

耐氧双歧杆菌生长代谢过程的研究

吴拥军 王嘉福 蔡金腾 罗敏 贵州大学生物技术学院食品科学系 贵阳 550025

摘 要 研究了耐氧双歧杆菌在 GAM 和 PTYG 培养基中生长曲线、基质消耗曲线和代谢产物。结果表明,耐氧双歧杆菌培养 12h 菌数分别达 8.4×10^9 cfu/ml 和 7.2×10^9 cfu/ml, pH 由 7.6 降至 4.2 培养(培养 20h);对糖和蛋白质的消耗率分别为 56.4% ~ 56.8% 和 58.8% ~ 60.0%,代谢产物中乙酸:乳酸的克分子数为 33:2.08 ~ 4.17。

关键词 耐氧双歧杆菌 生长代谢

Abstract The process of cell growth and metabolism of oxygen-resistant Bifidobacterium in two different kinds of media (GAM medium and PTYG medium) were studied. The high consuming ratio of oxygen-resistant Bifidobacterium was determined. The living oxygen-resistant Bifidobacterium number was 8.4×10^9 cfu/ml after fermentation 12h 37°C and the pH of ending point of the fermentation was ≤ 4.2 . The cumulation of lactic acid higher than acetic acid.

Key words Oxygen-resistant Bifidobacterium Cell metabolism

近年来,随着微生态学理论研究的不断发展与深入,应用微生态制剂来调整人体内微生态平衡作为防腐、治病和保健的手段正在世界范围内形成热潮。目前,国内外已有上百种微生态制剂被开发应用,其中以双歧杆菌活菌制剂居多,双歧杆菌是人类肠道菌群中一种重要的有益微生物。研究表明,该菌具有生物学屏障作用,有控制细胞内毒素血症、降低自氧化作用、整肠作用、可恢复肠道菌群的正常水平,对致病菌具有很强的拮抗作用^[2]。但因这类细菌属专性厌氧菌,对氧非常敏感,对低 pH 的抵抗能力较差,活性保持比较困难。目前市场上的大多数产品活菌量很低,保存不到一个月就全部死亡。这是当前亟待解决的问题之一^[4]。因此,耐氧双歧杆菌的研究显得特别重要。本文通过对耐氧双歧杆菌在不同培养基中生长繁殖和基质消耗以及代谢产物进行研究,主要是为了了解耐氧双歧杆菌的生长代谢的差异,为日益增多的微生态制剂的研究开发及应用提供理论依据,具有现实意义。

1 材料与方法

1.1 菌株 B_{w-6}、B_{w-4} 为耐氧长双歧杆菌;B_{s-1}、B_{s-4} 为耐氧青春双歧杆菌;B₁₋₃ 为耐氧幼儿双歧杆菌、B_{b-1} 为耐氧短双歧杆菌(以上菌种由本室提供)。

1.2 培养基

1.2.1 改良的 GAM 培养基^[1]:蛋白胨 2.0g、酵母浸膏粉 0.25g、葡萄糖 0.5g、磷酸氢二钠 0.25g、氯化钠 0.5g、硫代乙醇酸钠 0.1g、L-半胱氨酸 0.1g、牛肉汤 50ml、肝汤 50ml,调 pH 至 7.5 0.7×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.2.2 PTYG 培养基^[10]:胰胨 0.5g、酵母抽提物 1.0g、吐温 800.1ml、L-半胱氨酸 0.05g、蛋白胨 0.5g、葡萄糖 1.0g、蒸馏水 100ml、盐溶液 4.0ml。

盐溶液成分(100ml):无水 CaCl₂ 0.2g、K₂HPO₄ 41.0g、MgSO₄·7H₂O 0.48g、KH₂PO₄ 1.0g、NaHCO₃ 10.0g、NaCl 2.0g。

1.3 实验方法

1.3.1 小瓶实验:500ml 三角瓶装培养基 400ml 接种量 3%,37°C 恒温培养 20h。

1.3.2 活菌数的测定:参照[2]方法进行。

1.3.3 生长曲线的测定:采用光电比浊法。

1.3.4 总糖的测定:采用费林试剂法^[3]。

1.3.5 还原糖的测定:采用费林试剂法^[3]。

1.3.6 pH 值的测定:采用 PHS-30A 型数字酸度计。

1.3.7 蛋白浓度的测定:采用考马斯亮兰比色法^[3]。

1.3.8 代谢产物的分析:采用日本岛津 GC-5A 气相色谱仪测定。

1.3.8.1 样品前处理:取 37°C 培养 20h 的耐氧双歧杆菌发酵液 4000r/min 离心,取上清液 0.2ml,加 4 滴 20% NaOH 70°C 挥干,在干燥器中放置 4 天(除水分),用 2ml 乙醇加 8 滴 H₂SO₄ 洗涤。

1.3.8.2 GC 条件:FID10²,G6-16A,Parapak Q 80 ~ 100 目,1mm × 3mm 不锈钢;载气流速:H₂ 40ml/min;柱温:120°C,200°C,230°C(共 130min);进样温度:200°C;检测温度: $\leq 230^\circ\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 小瓶静置培养中双歧杆菌的生长和代谢

采用 B_{W-63} 分别接种 PTYG 和 GAM 培养基 37℃ 20h, 采用费林试剂法、考马斯亮兰比色法、光密度比色法和显微计数法每隔 2h 测定一次, 分别测定 B_{W-6} 菌株对总糖、还原糖的消耗、蛋白质消耗、生长曲线和 pH 值的变化曲线。

2.1.1 糖的消耗

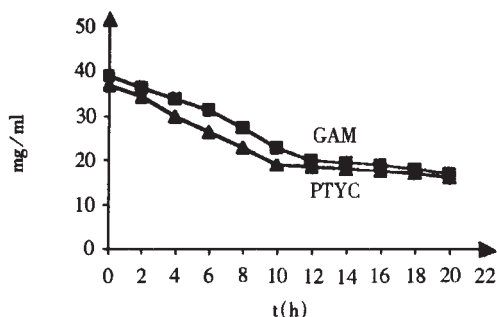


图1 总糖的代谢曲线

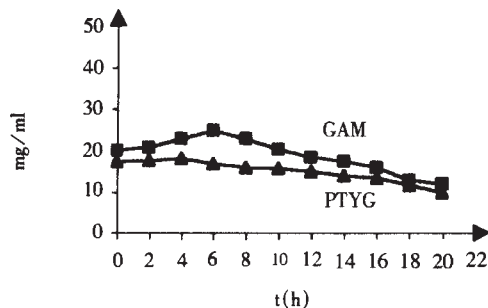


图2 还原糖的代谢曲线

结果表明, GAM 培养基总糖、还原糖的消耗率分别为 56.4%、39%, PTYG 为 56.8%、42.9%。从总糖的消耗曲线可以看出, 在两种不同的培养基中, 前 10h 均直线减少, 10~20h 曲线平缓, 糖的消耗减少。从还原糖的消耗曲线可以看出, 耐氧双歧杆菌在 GAM 培养基中 6h 内呈上升趋势, 在 PTYG 中前 4h 上升较快, 说明耐氧双歧杆菌利用自身分解酶对多糖的降解能力较强, 因此, 在制备耐氧双歧杆菌的发酵培养基时, 可加入一定量的低聚糖, 减少还原糖的用量。

2.1.2 蛋白质的消耗

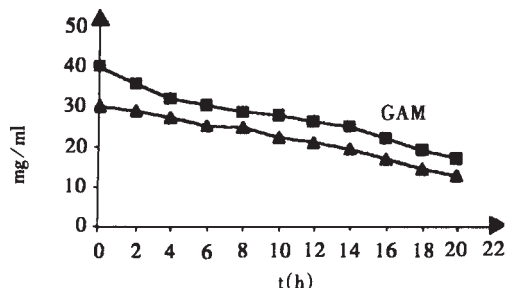


图3 蛋白质的代谢曲线

培养基中蛋白质消耗率较高, 比杨基强等报道的 21.1%^[4] 高出近 38.8%, 说明耐氧双歧杆菌对蛋白质的代谢在 PTYG 和 GAM 培养基中高于牛乳培养基。分析原因, 是由于培养液未离心, 待测液中包含有部分菌体蛋白质。从图 3 还可看出, 耐氧双歧杆菌对蛋白质的消耗率在两种蛋白含量不同的培养基中大致相等。但 PTYG 较 GAM 成本低, 因此在制备微生态制剂时应充分考虑在满足菌体生长的情况下, 适当降低蛋白浓度, 以降低生产成本。

2.1.3 菌体生长

从图 4 耐氧双歧杆菌 B_{W-6} 的生长曲线可以看出, 耐氧双歧杆菌生长过程无明显的迟滞期, 稳定期也很短。当菌量达到峰值后即开始下降, 这与杨基强等报道的普通两歧双歧杆菌在牛乳中生长规律相同^[4]。从活菌量上看, 耐氧双歧杆菌在 GAM 培养基中 12h 可以达到 8.4×10^9 cfu/ml, 在 PTYG 中为 7.2×10^9 cfu/ml。而普通双歧杆菌在牛乳中只为 2×10^9 cfu/ml, 15~

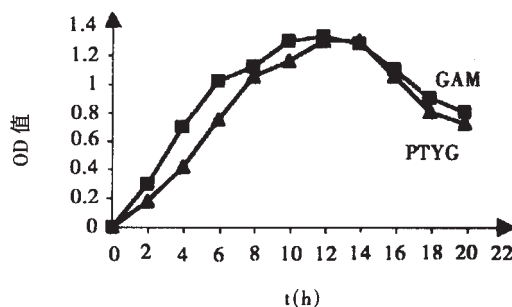


图4 生长曲线(光密度比色法)

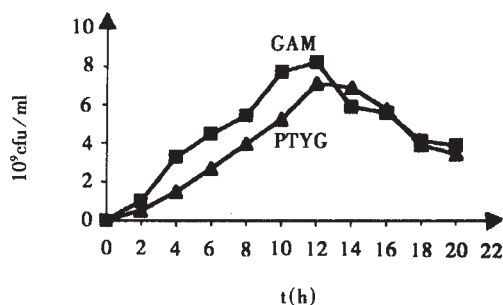


图5 生长曲线(显微计数法)

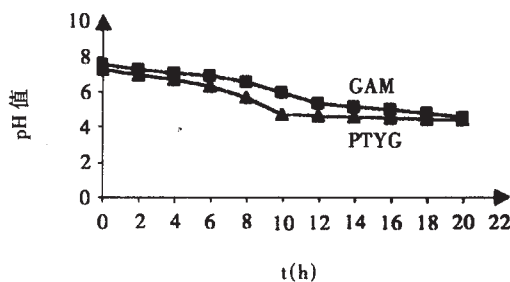


图6 pH 值的变化

16h 才达峰值,明显延迟了 3~4h,说明耐氧双歧杆菌平均生长速率高于普通双歧杆菌。本研究比较了两种方法测定耐氧双歧杆菌的生长曲线。两种测定结果基

本反映了耐氧双歧杆菌的生长特性,但测定结果存在一定差异,显微计数法费时,误差较大;光密度比色法简便快捷,误差较小,适用于大批量检测,但两者准确度都不及稀释平板计数法。

2.2 pH 值的变化

耐氧双歧杆菌 B_{w-6} 在 GAM 和 PTYG 中培养 20h 终点 pH 值分别为 4.2 和 4.1,比普通双歧杆菌偏高^[4],前 10h 酸度下降较快,10~20h 期间较平缓。基质 pH 越低,双歧杆菌的存活越小^[9],因此对于耐氧双歧杆菌的制品可培养 10~14h,这有利于制品中耐氧双歧杆菌活菌量,提高制品的疗效。

2.3 主要代谢产物分析

利用气相色谱分析双歧杆菌对葡萄糖的终端代谢产物,是双歧杆菌分类鉴定和开发应用的重要依据。测定结果见图 7~12 及表 1。

从表 1 可以看出,除 B_{w-2} 菌株醋酸和乳酸克分子数之比为 3:2.08 外,其余几株耐氧双歧杆菌代谢产物中,乳酸含量均偏高。最高的耐氧长双歧杆菌醋酸与乳酸的克分子数之比可达 3:4.17。从伯杰氏细菌鉴定手册中查到双歧杆菌发酵葡萄糖,主要生成乙酸和 L(+) 乳酸,二者的克分子之比为 3:2,其代谢途径为磷酸己糖解酮酶途径(HK):2mol 葡萄糖产生 2mol 乳酸和 3mol 乙酸。B_{w-6} 未经耐氧驯化前代谢葡萄糖得到的醋酸和乳酸克分子数之比为 3:2;耐氧驯化后为 3:4.17。于是又对 B_{w-6} 作了糖发酵生化试验,结果发现,对鼠李糖、纤维二糖、甘露糖的发酵全部为阳性,而未经耐氧驯化的均为阴性。分析,双歧杆菌经耐氧驯化后,可能产生旁路代谢途径;或者由于耐氧后,细胞内某些酶启动基因被打开,因此要弄清楚这一点,有待从分子生物学角度进行进一步研究。

综上所述,双歧杆菌制品其疗效主要在于双歧杆菌生长代谢过程中产生的各种酶类、有机酸、细菌素等。因此如何提高和保持制品中的活菌数是评定产品质量好坏的重要依据。通过对耐氧双歧杆菌生长代谢过程的研究表明,耐氧双歧杆菌对蛋白质和碳水化合物

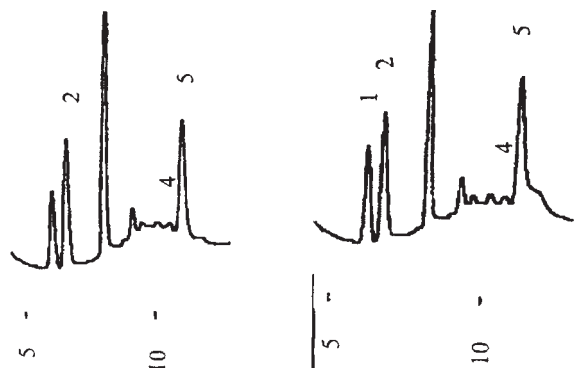


图 7 (B_{b-1}) 图 8 (B_{w-2})

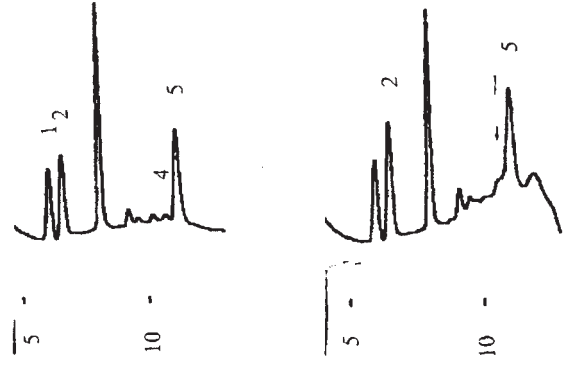


图 9 (B₁₋₃) 图 10 (B_{s-4})

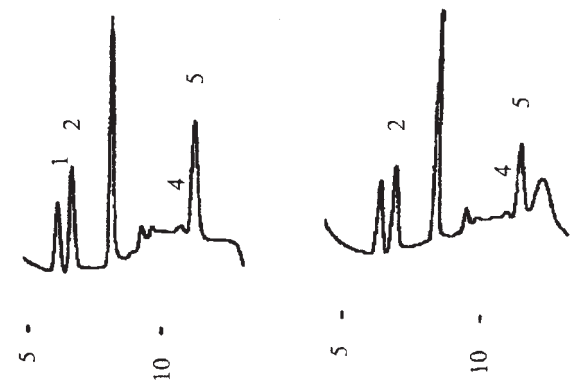


图 11 (B_{s-1}) 图 12 (B_{w-6})

表 1 双歧杆菌终端代谢产物的气相色谱测定结果

项目 菌号	代谢产物含量 mg/ml			醋酸毫克 分子数	乳酸毫克 分子数	醋酸: 乳酸 (分子数之比)
	甲酸	醋酸	乳酸			
B _{b-1}	1.88	3.37	5.58	5.62	6.21	3:3.31
B _{w-2}	1.97	3.19	3.31	5.32	3.68	3:2.08
B ₁₋₃	2.04	3.29	4.58	5.48	5.39	3:2.95
B _{s-4}	2.02	4.26	5.73	7.10	6.37	3:2.69
B _{s-1}	2.18	2.96	6.10	4.93	6.79	3:4.13
B _{w-6}	2.22	2.59	5.39	4.32	6.00	3:4.17

消耗量较大。其中蛋白质和碳水化合物含量分别达到 30 ~ 35mg/ml, 终点 pH 保持在 4.1 ~ 4.5, 可充分满足耐氧双歧杆菌的生长要求, 同时产品活菌保持量远远高于同类普通双歧杆菌制品, 适用于商品化生产。

参考文献

- 1 吴拥军等. 双歧杆菌的分离与鉴定. 西南农业学报, 1997, 10(3) 6 ~ 9.
- 2 吴拥军等. 耐氧双歧杆菌对肠道菌的拮抗作用及对肠毒素的降解作用. 食品科学, 1999, (12) 47 ~ 49.
- 3 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生物化学方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- 4 杨基强等. 双歧杆菌生长和代谢. 微生物学通报, 1995, 22

- (6) 347 ~ 350.
- 5 钱旭初等. 两歧双歧杆菌菌株抑制剂的研究. 两歧双歧杆菌的发酵条件. 微生物学通报, 1990(2) 96 ~ 98.
- 6 杨洁林等. 乳酸菌 - 生物学基础及应用. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- 7 包行毫等. 双歧杆菌某些生长因素的研究. 中国微生态学杂志, 1998, 10(2) 65 ~ 70.
- 8 高松柏等. 双歧杆菌和双歧杆菌乳糖的研究. 中国乳品工业, 1991, 19(2) 51 ~ 60.
- 9 王占武等. 不同酸性条件对双歧杆菌存活的影响. 微生物学通报, 1997, 24(2) 95 ~ 98.
- 10 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.

葡萄籽中多酚类物质的提取 及其对油脂的抗氧化作用

张峻 吉伟之 齐欣 天津市园艺工程研究所 300384

摘 要 研究了葡萄籽中多酚类物质的提取工艺, 并考察了该提取物对食用油脂的抗氧化作用。结果表明, 对含水率 8% 的葡萄籽, 60% ~ 80% 的丙酮溶液为最佳提取剂。在 20℃ ~ 50℃ 的范围内, 温度对提取率无明显影响。进行一次或两次提取操作时, 料液比以 1: 20, 每次浸提 30min 为宜, 提取三次时, 最佳料液比为 1: 5。该葡萄籽提取物对葡萄籽油及猪油均有着较好的抗氧化作用, 且效果优于 BHT。

关键词 葡萄籽 多酚类物质 提取 抗氧化性

Abstract The extraction of polyphenols from grape seeds was studied and the antioxidant activity of the extract towards edible oils was evaluated as well. It was found that, the acetone - water (80: 20 to 60: 20) mixture was the optimum extractant for the grape seeds with moisture content of 8%. The extraction yield of polyphenols showed no obvious increase from 20℃ to 50℃. The ratio of grape seeds to extractant was optimal at 1: 20 for one extraction or twice but 1: 5 for three times of extraction with 30min each. The oven - storage experiment indicated that the grape seeds extract showed stronger protection for lard and grape seed oil from oxidation than the BHT.

Key words Grape seeds Polyphenols Extract Antioxidation

多酚类物质广泛存在于自然界中, 是植物的次生代谢产物, 具有清除机体内自由基、抗脂质氧化、延缓机体衰老、预防心血管疾病、防癌、抗辐射等生物活性功能^[1~2]。国内多酚类物质的研究始于八十年代中后期, 主要集中在茶儿茶素和银杏黄酮两方面, 目前已达到工业化生产水平, 但对葡萄中多酚类物质的研究则报道较少^[3]。葡萄中富含多酚类物质, 尤其是葡萄籽中多酚类物质含量达 5% ~ 8%^[4]。据不完全统计, 我国每年酿制葡萄酒后的下脚料——葡萄籽约五千吨左右。若按 5% 的多酚提取率, 多

酚年产量可达 2500 吨, 参考银杏叶黄酮收购价 (1000 元/kg), 年产值在 2 亿元左右, 若进一步开发成保健食品等深加工产品, 将增值 5 ~ 10 倍, 年产值达 10 亿元以上。因此, 葡萄多酚的研制与开发对天然植物资源的利用、保健食品及生物制药工业的发展均有着积极的意义。

本文即对葡萄籽中多酚类物质的提取进行研究, 同时还考察了该提取物对食用油脂的抗氧化作用。