

海藻糖和透明质酸对长双歧杆菌的保护作用

张玉华^{1,2}, 籍保平^{1,*}, 凌沛学^{1,3}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 山东商业职业技术学院, 山东 济南 250013; 3. 山东省生物药物研究院博士后科研工作站, 山东 济南 250108)

摘 要: 根据长双歧杆菌存活率、产酸力、形态、生长曲线和 -D- 半乳糖苷酶泄漏率, 研究了海藻糖、乳糖、蔗糖、透明质酸、海藻糖和透明质酸组合以及脱脂乳粉对长双歧杆菌的保护作用。在长双歧杆菌冷冻干燥和高温贮存过程中, 各种保护剂均显示了不同程度的保护作用, 其中海藻糖和透明质酸组合物的作用最佳。

关键词: 海藻糖; 透明质酸; 长双歧杆菌; 保护作用

Protective Effects of Trehalose and Hyaluronic Acid on *Bifidobacterium Longum*

ZHANG Yu-hua^{1,2}, JI Bao-ping^{1,*}, LING Pei-xue^{1,3}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Shandong Institute of Commerce and Technology, Jinan 250013, China; 3. Working Station for Postdoctoral Scientific Research, Institute of Biopharmaceuticals of Shandong Province, Jinan 250108, China)

Abstract: According to the survival rate, acid-produced capacity, configuration, growth curve and leakage rate of -D-galactosidase (GAL), the protective effects of trehalose, lactose, sucrose, hyaluronic acid (HA), the combination of trehalose and HA and skim milk powder on *Bifidobacterium Longum* (*B. Longum*) were investigated. The protective effects on *B. Longum* was conferred by all the protectants with different degrees during lyophilization and high-temperature storage, among which the combination of trehalose and HA was the most effective.

Key words: trehalose; hyaluronic acid; *Bifidobacterium Longum*; protective effects

中图分类号: 0939.97

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)11-0053-05

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是人和动物肠道中的重要微生物, 具有调节微生态平衡^[1]、抑制致病菌和腐败菌、提供营养、增强免疫力^[2]、抗肿瘤和抗衰老等生理功能^[3]。正常人体内双歧杆菌等有益菌为优势菌群, 当机体健康状况发生变化时, 如衰老、创伤、放化疗、大量服用抗生素等, 易使肠道微生态平衡系统遭到破坏, 双歧杆菌等有益菌群处于劣势, 导致肠道功能减退, 诱发内源感染, 造成机体病变^[4]。通过补充外源性双歧杆菌制剂, 使其在肠道定植, 有利于改善微生态平衡, 促进机体健康。然而, 双歧杆菌为专性厌氧菌, 对营养要求苛刻, 抗性差, 液体条件下难以长期保存。通过冷冻干燥将其制成双歧杆菌活菌制剂, 是目前延长活菌保存期的重要途径之一, 但冷冻干燥损伤微生物细胞, 降低其活力。研究表明, 冻干过程中添加有效的保护剂能够提高菌体存活率、延长存活期^[5], 因此寻求有效的保护剂是解决这一问题的技术关键。本

文就冷冻干燥对长双歧杆菌的破坏作用以及海藻糖和透明质酸(hyaluronic acid, HA)的保护作用进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

长双歧杆菌(*B. Longum*, CICC 编号: 6068) 中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 试剂

海藻糖(纯度 > 99%) 日本林原商事株式会社; 透明质酸($M_r=2.0 \times 10^6$) 山东福瑞达生物化工有限公司; 邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG) Amresco 公司; 乳糖、蔗糖等试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

收稿日期: 2006-08-14

*通讯作者

作者简介: 张玉华(1973-), 女, 博士研究生, 研究方向为功能食品。

119[#] 培养基。

1.1.4 仪器

YQX-II 厌氧培养箱 上海市新苗医疗器械有限公司; Agilent 8453 紫外-可见分光光度计 德国 Agilent 科技公司; FreeZone 6L 冷冻干燥机 美国 Labconco 公司; Sigma3K30 高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司; S-520 扫描电子显微镜 日本 HITACHI 公司; Delta 320 pH 计 Mettler Toledo 公司。

1.2 方法

1.2.1 保护剂溶液制备

保护剂溶液均用 10mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液配制, 海藻糖、乳糖、蔗糖、脱脂乳粉的浓度均为 10%, HA 组浓度为 0.4%, 海藻糖+HA 组二者浓度分别为 10% 和 0.2%。保护剂溶液均采用 0.2 μ m 无菌微孔滤膜过滤除菌。分别将上述缓冲液和蒸馏水经 121 $^{\circ}$ C, 20min 灭菌后为对照。

1.2.2 冻干菌粉制备

菌种活化 接种液体培养基 37 $^{\circ}$ C 恒温厌氧培养 20h 1 \times 9000 g 离心 10min 收集菌体 湿菌体与保护剂溶液混和均匀, 得菌悬液 分装于 2ml 安瓿 冷冻干燥 干菌粉 安瓿充 N₂ 并熔封。

1.2.3 冷冻干燥

取菌悬液 0.5ml 分装于 2ml 无菌安瓿内, 管口塞灭菌脱脂棉以防止杂菌落入。先预冻, 再置于真空冷冻干燥机内冷冻干燥(真空度约 6.9Pa, 隔板温度约 -50 $^{\circ}$ C) 约 48h。用无菌蒸馏水将冻干菌粉定量水化后测定活菌数和产酸力。

1.2.4 菌体存活率和产酸力测定

菌体存活率: 平板菌落计数法。菌液采用 10 倍递增稀释, 将适当浓度稀释液均匀涂布于固体培养基, 每个稀释度做 4 个重复, 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 20h 后菌落计数。菌体存活率 = 处理后单位体积活菌数 / 处理前单位体积活菌数 \times 100%。

菌体产酸力: 以培养一定时间后发酵液 pH 值表示, pH 值用 pH 计测定。

1.2.5 冻干菌粉贮存稳定性实验

将盛有冻干菌粉的安瓿置 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内, 定期取出用无菌蒸馏水将冻干菌粉定量水化后测定活菌数和产酸力。

1.2.6 冻干菌体扫描电镜观察

用胶带将冻干菌粉固定于扫描电镜样品台上, 表面喷金, 扫描电镜观察菌体形态特征并拍摄照片。

1.2.7 生长曲线测定

将长双歧杆菌的菌悬液以 5% 的比例接种, 37

厌氧培养, 间隔一定时间取样一次, 取出的样品放冰箱中保存, 最后一起比浊测定。以未接种的液体培养基为空白对照, 从低浓度的菌悬液开始, 依次测定 600nm OD 值^[6]。以菌悬液 OD 值为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘出长双歧杆菌加缓冲液组和以海藻糖+HA 为保护剂组冻干前后的生长曲线。

1.2.8 -D- 半乳糖苷酶活力^[7]测定

以 ONPG 为酶作用底物, 生成有色产物邻硝基苯(ONP), 通过比色法测定。

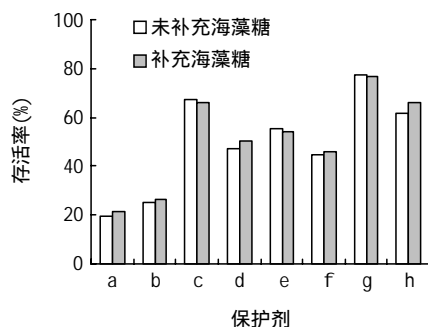
ONP 标准曲线绘制: 取 6 支试管分别加入 200 μ g/ml ONP 溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml, 用 pH7.0 磷酸盐缓冲液补足 1ml, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 然后分别加入 0.5mol/L 的冷 Na₂CO₃ 溶液 1.5ml 终止反应, 以第一个管为空白, 测定 420nm 处的 OD 值, 重复 3~4 次, 取平均值。以 ONP μ g 数为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线。

无细胞提取液制备: 取 3ml 细胞悬浊液, 1 \times 9000 g 离心 10min, 上清液用于测定酶活力。通透性细胞悬液制备: 取 3ml 同上细胞悬浊液, 加 0.1ml 甲苯-丙酮(1:9)混合液, 25 $^{\circ}$ C 用力振荡 5min, 磷酸盐缓冲液将其适当稀释后测酶活力。

酶活力测定方法: 取 0.5ml 待测样品液, 加 1.5ml 用磷酸盐缓冲液(0.05mol/L, pH7.0)配制的 0.005mol/L ONPG, 37 $^{\circ}$ C 反应 10min, 加入 0.5mol/L 的冷 Na₂CO₃ 溶液 1.5ml 终止反应, 于 420nm 处测定 OD 值。根据标准曲线确定 ONPG 释放的 ONP 的 μ mol 数。-D- 半乳糖苷酶活力定义为: 1ml 反应液中每 min 释放的 ONP 的 μ mol 数。-D- 半乳糖苷酶泄漏率 = 上清液中酶活力 / 通透性细胞液中酶活力 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 冷冻干燥对菌体的影响以及海藻糖和 HA 的保护作用



a- 无菌水组, b- 缓冲液组, c- 海藻糖组, d- 乳糖组, e- 蔗糖组, f- HA 组, g- 海藻糖+HA 组, h- 脱脂乳粉。

图1 冻干长双歧杆菌存活率

Fig.1 Survival rate of lyophilized *B. longum*

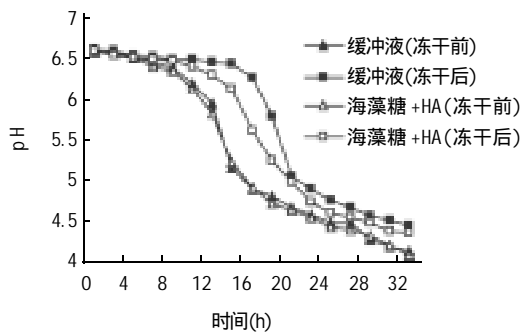


图2 冻干前后长双歧杆菌发酵液 pH 值变化

Fig.2 pH changes of zymotic fluid of *B. longum* prior to and after lyophilization

冷冻干燥对菌体存活率和产酸力产生影响,冻干前将菌体悬浮于保护剂溶液中,能够提高其存活率和产酸能力。实验所用的单一保护剂中,海藻糖的作用最显著,HA 的作用低于其他双糖组,将海藻糖和 HA 组合用于冻干保护剂时其作用高于其他各组。

研究表明,海藻糖可以作为碳源被细菌利用。为了考察由于菌体对海藻糖的利用使其增殖还是冻干过程中海藻糖发挥的保护作用,在冻干前后菌落计数时,菌悬液中无海藻糖的各组均补充适量海藻糖,使其含量与海藻糖组和海藻糖+HA 两组相同。结果表明,补充海藻糖后菌体存活率与未补充无明显差异。从而说明海藻糖组和海藻糖+HA 组冻干后菌体较高的存活率和产酸力主要是由于海藻糖和 HA 对菌体的保护作用,而不是海藻糖被菌体利用的结果。

2.2 冻干菌粉贮存稳定性

冻干菌粉在 37℃ 贮存期间存活率逐步降低,无菌水和缓冲液组分别于 30d 和 50d 后无活菌检出,加保护剂各组的存活率均显著提高,贮存期延长。海藻糖和 HA 复配组存活率高于二者单独使用,且二者具有协同作用。

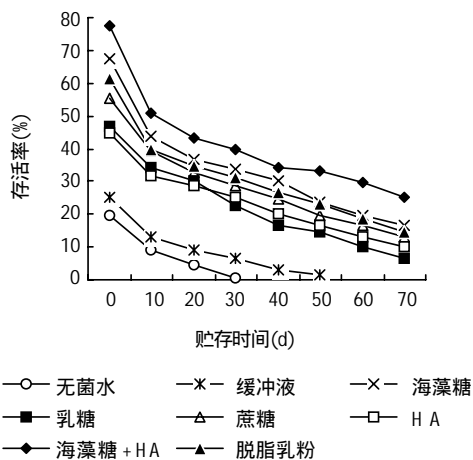
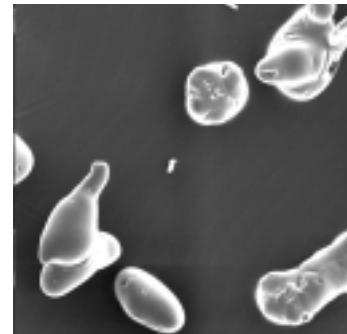


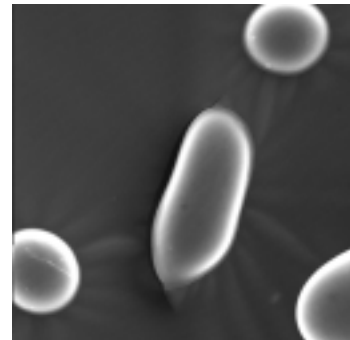
图3 冻干长双歧杆菌 37℃ 贮存期间存活率变化

Fig.3 Survival rate of lyophilized *B. longum* during storage at 37℃

2.3 扫描电镜观察冻干菌体形态特征

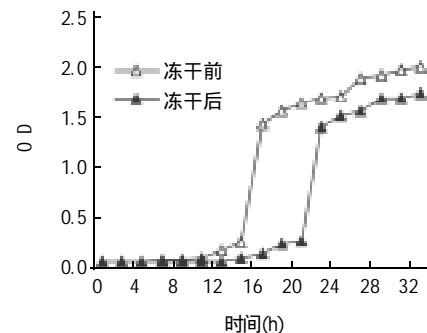


A- 缓冲液

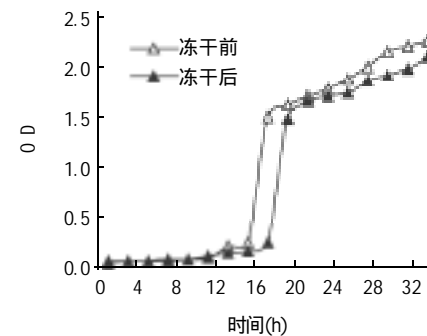


B- 海藻糖+HA

图4 冻干长双歧杆菌扫描电镜照片

Fig.4 Scanning electron microscope photos of lyophilized *B. longum*

A- 缓冲液



B- 海藻糖+HA

图5 长双歧杆菌冻干前后生长曲线

Fig.5 Growth curve of *B. longum* prior to and after lyophilization

由扫描电镜照片可见,加海藻糖和HA组冻干后菌体细胞表面圆滑、饱满,无保护剂组细胞表面皱缩、变形。

2.4 冷冻干燥对长双歧杆菌生长繁殖的影响

为了考察冻干对长双歧杆菌生长繁殖的影响以及保护剂的作用,测定了加缓冲液组和海藻糖与HA组合物在冻干前后菌体的生长曲线。结果表明,冷冻干燥能够阻碍长双歧杆菌的生长繁殖,使停滞期延长,对数期滞后,菌悬液吸光值降低。但冻干对两组的影响程度不同,对海藻糖+HA组的影响比缓冲液组小,说明冻干过程中海藻糖和HA保护长双歧杆菌,降低了冷冻干燥对菌体生长繁殖的影响。

2.5 冷冻干燥对长双歧杆菌细胞膜的破坏以及保护剂的作用

以OD值对ONP含量进行回归分析,得回归方程为: $Y=0.55704X+0.002186$, $r=0.9998949$ 。

根据该回归方程计算得到冻干前后长双歧杆菌-D-半乳糖苷酶泄漏率,如表1所示。

表1 冻干前后长双歧杆菌-D-半乳糖苷酶泄漏率
Table 1 Leakage rate of GAL of *B. longum* prior to and after lyophilization

组别	冻干前(%)	冻干后(%)
无菌水	0.105	15.87
缓冲液	0.168	14.92
海藻糖	0.316	8.21
乳糖	0.197	8.69
蔗糖	0.619	7.49
HA	0.125	9.67
海藻糖+HA	0.149	7.98
脱脂乳粉	0.473	7.32

冻干-再水化过程易引起菌体细胞膜融合、相变和侧相分离等物理状态的变化,从而导致膜渗透性增加,内容物泄漏^[8]。膜渗透性的变化可以通过-D-半乳糖苷酶的泄漏率来反映,-D-半乳糖苷酶是普遍存在于各种双歧杆菌体内的一种乳糖分解酶,Desjardins等^[9]发现该酶与细胞膜相连。冻干-再水化导致长双歧杆菌胞内-D-半乳糖苷酶泄漏增加,说明该过程对细胞膜有破坏作用,使其渗透性增加,实验中的几种添加剂具有保护细胞膜的作用。

3 结论

微生物冻干过程中存在多种应力^[10]。这些应力是导致其死亡的因素,通常包括以下几个方面:冷冻过程中水结冰时体积增大以及冰晶的机械作用,易破坏胞内蛋白质活性部位一些弱的化学键;水结冰后溶质浓度增加、离子强度增加、pH值变化、相分离;干燥过程

中大部分与蛋白质、磷脂等生物大分子结合的水分子被除去,易导致蛋白质分子变性失活,细胞膜结构、功能改变,Li evense等^[11]认为冷冻干燥对微生物细胞膜的破坏是导致其死亡的主要原因。

大量研究表明^[12],海藻糖具有稳定生物膜和蛋白质结构、抗逆保鲜的作用,并且该作用优于其它糖类,本研究结果与之相符,实验所用的单一保护剂中海藻糖的作用最显著。然而,单一保护剂不能满足菌体抵抗外界恶劣环境的条件,以海藻糖和HA复配的保护剂效果最佳,这是由于二者具有协同作用:海藻糖能够渗透到细胞内部,并填充在蛋白质等活性大分子周围,当干燥失水后,海藻糖的羟基可与生物分子的极性基团形成氢键,代替极性基团周围失去的水分子,从而维持蛋白质结构的稳定性^[12]。海藻糖与生物膜磷脂极性基团之间的氢键结合可以阻止脱水导致的膜之间彼此靠近,从而抑制膜融合。糖与膜脂的直接相互作用使得膜脂脱水后主相变温度变化不大,低于操作温度,这样膜脂始终处于液晶相,从而避免了脱水-再水化过程中的相变以及由此导致的膜内容物的泄漏。另外,脱水后海藻糖在生物分子周围形成玻璃态,处于玻璃态的糖类黏度较高,分子扩散系数低,因此包在糖玻璃体内部的生物分子的链段运动受阻,分子的伸展和聚集受到抑制,从而维持其三维结构的稳定^[13,14];HA为高分子化合物,玻璃化温度(T_g)高,能够在细胞表面形成稳定的玻璃态,并赋予冻干细胞体系较高的 T_g 。这样,细胞内外均存在保护作用,稳定性增强。

参考文献:

- [1] 叶红,杨隽,叶于薇,等.益生菌制剂改善胃肠道功能的动物试验研究[J].中国微生态学杂志,2001,13(1):19-21.
- [2] 周正任,姚振宇,杨晓临,等.口服短双歧杆菌活菌制剂对机体免疫功能的增强效应[J].微生物学杂志,1998,18(4):5-8.
- [3] 刘吉成,刘伯阳,王惠艳.双歧杆菌的生理作用及开发前景[J].中国微生态学杂志,2004,16(4):250-251.
- [4] 田洪涛,张柏林,贾英民,等.双歧杆菌与人体胃肠道微生态[J].河北农业大学学报,2000,23(4):83-88.
- [5] Berny JF, Henneberg GL. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates[J]. Mycologia, 1991, 83: 805-815.
- [6] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].高等教育出版社,1981.97-99.
- [7] Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying[J]. J Appl Microbiol, 1997, 82: 87-94.
- [8] Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, et al. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state[J]. Cryobiology, 2001, 43: 89-105.
- [9] Desjardins ML, Roy D. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles[J]. Dairy Sci, 1990, 73: 299-307.
- [10] Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals

亚微米 - 胡萝卜素乳状液粒径分布及其稳定性研究

程建斌¹, 王大红^{1,2}, 潘思轶^{2,*}

(1. 武汉星辰现代生物工程有限公司, 湖北 武汉 430074;

2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用激光粒径分析仪研究了亚微米 - 胡萝卜素乳状液的粒径分布及其稳定性。研究结果表明, 亚微米 - 胡萝卜素乳状液粒径细小且分布均匀, 其粒径范围在 0.0507 ~ 0.3393 μm 之间, 平均粒径 0.1420 μm 。亚微米 - 胡萝卜素乳状液放置 6 个月, 粒径大小与分布无显著性变化, 说明其相当稳定。

关键词: 亚微米; - 胡萝卜素; 乳状液; 粒径大小与分布; 稳定性

Study of the Particle Distribution and Stability of Submicron -carotene Emulsion

CHENG Jian-bin¹, WANG Da-hong^{1,2}, PAN Si-yi^{2,*}

(1. Wuhan Stars Modern Bioengineering Co. Ltd, Wuhan 430070, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The particle size, distribution and stability of submicron -carotene emulsion were studied with the laser granulometry analyzer. The results showed that the diameter of submicron -carotene emulsion is minuteness and the distribution is very uniformity. The range of particle size is 0.0507 μm to 0.3393 μm and the average size is 0.1420 μm . After the observation in 6 months, the remarkable change of the particle size and distribution of submicron -carotene emulsion did not arise. It was quite stable.

Key words: submicron; -carotene; emulsion; particle size and distribution; stability

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)11-0057-03

- 胡萝卜素是自然界普遍存在也是最稳定的天然色素之一。现代研究表明, - 胡萝卜素不仅是安全的天然食品着色剂, 而且具有多种生理功能, 如具有强烈的抗氧化功能, 能有效地捕获和清除体内的自由基, 是动物 V A 的主要来源, 对动物的生长发育有重要的作用, 尤其对其繁殖力影响很大^[1]。 - 胡萝卜素作为食品添加剂和营养补充剂已被联合国粮农组织 (FAO) 和世界

卫生组织 (WHO) 食品添加剂联合专家委员会推荐, 被认定为 A 类优秀营养色素, 并在世界 52 个国家和地区获准应用^[2]。近年来, 随着科学研究的深入以及人们生活水平的提高, 天然 - 胡萝卜素的保健功能被逐渐认识和发现, 其应用领域也从食品着色逐步扩大到营养食品、保健品及药品三大领域^[3]。

由于 - 胡萝卜素是油溶性色素, 不溶于水, 对光

收稿日期: 2005-10-18

*通讯作者

基金项目: 国家级火炬计划项目 (98D231D7610465); 国家重点科技攻关计划项目 (96-C03-01-08)

作者简介: 程建斌 (1965-), 男, 高级工程师, 研究方向为生物技术与食品加工。

[J]. Int J Pharm, 2000, 203(1-2): 1-60.

[11] Lievense L C, Verbeek M A M, Noomen A, et al. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 41: 90-94.

[12] Lopez-diez E C, Boneb B. The interaction of trypsin with trehalose: an investigation of protein preservation mechanisms [J]. Biochim Biophys

Acta, 2004, 1673(6): 139-148.

[13] Crowe J H, Carpenter J F, Crowe L M. The role of vitrification in anhydrobiosis [J]. Annu Rev Physiol, 1998, 60: 73-103.

[14] GREEN J L, ANGELL C A. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly [J]. J Phys Chem, 1989, 93: 2880-2882.