

复配魔芋寡糖/低聚异麦芽糖增殖嗜酸乳杆菌的协同增效研究

王凌, 谭莎莎, 宋蓉, 李斌

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430000)

摘要: 魔芋寡糖最近被认定为新食品原料, 具有良好的促进益生菌增殖作用, 但其生产成本较高, 妨碍商业应用。本研究利用成本较低的低聚异麦芽糖与魔芋寡糖进行复配, 考察复配低聚糖对嗜酸乳杆菌增殖的综合效果。分别以不同浓度及不同分子量魔芋寡糖、低聚异麦芽糖、不同比率魔芋寡糖/低聚异麦芽糖复合物为碳源, 进行嗜酸乳杆菌体外培养实验, 采用 OD 值、菌落总数和 pH 值来评价嗜酸乳杆菌增殖效果。结果: 低分子量魔芋寡糖增殖效果优于中高分子量魔芋寡糖, 魔芋寡糖和低聚异麦芽糖最适添加量为 2%。与添加单一低聚糖比较, 复配低聚糖在 1:1 比率下, 提高对嗜酸乳杆菌的增殖促进作用, 且减缓发酵液酸度下降。因此复配寡糖能够有效降低生产成本, 并且增强嗜酸乳杆菌增殖效果, 更加适用于食品中。

关键词: 魔芋寡糖; 低聚异麦芽糖; 嗜酸乳杆菌; 协同作用

文章编号: 1673-9078(2015)10-151-155

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.026

Synergistic Effect of Konjac Oligosaccharides/Isomalto-oligosaccharide Complex on the Growth of *Lactobacillus acidophilus*

WANG Ling, TAN Sha-sha, SONG Rong, LI Bin

(College of Food Science Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430000, China)

Abstract: Konjac oligosaccharides (KOS), a new food raw material, can promote probiotics proliferation, but its commercial application is restricted by its high cost. The present study aimed to prepare a complex of KOS and low-cost isomalto-oligosaccharide (IMO) to examine the synergistic effect of the complex on the growth of *Lactobacillus acidophilus*. Different concentrations and molecular weights of KOS and IMO as well as different ratios of KOS/IMO complexes were used as carbon sources to conduct the *in vitro* culture experiments of *L. acidophilus*. The effect on the *L. acidophilus* proliferation was evaluated by measuring the optical density (OD) value, the total number of colonies, and pH value. The results showed that the proliferative effect of low-molecular-weight KOS was better than those of medium- and high-molecular-weight KOS, and the optimum amounts of KOS and IMO addition were 2%. Compared with the addition of single oligosaccharides, addition of the KOS/IMO complex at a ratio of 1:1 enhanced the proliferation of *L. acidophilus* and reduced the acidity of the fermentation broth. Therefore, the KOS/IMO complex can effectively reduce the production cost, enhance the proliferation of *L. acidophilus*, and is more suitable for food production.

Key words: konjac oligosaccharides; isomalto-oligosaccharide; *Lactobacillus acidophilus*; synergistic effect

乳酸菌是一群能以可发酵性碳水化合物为底物产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的通称, 广泛存在于人、畜、禽肠道、许多食品、物料及少数临床样品中^[1]。大量研究表明, 乳酸菌能够调节机体胃肠道正常菌群、保持微生态平衡, 降低血清胆固醇, 控制内毒素, 抑制肠道内腐败菌生长繁殖和腐败产物的产生^[2], 其生理功能与机体的生命活动息息相关。然而, 乳酸

收稿日期: 2015-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31301451); 湖北省自然科学基金资助项目 (2013CFB197)

作者简介: 王凌, 副教授, 主要从事食品营养学与生物学研究

菌在人体数量差异性较大, 同时市面上许多益生元产品中乳酸菌含量不稳定且存活率较差, 鉴于此, 国内外学者就维持人体肠道乳酸菌正常数量和延长乳酸菌存活率做了大量工作, 其中, 向体内添加益生因子如低聚糖以促进益生菌增殖是研究较为成熟的一种方法^[3]。

低聚异麦芽糖是目前产量最大应用最广泛的低聚糖之一, 价格低廉, 已被应用于乳制品、保健品、焙烤食品、糖果等之中, 对于其增殖肠道有益菌的作用已经得到国内外研究证实, 但近年来研究发现, 低聚异麦芽糖能显著增加肠道发酵液酸度, 从而在发酵

后期抑制肠道有益菌的增殖,破坏肠道菌群平衡,作为益生元应用具有其局限性^[4-5]。魔芋寡糖 2014 年被卫生部认定为新食品原料,其具有一定的甜度,不被人体内消化道所消化,产能低,在促进肠道菌增殖,降低肠道乙酸产量方面具有较好效果,可以降低发酵液酸度^[6],减少有毒发酵产物及有害细菌酶的产生,增强机体的免疫力和抗氧化能力,降低血糖和血脂,在维护肠道健康、预防结肠癌、降低细胞毒性方面具有良好的效果,是目前低聚糖益生元研究的热点^[7-8]。低聚糖分子链段的长短影响细菌对其的利用,但是不同分子量魔芋寡糖对肠道菌增殖作用的相关研究尚未见报道,同时,魔芋寡糖生产成本较高,妨碍其商业应用。本文以肠道优势菌嗜酸乳杆菌为发酵菌种,研究高中低三种分子量和不同浓度的魔芋寡糖对乳杆菌的增殖效果,同时尝试将适宜分子量和浓度的魔芋寡糖与成本较低的低聚异麦芽糖进行复配,考察复配寡糖对嗜酸乳杆菌增殖的综合效果,以期找到最适的复配比例,在促进乳杆菌增殖的同时降低生产成本,为低聚异麦芽糖和魔芋寡糖的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种 嗜酸乳杆菌(130402LA, 1.5×10^{11} cfu/g),购自上海交大昂立股份有限公司。

寡糖材料 2000 u 魔芋寡糖、5000 u 魔芋寡糖、10000 u 魔芋寡糖,购自湖北天源协力魔芋生物科技有限公司;低聚异麦芽糖,购自河南盛之德商贸有限公司。

自配 MRS 培养基(g/L)蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,牛肉膏 10 g,硫酸锰 0.05 g,硫酸镁 0.2 g,磷酸氢二钾 2 g,吐温-80 1 mL,柠檬酸氢二铵 2 g,乙酸钠 5 g,蒸馏水 1000 mL,分别添加高中低三种分子量的魔芋寡糖和低聚异麦芽糖作为碳源,设置 1.0%、2.0%、3.0% 三个浓度梯度,调节 pH 至 7.0 ± 0.1 。在考察寡糖分子量和浓度对嗜酸乳杆菌增殖影响时,以未添加寡糖的 MRS 培养基和未添加碳源的自配 MRS 培养基作为空白对照^[9]。

商品 MRS 基础培养基,购自青岛海博药业。

1.2 实验方法

培养方法:无菌条件下,吸取活化后的嗜酸乳杆菌菌液按 1% 接种量分别加入含有不同寡糖样品的 MRS 培养基中,37 °C 厌氧培养,在 0 h、6 h、12 h、24 h 和 36 h 取各管发酵液测 OD 值、pH 值、菌落总

数等指标;

参数测定方法 OD 值测定:采用 UV-1100 型紫外分光光度计在 600 nm 的波长下进行测定;pH 值测定:用 PHS-3C 型酸度计测定;活菌数测定:平板计数法^[10]

嗜酸乳杆菌的数量表征方法:将活化后的嗜酸乳杆菌按 1% 接种量加入 MRS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养,每 3 h 取样测菌落总数和菌液 OD 值,以菌落总数和菌液 OD 值为纵坐标,时间为横坐标,绘制生长曲线。

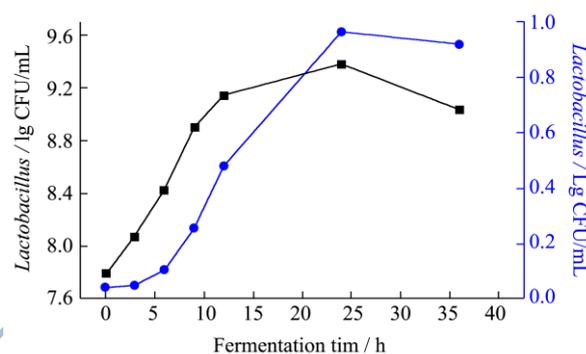


图1 嗜酸乳杆菌体外增殖曲线

Fig.1 Growth curve of *Lactobacillus acidophilus* in MRS broth

由图1可以看出,在0~24 h内,菌数与OD值变化趋势大体上一致,24 h后因菌体生长进入衰亡期,因衰亡菌体依然存在于培养液中,所以菌液OD值高于活菌计数结果。考虑到实验的方便性,后续实验在24 h之内的结果我们都以菌液OD值来表示。

数据分析:本试验的所有数据处理过程(包括平均值和标准差分析等)均应用 Microsoft Office Excel、origin6.0 和 SPSS16.0、Microsoft Office Word 软件进行数据处理和统计分析,结果为平均值±标准偏差,根据数据分析需要选择折线图、柱形图呈现。

2 结果与讨论

2.1 不同分子量的魔芋寡糖对嗜酸乳杆菌生长的影响

Chen H L 等研究表明较低聚合度(DP=5)的魔芋寡糖对嗜酸乳杆菌增殖的促进作用优于较高聚合度(DP=10)的魔芋寡糖,说明低聚糖分子链段越短,越利于细菌利用^[11]。本文从分子量方面对此进行了进一步研究,在 MRS 基础培养基中分别添加高、中、低三种分子量的魔芋寡糖,以未添加寡糖的 MRS 基础培养基为空白对照,37 °C 下培养数小时,在培养 0 h、12 h、24 h 时间点时测定嗜酸乳杆菌发酵液的 OD

值和 pH 值。综合图 2、图 3，发酵 24 h 后，添加了分子量 5000 和分子量 10000 的寡糖组中嗜酸乳杆菌菌数明显低于分子量 2000 的寡糖组，说明嗜酸乳杆菌不能利用中高分子量的寡糖进行大量增殖。分子量 2000 的寡糖组中嗜酸乳杆菌的生长适应期变短，发酵 12 h 时 OD 值为 1.85，细菌增殖幅度高于对照组值 0.75。发酵至 24 h 时 2000 分子量组的 OD 值增大到 2.02，均高于其他组，表明低分子量寡糖能为嗜酸乳杆菌的增殖提供能量，促进嗜酸乳杆菌大量增殖，延缓嗜酸乳杆菌衰亡过程。图 3 pH 曲线的变化趋势也和图 2 相一致。

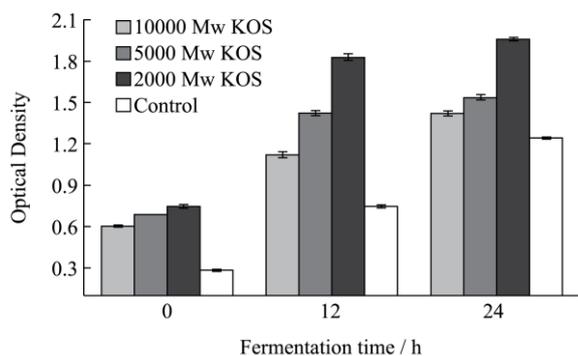


图 2 不同分子量魔芋寡糖对嗜酸乳杆菌发酵液 OD 的影响
Fig.2 Effect of different molecular weights of KOS on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

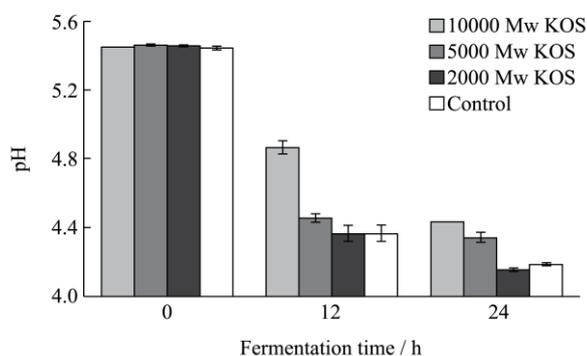


图 3 不同分子量魔芋寡糖对嗜酸乳杆菌发酵液 pH 的影响
Fig.3 Effect of different molecular weights of KOS on pH value of *Lactobacillus acidophilus*

2.2 不同浓度魔芋寡糖、低聚异麦芽糖对嗜酸乳杆菌体外增殖的影响

选择分子量 2000 的魔芋寡糖作为后续试验材料，在 MRS 基础培养基中分别添加浓度 1.0%、2.0%、3.0% 的魔芋寡糖，以及 1.0%、2.0%、3.0% 的低聚异麦芽糖，以未添加寡糖的 MRS 基础培养基为空白对照组，37 °C 下培养数小时，取发酵 0 h、12 h、24 h 时的细菌发酵液测其 OD 值和 pH 值。

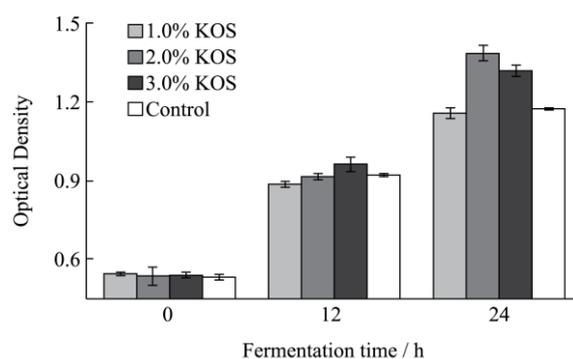


图 4 不同浓度魔芋寡糖对嗜酸乳杆菌体外增殖的影响
Fig.4 Effect of different concentrations of KOS on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

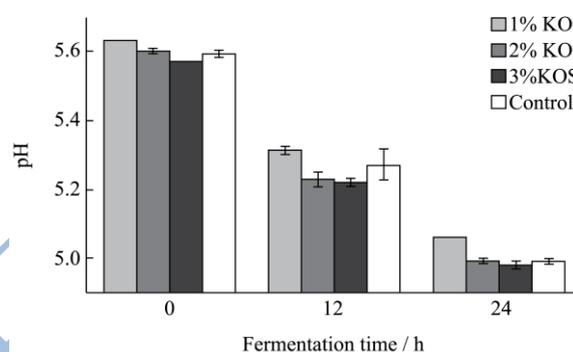


图 5 不同浓度魔芋寡糖对嗜酸乳杆菌发酵液 pH 值的影响
Fig.5 Effect of different concentrations of KOS on the pH value of *Lactobacillus acidophilus* broth

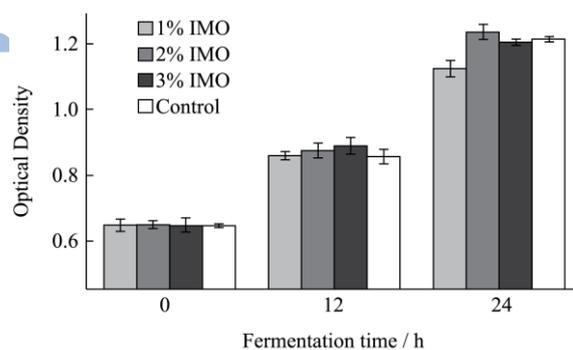


图 6 不同浓度低聚异麦芽糖对嗜酸乳杆菌体外增殖的影响
Fig.6 Effect of different concentrations of IMO on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

在如图 4 所示，在发酵 24 h 时，1.0% 魔芋寡糖组中嗜酸乳杆菌的 OD 值低于对照组，其原因可能主要是添加的寡糖浓度不足以支撑嗜酸乳杆菌的生长增殖。2.0% 和 3.0% 魔芋寡糖组 OD 值高于对照组，表明这两个浓度的魔芋寡糖能很好地作为碳源为嗜酸乳杆菌的增殖起到促进作用，由此说明一定浓度的魔芋寡糖可以作为益生菌增殖的碳源。而对于低聚异麦芽糖也有研究证实，当其浓度较低时，由于碳源不足，并不能促进双歧杆菌、乳酸菌的增殖^[12]，这与本实验结

果相似。同时本研究发现当低聚异麦芽糖浓度为3.0%时,对嗜酸乳杆菌的增殖作用低于对照组,说明较高浓度的低聚异麦芽糖也会抑制嗜酸乳杆菌增殖(见图6)。综合考虑对嗜酸乳杆菌的增殖效果和经济因素,魔芋寡糖和低聚异麦芽糖促进嗜酸乳杆菌增殖的最适浓度均为2.0%。

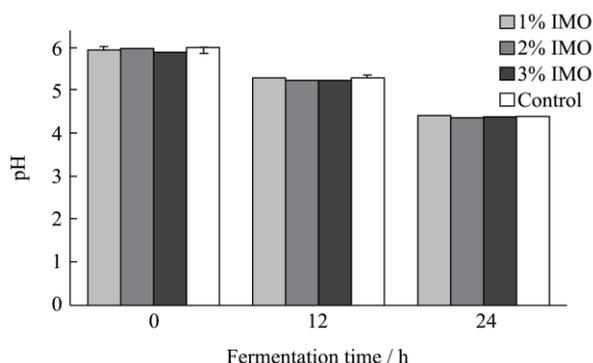


图7 不同浓度低聚异麦芽糖对嗜酸乳杆菌发酵液 pH 值的影响
Fig.7 Effect of different concentrations of IMO on the pH value of *Lactobacillus acidophilus* broth

2.3 复合低聚糖对嗜酸乳杆菌体外增殖的影响

经筛选得到低聚异麦芽糖和低分子量魔芋寡糖在浓度2.0%时增殖效果最好,为了进一步研究低聚异麦芽糖和魔芋寡糖复配对嗜酸乳杆菌增殖的影响,因此选择去除葡萄糖的自配MRS培养基,添加2.0%的低聚异麦芽糖、低分子量魔芋寡糖和魔芋寡糖/低聚异麦芽糖(1:1)、魔芋寡糖/低聚异麦芽糖(3:2)、魔芋寡糖/低聚异麦芽糖(2:3)作为碳源,同时以未添加碳源的自配MRS基础培养基为空白对照组,37℃下培养数小时,在不同时间测定嗜酸乳杆菌菌数和pH值,结果如图8、图9。

综合图8、图9,复配寡糖组在发酵12h和24h后菌数增长明显高于单一寡糖组,1:1复配组的嗜酸乳杆菌菌数高于其他复配组。单一添加组中,在培养初始时,添加低聚异麦芽糖对嗜酸乳杆菌的增殖效果优于魔芋寡糖,但在发酵24h后添加低聚异麦芽糖的发酵液中菌数开始减少;对发酵液酸度进行研究,发现嗜酸乳杆菌代谢产生乳酸、乙酸等酸性物质,降低发酵液酸度,而发酵液酸度降低,使嗜酸乳杆菌生长受抑制。图9表明,发酵24h后,添加低聚异麦芽糖的发酵液酸度明显大于复配组和魔芋寡糖组,这也是低聚异麦芽糖在发酵24h时细菌生长受抑制的原因;而添加魔芋寡糖的发酵液酸度变化较小,产酸量小于低聚异麦芽糖。WT Wu、HL Chen等对肠道菌群利用

魔芋寡糖发酵产生短链脂肪酸机制的研究表明,魔芋寡糖在产丙酸、丁酸具有优势,而乙酸产量相对较小,添加适当魔芋寡糖有利于降低发酵液酸度^[13-14]。综合以上,魔芋寡糖与低聚异麦芽糖复配能够在促进肠道益生菌如嗜酸乳杆菌增殖的同时,降低发酵液酸度,延缓菌体衰亡,其中以低聚异麦芽糖与魔芋寡糖比例为1:1时嗜酸乳杆菌增殖效果最佳,酸度降低也较小,是较好的复合益生元添加物。

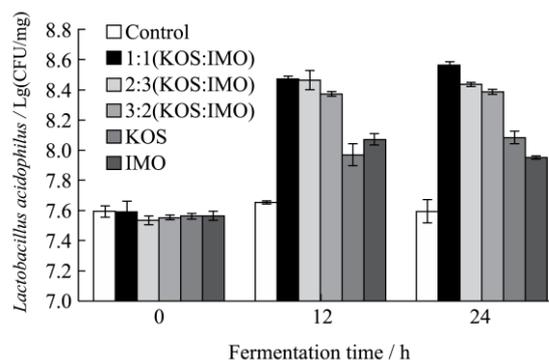


图8 魔芋寡糖/低聚异麦芽糖复合糖对嗜酸乳杆菌菌数的影响
Fig.8 Effects of KOS/IMO complex oligosaccharides on the growth of *Lactobacillus acidophilus*

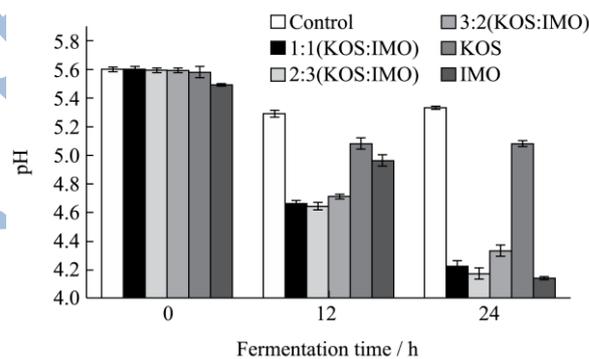


图9 魔芋寡糖/低聚异麦芽糖复合糖对嗜酸乳杆菌发酵液 pH 的影响
Fig.9 Effects of KOS/IMO complex oligosaccharides on the pH value of *Lactobacillus acidophilus* broth

3 结论

3.1 研究结果表明,无论是单一魔芋寡糖、低聚异麦芽糖,还是魔芋寡糖/低聚异麦芽糖复合物,都对嗜酸乳杆菌有明显的增殖作用。

3.2 对比低聚异麦芽糖,添加魔芋寡糖在发酵24h后促进嗜酸乳杆菌增殖的作用优于低聚异麦芽糖,说明魔芋寡糖在发酵后期可以更好地促进嗜酸乳杆菌增殖,同时添加魔芋寡糖的发酵液酸度下降速率低于添加低聚异麦芽糖的发酵液。魔芋寡糖分子量和添加量影响嗜酸乳杆菌增殖效果,表现为较小的分子量(分子量小于2000)和适宜的浓度(2.0%)更易于嗜酸乳

杆菌利用,浓度较小时嗜酸乳杆菌因碳源不足生长受抑制。

3.3 复配寡糖对嗜酸乳杆菌增殖效果优于单一寡糖。添加低聚异麦芽糖在发酵前期促进嗜酸乳杆菌增殖效果明显,有利于缩短细菌生长适应期;而魔芋寡糖在产丙酸、丁酸具有优势,乙酸产量相对较小,因此魔芋寡糖的添加帮助减少乳酸等酸性物质的产生,能够较好地降低肠道酸度,促进肠道益生菌如嗜酸乳杆菌、双歧杆菌增殖。魔芋寡糖与低聚异麦芽糖复配则能够在促进肠道益生菌如嗜酸乳杆菌增殖的同时,有效地降低发酵液酸度,延缓菌体进入衰亡期,其中以低聚异麦芽糖与魔芋寡糖比例为 1:1 时对嗜酸乳杆菌增殖效果最佳,酸度降低也较小,因此复配低聚异麦芽糖和魔芋寡糖在增殖益生菌方面有更好表现,同时有效降低成本,其在商业应用方面有很大价值。

参考文献

- [1] 乳酸菌:生物学基础及应用[M].中国轻工业出版社,1996
Lactic Acid Bacteria: Biological Basis and Application [M]. China Light Industry Press, 1996
- [2] 沈定树,郑静.益生元与肠道微生态[J].中国微生态学杂志,2013,25(6):742-744
SHEN Ding-shu, ZHENG Jing. Prebiotics and intestinal micro ecology [J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(6):742-744
- [3] 杨远志,李发财,庞明利,等.益生菌和益生元在功能性食品中的应用现状及展望[J].中国食品添加剂, 2009,6:187-192
YANG Yuan-zhi, LI Fa-cai, PANG Ming-li, et al. The application status and prospects of probiotics and prebiotics in functional food [J]. China Food Additives, 2009, 6: 187-192
- [4] 舒国伟,胡曼,陈合,等.3 种低聚糖对两歧双歧杆菌 BB03 生长的影响[J].中国酿造,2011,2:88-89
SHU Guo-wei, HU Man, CHEN He, et al. Three kinds of oligosaccharides on the influence of the growth of bifidobacteria BB03 [J]. China Brewing, 2011, 2: 88-89
- [5] Zhao Guohua, Liu Jing-Fu, Nyman Margareta, et al. Determination of short - chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography [J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2007, 846(1-2): 202-208
- [6] Hara H, Haga S, Aoyama Y, et al. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine [J]. The Journal of Nutrition, 1999, 129(5): 942-948
- [7] Al-Ghazzewi Farage H, Tester Richard F. Efficacy of cellulase and mannanase hydrolysates of konjac glucomannan to promote the growth of lactic acid bacteria [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(11): 2394-2396
- [8] 冉域辰.金银花水提物对双歧杆菌、乳酸杆菌的作用[D].重庆医科大学,2005
RAN Yu-chen. Honeysuckle Extract on the effect of bifidobacterium and *Lactobacillus* [D]. Chongqing Medical University, 2005
- [9] Melinda ChuaKelvin Chan, Trevor J HockingPeter A Williams, Christopher J Perry Timothy C Baldwin. Methodologies for the extraction and analysis of konjac glucomannan from corms of *Amorphophallus konjac* K.Koch [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(3): 2202-2210
- [10] 肖仔君,陈惠音,杨汝德.复合低聚糖对短双歧杆菌增殖作用的初步研究[J].食品工业科技,2005,7:102-103
XIAO Zai-jun, CHEN Hui-yin, YANG Ru-de. Preliminary Study of the Effect of Adding the Compound Oligosaccharides on Short Bifidobacterium Proliferation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2005, 7: 102-103
- [11] Chen Hsiao-Ling, Cheng Han-Chung, Liu Yann-Jiu, et al. Konjac acts as a natural laxative by increasing stool bulk and improving colonic ecology in healthy adults [J]. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 2006, 22(11-12): 1112-1119
- [12] 连晓蔚,彭喜春.不同肠道菌群利用低聚异麦芽糖体外发酵产短链脂肪酸的初步研究[J].食品与发酵工业,2011, 37(6): 39-41
LIAN Xiao-wei, PENG Xi-chun. The preliminary study on different gut bacteria using isomaltooligosaccharide *in vitro* fermentation to produce short chain fatty acids [J]. Food and Fermentation Industry, 2011, 37 (6) : 39-41
- [13] Wu Wen-Tzu, Cheng Han-Chung, Chen Hsiao-Ling. Ameliorative effects of konjac glucomannan on human faecal β -glucuronidase activity, secondary bile acid levels and faecal water toxicity towards Caco-2 cells [J]. The British journal of nutrition, 2011, 105(4):593-600
- [14] Chen Hsiao-Ling, Sheu Wayne Huey-Herng, Tai Tsai-Sung, et al. Konjac supplement alleviated hypercholesterolemia and hyperglycemia in type 2 diabetic subjects--a randomized double-blind trial [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2003, 22(1):36-42