

益生菌乳酸发酵法生产高纯度低聚异麦芽糖

许宏贤, 张晓萍, 段 钢*

(杜邦工业生物应用科技部 杰能科(中国)生物工程有限公司, 江苏 无锡 214028)

摘要: 研究了一种新的高纯度低聚异麦芽糖(IMO)生产方法。利用益生菌添加甜菜碱进行乳酸发酵, 将可发酵性糖葡萄糖、果糖和麦芽糖转化为乳酸, 使原料 IMO 等级由 IMO-50 提高到 IMO-90, 发酵液无需进行菌体分离即可用于食品加工。

关键词: 低聚异麦芽糖(IMO); 乳酸; 益生菌; 甜菜碱

中图分类号: Q 815 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1219—05

Production of High-Purity IMO by Lactic Acid Fermentation Using Probiotics

XU Hongxian, ZHANG Xiaoping, DUAN Gang*

(DuPont Industrial Biosciences, Genencor(China) Bio-Product Co., Ltd. Wuxi 214028, China)

Abstract: A new method for the production of high-purity isomalto-oligosaccharides (IMO) by the lactic acid fermentation using probiotic strains was demonstrated. With the addition of betaine and the fermentation of sugars such as glucose, fructose and maltose into lactic acid by probiotics, the low-purity IMO-50 was effectively converted into the high-purity IMO-90. There was no need to separate the strains after conversion. The method is an easy way to manufacture edible products.

Keywords: Isomalto-Oligosaccharides(IMO), lactic acid, probiotic strain, betaine

低聚异麦芽糖(Isomalto-Oligosaccharides, 简称 IMO)是功能性低聚糖的一种^[1], 又称分枝低聚麦芽糖、异麦芽低聚糖、异麦芽寡糖, 是指葡萄糖基以 α -1,6 糖苷键结合而成单数糖在 2~6 不等一类低聚糖, 主要是玉米淀粉在 α -淀粉酶和转葡萄糖苷酶的作用下通过一系列反应得到^[2], 使含异麦芽糖(Isomaltose, IG₂)、潘糖(Panose, P)、异麦芽三糖(Isomaltotriose, IG₃)以及四糖(含四糖)以上(G_n)的低聚糖。低聚异麦芽糖是一种酵母和乳酸菌难以利用的糖类, 用于面包、酸奶等发酵食品时不能被酵母菌、乳酸菌发酵利用, 它残留在食品中发挥其各种理化性能和抗龋齿性, 同时促进肠道内双歧杆菌

的发育。低聚异麦芽糖在发酵乳制品中不会妨碍正常乳酸菌发酵, 低聚异麦芽糖的不发酵性是其食品中发挥保健功能的前提基础^[3]。GBT20881-2007 表明商品低聚异麦芽糖产品规格主要有两种剂型即糖浆和糖粉; 两种规格即 IMO-50 型和 IMO-90 型^[4]。IMO-50 型含有一定量的葡萄糖、麦芽糖; 而 IMO-90 型含葡萄糖和麦芽糖较少, 是高纯度产品。典型的酶法 IMO 生产工艺流程如图 1 所示。

乳酸, 学名为 α -羟基丙酸、2-羟基丙酸、丙醇酸, 其化学式为 C₃H₆O₃, 相对分子质量 90.08。乳酸是一种重要的有机酸, 广泛存在于人体、动植物及微生物中。乳酸是一种风味物质, 同时乳酸、乳酸盐

收稿日期: 2015-01-18

作者简介: 许宏贤(1970—)女, 江苏无锡人, 工学硕士, 高级工程师, 主要从事食品与发酵工程研究。E-mail: xuhongxian@hotmail.com

* 通信作者: 段 钢(1966—), 男, 辽宁沈阳人, 工学博士, 亚太地区技术总监, 主要从事工业酶应用与开发研究。E-mail: gang.duan@dupont.com

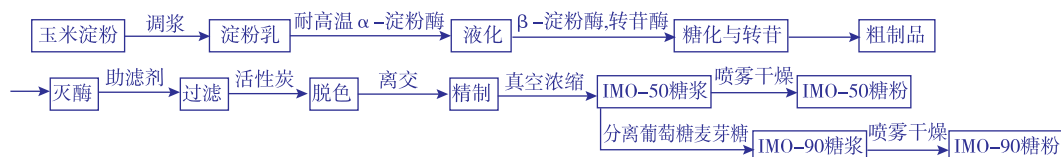


图1 低聚异麦芽糖生产工艺流程

Fig. 1 Process chart of IMO

及其衍生物广泛应用于食品、医药、酿造、纺织等领域。L-乳酸的工业化生产我国多采用细菌发酵^[5]。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是一群形态代谢性能和生理学特征不完全相同的能发酵碳水化合物产生乳酸的革兰氏阳性细菌总称,它的自然宿主是人类、动物和植物^[6]。益生菌是指通过摄入适当量从而对宿主产生有益作用的活性微生物。益生菌对人体主要具有免疫调节、调整肠道菌群、防止腹泻、降低粪便中某些酶活性及抗突变抗癌的医疗保健作用。最常见的益生菌主要有 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 属^[7]。

甜菜碱是一种季铵型生物碱,生产方法有两种^[8]。一种是从甜菜制糖废液中回收,另一种是化学合成,甜菜碱在化工、印染、日化、医药、食品、饲料等领域中都有广泛的应用,用它制造人造肉等食品,对老人保健、儿童生长发育都能起到良好的促进作用。作为一种高效活性甲基供体生物营养素,甜菜碱具有多种生理功能,如促进动物蛋白质和脂肪代谢、调节渗透压、稳定维生素、改善饲料适口性等。

低聚异麦芽糖酶法工艺生产的糖浆如果不经过去除葡萄糖、麦芽糖的过程,其 IMO 质量分数一般不会超过 60%。

根据国标 GBT20881-2007, IMO-90 中葡萄糖和麦芽糖的含量不高于 10%,是高纯度产品,高纯度低聚异麦芽糖具有特殊的生物活性功能,甜度低、热值低、抗龋齿,促进人体肠道内双歧杆菌大量繁殖,明显抑制肠道内有害菌的繁殖及腐败物质的生成,具有防止便秘、增强机体免疫力等功效,更适宜糖尿病人和肥胖症患者等人群食用,从而扩大了 IMO 的应用范围。利用发酵法去除可发酵性糖从而提高功能性低聚糖含量的研究近年开始见诸报道^[9-10],相关的研究有利用乳酸菌发酵法生产高活性大豆低聚糖^[11-12];利用酵母菌生产高纯度低聚异麦芽糖联产酒精等^[13-15];而少量残余酒精可能影响产品的风味;但是在商品 IMO-50 的基础上,通过乳酸菌

发酵从而提升 IMO 等级的研究尚未见报道,IMO 浓缩糖浆的高渗透压可能是影响乳酸发酵的技术障碍之一。作者研究了通过添加甜菜碱进行益生菌发酵,将葡萄糖和麦芽糖转化为乳酸,从而提高 IMO 的等级,该技术无需进行发酵液菌体分离,有着广泛的应用前景和巨大的商业潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

IMO-50 糖浆:作者所在实验室制备;甜菜碱 Betafin BP20;杜邦工业生物应用科技部提供;菌种: *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.2446:购自中国普通微生物菌种保藏管理中心; *Lactobacillus plantarum* CICC 20659:购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

分析试剂:乳酸,葡萄糖,果糖,麦芽糖,麦芽三糖,异麦芽糖,异麦芽三糖,异麦芽四糖,异麦芽五糖,异麦芽六糖,异麦芽七糖,潘糖,海藻糖,麦芽酮糖,曲二糖,黑曲霉糖;Sigma-Aldrich 公司产品;醋酸钠(ICS 级);Fisher 公司产品。

基础液体培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 10,酵母膏 5, K_2HPO_4 2,柠檬酸氢二铵 2,无水乙酸钠 5,葡萄糖 20, Tween 80 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 20,自来水配制, pH 6.5,基础固体培养基加入质量分数 2%琼脂粉;121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基(g/L):玉米浆 40,酪蛋白 10,牛肉膏 10,酵母膏 10, Tween 80 1.5, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.3, $CaCO_3$ 20,用实验室自己制备的 IMO-50 配制, pH 6.5,根据试验条件不同添加甜菜碱。

1.2 实验设备

高压液相色谱:Agilent 1100 系列,Agilent 公司产品;离子色谱(IC):ICS-5000型离子色谱;戴安公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌活化与扩培 从斜面上取一环乳酸菌,转移到装有 100 mL 液体基础培养基的 500 mL

三角瓶中,37 ℃摇床 200 r/min 培养 12~18 h。

1.3.2 乳酸发酵实验步骤 配制发酵培养基,装液量每个发酵罐 1 000 mL。打开 Bio-Command Plus 软件,控制温度 45 ℃;根据试验条件不同用氨水或氢氧化钙调节 pH 6.5。按接种量体积分数 10%接入培养好的液体种子,开始发酵,过程中控制 pH 温度稳定。发酵过程中取样进行 HPLC 分析乳酸含量和残余葡萄糖、二糖含量。发酵结束取样进行 IC 分析 IMO 组成。

2 结果与讨论

2.1 甜菜碱添加量的影响

考虑到 IMO-50 糖浆的高渗透压,而甜菜碱可以调节乳酸发酵渗透压^[18],故首先考察甜菜碱不同添加量对发酵的影响。试验菌种为 *L. rhamnosus* CGMCC 1.2446,20%氨水调节 pH,将不同含量的甜菜碱加入到发酵培养基中培养,定期取样,采用 HPLC 测定发酵液中乳酸和残余一糖二糖的质量分数,结果如图 2 所示。

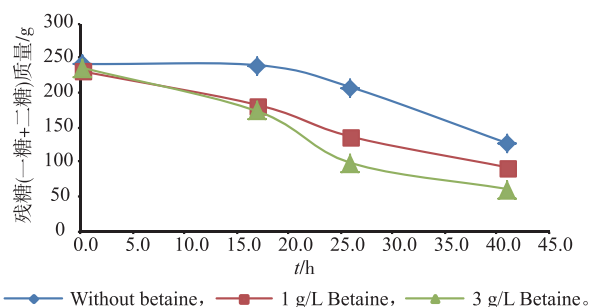


图 2 不同添加量甜菜碱对残余一糖、二糖的影响
Fig. 2 Effect of betaine on residual sugars (DP1+DP2)

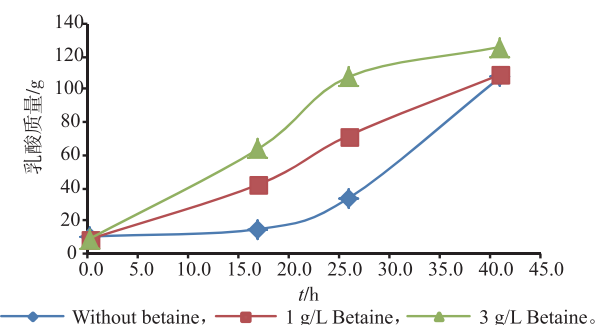


图 3 不同添加量甜菜碱对乳酸的影响
Fig. 3 Effect of betaine on the content of lactic acid

由图 2 可知,在不添加甜菜碱的情况下,在发酵的前 17 h,残余的一糖二糖几乎没有变化,发酵的延滞期非常长,发酵几乎处于停滞状态,最终残

糖含量较高;添加甜菜碱后情况明显好转,高添加量 3 g/L 优于低添加量 1 g/L;由图 3 可知,在不添加甜菜碱或甜菜碱添加量不足的情况下,乳酸含量较低,与图 2 残糖降低水平相呼应。相关研究表明,在高渗环境下细胞的生长速率和酶活会大幅下降,甜菜碱作为一种外源性的渗透保护剂,可以平衡细胞内外的渗透压,从而提高微生物对高渗环境的耐受性;对于乳酸菌 *Lactobacillus*,甜菜碱还是酶活的渗透压保护剂。由于 IMO-50 糖浆的干物质质量分数高达,试验结果再次证明了如果用 IMO-50 糖浆直接进行发酵,必须添加适量的甜菜碱。

2.2 氢氧化钙质量分数的影响

在工业化规模乳酸发酵生产中,氢氧化钙是最普遍使用的 pH 调节剂,故考察不同质量分数氢氧化钙对发酵的影响。试验菌种 *L. rhamnosus* CGMCC 1.2446,将 3 g/L 甜菜碱加入到发酵培养基中培养,用 20%或 8.5%氢氧化钙溶液调节 pH,定期取样,采用 HPLC 测定乳酸含量和残余一糖二糖的变化,结果见图 4 和图 5。

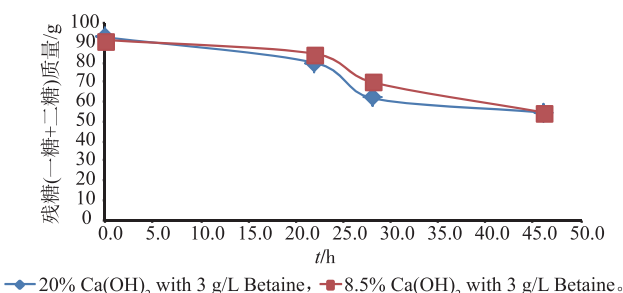


图 4 不同质量分数氢氧化钙对残余一糖、二糖的影响
Fig. 4 Effect of Ca(OH)₂ on residual sugars (DP1+DP2)

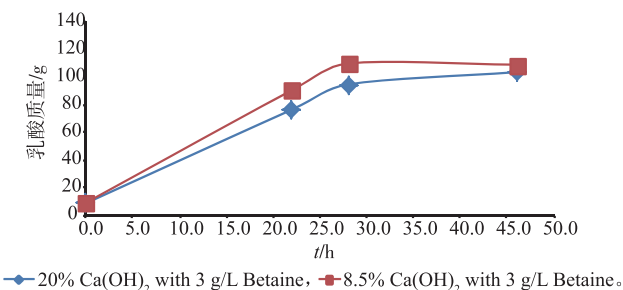


图 5 不同质量分数氢氧化钙对乳酸的影响
Fig. 5 Effect of Ca(OH)₂ on the content of lactic acid

由图 4 可知,质量分数 8.5%和 20%氢氧化钙的最终残余一糖二糖数值几乎没有差别,图 5 表明 8.5%的最终乳酸含量略高于后者,发酵过程中前者的产酸速率略快于后者,这可能是由于低质量分

的氢氧化钙有一定的稀释作用所致。由于 HPLC 显示残余的一糖含量接近零,二糖仍有部分残余,而 HPLC 无法分辨残余二糖的具体成分,故选取质量分数 20%氢氧化钙的发酵液与原始糖浆进行 IC 分析,结果如表 1 所示。

表 1 IMO-50 糖浆发酵前后 IC 分析
Table 1 IC analysis of sugar profiles of IMO-50 before and after fermentation

残糖		残糖质量/g		差值/%
		发酵 0 h	发酵 46 h	
一糖	葡萄糖	78.66	0.11	-99.86
	果糖	3.49	0	-100.00
二糖	麦芽糖	7.29	3.68	-49.52
	异麦芽糖	58.56	43.84	-25.14
	黑曲霉二糖	4.73	3.76	-20.51
	海藻糖	2.03	2.67	31.53
	麦芽酮糖	6.90	4.46	-35.36
	曲二糖	5.00	4.59	-8.20
三糖	异麦芽三糖	27.14	21.88	-19.38
	麦芽三糖	1.24	4.23	241.13
	潘糖	23.93	25.57	6.85
高糖	异麦芽四糖	1.46	1.08	-26.03
	异麦芽五糖	1.38	1.73	25.36
	异麦芽六糖	3.77	1.15	-69.50
	异麦芽七糖	3.39	3.39	0.00
可检测的总糖		228.96	122.14	
利用的糖			106.82	

由表 2 可知,通过 *L. rhamnosus* 乳酸发酵,IMO-50 糖浆一糖中的葡萄糖从 78.66 g 降低到 0.11 g,果糖含量从 3.49 g 降为零;二糖中的麦芽糖从 7.29 g 降低到 3.68 g;异麦芽糖、黑曲霉二糖、麦芽酮糖略有下降,海藻糖和曲二糖变化不大;三糖及三糖以上成份变化不大。即通过 *L. rhamnosus* 乳酸发酵,可发酵性糖(葡萄糖、果糖、麦芽糖)大幅降低,从 39.1%降低到 3.1%;由于 *L. rhamnosus* 属于益生菌,也会代谢某些低聚糖成份转化为乳酸,如异麦芽糖、黑曲霉二糖和麦芽酮糖等,但利用顺序靠后;总体来讲,发酵前总糖为 228.96 g,发酵后为 122.14 g,有 106.82 g 糖通过 *L. rhamnosus* 转化为 103.45 g 乳酸。发酵液是高纯度 IMO 糖浆(可发酵性糖含量仅为 3.1%)、乳酸和 *L. rhamnosus* 的混合物。

2.3 其它益生菌的发酵

试验菌种 *L. plantarum* CICC 20659,将 3 g/L 甜

菜碱加入到发酵培养基中培养,用质量分数 20%氢氧化钙调节 pH,定期取样,采用 HPLC 测定乳酸含量,结果如表 2 所示;采用 IC 测定发酵前后 IMO 成份变化,结果如表 3 所示。

表 2 菌种 *L. plantarum* CICC 20659 发酵结果 HPLC 分析
Table 2 HPLC analysis of the result of fermentation by *L. plantarum* CICC 20659

时间/h	二糖质量 分数/%	葡萄糖 质量分数/%	乳酸质量浓 度/(mg/mL)	乳酸 产量/g	残糖 质量/g
0.0	9.97	12.19	15.53	15.53	
6.0	9.87	14.15	19.52	20.50	
22.5	8.09	7.29	63.79	76.55	
30.0	7.32	0.90	83.88	105.69	
46.0	6.55	0.00	102.24	130.87	83.84
52.0	6.07	0.00	112.97	145.73	78.30

表 3 菌种 *L. plantarum* CICC 20659 发酵前后 IC 对比
Table3 IC analysis of sugar profiles after *L.plantarum* fermentation

残糖		残糖质量/g		差值/%
		发酵 0 h	发酵 46 h	
一糖	葡萄糖	105.28	0.09	-99.92
	麦芽糖	24.70	4.09	-83.43
二糖	海藻糖	3.67	0.23	-93.73
	异麦芽糖	48.02	26.78	-44.23
	麦芽酮糖	2.50	4.90	95.79
	曲二糖	5.12	3.39	-33.88
三糖	黑曲霉二糖	5.24	3.28	-37.48
	异麦芽三糖	25.02	32.61	30.29
	潘糖	32.06	17.21	-46.33
高糖	麦芽三糖	3.34	0.78	-76.55
	异麦芽四糖	1.43	4.03	181.89
	异麦芽五糖	1.46	3.75	156.53
	异麦芽六糖	6.50	3.85	-40.71
可检测的总糖		264.35	104.97	
利用的糖			159.38	

由表 3 可知:通过 *L. plantarum* 乳酸发酵,IMO-50 糖浆一糖中的葡萄糖从 105.28 g 降低到 0.09 g;二糖中的麦芽糖含量从 24.7 g 降低到 4.09 g;海藻糖从 3.67 g 降低到 0.23 g,异麦芽糖从 48.02 g 降低到 26.78 g,曲二糖、黑曲霉二糖略有下降,麦芽酮糖未见降低;三糖中麦芽三糖从 3.34 g 降低到 0.78 g,潘糖从 32.06 g 降低到 17.21 g,异麦芽三糖含量未见降低。即通过 *L. plantarum* 乳酸发酵,可发酵性糖(葡萄糖、麦芽糖)大幅降低,从 49.17%降低

到3.98%;由于 *L. plantarum* 属于益生菌,也会代谢某些低聚糖成份转化为乳酸,如异麦芽糖、海藻糖、曲二糖、黑曲霉二糖、潘糖等;总体来讲,发酵前总糖为 264.35 g,发酵后为 104.97 g,有 159.38 糖通过乳酸菌 *L. plantarum* 转化为 145.73 g 乳酸。发酵液是高纯度 IMO 糖浆(可发酵性糖含量仅为 3.98%)、乳酸和益生菌 *L. plantarum* 的混合物。

比较表 1 和表 3 可知,不同的益生菌如 *L. rhamnosus*, *L. plantarum* 进行 IMO 乳酸发酵,尽管其最终发酵液中 IMO 的成分不尽相同,但是其可发酵性糖(葡萄糖、果糖、麦芽糖)的质量分数都低于

4%,从而使 IMO-50 的等级提高到 IMO-90,当然由于益生菌本身可以利用某些低聚糖成份,如何及时判断和控制发酵终点尚值得进一步探讨。

3 结 语

低聚异麦芽糖是一种集营养、保健、疗效于一体的功能性低聚糖。益生乳酸菌因为与人类健康息息相关而日益备受关注。作者提供的方法所得发酵液中所含成分(IMO,乳酸,益生菌)均是可食用成分,发酵液无需进行菌体分离即可用于食品加工。

参考文献:

- [1] PATEL S, GOYAL A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2010, 27(5): 1119-1128.
- [2] 张晓萍, 段钢. 功能性低聚糖酶法制备研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011(4): 159-165.
ZHANG Xiaoping, DUAN Gang. Recent progress on enzyme preparation of functional oligosaccharides [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2011(4): 159-165. (in Chinese)
- [3] 王良东. 低聚异麦芽糖性质、功能、生产和应用[J]. 粮食与油脂, 2008(4): 43-47.
WANG Liangdong. The properties, functions, production and utilizations of isomaltooligosaccharide [J]. **Cereals and Oils**, 2008(4): 43-47. (in Chinese)
- [4] GBT 20881-2007, 低聚异麦芽糖[S].
- [5] 段钢. 酶制剂在大宗生化品生产中的应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014.
- [6] 张文羿, 白梅, 张和平. 益生乳酸菌遗传稳定性研究进展[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 361-366.
ZHANG Wenyi, BAI Mei, ZHANG Heping. Genetic stability of probiotic lactic acid bacteria-a review [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2014, 54(4): 361-366. (in Chinese)
- [7] DUAN G, LARS W P, YING Q, et al. Functional oligosaccharides composition and a method for reducing fermentable sugars: WO, 2015061135A1[P]. 2015-4-30.
- [8] 汪家铭. 甜菜碱发展前景看好[J]. 精细与专用化学品, 1997, 15: 18.
WANG Jiaming. Prospects of the development of Betaine[J]. **Fine and Specialty Chemicals**, 1997, 15: 18. (in Chinese)
- [9] NAKAKUKI T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan[J]. **Pure and Applied Chemistry**, 2002, 74(7): 1245-1251.
- [10] MUSSATTO S I, MANCILHA I M. Non-digestible oligosaccharides: A Review [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2007, 68(3): 587-597.
- [11] 刘欣, 张春红, 赵秀红, 等. 乳酸菌发酵法生产高活性大豆低聚糖的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 137-139.
LIU Xin, ZHANG Chunhong, ZHAO Xiuhong, et al. Study of high activity of functional soya oligosaccharide produced by lactic acid bacteria fermentation[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2006, 27(11): 137-139. (in Chinese)
- [12] 刘长江, 张春红, 赵秀红, 等. 乳酸菌发酵法生产高活性大豆低聚糖工艺[P]. 中国专利: 200610045808.7, 2006-10-4.
- [13] 刘宗利, 王乃强, 袁卫涛, 等. 高纯度低聚异麦芽糖及酒精联产制备方法[P]. 中国专利: 101805767 A, 2010-8-18.
- [14] ZHONG Z S, ZHU J H, LI X L, et al. Method for the removal of monosaccharide in oligosaccharides production: US, 7906314 B2 [P]. 2011-3-15.
- [15] 梁磊, 黄向阳, 尚红岩, 等. 用于发酵法纯化生产高纯度低聚异麦芽糖的固定化酵母[P]. 中国专利: 201020223072, 2010-6-10.