文章编号:1000-5404(2012)18-1849-04

论著

椰汁体外促双歧杆菌生长作用的研究

朱 辉,张德纯,王春耀,刘明方,刘胜男 (400016 重庆,重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,病原生物学教研室)

[摘要] **目的** 探讨椰汁体外对4株双歧杆菌生长的促进作用。**方法** 利用4株常见的双歧杆菌作为受试菌,以菌液 $D(600)$ 值、pH值、活菌计数以及发酵牛乳凝乳时间和乳液pH值等为指标,来研究椰汁对4种双歧杆菌增殖和活性的促进作用。**结果** 按照25%(V/V)添加椰汁时,4株双歧杆菌菌体浓度(光密度值及活菌计数)均明显高于空白对照组($P<0.05$),其中两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌以及长双歧杆菌甚至高于双歧因子阳性对照组($P<0.05$)。4株双歧杆菌发酵含有椰汁的牛乳后,两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌和长双歧杆菌的凝乳时间均较空白对照组和阳性对照组明显缩短($P<0.05$),婴儿双歧杆菌却未出现凝乳现象,但4株双歧杆菌pH值均低于空白对照组和阳性对照组($P<0.05$)。**结论** 椰汁有可能成为一种良好的双歧因子,并可作为双歧杆菌的天然培养基。

[关键词] 椰汁;双歧杆菌;促生长作用;双歧因子
[中图法分类号] Q93-335;R935;R939.121 [文献标志码] A

Coconut juice improves *Bifidobacterium* proliferation *in vitro*

Zhu Hui, Zhang Dechun, Wang Chunyao, Liu Mingfang, Liu Shengnan (Department of Pathogenic Biology, Center of Molecular Medicine and Tumor Research, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of coconut juice on the growth of 4 strains of *Bifidobacterium in vitro*. **Methods** Four strains of common *Bifidobacterium* were employed as the tested bacteria. The variation of OD_{600} values, pH values, plate counts of bacteria liquid, coagulation time of the fermented milk and its pH values were investigated for the effect of coconut juice on proliferation of 4 strains. **Results** Coconut juice of 25% (V/V) resulted in significantly higher light density values and live bacteria count in the 4 strains compared with blank control group ($P<0.05$), with *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium longum* even higher than positive control group ($P<0.05$). After coconut juice was added into fermenting milk with 4 strains of *Bifidobacterium*, coagulation time of the fermented milk of *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium longum* was significantly shortened, compared with the blank control group and the positive control group ($P<0.05$), except the *Bifidobacterium infantis*. However, the pH values of the 4 strains were all lower than that of the blank control group and the positive control group ($P<0.05$). **Conclusion** Coconut juice may become a kind of good bifidogenic factors, and can be used as the natural medium for *Bifidobacterium*.

[**Key words**] coconut juice; *Bifidobacterium*; growth promotion; bifidogenic factors

Corresponding author: Zhang Dechun, E-mail: zhangdechun46@163.com

双歧杆菌(*Bifidobacterium*,spp)是革兰阳性无芽孢的厌氧杆菌,是人体肠道内重要的生理菌群,它在控制内毒素血症、改善肠黏膜屏障功能、增强机体免疫力等方面起着重要的作用[1]。近年来,双歧杆菌已被运用于各个领域,但是由于双歧杆菌营养要求较高而且生长较慢,所以研究开发一些具有促进双歧杆菌生长的物质也是这一领域所要探讨的问题。人们把能够促进双歧杆菌生长的因子如功能性的低聚糖等称为双歧因子。现已研究发现,多种天然的物质中含有促进双歧杆菌生长的成分,如胡萝卜汁、番茄汁、菊花水煎液、金银花等。椰子,多年生常绿乔木,属于棕榈科椰子属,是热带地区典型的木本油料作物和食品能源食物,椰子的综合利用经济效益高,享有"宝树"之誉,椰汁便是椰子的抽取汁液,汁清如水且营养丰富[2]。本实

[通信作者] 张德纯,E-mail:zhangdechun46@163.com

表1 不同椰汁含量培养基中的菌体浓度（$\bar{x} \pm s$）

菌株	椰汁含量					阳性对照	空白对照
	100%	50%	25%	12.5%	6.25%		
1101	0.408 7 ±0.001 4	2.660 3 ±0.001 2	3.015 3 ±0.000 5[ab]	2.849 7 ±0.001 4	2.820 3 ±0.001 3	2.740 0 ±0.000 9[ab]	2.015 0 ±0.000 9
1102	0.425 3 ±0.000 5	2.195 7 ±0.001 0	2.905 3 ±0.001 4[ab]	2.880 7 ±0.001 0	2.861 0 ±0.000 9[ab]	2.769 0 ±0.000 9	2.700 7 ±0.001 0
1103	0.012 0 ±0.000 8	2.649 7 ±0.000 5	3.114 7 ±0.000 5[ab]	3.094 7 ±0.000 5	3.080 0 ±0.000 9	2.921 3 ±0.001 4	2.500 7 ±0.001 0
1104	0.026 0 ±0.000 8	2.911 0 ±0.000 9	2.915 7 ±0.000 5[ab]	2.715 3 ±0.000 5	2.625 3 ±0.000 5	3.010 0 ±0.000 9	2.616 0 ±0.008 9

a：$P<0.05$，与空白对照组相比；b：$P<0.05$，与阳性对照组相比

验主要探讨椰汁对常见双歧杆菌的体外促生长作用，为椰汁的开发与利用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源 两歧双歧杆菌（编号：1101）、青春双歧杆菌（编号：1102）、长双歧杆菌（编号：1103）、婴儿双歧杆菌（编号：1104），均为实验室保存的冻干菌种。

1.1.2 受试物来源 椰子为市售，产地海南，将椰子置于超净工作台中，于椰蒂处消毒后无菌抽取椰汁，将此椰汁浓度定为100%，100 ℃煮沸30 min，分装，4 ℃保存备用。

1.1.3 培养基 BL液体和固体培养基；双歧因子（ISO-OLIGO，由台湾姚纪高教授惠赠），按照1%添加到BL液体培养基中作为阳性对照，同时设置不含椰汁的BL液体培养基作为空白对照；某品牌牛奶：市售。

1.2 仪器与设备

722型分光光度计，pH计，移液器，精密电子天平，超净工作台，细菌培养箱，厌氧培养系统，高压灭菌锅等。

1.3 方法

1.3.1 菌种的复苏、传代与菌液的制备 4株双歧杆菌均取自冷冻真空干燥的菌种，无菌生理盐水稀释后，再用无菌吸管移入BL固体培养基中，放置于厌氧罐，37 ℃恒温培养48 h，并于BL液体培养基中反复传代2～3次。分别将传代后的4株双歧杆菌用生理盐水稀释，麦氏比浊管调整菌悬液的浓度为0.5麦氏（即1.5×10^8 CFU/ml）备用。

1.3.2 菌体浓度的测定以及椰汁最佳添加量的确定 用不含双歧因子的BL液体培养基将椰汁浓度分别调整为100%（V/V）、50%（V/V）、25%（V/V）、12.5%（V/V）和6.25%（V/V）。将含不同浓度椰汁的BL培养基进行分装，4 ml/管，每个浓度4管，同时以4 ml/管含有1%双歧因子的BL培养基（4管）和不含椰汁的BL培养基（4管）分别作为阳性对照以及空白对照。0.5麦氏比浊的菌液，再次用生理盐水稀释10倍后，移液器取50 μl两歧双歧杆菌菌悬液，分别接种到含不同浓度椰汁的BL培养基、阳性对照管以及空白对照管中，共7管，以此类推，将1102、1103和1104也按照如此方式接种。37 ℃厌氧培养48 h后，取样在600 nm处测吸光度值（各测3次，取平均值），同时以相应的培养基调零。

1.3.3 活菌计数 稀释后滴注培养法[3]：将上述4种0.5麦氏的菌悬液用无菌生理盐水进行10倍稀释后，用移液器分别取50 μl 4种菌悬液接种于含25%椰汁的BL液体培养基中，同时以添加1%双歧因子的BL液体培养基作为阳性对照，并设无椰汁空白对照。厌氧培养24 h后，各标本分别取0.1 ml进行10倍梯度的系列稀释，然后每个稀释度20 μl定量点种于BL固体平板上，计数平板上平均每滴稀释标本液的菌落数。最终每毫升原标本所含活菌数的计算公式为：CFU/ml = 平均每滴菌落数×50×稀释倍数。

1.3.4 菌液$D(600)$的测定 4种0.5麦氏的菌悬液用无菌生理盐水10倍稀释后，用移液器分别取50 μl 4种菌悬液接种于含25%椰汁的BL液体培养基中，同时以添加1%双歧因子的BL液体培养基作为阳性对照，并设无椰汁空白对照。37 ℃厌氧培养，分别于0、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 h取样在600 nm处测定吸光度值（各测3次，取平均值），以相应的培养基调零。

1.3.5 凝乳时间以及乳液发酵24 h后的pH值的测定 分别取0.2 ml上述0.5麦氏的4种菌的菌悬液接种于6 ml含25%椰汁的纯牛乳中，以添加1%的双歧因子作为阳性对照，另设无椰汁空白对照。37 ℃厌氧培养，24 h内观察凝乳时间，厌氧培养至24 h时，测定发酵乳液的pH值。

1.3.6 统计学分析 计量资料符合正态分布且方差齐，以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 18.0统计软件进行方差分析，两两比较采用SNK-q检验，$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 最佳椰汁添加量的确定

48 h后4种双歧杆菌在含不同椰汁添加量的BL液体培养基中菌体浓度[$D(600)$]的测定结果如表1所示。

从表1可以看出，当椰汁添加量为25%时，4种双歧杆菌菌体浓度均大于空白对照组，且差异具有统计学意义（$P<0.05$），其中在此添加量的条件下，两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌和长双歧杆菌的菌体浓度甚至高于双歧因子阳性对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），因此将25%椰汁添加量确定为最佳添加量，后续的试验均使用此添加量。不同椰汁添加量组相比，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 活菌计数结果

以24 h后活菌计数测定结果的对数值作为活菌计数的结果指标，如表2所示。

表 2　活菌计数的结果（lg CFU/ml，$\bar{x} \pm s$）

菌株	椰汁添加量 25%	阳性对照	空白对照
1101	8.698 ± 0.030[ab]	8.224 ± 0.059	8.224 ± 0.045
1102	10.222 ± 0.038[ab]	8.825 ± 0.019	8.224 ± 0.027
1103	9.302 ± 0.026[ab]	9.223 ± 0.029	9.068 ± 0.031
1104	8.922 ± 0.011[ab]	9.224 ± 0.026	8.427 ± 0.019

a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与阳性对照组比较

表 2 结果表明，4 种双歧杆菌菌株在椰汁添加量为 25% 时，24 h 后活菌计数对数值的结果均高于空白对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$），其中两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌和长双歧杆菌活菌计数结果甚至高于双歧因子阳性对照组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

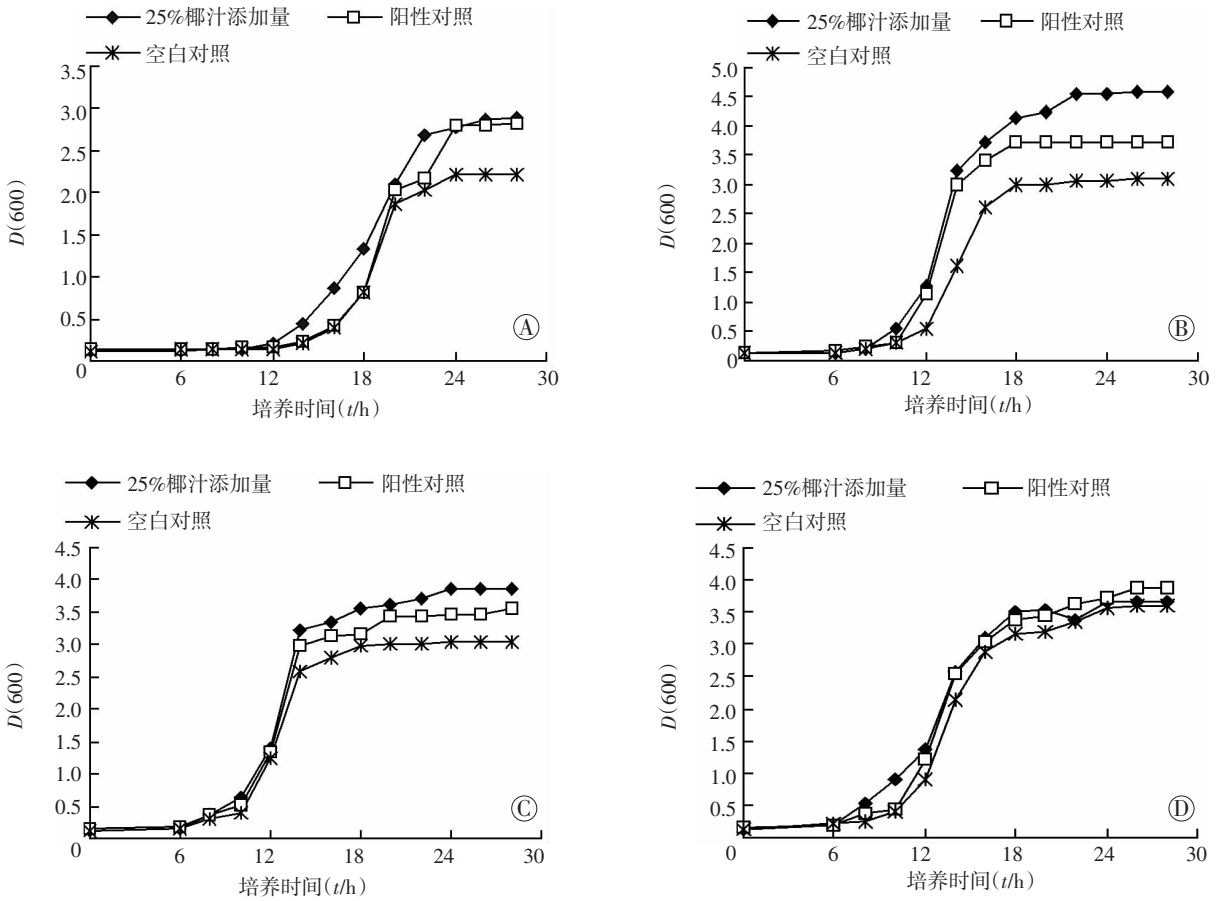
2.3　菌液 $D(600)$ 的测定结果

4 种菌悬液在含 25% 椰汁添加量的 BL 液体培养基、双歧因子阳性对照和无椰汁空白对照培养基中，37 ℃ 厌氧培养，28 h 内在各时间点测定菌液 $D(600)$，并据此结果分别绘制 4 种菌株的 OD 值变化曲线，如图 1 所示。

由图 1 可以看出，当椰汁添加量为 25% 时，4 种双歧杆菌 $D(600)$ 最大值均高于空白对照，以两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌和长双歧杆菌最为明显。其中青春双歧杆菌和长双歧杆菌 $D(600)$ 最大值甚至高于双歧因子阳性对照，吸光度值分别比阳性对照高出 1.5 和 1.0。

2.4　椰汁添加后对双歧杆菌发酵牛乳的影响

以凝乳时间和发酵 24 h 后乳液 pH 值为测定指标，结果如表 3 所示。



A:1101 菌株，B:1102 菌株，C:1103 菌株，D:1104 菌株

图 1　4 株双歧杆菌在各培养基中的 $D(600)$ 值变化曲线

表 3　椰汁对双歧杆菌发酵牛乳的影响（$\bar{x} \pm s$）

测定指标	菌株 1101			菌株 1102			菌株 1103			菌株 1104		
	25% 椰汁添加量	阳性对照	空白对照	25% 椰汁添加量	阳性对照	空白对照	25% 椰汁添加量	阳性对照	空白对照	25% 椰汁添加量	阳性对照	空白对照
凝乳时间(h)	19.00 ± 0.07[ab]	19.56 ± 0.09	20.08 ± 0.08	28.03 ± 0.04[ab]	29.19 ± 0.02	30.04 ± 0.04	23.96 ± 0.04[ab]	24.59 ± 0.09	25.04 ± 0.04	—	—	—
pH 值	3.53 ± 0.03[ab]	4.07 ± 0.02	4.58 ± 0.02	3.80 ± 0.05[ab]	4.08 ± 0.04	4.29 ± 0.05	3.09 ± 0.04[ab]	4.82 ± 0.05	5.03 ± 0.03	5.39 ± 0.05[ab]	5.46 ± 0.05	5.96 ± 0.04

“—”表示未出现凝乳现象；a：$P<0.05$，与空白对照组相比；b：$P<0.05$，与阳性对照组相比

表3表明,25%的椰汁添加量能使两歧双歧杆菌、青春双歧杆菌和长双歧杆菌的凝乳时间较空白对照分别提前1、2、1 h,差异具有统计学意义($P<0.05$),同时较双歧因子阳性对照凝乳时间也都有所提前,差异具有统计学意义($P<0.05$)。但是,婴儿双歧杆菌均未出现凝乳现象。发酵24 h后乳液pH值测定结果表明,相同的发酵条件下,凝乳时间越短、pH值越低,4株双歧杆菌发酵24 h后乳液pH值均较空白与阳性对照组低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

双歧杆菌是自然定居于人类和温血动物胃肠道中的一种革兰染色阳性的原核细胞型微生物,起着维持胃肠道健康平衡的重要作用[4]。但是双歧杆菌生长的营养要求较高,以葡萄糖和一些低聚糖等有机碳源作为碳源和能量的来源,最适宜的氮源则是蛋白质水解产物如氨基酸、多肽、蛋白胨等,此外双歧杆菌生长还需要钠、钾、钙、镁、锰、铁等矿物元素以及双歧因子、维生素等一些促生长因子[5]。椰汁,作为椰子的可利用成分之一,含有丰富的营养成分,如蛋白质、脂肪、糖类、水分、维生素、微量元素等。其中糖类和多种氨基酸成分可以满足双歧杆菌生长所需的碳源和氮源;维生素和一些矿物元素又能够促进双歧杆菌的新陈代谢和酶类的合成,尤其是锰等金属离子可以促进双歧杆菌细胞壁的合成,并且也是激活双歧杆菌糖苷酶的主要成分[6]。因此,当椰汁添加进无双歧因子的BL培养基中,4株双歧杆菌均能很好的生长。但是,通过比较不同的添加量可知,椰汁添加并非越多越好。吴拥军等[7]在对耐氧双歧杆菌生长代谢过程的研究中指出,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,所以尽管椰汁蛋白含量高,但是椰汁添加量浓度过高,双歧杆菌最大吸光度值反而降低,只有椰汁添加量为25%时,才能很好地促进双歧杆菌的生长,尤其是青春双歧杆菌和长双歧杆菌。

菌液的吸光度值可以确定细菌的生长密度,反映的是细菌的总密度;活菌计数的结果反映的则是活菌数,与吸光度值不同,但是二者均可作为检测细菌增殖的指标。双歧杆菌发酵糖类的代谢产物主要是一些短链的有机酸如醋酸、乳酸等,故双歧杆菌发酵乳液的pH值测定可以作为双歧杆菌具有活性的指标。凝乳时间一定程度上能够说明双歧杆菌的活性,但是此项指标容易受到很多因素的干扰,本次试验中婴儿双歧杆菌未出现凝乳现象,原因可能是:此种市售牛奶具体的加工处理途径不清楚,可能有一些因素会影响凝乳;菌种可能不太适应牛奶这一培养基,此外牛奶培养基可能没有经过脱氧处理,不能创造一个相对厌氧的培养环境。从发酵乳液24 h后的pH值测定结果可以看出,婴儿双歧杆菌在3种类型的培养基中pH值均高于其他几种双歧杆菌,也说明此株婴儿双歧杆菌在牛奶这一培养基中的生长状况不好,同时该菌株产酸能力可能也较弱。

本研究表明,当椰汁添加量为25%时,能够很好地促进双歧杆菌的生长,特别是青春双歧杆菌和长双歧杆菌的生长,可见椰汁可以作为双歧杆菌的天然培养基。已有研究表明椰汁是天然的运动饮料,椰子的提取物能够有效地降低血糖和血脂水平[8]。并且椰汁作为一种天然饮品,如能够结合益生菌进行功能性食品的开发研究,将会为椰汁开辟新的利用途径。但是由于天然椰汁成分复杂,椰汁中促进双歧杆菌生长的主要成分及其机制还需要深入地研究,而且椰汁中是否含有低聚糖等双歧因子成分也值得进一步地探讨。

参考文献:

[1] Waller P A, Gopal P K, Leyer G J, *et al*. Dose-response effect of Bifidobacterium lactis HN019 on whole gut transit time and functional gastrointestinal symptoms in adults[J]. Scand J Gastroenterol, 2011, 46(9): 1057-1064.

[2] 郑亚军, 李艳, 黄宇峰, 等. 椰子蛋白质研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 171-174.

[3] 张雪平, 陆俭, 傅思武, 等. 酪酸梭菌与双歧杆菌对肠道致病菌的体外生物拮抗作用[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(5): 260-262.

[4] Leahy S C, Higgins D G, Fitzgerald G F, *et al*. Getting better with bifidobacteria[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98(6): 1303-1315.

[5] 冉域辰, 黎海芪, 刘明芳. 金银花水提物对双歧杆菌与乳酸杆菌体外生长的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1131-1133.

[6] 段长恩, 秦卫玲, 孙爱平. 椰子汁对青春双歧杆菌体外增殖的影响[J]. 新乡医学院学报, 2009, 26(5): 450-452.

[7] 吴拥军, 王嘉福, 蔡金腾, 等. 耐氧双歧杆菌生长代谢过程的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 40-43.

[8] Naskar S, Mazumder U K, Pramanik G, *et al*. Evaluation of antihyperglycemic activity of Cocos nucifera Linn. on streptozotocin induced type 2 diabetic rats[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(3): 769-773.

(**收稿**:2012-03-30;**修回**:2012-06-06)

(编辑 邓强庭)