

文章编号:1008-1542(2012)02-0115-04

枸杞多糖对德氏乳酸杆菌在体外生长与保存活力的影响

王瑞君^{1,2}

(1. 宜春学院江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西宜春 336000; 2. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000)

摘要:研究枸杞多糖对德氏乳酸杆菌保加利亚亚种的体外生长与保存是否有促进作用。利用水提法提取枸杞多糖, 利用含有不同浓度枸杞多糖的 MRS 培养基研究枸杞多糖对乳酸杆菌的影响。结果表明, 在一定浓度范围内, 随着枸杞多糖浓度的上升, 培养基中乳酸杆菌的活菌数呈上升趋势。证明在一定浓度范围内, 枸杞多糖对乳酸杆菌的生长与保存具有促进作用。

关键词:枸杞多糖; 德氏乳酸杆菌; 生长; 保存

中图分类号: Q815 文献标志码: A

Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on growth and preservation of *Lactobacillus delbrückii*

WANG Rui-jun^{1,2}

(1. Key Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun University, Yichun Jiangxi 336000, China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun Jiangxi 336000, China)

Abstract: Whether *Lycium barbarum* polysaccharides has positive effect on preservation and growth of *Lactobacillus delbrückii* is studied. The traditional water extraction is employed to obtain polysaccharides. Cells grow in MRS with different concentration of *Lycium barbarum* polysaccharides. Within a certain concentration range, positive correlation is found between polysaccharides concentration and total viable count of *Lactobacillus*. The increased polysaccharides concentration in MRS appears to be responsible for the stimulatory effects on the growth and preservation of *Lactobacillus*.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharides; *Lactobacillus delbrückii*; growth; preservation

枸杞为茄科、枸杞属的多分枝灌木植物, 富含枸杞多糖、甜菜碱、类胡萝卜素及类胡萝卜素酯、抗坏血酸、多种不饱和脂肪酸、多种氨基酸及矿质元素(K, Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, P)等多种成分^[1-2], 具有很高的营养价值和药用保健功能, 是中国传统的药食同源食物。其中枸杞多糖是主要的生物活性成分, 枸杞多糖中包含了阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖等多种成分^[3], 具有抗氧化^[4]、抗衰老^[5]、提高免疫力^[6]等多种功效。BAE 等报道枸杞的甲醇提取物提高了酸奶的抗氧化活性^[7], 这一结果显示枸杞的某些化学成分可能有利于酸奶中微生物的存活, 但有关枸杞多糖对酸奶中乳酸菌的影响未见报道。

大多数乳酸菌属于益生菌, 主要包括乳酸杆菌与双歧杆菌。乳酸杆菌是人体和动物胃肠道内的共生菌, 现广泛应用于食品、医药、饲料等领域。常见的乳酸杆菌包括德氏乳酸杆菌(*Lactobacillus delbrückii*)、嗜酸

收稿日期: 2011-08-29; 修回日期: 2011-11-28; 责任编辑: 王海云

作者简介: 王瑞君(1970-), 女, 山东潍坊人, 讲师, 硕士, 主要从事微生物方面的研究工作。

乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、鼠李糖乳酸杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)等。现在多项研究表明乳酸杆菌等益生菌有助于降低宿主体内胆固醇水平、改善宿主的免疫功能^[8],对腹泻、过敏、肠易激综合征、炎症性肠病等也有显著疗效^[9-10]。但是乳酸杆菌发挥益生作用,必须克服胃肠道的物理和化学障碍,特别是对胃酸和胆汁的耐受^[11]。此外,在生产、运输或储存中,乳酸杆菌制剂也必须保持足够的活菌数。研究表明,益生菌制剂的活菌数1 g或1 mL应介于 $10^7 \sim 10^9$ CFU的范围内^[12]才能充分发挥乳酸杆菌等的益生作用。作为活菌制剂,乳酸杆菌制品易受周围环境(如温度等)的影响,导致数量不稳定。笔者研究枸杞多糖对乳酸杆菌的生长、保存的促进作用,以期克服乳酸杆菌在应用时活菌数易降低的问题。本研究也可扩大枸杞等中草药的利用范围,为非乳品发酵微生态制剂的研发提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1)枸杞 宜春汇仁堂药店提供。2)乳酸杆菌 德氏乳酸杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrückii* subsp. *Bulgarius*),来源于伊利酸牛奶。3)培养基 MRS液体培养基(蛋白胨10 g,牛肉膏8 g,酵母膏4 g,葡萄糖20 g,柠檬酸氢二铵2 g,吐温80 1 mL,乙酸钠5 g,磷酸氢二钾2 g,硫酸镁0.6 g,硫酸锰0.2 g,水1 000 mL,pH值为6.5)用于乳酸杆菌的活化、保存;MRS固体培养基(在MRS液体培养基的基础上添加质量分数为2%的琼脂)用于乳酸杆菌的计数。

1.2 方法

1.2.1 枸杞多糖的提取

利用水提法提取枸杞多糖^[13-14]。将枸杞放入烤箱中,干燥后粉碎,加入体积分数为80%的乙醇,加热浸泡后过滤,滤渣中加入蒸馏水,于100℃恒温2 h后过滤,将滤液浓缩后,用无水乙醇沉淀、过滤,将沉淀物加入丙酮-乙醚混合液(体积比为1:1),50~60℃条件下回流30 min,于60℃恒温干燥至恒重得枸杞多糖粗提取物。在多糖粗提取物中加蒸馏水使其完全溶解,用SEVAGA^[15]法脱去溶液中的蛋白质,离心除去蛋白质,保留上清液。重复3次,获得枸杞多糖。

1.2.2 枸杞多糖对乳酸杆菌的影响

MRS培养基中加入质量分数不等的枸杞多糖,使其在MRS培养基中的终浓度(质量分数,下同)分别为0,0.2%,0.4%,0.6%,0.8%,1.0%,1.2%,1.4%,1.6%。将上述培养基在115℃下灭菌30 min后,平均分装在21支10 mL的离心管中,按1:100(体积比)接种新鲜的德氏乳酸杆菌菌液。每个浓度任选3支放在一起,共分为7组,分别标记为A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,于37℃条件下在厌氧罐内培养48 h,取出全部离心管,用MRS固体培养基计数A1组的菌落数,其余各组于室温下保存,每隔5 d依次取出下一编号样品,用MRS固体培养基计数,直至35 d后取出A7组进行活菌计数。

2 结果

表1给出了不同浓度的枸杞多糖对乳酸杆菌生长和保存的影响。A1组的数据(见表1)显示,在0~0.8%的浓度范围内,随着枸杞多糖浓度的增加,乳酸杆菌的菌落数呈上升趋势;枸杞多糖的浓度为0.8%时菌落数达最大值;枸杞多糖的浓度超过0.8%后,随着枸杞多糖浓度的增加,乳酸杆菌的菌落数呈下降趋势。这一结果表明在一定的浓度范围内枸杞多糖对乳酸杆菌的生长具有促进作用。

A2-A7组(见表1、图1)为室温条件下保存不同时间后,不同浓度的枸杞多糖对乳酸杆菌保存活力的影响。结果显示在0~0.8%的范围内,随着枸杞多糖浓度的增加,在相同的保存时间内乳酸杆菌的活菌数及存活率呈上升趋势;在0.8%~1.6%的

表1 不同浓度的枸杞多糖对乳酸杆菌生长和保存的影响

Tab. 1 Effects of Lycium barbarum polysaccharides on the growth and preservation of *Lactobacillus*
×10⁷ CFU/mL

ω(枸杞多糖)/%	样品活菌数						
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
0	1.26	0.78	0.42	0.20	0.10	0.05	0.04
0.2	1.73	1.44	1.18	0.68	0.36	0.21	0.14
0.4	2.05	1.87	1.67	1.41	0.96	0.7	0.45
0.6	2.32	2.12	1.95	1.86	1.6	1.32	1.18
0.8	2.48	2.32	2.24	2.08	1.87	1.55	1.43
1.0	2.41	2.21	2.06	1.89	1.74	1.62	1.51
1.2	2.12	1.96	1.81	1.65	1.52	1.35	1.09
1.4	1.94	1.75	1.58	1.42	1.35	1.32	1.14
1.6	0.96	0.84	0.72	0.60	0.42	0.30	0.24

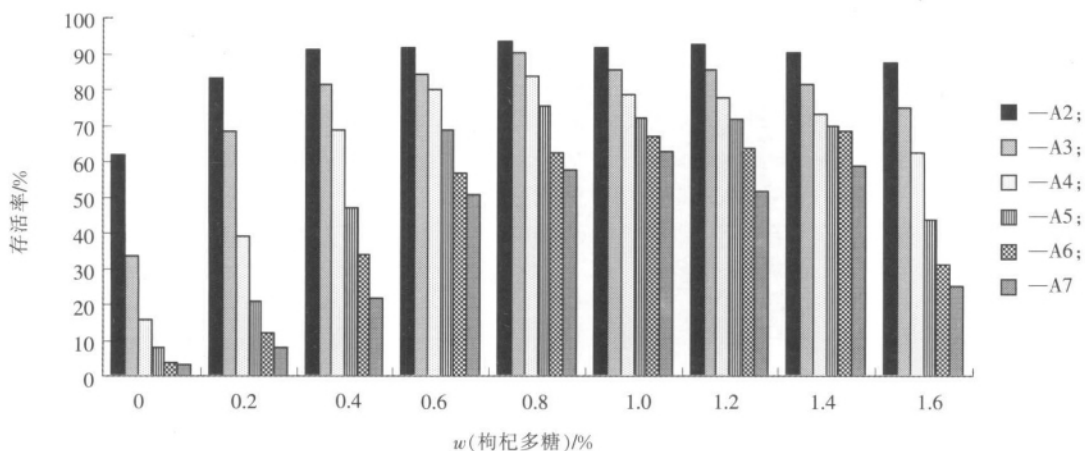


图1 枸杞多糖对德氏乳酸杆菌保存存活率的影响

Fig.1 Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the survival rate of *Lactobacillus delbrückii*

范围内,乳酸杆菌的存活数及存活率呈下降趋势。这说明在一定浓度范围内,枸杞多糖对乳酸杆菌的保存具有促进作用。

3 讨论

德氏乳酸杆菌在食品工业,尤其在酸奶、奶酪等领域应用非常广泛。本文以德氏乳酸杆菌作为指示菌,研究枸杞多糖对乳酸杆菌的生长与保存的促进作用。

结果显示,在一定浓度范围内枸杞多糖对乳酸杆菌的生长与保存具有促进作用,这可能与枸杞多糖的组成成分有关。资料证实,乳酸杆菌可利用葡萄糖、甘露糖、果糖等多种成分^[16]作为碳源、能源物质。在乳酸杆菌产生的某些胞外水解酶的作用下,枸杞多糖可能分解为葡萄糖、甘露糖等单糖,为乳酸杆菌的生长繁殖提供了能源物质。枸杞多糖对乳酸杆菌的生长与保存的促进作用也可能与枸杞多糖的抗氧化功能有关。乳酸杆菌为厌氧微生物或微好氧微生物,枸杞多糖的抗氧化功能可能减少了保存过程中氧对乳酸杆菌的抑制作用。

有关中草药与微生物之间关系的研究多集中于中草药对致病微生物的抑制作用,对中草药与益生菌之间的关系研究较少。本研究为某些中草药与益生菌的联合使用提供了一定依据。但中草药的成分比较复杂,有关中草药与益生菌之间的相互作用机制尚不很明确,需进一步研究。

参考文献:

- [1] 谢忱,徐丽珍,李宪铭,等. 枸杞子化学成分的研究[J]. 中国中药杂志(China Journal of Chinese Materia Medica), 2001, 26(5): 323-324.
- [2] 刘萍,王凤英. 不同产地枸杞子微量元素的对应分析[J]. 安徽农业科学(Journal of Anhui Agricultural Sciences), 2008, 36(19): 8 135-8 136.
- [3] 何进,张声华. 枸杞及枸杞多糖研究[J]. 食品科学(Food Science), 1995, 16(2): 14-21.
- [4] LI X M. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 40: 461-465.
- [5] 沈自尹,郭为民,陈瑜. 枸杞多糖调控老年大鼠 T 细胞凋亡及相关基因表达的研究[J]. 中国免疫学杂志(Chinese Journal of Immunology), 2002, 18(9): 628-630.
- [6] 朱彩平,张声华. 枸杞多糖对肝癌 H₂₂ 荷瘤鼠的抑瘤和免疫增强作用[J]. 营养学报(Acta Nutrimenta Sinica), 2006, 28(2): 182-183.
- [7] BAE H C, CHO I S, NAM M S. Effects of the biological function of yogurt added with *Lycium chinense* Miller extract[J]. Journal of Animal Science and Technology, 2005, 47(6): 1 051-1 058.
- [8] WU R, WANG L, WANG J, et al. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(3): 1-9.
- [9] MCFARLAND L V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea[J]. Travel Med Infect Dis, 2007, 5: 97-105.
- [10] RASTALL R A, GIBSON G R, GILL H S, et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and

- symbiotic to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2005, 52: 145-152.
- [11] del PIANO M, MORELLI L, STROZZI G P, et al. Probiotics: From research to consumer[J]. Digestive and Liver Disease, 2006, 38(2): 248-255.
- [12] DONNET-HUGHES A, ROCHAT F, SERRANT P, et al. Modulation of nonspecific mechanisms of defence by lactic acid bacteria: Effective dose[J]. J Dairy Sci, 1999, 82: 863-869.
- [13] 胡仲秋, 王利, 王保玲, 等. 枸杞多糖提取及消除羟自由基活性研究[J]. 食品科学(Food Science), 2009, 30(24): 93-98.
- [14] 陈群, 杨桂文, 安利国. 银杏白果多糖的提取、纯化和分析[J]. 中国药学杂志(Chinese Pharmaceutical Journal), 2002, 3(5): 331-333.
- [15] 朱彩平, 张声华. 枸杞子水提物中多糖含量的测定[J]. 食品与发酵工业(Food and Fermentation Industries), 2005, 31(2): 111-113.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

(上接第 114 页)

中, 稀释至刻度摇匀即得。在 320 nm 处按照紫外分光光度法测定吸光度, 以吸光度 A 对质量浓度 ρ 作图(略), 得到回归方程 $A = 18.841\rho + 0.0061$ ($R^2 = 0.9998$), 说明在此质量浓度范围内吸光度与质量浓度具有良好的线性关系。

2) 包合物中药物含量的测定

精密称取制备的包合物, 置于 50 mL 容量瓶中, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 在 320 nm 波长处分别测定吸光度, 代入回归方程计算吡哆美辛含量。

3) 包合物包含率的测定

将包合物总量精确称定, 分别准确称取一定量的包合物, 用溶剂溶解后稀释至适当的倍数, 使吡哆美辛质量浓度在标准曲线要求的范围内, 按照紫外分光光度法测定吸光度, 然后计算出包合物中含有吡哆美辛的质量, 计算不同方法制备的包含率, 包含率 = 包合物中药物的量 / 药物投料总量 $\times 100\%$ 。结果见表 1。

表 1 不同制备方法制备的包合物包含率比较

Tab. 1 Comparison of the inclusion rate of inclusion compound by different methods

项目	制备方法		
	饱和水溶液法	研磨法	冷冻干燥法
包含率/%	3.0	61.0	41.7

2 讨论

1) SBE- β -CD 用饱和水溶液法制备包合物的包含率较低, 可能是由于其取代基较大、较多, 包合药物时造成了一定的空间位阻, 制备时给予的能量较低, 不足以使药物克服空间位阻进入 CD 空腔中。研磨时若能给予较高的能量, 可以克服 SBE- β -CD 分子的空间位阻, 使药物分子更容易进入主体分子空腔内, 得到较高的包含率。

2) 研磨后冷冻干燥法制得的包合物为白色疏松状物, 而用研磨法直接烘干得到的包合物硬度和黏度都很大, 可能是在研磨过程中形成“固体桥”的原因。粒子在受压时变形相互嵌合产生机械结合力, 物料由于摩擦力而产生热, 特别是颗粒间支撑点处局部温度较高, 使熔点较低的物料部分融化; 研磨停止后压力解除, 烘干重新固化, 水溶性成分在粒子的接触点处析出结晶而形成“固体桥”。

参考文献:

- [1] 梁金, 蒋异山. 胍酞嗪注射液质量改进的研究[J]. 中国医药工业杂志(Chinese Journal of Pharmaceuticals), 1983(5): 20-22.
- [2] 余兰, 秦芳芳. 吡哆美辛-羟丙基- β -环糊精包合物软膏的制备及含量测定[J]. 中国药房(China Pharmacy), 2007, 18(7): 525-526.
- [3] 葛艳蕊, 王奎涛. β -环糊精玫瑰香精微胶囊的制备[J]. 河北科技大学学报(Journal of Hebei University of Science and Technology), 2004, 25(2): 14-17.
- [4] 赵娥, 吴刚. β -环糊精包合技术应用研究进展[J]. 山东医药工业(Shandong Medical Industry), 2002, 21(1): 32-33.
- [5] 王志宣, 邓英杰. 环糊精包合物脂质体给药系统的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报(Journal of Shenyang Pharmaceutical University), 2006, 23(9): 607-612.
- [6] 郑筱萸, 廖清江. 药学前沿(2001年卷)[M]. 北京: 中国医药出版社, 2002.
- [7] 杜记民, 李强, 付磊霞, 等. 二氧化硅负载五氧化二钒合成、表征和催化性能研究[J]. 河北科技大学学报(Journal of Hebei University of Science and Technology), 2010, 30(2): 166-171.