疆酸奶子中乳酸菌多样性分析[J].山东大学学报(理学版),2008,43(7):18-22,27.
- [5] Vernazza C L, Gibson G R, Rastall R A. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100 (4): 846-853.
- [6] Gullón B, Gullón P, Sanz Y, et al. Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2011, 44(8): 1687-1696.
- [7] Oliveira R P de S, Perego P, de Oliveira M N, et al. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2012, 47(2): 358-363.
- [8] Hernandez-Hernandez O, Muthaiyan A, Moreno F J, et al. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*[J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(2): 355-361.
- [9] 周景欣,袁杰利,李新仓.几种益生元制剂对肠道菌群作用效果的研究[J].中国微生态学杂志,2008,20(2):145-146,153.
- [10] Conter M, Muscariello T, Zanardi E, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from an Italian dry fermented sausage [J]. *Annali della Facoltà di Medicina, Veterinaria-Università di Parma*, 2005(25): 167-174.
- [11] Bouazzaoui K, LaPointe G. Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65(2): 216-225.
- [12] Yoon J, Lee S T, Park Y. Inter- and Intraspecific Phylogenetic Analysis of the Genus *Nocardoides* and Related Taxa Based on 16S rDNA Sequences[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998(48): 187-194.
- [13] 赵玉娟,李盛钰,张莉,等.植物乳杆菌C88胞外多糖生物合成基因的克隆及序列比对[J].基因组学与应用生物学,2011,30(4):331-337.
- [14] 魏爱彬.益生乳酸菌*L. casei* Zhang和*L. plantarum* IMAU10120在豆粕中发酵特性的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
- [15] Fredslund F, Hachem M A, Larsen R J, et al. Crystal Structure of α -Galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: Insight into Tetramer Formation and Substrate Binding[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 412(3): 466-480.
- [16] Alazzeah A Y, Ibrahim S A, Song D, et al. Carbohydrate and protein sources influence the induction of α - and β -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*[J]. *Food Chemistry*, 2009(117): 654-659.
- [17] 万荣峰,王丽平,江善祥.两种低聚糖对乳酸菌体外增殖的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(19):3768-3770.
- [18] 武香玉,徐海燕,辛国芹,等.不同益生元对肠道菌群的影响[J].饲料博览,2013(5):5-8.