

壳寡糖对乳酸杆菌体外生长的影响

吴大畅 王丽新 张翠丽 辛毅[△]

(大连医科大学生物技术系 辽宁 大连 116044)

摘要 目的:研究壳寡糖对乳酸杆菌体外生长的影响。方法:将乳酸杆菌 MRS 培养基中的葡萄糖替换为壳寡糖及向原培养基中加入适量的壳寡糖,通过测定 OD 值比较乳酸杆菌的生长状况。结果:以壳寡糖完全代替葡萄糖的培养基中乳酸杆菌的生长状况不如 MRS 培养基,而少量壳寡糖与葡萄糖协同的培养条件使乳酸杆菌的生长适应期明显减短,促进其生长。结论:乳酸杆菌对壳寡糖的利用不如对葡萄糖的利用,1g/l 壳寡糖与葡萄糖协同作用时可明显缩短乳酸杆菌的生长适应期,促进细菌生长。

关键词 壳寡糖;乳酸杆菌;体外培养;生长曲线

中图分类号:Q533,R378.992 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)05-849-03

Effect of Chito-Oligosaccharide on Growth of Lactobacillus in Vitro

WU Da-chang, WANG Li-xin, ZHANG Cui-li, XIN Yi[△]

(Biotechnology department of Da Lian Medical University, Dalian Liaoning 116044, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Chito-Oligosaccharide (COS) on the growth of Lactobacillus in vitro. **Methods:** Replace glucose with COS in Lactobacillus medium and apply moderate COS to the original medium. Lactobacillus growth was detected by measuring its OD value. **Results:** Lactobacillus growth in the original medium is better than that in the medium of COS replaced for glucose, and the lag phase in the medium adding a little COS is shorter than the original medium, promote the multiplication of Lactobacillus in vitro. **Conclusion:** Glucose is better than COS for the growth of Lactobacillus. The synergistic action of COS and glucose can shorten the growth lag phase and promote the multiplication of Lactobacillus with 1g/l COS.

Key words: COS; Lactobacillus; In vitro culture; Growth curve

Chinese Library Classification(CLC): Q533, R378.992 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)05-849-03

前言

壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物^[1],是由 2~10 个氨基葡萄糖以 β -1,4 糖苷键连接而成的碱性寡糖,它通常是由壳聚糖通过生物工程技术降解制备的低聚氨基葡萄糖,属于海洋性功能寡糖。壳寡糖具有结构特异、活性独特、低热值、安全无毒、无副作用、无残留和稳定性好等特点^[2-3],且水溶性好,很容易被吸收利用,生物活性比壳聚糖更强。特别是聚合度为 6 左右的壳寡糖,更具有许多独特的生理活性和功能,如在人体肠道内活化增殖双歧杆菌,抑制大肠杆菌的生长^[4],促进脾脏抗体生成,抑制肿瘤细胞的生长,在微酸环境中具有较强的抗菌作用和显著的保湿吸湿能力^[5],活化植物细胞,促进植物快速生长^[6]等。因此,水溶性壳寡糖具有极为广泛的应用范围和发展前途,受到研究者的广泛关注,海洋性功能寡糖的开发也成为当今生物技术领域的重要课题^[7]。

乳酸杆菌是在乳酸菌中与动物关系最密切的菌属。动物和人类从口腔到直肠始终有该菌存在,是动物肠道中优势菌群之一。它们在宿主体内发挥生物拮抗作用,维持机体微生态平衡,发挥免疫调节、抗肿瘤等作用^[8]。当乳酸杆菌比例下降,则动物消化机能紊乱,严重者导致动物肠炎、下痢等疾病。乳酸杆菌的

数量变化往往预示着人体状态发生变化。因此,确切了解乳酸杆菌生长的影响因素及对其进行精确定量将对疾病的诊治具有重要意义^[9-11]。

有文献报道另一种寡糖—甘露寡糖可以增殖肠道内乳酸杆菌^[12],也有文献报道壳寡糖对双歧杆菌的体外生长有明显的促进作用^[13]。而有关壳寡糖对乳酸杆菌的生长影响却未见报道。基于此,本文用壳寡糖代替乳酸杆菌 MRS 培养基中的葡萄糖及向 MRS 培养基中加入壳寡糖与葡萄糖配伍,在相同条件下对乳酸杆菌进行体外培养,绘制生长曲线,以此来判断各培养基中乳酸杆菌的生长情况。进一步明确壳寡糖的作用及其机理,为其应用开发提供理论依据,探寻促进益生菌生长的有效途径。

1 材料与方法

1.1 仪器

DHG-9071A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);台式高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司);酶标仪(thermo electron corporation);恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司);洁净工作台(洁净等级 100 级,上海博迅实业有限公司医疗设备厂);隔水式电热恒温培养箱(型号:nsk-po,湖北省黄石市医疗器械厂);立式压力蒸汽灭菌器(型号:YXQ-LS-30 SII,上海博迅实业有限公司医疗设备厂);FA 分析天平(上海越平科学仪器有限公司);天平(上海光正医疗仪器有限公司);PHS-3C 型精密 pH 计(常州市国立试验设备研究所)。

作者简介: 吴大畅(1977-),女,硕士,讲师,主要研究方向:肠道菌群,电话 13130438926, E-mail: dxchangdl@yahoo.com.cn

△通讯作者: 辛毅 jimxin@hotmail.com

(收稿日期:2011-07-17 接受日期:2011-08-12)

1.2 材料

壳寡糖(济南海得贝海洋生物工程有限公司,食品级,脱乙酰度 85.3%,分子量 <3000,批号:100627),德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus Delbrueckii* ATCC 7830)大连医科大学生物技术系保存),MRS 培养基(胰酪蛋白胨 10.0 克,酵母浸粉 5.0 克,柠檬酸胺 2.0 克,硫酸镁 0.575 克,硫酸锰 0.12 克,吐温-80 1.0 克,葡萄糖 20.0 克,硫酸亚铁 0.034 克,乙酸钠 25.0 克,磷酸氢二钾 6.0 克,蒸馏水 1.0 升,所用试剂均为分析纯)

1.3 实验方法与步骤

1.3.1 菌种活化 将保存在斜面培养基上的乳酸杆菌转接到经灭菌的含有 10MLMRS 培养基的试管中,37℃ 恒温培养箱中培养,备用。

1.3.2 壳寡糖对乳酸杆菌体外生长的影响 将活化好的菌种用无菌生理盐水配制成浓度为 1×10^7 cfu/ml 菌悬液,按 1% 的接种量分别接种到以下三种培养基中 a. 正常培养基作为对照组 b. 用浓度分别为 5g/l, 10g/l, 20g/l 的壳寡糖代替葡萄糖作为乳酸杆菌培养基的碳源 c. 向正常 MRS 培养基中分别加入终浓度为 2g/l, 1g/l, 0.5g/l 的壳寡糖与其中的葡萄糖协同。每个处理方法设立六个重复孔。

1.3.3 乳酸杆菌生长曲线的测定 接种后,将菌种与各组液体培养基摇匀,在 37℃ 恒温下培养,每四小时在酶标仪 630nm 波长下测定一次吸光度值,以培养时间为横坐标,相应的吸光度值为纵坐标,记录数据并绘制生长曲线。

2 结果

2.1 壳寡糖完全代替葡萄糖作为碳源

用 COS 完全代替葡萄糖的培养基中乳酸杆菌的生长曲线不典型,由图 1 可见,在 0~32 h 内,三个处理组培养基的 OD 值均小于 MRS 对照组,乳酸杆菌的增殖速度明显下降,证明了葡萄糖优于 COS 更适于为乳酸杆菌生长提供碳源,乳酸杆菌不能单独有效地利用壳寡糖。同时还可以观察到在 3 个处理组中乳酸杆菌生长的适应期有不同程度缩短。在 5g/lCOS 培养基上,乳酸杆菌的生长适应期最短,培养 15h 后,菌体生长即达到稳定,此时培养基的 OD 值达到最大,菌体数量最多。在 20g/lCOS 培养基中,乳酸杆菌生长速度极其缓慢,生长适应期有所缩短,在培养 9h 前后便进入对数生长期,培养 12h 很快进入稳定期,OD 值达最大。综上:乳酸杆菌生长适应期长短:5g/lCOS 组 < 20g/lCOS 组 < MRS 对照组 = 10g/lCOS 组;乳酸杆菌进入稳定期 OD 值:20g/lCOS 组 < 5g/lCOS 组 < 10g/lCOS 组 < MRS 对照组。

2.2 壳寡糖与葡萄糖协同使用作为碳源

向正常培养基中加入壳寡糖与葡萄糖协同作用时,处理组的生长曲线与对照组的生长曲线趋势大体一致(图 2),在 0~32 h 内,1g/lCOS 和 0.5g/lCOS 处理组培养基的 OD 值普遍高于 MRS 对照组(图 3),乳酸杆菌的增殖速度明显提高,证明了两种糖协同作用更适于为乳酸杆菌生长提供碳源。并且浓度为 1g/lCOS 组培养基中的乳酸杆菌提前进入了对数生长期,缩短了生长适应期,且对数生长期时间延长。这表明:向正常培养基中加入适量的壳寡糖可以有效缩短乳酸杆菌生长适应期,促进细菌生长,本实验得到的最佳浓度为 1g/l。

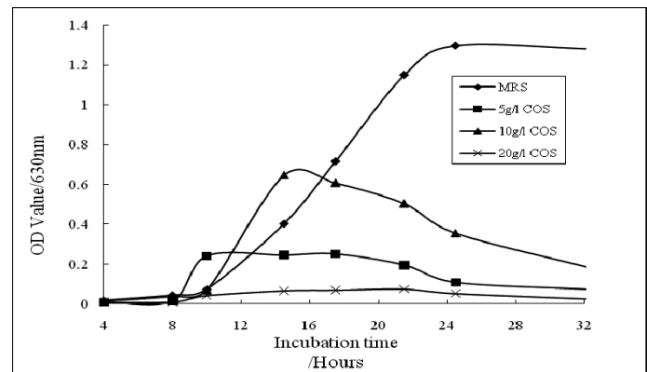


图 1 乳酸杆菌在不同培养条件下的生长曲线

Fig.1 Grow curve of *Lactobacillus* under different culture conditions

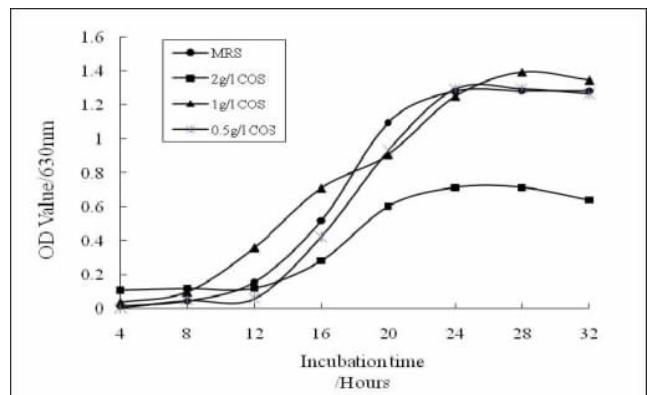


图 2 协同培养条件下乳酸杆菌的生长曲线

Fig.2 Grow curve of *Lactobacillus* under collaborative culture conditions

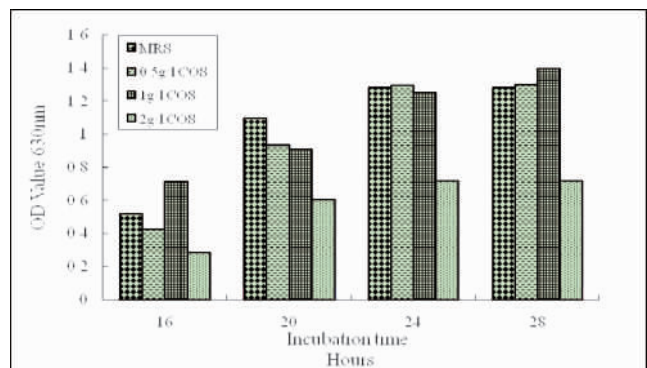


图 3 乳酸杆菌在各协同培养组生长情况

Fig.3 Growth status of *Lactobacillus* under collaborative culture conditions

3 讨论

人体是一个复杂的微生态系统,包含多种微生物,其中乳酸杆菌是重要的优势菌,也是目前微生物生态学领域中备受重视的研究对象。它在保持人体腔道酸性环境,维持菌群平衡中起关键作用,是重要的益生菌。乳酸杆菌通过与肠粘膜上皮细胞相互作用,紧密结合,与其它厌氧菌一起共同占据肠粘膜的表面,形成一个生物学屏障,阻止致病菌的定植与入侵,同时它还能产生多种代谢产物如细菌素样物质和表面活性物质来抑制真菌生长^[14]。另外乳酸杆菌的代谢产物或细菌降解产物可与巨噬

细胞、树突状细胞表面的 Toll 样受体结合,激活巨噬细胞、树突状细胞并释放细胞因子,这些细胞因子又可诱导宿主其他免疫细胞的应答,提高免疫细胞再循环而活化全免疫系统^[15],还可提高 T 细胞针对有丝分裂原的增殖能力,使 T 细胞的数目增多^[16],阻止外来致病菌的感染。有报道作为阴道优势菌群的乳酸杆菌与宫颈癌及其早期病变的发生有关^[17]。由于含乳酸杆菌的制剂为生物制剂,具有安全无毒的优点,因此有学者开始尝试将目的抗原表达于乳酸杆菌胞膜上,作为一种安全的黏膜免疫的疫苗载体作用于宫颈粘膜局部^[18],以期达到宫颈癌的一级预防。可见,乳酸杆菌对人类健康起着重要作用,寻找能够促进乳酸杆菌增殖的生物活性因子,同样具有重要的医用价值和社会意义。

乳酸杆菌对营养要求比较苛刻,培养基中需要多种物质,而许多寡糖类物质对乳酸杆菌的生长有促进作用,称为益生元。已有文献报道,另一种海洋寡糖—甘露寡糖可以增殖肠道内乳酸杆菌^[12],也有文献报道壳寡糖对双歧杆菌的体外生长有明显的促进作用^[13]。本文结果与上述报道不完全一致,可能是由于寡糖对乳酸杆菌的促生长作用与糖的结构、纯度等有关。研究表明高纯度、一型糖苷键连接的寡糖对双歧杆菌的作用效果最为显著,如菊糖或果寡糖对双歧杆菌的生长有明显的增殖作用^[19-20],其中果寡糖最易被双歧杆菌利用,是目前最有价值的双歧因子,有人也称之为有益菌专一增殖因子^[21]。

壳寡糖是由壳聚糖经过降解得到的,易溶于水,具有独特生理功能,易被多种生物利用,虽然本实验表明,单独使用壳寡糖并不能促进乳酸杆菌的体外生长,但至于是否能在体内促进肠道中的乳酸杆菌的生长,还有待证实。另外,虽然壳寡糖单独作为碳源使用时不能促进乳酸杆菌的体外生长,但低浓度的壳寡糖与葡萄糖协同作为碳源时,却可缩短乳酸杆菌生长的适应期,延长对数期,促进细菌生长,这对于工业生产具有重要意义。

虽然壳寡糖易溶于水,但本实验将壳寡糖加入培养基后出现轻微浑浊现象,为避免对实验结果造成影响,本实验在测定吸光度做生长曲线的同时,还用细胞计数板进行了镜下计数,两部分结果得到了一致的结论,确保了实验结果的准确性和可靠性。

参考文献(References)

- [1] Mathur NK, Narang CK. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals[J]. J Chem Educ, 1990, 67(11):938-942
- [2] 香红星,董仲华,刘亚力. 功能性寡糖的研究应用进展[J]. 饲料研究, 2001(7): 9-11
Xiang Hong-xing, Dong Zhong-hua, Liu Ya-li. Advances in research of functional Oligosaccharides[J]. Feed Research, 2001(7): 9-11
- [3] 刘晗,白雪芳,杜昱光,王克夷.寡糖的生物活性[J].精细与专用化学品. 2005, 13(13): 15-18
Liu Han, Bai Xue-fang, Du Yu-guang, Wang Ke-yi. Recent advances in study on bioactivities of oligosaccharide[J]. Fine and specialty chemicals. 2005,13(13): 15-18
- [4] Varum KM, Anthonsen MW, Grasdalen H. Determination of the degr-

ee on N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins(chitosans) by high-field N.M.R.spectroscopy[J]. Carbohydrate Release, 1991,211(8):17-23

- [5] 夏文水,吴炎楠. 甲壳低聚糖功能性质 [J]. 食品与生物技术学报. 1996, 15(4): 297-302
Xia Wen-shui, Wu Yan-nan. Functional property of Chitooligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 1996,15(4): 297-302
- [6] Vachoud L, Domard A. Physicochemical properties of physical chitin hydrogels: modeling and relation with the mechanical properties [J]. 2001,2(4): 1294-1300
- [7] 商文静,赵小明,杜昱光,等. 壳寡糖诱导植物抗病毒研究初报[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(5): 73-75
Shang Wen-jing, Zhao Xiao-ming, Du Yu-guang, et al. First report on oligosaccharide induced resistance to plant virus [J]. Journal of northwest sci-tech university of agriculture and forestry (Natural Science Edition), 2005, 33(5): 73-75
- [8] 任月,袁杰利. 乳酸杆菌及其免疫治疗作用研究进展[J]. 中国微生物生态杂志, 2005, 17(5): 392
Ren Yue, Yuan Jie-li. Advances in research of Lactobacillus and its immunotherapy function [J]. Chinese Journal of microecology, 2005, 17(5): 392
- [9] Serrazanetti DI, Guerzoni ME, Corsetti A, et al. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli [J]. Food Microbiol, 2009, 26(7): 700-711
- [10] 王晓华,夏文涵,王晓刚,等. 肠道菌群失调症的研究进展[J]. 实用临床医学, 2007, 8(8): 136-138
Wang Xiao-hua, Xia Wen-han, Wang Xiao-gang, et al. Advances in research of alteration of intestinal flora[J]. Practical clinical medicine, 2007, 8(8): 136-138
- [11] Guerrero HI, Torre DA, Vargas VF, et al. Intestinal flora, probiotics, and cirrhosis[J]. Ann Hepatol, 2008, 7(2): 120-124
- [12] 刘晓瑛,王金涛,俞菲菲,等.甘露寡糖对冷应激鸡盲肠内大肠杆菌和乳酸杆菌数量的影响研究 [J]. 浙江畜牧兽医, 2010, 35(6): 46-51
Liu Xiao-ying, Wang Jin-tao, Yu Fei-fei, et al. Research on the influence of cold stress on the number of E.coli and lactobacillus in chicken cecum[J]. Zhejiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2010,35(6):46-51
- [13] 卜宁,马莲菊,刘诗扬,徐方旭. 两种海洋寡糖对双歧杆菌体外生长作用的影响[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2009, 27(4): 472-475
Bu Ning, Ma Lian-ju, Liu Shi-yang, Xu Fang-xu. Effect of two marine oligosaccharides on growth Of Bifidobacteria in Vitro[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science), 2009, 27(4): 472-475
- [14] Vekedins C, Dermeih C, Rei G, et al. Inhibition of initial adhesion of unpathogenic Enterococcus faecalis by biosurfactants from lactobacilli is dates[J]. Applied Environmental Microbial, 1996, 42(3): 1958
- [15] Takeshi M, Akimitsu T, Haruo I, et al. Antitumor activity and action mechanisms of Lactobacillus casei through the regulation of immune responses[J]. Bio Factors, 2004, (22): 63-66 (下转第 839 页)

毒理学杂志,1987,1:161-165

DING Xun-cheng. Toxic action of manganese on dopaminergic receptor of striatum of Rats [J]. Journal of pharmacology and toxicology of China, 1987,1:161-165

- [12] Shimizu, Eguchi Y, Kamiike W, et al. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: Possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions[J]. Oncogene, 1996,12:2045-2050
- [13] Molina RM, Phattanasaradee S, Kim J, et al. Ingestion of Mn and Pb by rats during and after pregnancy alters iron metabolism and behavior

in offspring[J]. Neurotoxicology, 2011, 32(4):413-422

- [14] Li H, Wu S, Shi N, et al. J Nrf2/HO-1 pathway activation by manganese is associated with reactive oxygen species and ubiquitin-proteasome pathway, not MAPKs signaling [J]. Appl Toxicol, 2011, 7. doi: 10.1002/jat
- [15] Negga R, Rudd DA, Davis NS, et al. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* [J]. Neurotoxicology, 2011, 32(3):331-341

(上接第 851 页)

- [16] Lim BK, Mahendran R, Lee YK, et al. Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse[J]. Japanese J Cancer Res, 2002, 93(1):36-41
- [17] Korshunov VM, Kafarskaia LI, Bagirova MS, et al. The effect of solco Trichovac on the vaginal microflora of patients with a papilloma-virus infection associated with a cervical intraepithelial neoplasm[J]. Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii I Immunobiologii, 1994 (5) : 13-17
- [18] 逯彩虹,程建新,周艾琳等.乳酸菌抗肿瘤作用的概况与应用进展[J].实用肿瘤杂志,2009,24(1):90-94
- Lu Cai-hong, Cheng Jian-xin, Zhou Ai-lin [J]. General situation and application progress of *Lactobacillus* antitumor effect [J]. Journal of

practical oncology, 2009, 24(1) :90-94

- [19] 陈晋安,刘蓉,郑忠辉,等.菊芋低聚果糖促进双歧杆菌生长的研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2001,40(4):968-972
- Chen Jin-an, Liu Rong, Zheng Zhong-hui, et al. The growth-promoting effect of Jerusalem artichoke fructo-oligosaccharides on *Bifidobacteria* [J]. Journal of Xiamen University (Natural Sciences), 2001, 40(4):968-972
- [20] Roberfrid MB, Van Loo JAE, Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products[J]. The Journal of Nutrition, 1998, 128(1) :11-19
- [21] 杜昱光,蒋寒青.双歧杆菌促进生长因子的研究[J].中国微生态学杂志,1996,8(6):50-51
- Du Yu-guang, Jiang Han-qing. Study on bifidus factors of *Bifidobacteria* [J]. Chinese Journal of Microecology, 1996, 8(6) :50-51