

金钗石斛低聚糖纯品对乳杆菌抗应激能力的影响

渠 婷^{1,2}, 马朝阳^{1,2}, 王洪新^{1,2*}

(1. 江南大学食品学院, 无锡 214122; 2. 国家功能食品工程技术研究中心(江南大学), 无锡 214122)

摘 要: 利用水作为溶剂从金钗石斛中提取糖类成分, 经无水乙醇沉淀脱蛋白质和多糖, 再经大孔树脂分离, 得到的低聚糖通过葡聚糖凝胶柱, 获得 1 个低聚糖纯品。将纯品冷冻干燥后, 添加到乳杆菌的培养基中, 分别对乳杆菌的生长曲线、耐热性、抗苯酚抑制作用进行了实验研究, 结果表明, 金钗石斛低聚糖在促进乳杆菌生长、降低高温对于乳杆菌的伤害和苯酚对于乳杆菌的伤害方面都有明显效果。

关键词: 金钗石斛; 低聚糖; 纯化; 乳杆菌; 抗应激能力

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2017)06-0968-05

Isolation of oligosaccharide from *Dendrobium nobile* and its effect on the anti-stress ability of *Lactobacilli*

QU Ting^{1,2}, MA Chaoyang^{1,2}, WANG Hongxin^{1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122;

2. National Engineering Research Center for Functional Food, Wuxi 214122)

Abstract: *Dendrobium Nobile* oligosaccharide was extracted in water and purified by a three-step process: precipitation of protein and polysaccharides by anhydrous ethanol, decolorization after precipitation with macroporous resin and final purification through Sephadex G-25 gel chromatography. As a result, a resultant oligosaccharide compound was obtained, and its effect on growth curve, heat resistance and anti-phenol inhibition of *Lactobacilli* in a stress environment was further studied. The results showed that the oligosaccharide significantly promoted the growth of *Lactobacilli*, and reduced the damage caused by high temperature and phenol.

Key words: *Dendrobium nobile*; oligosaccharide; isolation; *Lactobacilli*; anti-stress ability

石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)属于兰科石斛属,是多种药物的总称,位居四大仙草之首,最早在《神农本草经》就有相关记载,石斛具有益胃生津,滋阴清热的功效^[1]。在《中国药典》有关于金钗石斛、鼓槌石斛及流苏石斛的描述。低聚糖(Oligosaccharides),又称为寡糖,是单糖通过糖苷键连接起来形成的具有直链或者分支链的低度聚合糖,一般是指含有 2~10 个单糖的聚合物。现已有报道证实功能性低聚糖具有促进肠道益生菌生长、改善人体内环境、增强机体免疫力和抗氧化等活性,具有良好的发展前景^[2-5]。

近年来,中国对于石斛多糖和石斛碱的研究颇

多,成果颇丰^[6-10],但对于石斛中所含有的低分子糖类的研究很少。为了更为综合的利用石斛这一名贵中草药,故对石斛中所含有的低聚糖进行了研究,将水提醇沉获得多糖后的上清液进行了收集,浓缩,纯化后得到低聚糖纯品,并对金钗石斛低聚糖纯品对乳酸菌的抗应激能力的影响^[11-13]进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

实验用金钗石斛来自于贵州赤水国礼石斛有限公司;无水乙醇、无水葡萄糖、苯酚、浓硫酸购自国药集团化学试剂有限公司;壳低聚糖(COS)日

收稿日期: 2017-02-24

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP51501)和金钗石斛资源精深加工系列产品的研究与开发(150035)共同资助。

作者简介: 渠 婷, 硕士研究生。E-mail: febeQt@163.com

* 通信作者: 王洪新, 教授, 博士生导师。E-mail: hxwang@jiangnan.edu.cn

本三得利公司; 大孔树脂 AB-8, 东鸿化工有限公司; 葡聚糖凝胶柱柱填料 Sephadex G-25, Pharmacia 公司。

实验菌种植物乳杆菌 (*L. paraplantarum*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 和鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*), 保存于江南大学食品学院食品功能因子实验室。

MRS 液体培养基: 蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 8.0 g、酵母粉 4.0 g、葡萄糖 20.0 g、磷酸氢二钾 2.0 g、柠檬酸氢二铵 2.0 g、乙酸钠 5.0 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.04 g、吐温-80 1.0 g、水 1 000 mL, pH 5.7±0.2。

MRS 固体培养基: 蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 5.0 g、酵母粉 4.0 g、葡萄糖 20.0 g、吐温-80 1.0 mL、磷酸氢二钾 2.0 g、乙酸钠 5.0 g、柠檬酸三铵 2.0 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、琼脂粉 15.0 g, pH 6.2±0.2。

1.2 实验仪器与设备

UV-2100 紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HH-4G 恒温水浴锅, 常州赛普实验仪器厂; SHZ-III 循环水式真空泵, 上海姜强仪器有限公司; FW80 高速粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; AR224CN 电子天平, 奥豪斯仪器(常州)有限公司; BC-R206 旋转蒸发仪, 上海贝凯生物化工设备有限公司; SBS-100 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器有限公司; BT100-1JDG1 数显恒流泵, 重庆科耐普蠕动泵有限公司; DRP-9162 电热恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司; PremiumU410 超低温冰箱, 德国艾本德公司。

1.3 实验方法

1.3.1 金钗石斛低聚糖的粗分 将金钗石斛低聚糖的浓缩液在中性条件下上 AB-8 大孔树脂(1 000 mm×50 mm), 调节流速为 25 mL min⁻¹, 用去离子水进行洗脱, 250 mL 收集 1 次, 用苯酚-硫酸法测定糖的含量, 将含糖的部分合并浓缩, 冷冻干燥成粉末状, 备用。

1.3.2 金钗石斛低聚糖的纯化 样品的预处理: 称取 1 g 金钗石斛低聚糖粗品, 用去离子水充分溶解, 配置成浓度为 50 mg mL⁻¹ 的溶液, 用以上柱。

填料的预处理: 称取适量的葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-25 颗粒与烧杯中, 加入过量的去离子水, 在室温下溶胀 12 h。

Sephadex G-25 凝胶层析分离与收集: 将处理好的样品上葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-25 (500 mm×16 mm), 用去离子水洗脱, 流速为 1 mL min⁻¹, 每管收集 5 mL。用苯酚-硫酸法测定低聚糖含量, 以紫外吸光值为纵坐标, 洗脱管数为横坐标作洗脱曲线图。

合并同一峰区的低聚糖洗脱液, 进行真空浓缩后冷冻干燥, 得到金钗石斛低聚糖纯品。

1.3.3 石斛低聚糖对乳杆菌生长的影响 将菌株置于 MRS 培养基中活化 16 h 后, 活化后的菌种按 1% 的接种量分别将 3 株乳酸菌接种到 4 份 10 mL 处理过的 MRS 培养基内, 其中 3 份中糖类物质分别为 2% 葡萄糖、2% 壳低聚糖和 2% 金钗石斛低聚糖, 另外 1 份为空白对照组, 不含任何糖类物质。取 96 孔培养板, 各孔加入 200 μL 各菌液, 将培养板置于恒温培养箱中温度为 37℃, 24 h 动力学测定各孔的 OD 值, 每隔 2 h 测一次 OD₆₂₀, 每组设置 3 个平行实验, 以时间为横坐标, 吸光值 OD₆₂₀ 为纵坐标, 作图。

1.3.4 热处理 培养 24 h 的 3 株乳酸菌, 按 1% 的接种量接种至 4 份 10 mL 处理过的 MRS 培养基内, 其中 3 份中糖类物质分别为 2% 葡萄糖、2% 壳低聚糖和 2% 金钗石斛低聚糖, 另外 1 份为空白对照组, 不含任何糖类物质。然后分别置于 65℃ 的水浴中, 于 0、10、20 和 30 min 分别取出冰浴使其迅速冷却, 然后稀释, 作平板活菌计数, 测定存活的活菌数量, 每组重复实验 3 次。

1.3.5 0.4% 苯酚处理 将培养了 24 h 的 3 株乳酸菌, 按 1% 的接种量接种至 4 份 10 mL 处理过的 MRS 培养基内, 其中 3 份中糖类物质分别为 2% 葡萄糖、2% 壳低聚糖和 2% 金钗石斛低聚糖, 另外 1 份为空白对照组, 不含任何糖类物质。随即测定各菌浓度, 记为 C₀, 然后在各培养基中加入苯酚, 使苯酚浓度为 0.4%, 置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h, 平板测定活菌浓度, 记为 C₂₄, 用 C₀ 减去 C₂₄ 所得的值则可以表示苯酚对于乳酸菌生长的抑制情况。

2 结果与分析

2.1 葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-25 分离纯化金钗石斛低聚糖

采用葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-25 分离纯化金钗石斛低聚糖粗品, 用苯酚-硫酸法逐管显色后, 用紫外分光光度计测其吸光值, 以 OD₄₉₀ 值为纵坐标, 洗脱管数为横坐标绘制洗脱曲线, 如图 1 所示。

洗脱曲线上显示有 3 个吸收峰, 表明至少存在 3 种糖分。各个吸收峰对应收集的管号数和保留体积见表吸收峰 I~III 所含糖分分别命名为糖 1、糖 2 和糖 3。从洗脱曲线上明显可以看出, 金钗石斛低聚糖粗品中糖 1 的含量比较大, 其次为糖 3 和糖 2, 且 3 个峰的位置距离较远, 说明这 3 个糖的混合的可能性极低。由洗脱曲线可知 3 种糖的吸收峰的面积差异

较为明显,故这3种糖的含量差异也较大。糖1的含量明显大于后2种糖,故反复进行葡聚糖凝胶柱Sephadex G-25洗脱,合并收集糖1,并进行真空浓缩,真空冷冻干燥,得到金钗石斛低聚糖糖1纯品。

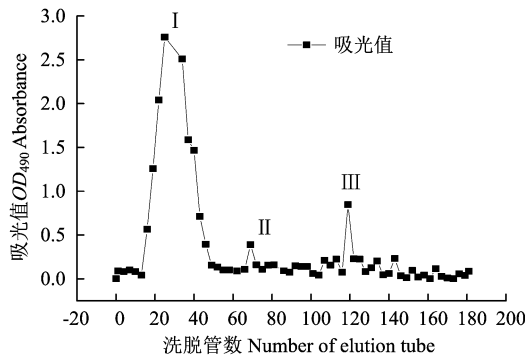


图1 葡聚糖凝胶柱Sephadex G-25分离金钗石斛低聚糖粗品的洗脱曲线

Figure 1 Sephadex G-25 column chromatogram of the oligosaccharides extracted from *Dendrobium nobile*

表1 洗脱曲线上各吸收峰对应的收集管数及保留体积
Table 1 Tube number and retention volume of each absorption peak on these parathion graphs

吸收峰标号 Elution peak	收集管号数/根 Number of collection tube	保留体积/mL Retention volume
I	13~50	190
II	65~71	30
III	116~128	65

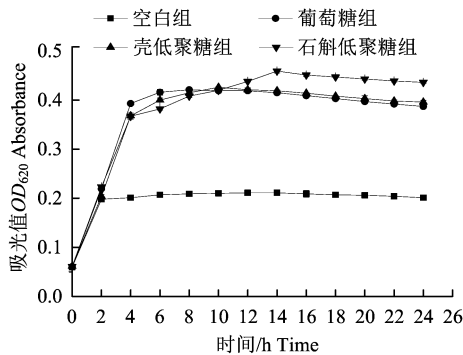


图2 在含有不同糖源的培养基以及空白对照组中,植物乳杆菌的生长曲线

Figure 2 The growth curves for *L. paraplantarum* grown in MRS containing various carbohydrates and the control group without sugar

2.2 石斛低聚糖对乳酸菌生长的影响

低聚糖是一类不能被人类消化酶所消化的糖类,但它可以作为肠道有益菌增殖底物的一类物质。因为低聚糖结构的不同,乳酸菌等有益菌的代谢能力也不相同。结果(图2~图4)显示,3株乳杆菌在以壳低聚糖、石斛低聚糖及葡萄糖为单一糖源的

情况下,均可以很好地生长,在空白对照组不含任何糖类物质的时候,乳杆菌的生长受到了限制,不同糖源乳杆菌的生长曲线也不同,以葡萄糖为唯一碳源的菌生长迅速,但以金钗石斛低聚糖为唯一碳源的菌生长相对缓慢但更为旺盛。

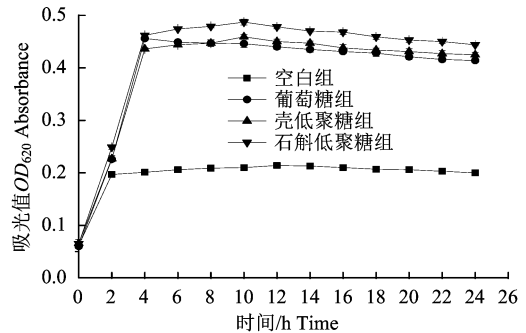


图3 在含有不同糖源的培养基以及空白对照组中,嗜酸性乳杆菌的生长曲线

Figure 3 The growth curves for *L. acidophilus* grown in MRS containing various carbohydrates and the control group without sugar

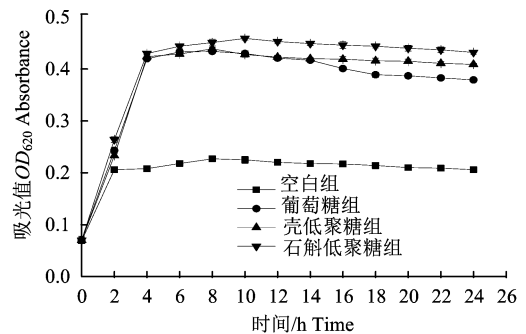


图4 在含有不同糖源的培养基以及空白对照组中,鼠李糖乳杆菌的生长曲线

Figure 4 The growth curves for *L. rhamnosus* grown in MRS containing various carbohydrates and the control group without sugar

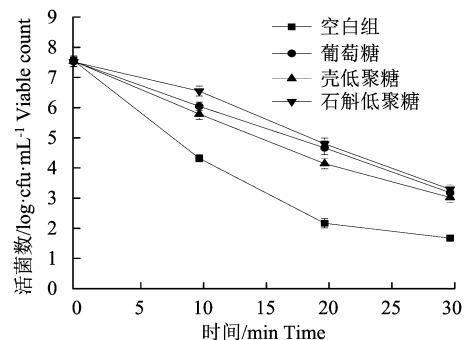


图5 不同糖源以及空白对照组对植物乳酸菌经65°C, 30 min处理后,存活能力的影响

Figure 5 The influence of oligosaccharides and glucose on the survival of *L. paraplantarum* after 30 min exposure at 65°C. The control group was MRS without any sugar

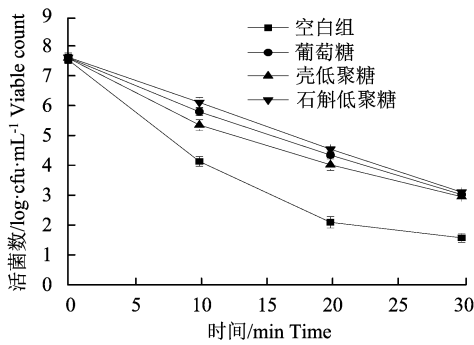


图 6 不同糖源以及空白对照组对嗜酸性乳酸菌经 65°C, 30 min 处理后, 存活能力的影响
Figure 6 The influence of oligosaccharides and glucose on survival of *L. acidophilus* after 30 min exposure at 65°C. The control group was MRS without any sugar

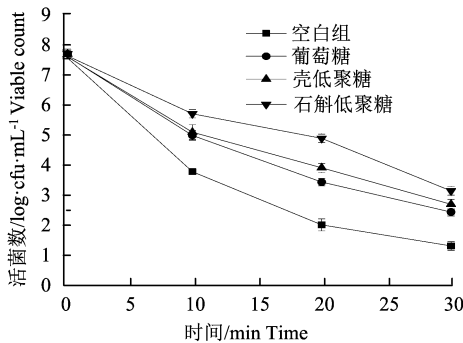


图 7 不同糖源以及空白对照组对鼠李糖乳酸菌经 65°C 30 min 处理后, 存活能力的影响
Figure 7 The influence of oligosaccharides and glucose on survival of *L. rhamnosus* after 30 min exposure at 65°C. The control group was MRS without any sugar

2.3 耐高温

食品中常用的杀菌的方法是巴氏杀菌法, 虽然这种方法可以杀死一些病原菌和杂菌, 但同时益生

菌也会受到不同程度的影响。现在普遍使用的巴氏消毒法是指在 62.8°C 下 30 min。故为了更好地观察高温下金钗石斛低聚糖对于乳酸菌的保护作用, 实验采用 65°C 下处理 30 min。结果(图 5~图 7)显示, 在 65°C 处理过程中, 3 株乳杆菌随着时间的延长, 活菌数减少, 不同糖源的实验组与空白对照组相比, 均能够提高乳杆菌的耐热能力, 其中石斛低聚糖的效果最好。

2.4 0.4% 苯酚的影响

在人体肠道内, 食物的残渣或者人体自身的氨基酸脱氢会生成苯酚^[11], 而苯酚对于肠道内的益生菌具有抑制作用。用 0.4% 的苯酚处理含不同糖源的 3 株乳杆菌, 结果如表 1 所示, 经 0.4% 的苯酚处理以后, 均出现了抑制的效果, 其中与空白对照组相比较, 含有糖源的培养基可以降低苯酚对于乳杆菌的抑制作用, 其中金钗石斛低聚糖的作用较为显著。

3 结论

通过大孔树脂 AB-8 及葡聚糖凝胶柱 Sephadex G-25 的分离纯化, 最终得到一个低聚糖纯品糖 1。

由乳酸菌生长的实验结果(图 2~图 4)可见, 与无糖源的培养基对比, 葡萄糖、壳低聚糖和金钗石斛低聚糖这三种物质都可以促进乳酸菌的生长, 以葡萄糖为唯一碳源的菌生长迅速, 但以金钗石斛低聚糖为唯一碳源的菌生长相对缓慢但更为旺盛。

从耐高温的实验结果(图 5~图 7)可看出, 加入糖类物质的菌液存活率远高于空白组, 其中加入金钗石斛低聚糖的那一组最为明显, 这说明金钗石斛低聚糖可以有效的减少高温处理对益生菌带来的破坏。

表 2 不同糖源以及空白对照组对 3 种乳酸菌对 0.4% 苯酚耐受能力的影响

Table 2 Tolerance of lactobacilli strains to 0.4% phenol in different sugar broth

糖原 ¹ Glucogen	活菌数 ² /log cfu mL ⁻¹ Viable count								
	植物乳杆菌 <i>L. paraplantarum</i>			嗜酸性乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>			鼠李糖乳杆菌 <i>L. rhamnosus</i>		
	C ₀	C ₂₄	抑制 ³	C ₀	C ₂₄	抑制	C ₀	C ₂₄	抑制
空白 Blank	7.49±0.09	3.47±0.07	4.02	7.39±0.07	3.41±0.05	3.98	7.35±0.09	3.53±0.12	3.82
葡萄糖 Glucos	7.41±0.11	5.98±0.06	1.43	7.31±0.06	5.83±0.05	1.48	7.29±0.11	4.99±0.02	2.30
壳低聚糖 COS	7.30±0.02	5.89±0.05	1.41	7.49±0.03	5.75±0.04	1.74	7.21±0.14	5.14±0.07	2.07
石斛低聚糖 Oligosaccharides of <i>Dendrobium nobile</i>	7.46±0.12	6.44±0.11	1.02	7.28±0.02	6.18±0.05	1.10	7.31±0.12	5.52±0.03	1.79

注: 1 为分别含有葡萄糖、壳聚糖、石斛低聚糖与 0.4% 苯酚混合的 MRS 培养基, 空白组为不含任何糖类物质。2 为每组实验 3 次的平均值, 以±SD 的形式表示。3 为抑制=log₁₀C₀ - log₁₀C₂₄

Note: 1 means containing glucose, chitosan, oligomeric glycopene mixed 0.4% phenol MRS medium, respectively, the blank group do not contain any sugars. 2 means the average of three experiments and per group is expressed as ±SD. 3 means inhibitors=log₁₀C₀ - log₁₀C₂₄

在 0.4% 苯酚对乳酸菌的影响的实验中,测定了苯酚对于含有不同糖原及空白组培养基中的乳酸菌的生长。结果表明,低聚糖和葡萄糖均可以减少苯酚对于乳酸菌的伤害,其中金钗石斛低聚糖的效果最为明显。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] MUSSATTO S I, DE MANCILHA I M. Non-digestible oligosaccharides: A review[J]. Carbohydr Polym, 2007, 68(3): 587-597.
- [3] NOBRE C, TEIXEIRA J A, RODRIGUES L R, et al. New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructo-oligosaccharides[J]. Crit Rev Food Sci, 2015, 55(10): 1444-1455.
- [4] KIM S, KIM W, HWANG I K, et al. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal[J]. Int J Food Sci Tech, 2003, 38(3): 337-342.
- [5] WANG J, HUANG H H, CHENG Y F, et al. Structure analysis and laxative effects of oligosaccharides isolated from bananas[J]. J Med Food, 2012, 15(10): 930-935.
- [6] YAN W, DING X. Isolation and characterization of 10 microsatellite markers for *Dendrobium nobile*, a traditional Chinese tonic medicine[J]. Conserv Genet Resour, 2015, 7(1): 303-304.
- [7] ZHANG Y, WANG H, WANG P, et al. Optimization of PEG-based extraction of polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. and bioactivity study[J]. International Int J Biol Macromol, 2016: 1057-1066.
- [8] ZHOU X, ZHENG C, WU J, et al. Five new lactone derivatives from the stems of *Dendrobium nobile*. [J]. Fitoterapia, 2016, 115: 96-100.
- [9] 张晓敏, 孙志荣, 陈龙, 等. 金钗石斛的化学成分的药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(7): 895-899
- [10] RUNGWICHANIWAT P, SRITULARAK B, LIKHITWITAYAWUID K. Chemical constituents of *Dendrobium williamsonii* [J]. Phcog J, 2014, 6(3): 36-41.
- [11] 金苏, 张国亮, 冀朵朵, 等. 乳酸菌抗诱变致癌物质研究[J]. 食品工业科技, 2009, 12: 165-169.
- [12] PINTO M G, FRANZ C M, SCHILLINGER U, et al. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products[J]. Int J Food Microbiol, 2006, 109(3): 205-214.
- [13] XANTHOPOULOS V, LITOPOULOUTZANETAKI E, TZANETAKIS N, et al. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts[J]. Food Microbiol, 2000, 17(2): 205-215.