

低聚木糖对青春双歧杆菌的增殖

徐 勇 江 华 勇 强 余世袁 南京林业大学化学工程学院 210037

摘 要 通过体外严格厌氧培养技术,比较葡萄糖、木糖和定向酶解植物半纤维素制备的低聚木糖三种碳源增殖青春双歧杆菌的效果,检测了该低聚木糖的双歧因子作用。研究表明,该低聚木糖对青春双歧杆菌具有良好的增殖效果,青春双歧杆菌在优先利用木二糖和木三糖的同时可能会生成胞外酶,该酶可降解聚合度较高木四糖和木五糖使之转变为聚合度更小、更易为双歧杆菌的吸收代谢的低聚木糖和木糖。

关键词 低聚木糖 青春双歧杆菌 厌氧培养

Abstract In this paper, the effects of three carbon sources, namely, xylose and xylo-oligosaccharides, on the enzymatic selective hydrolysis of plant hemicelluloses, by the anaerobic culture of bifidobacterium adolescentis in vitro, and the ability to promote the proliferation of bifidobacteria were examined. It was shown that the home-made xylo-oligosaccharides were capable to support the growth of bifidobacterium adolescentis. It was found that the bifidobacterium adolescentis could metabolize xylobiose and xylotriose preferentially, and secrete extracellular enzymes, which were able to degrade the xylotetraose and xylopentose into the lower molecular weight xylo-oligosaccharides to be digested easily by bifidobacterium adolescentis.

Key words Xylo-oligosaccharides Bifidobacterium adolescentis Anaerobic culture

双歧杆菌是人体肠道中最重要的有益菌群,主要存在于人体的大肠,对人体具有多种保健作用,主要表现为^[1,2]:双歧杆菌可代谢产生醋酸和乳酸,降低肠道 pH 值,抑制腐败菌的生长;分解或利用致癌物,促进人体正常代谢;产生 B 族维生素,改善人体维生素的代谢;促进肠道蠕动,防止便秘;促进蛋白质的吸收,降低血清中的胆固醇;刺激人体免疫细胞,提高人体的免疫力等,因此,调整肠道的菌群结构使双歧菌等有益菌群处于优势状态,对于人体的健康及抗衰老具有重要的作用。

目前,人体双歧杆菌的增殖途径主要为口服活菌制剂和促使其在肠道自然增殖两种,相比而言,采用口服双歧因子使双歧杆菌在肠道中自然增殖远比口服活菌制剂安全、稳定、有效^[2]。在众多的双歧因子中,低聚木糖作为一种新兴的保健产品,凭借其低热值、难消化和对双歧杆菌的高选择性增殖效果等品质而倍受关注^[3]。本文采用定向酶水解法制得低聚木糖,并在体外严格厌氧条件下检测了该产品液对人体青春双歧杆菌的增殖效果,同时对青春双歧杆菌利用低聚木糖的机理进行了探讨。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

青春双歧杆菌(Bifidobacterium adolescentis),严格厌氧菌株,由中国食品发酵工业研究所工业微生物菌种保藏中心提供。

里氏木霉(Trichoderma reesei) Rut. C30,南京林业大学选育保存。

1.2 厌氧培养

1.2.1 种母活化:在 50ml 三角瓶中装入种子培养基并调节初始 pH7.0,121℃ 灭菌 25min 后趁热塞紧橡皮塞,转入 YQX-1 型厌氧培养箱中接入 BA 冻干粉,在 37±1℃ 条件下严格厌氧静置培养 30~36h。

1.2.2 种子培养基:蛋白胨 0.5%,胰胨 0.5%,牛肉浸膏 0.5%,酵母汁 1.0%,充分溶解于热蒸馏水,用定性滤纸滤除不溶物,加入葡萄糖 1.0%,CaCl₂ 0.0008%,MgSO₄ 0.001925%,KH₂PO₄ 0.004%,K₂HPO₄ 0.004%,NaHCO₃ 0.04%,NaCl 0.008%,煮沸驱氧后加入 L-半胱氨酸 0.05%,硫代乙醇酸钠 0.05%。

1.2.3 增殖培养:分装增殖培养基 9ml 至 10ml 具塞螺纹试管,121℃ 灭菌 25min 趁热旋紧螺盖并转入 YQX-1 型厌氧培养箱,接入 BA 种母液,接种量 10%,在 37±1℃ 条件下严格厌氧静置培养。

1.2.4 增殖培养基:以试验用碳源替换葡萄糖,其它成分同种子培养基。

1.3 测定方法

表1 低聚木糖液的组成

成分	木糖	木二糖	木三糖	木四糖	木五糖	NaSO ₄	重金属	其它	合计
色谱峰号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	-	-	-	-
占总固(%)	3.4	37.9	18.5	6.5	6.5	11.2	0	16.0	100.0
占总糖(%)	4.7	51.9	25.4	9.0	9.0	-	-	-	100.0

细菌浓度的测定：取青春双歧杆菌培养液 10ml 在 4000r/min 的条件下离心 30min，倾出上清液并存样分析，以无菌水洗涤沉淀物，重复上述操作 3 次，然后恒重沉淀物。

离心清液中总还原物的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸 (CNS) 法^[4]，采用稀酸水解法将低聚木糖降解为单糖后再以 DNS 测定还原糖、低聚木糖的浓度为：稀酸水解液中测得的木糖浓度 × 0.9；

离心清液中低聚木糖的测定采用高效液相色谱法。色谱仪：Waters HPLC 246-E；糖柱：Bio-Rad Aminex HPX-42A (Φ7.8 × 300mm)；保护柱：脱灰系统；流动相：高纯水，流速：0.6ml/min；柱温：85℃；检测器：差示折光检测器；

硫酸钠及其它金属离子的测定采用原子吸收光谱法。

2 结果与讨论

2.1 低聚木糖成分分析

采用里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) Rut C30 以植物半纤维素为碳源定向产木聚糖酶，所得酶液经纯化后定向酶解植物半纤维素得粗糖液，分离提纯粗糖液得到低聚木糖液，低聚木糖产品液的组成和高效液相色谱图如表 1 和图 1 所示。

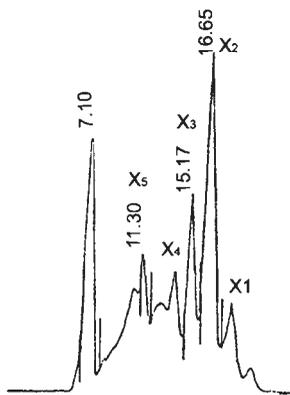


图1 低聚木糖液的高效液相色谱图

由表 1 和图 1 可知，酶法制备的低聚木糖液产品中，72.8% 的固形物为聚合度 1~5 的糖类物质，其中聚合度 2~5 的低聚木糖占总固形物的 69.4%，占总糖的 95.3%。在低聚木糖组分中又以木二糖和木三

糖为主，二者合计占总固形物的 56.4%，达总糖的 77.3%，木糖仅占总糖的 4.7%。因此，植物半纤维素经定向制备的低聚木糖酶定向酶解后分离提纯可得主要成份为木二糖和木三糖的低聚木糖产品，而木糖的含量却很低，因此本法达到了定向酶解植物半纤维制取低聚木糖的目的。

2.2 不同碳源对青春双歧杆菌的增殖效果

分别以葡萄糖、自制低聚木糖和木糖为碳源，自然 pH 条件下厌氧培养青春双歧杆菌，培养过程中各参数变化规律如图 2 所示。

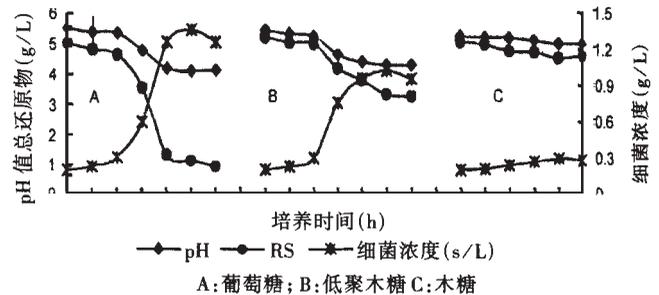


图2 碳源对青春双歧杆菌厌氧发酵的影响

由图 2 可见，在自然 pH 条件的培养中，单纯的木糖碳源几乎不能增殖青春双歧杆菌。葡萄糖和低聚木糖两种培养液 pH 值均呈明显下降，这说明二者在弱酸性条件下也可以使青春双歧杆菌发酵产酸，但葡萄糖培养基的增殖效果及产酸能力优于低聚木糖。

以 5.0g/L 葡萄糖为碳源培养时，接种后几乎没有停滞期，培养液的 pH 值和葡萄糖迅速下降，BA 浓度上升较快。培养至 30h，细菌浓度由接种时的 0.20g/L 增至最大值 1.37g/L，增加到 6.85 倍，葡萄糖浓度从 5.0g/L 降至 1.12g/L，耗糖率达到 77.5%。培养液的 pH 值降至 4.20，此时的 pH 条件已不利于青春双歧杆菌的培养，发酵进入衰亡期。

以酶法制取的低聚木糖为碳源进行培养时，青春双歧杆菌也能够快速增殖。培养至 30h，培养液的 pH 值降至最低点 4.30，其产酸能力与以葡萄糖为碳源的培养液相近。细菌浓度自 0.20g/L 增至最大值 1.03g/L，增加到 5.15 倍，略低于以葡萄糖为碳源的增殖作用，青春双歧杆菌对低聚木糖的消耗率仅为 39.0%，大大低于葡萄糖的消耗率 77.5%。这说明，少

量的低聚木糖就可对青春双歧杆菌产生良好的增殖效果。尽管葡萄糖对青春双歧杆菌等人体有益菌群的增殖效果良好,但由于青春双歧杆菌等双歧杆菌菌群主要定位于人体的大肠部位,淀粉类食物经人体口腔、胃和小肠等消化器官的消化吸收后,由之转化而来的葡萄糖却很难到达大肠部位。与之相比,低聚木糖几乎不为人体所消化吸收并且很难被体内的有害细菌所利用,因此酶法制备的低聚木糖可作为双歧因子直接增殖人体内的双歧杆菌。

2.3 青春双歧杆菌代谢低聚木糖的历程

人体大肠部位的 pH 条件为弱碱性^[5]。表 2 和图 3 为青春双歧杆菌在弱碱性条件下代谢低聚木糖过程中各参数随时间变化的规律。

表 2 弱碱性条件培养青春双歧杆菌过程中各参数的变化

培养时间 (h)	pH	细菌浓度 (g/L)	总还原物	
			浓度(g/L)	消耗率(%)
0	7.50	0.19	6.67	0
6	7.40	0.20	6.20	7.1
12	4.95	1.03	5.35	19.8
18	4.40	1.80	2.77	58.5
24	4.20	1.81	1.40	79.0
30	4.20	1.62	1.12	83.2

如表 2 和图 3 所示,在初始 pH7.50 的培养条件下,6.67g/L 的低聚木糖培养青春双歧杆菌至 24h,细菌浓度达到最大值 1.81g/L 增加到 9.53 倍,pH 降至 4.20,总糖耗率达 79.0%,其中低聚糖基本消耗完全,耗糖率达 98.5%。培养至 30h,低聚糖消耗完全,这说明本法制取的低聚木糖中的木二糖~木五糖等低聚木糖的利用,这完全符合低聚木糖作为双歧因子在人体大肠部位自然的增殖双歧杆菌的生理特点。

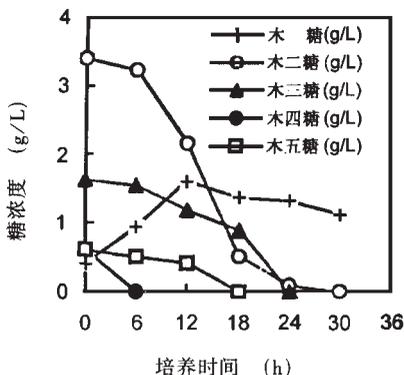


图 3 弱碱性条件下培养青春双歧杆菌过程中各糖组份随培养时间的变化

在培养过程中,培养液中的各低聚木糖组份的浓度均随培养时间的延长而下降,但不同组份的变化速

率却差异明显,其中木四糖浓度下降最快,至 6h 耗尽;木二糖次之,至木四糖耗尽后,木二糖浓度才迅速下降;木三糖和木五糖则消耗较慢。随着培养时间的延长,木糖浓度先上升至木四糖耗尽后再缓慢下降,但其终值仍高于初值,增加到 2.67 倍。

一般认为,低聚木糖类双歧因子以木二糖和木三糖等聚合度较小的物质为主^[6]。本研究表明,青春双歧杆菌对木四糖和木二糖的消耗速率较木三糖和木五糖更快,同时木糖的浓度在先表现为升高的趋势。这说明,在低聚木糖培养青春双歧杆菌的过程中,青春双歧杆菌在优先代谢木二糖和木三糖的同时会分泌出一些特殊的胞外酶(或酶系),该酶(或酶系)能够将木四糖和木五糖等聚合度较高的低聚糖降解为聚合度更小、更易代谢的木二糖或木三糖等,其中木四糖降解的速率较木五糖快,同时也生成副产物木糖。因此,培养过程中各糖组份的变化总体表现为:木四糖的消耗速率最快,木二糖次之,木三糖和木一糖消耗较慢。由于木糖不易利用,所以造成木糖的累积。在培养的后期,低聚木糖基本耗尽,青春双歧杆菌转而利用少量的木糖。

3 结论

3.1 采用定向产酶和定向酶解法以植物半纤维素为原料制取的低聚木糖产品中含有聚合度 2~5 的低聚木糖,其主要成分为木二糖和木三糖,达总糖的 77.3%。

3.2 酶法制备的低聚木糖产品可有效地增殖青春双歧杆菌,其中聚合度 2~5 的低聚木糖均为双歧因子,适宜于在人体大肠部位自然增殖人体肠道内双歧杆菌。

3.3 青春双歧杆菌在代谢低聚木糖的过程中优先利用木二糖和木三糖,同时可能会生成一些胞外酶(或酶系),该胞外酶(或酶系)可将聚合度较高的木四糖和木五糖降解为聚合度更小、更易为青春双歧杆菌所代谢的木二糖和木三糖,同时生成木糖。

参考文献

- 1 Poupard, J. A., et al. Bacteriol. Rev., 1973, 37: 136 ~ 165.
- 2 马延和,周培瑾. 浅谈寡糖的开发和利用. 食品与发酵工业, 1993, 1: 80 ~ 82.
- 3 陈瑞娟. 新型低聚糖介绍. 食品与发酵工业, 1993, 2: 82 ~ 90.
- 4 Miller, G. L. Anal. chem. 1959, 31(3): 426 ~ 428.
- 5 Lim, K. S. et al. J. Dairy Sci. 1993, 76: 2168.
- 6 郑建仙. 功能性食品甜味剂. 北京:中国轻工业出版社, 1995.