

# 一株乳酸菌胞外多糖产生的影响因素及其提取\*

陈 营<sup>1,2</sup> 孙莉萍<sup>1</sup> 曾 勇<sup>1</sup> 王 蕾<sup>2</sup> 安利国<sup>2</sup>

(烟台大学化学生物理工学院 烟台 264005)<sup>1</sup>

(山东师范大学生命科学学院 济南 250014)<sup>2</sup>

**摘要:**应用苯酚—硫酸法对乳酸菌胞外多糖产生的影响因素进行了研究,表明该菌株在培养温度为 30℃,培养时间为 40~48h, pH 值降到 4 时,胞外多糖的产量最大。葡萄糖是乳酸菌产生多糖的良好碳源。在对乳酸菌的培养物进行离心、透析、脱蛋白、脱色,最后用乙醇沉淀,得到粗品多糖,粗品多糖至少含有两种分子量和含量相差很大的多糖。经过 SephadexG-200 凝胶柱得到多糖精品 EPS-II,薄层层析结果显示其为一纯化的样品。

**关键词:**乳酸菌,胞外多糖,柱层析,薄层层析

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0085-06

## The Production Influencing Factors of Extracellular Polysaccharide (EPS) from a Strain of Lactic Acid Bacteria and EPS Extraction \*

CHEN Ying<sup>1,2</sup> SUN Li-Ping<sup>1</sup> ZENG Yong<sup>1</sup> WANG Lei<sup>2</sup> AN Li-Guo<sup>2</sup>

(College of Chemistry & Biology, Yantai University, Yantai 264005)<sup>1</sup>

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014)<sup>2</sup>

**Abstract:** The influencing factors of EPS produced from LAB were studied by using the Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method. It was demonstrated that the strain produced EPS at the most amount when it was incubated to 40~48h and pH4 under 30℃. Glucose is the most suitable sugar source for LAB producing EPS. The rough EPS was obtained from LAB culture after centrifugation, dialysis, deprotein, decoloration, and ethanol-precipitation. The sample was at least composed of two polysaccharides that were different completely from the molecule weight and the amount. The purified EPS was got through the SephadexG-200 column and it was showed that it was a purified sample by thin layer chromatography.

**Key words:** Lactic acid bacteria, Extracellular polysaccharide (EPS), Column chromatography, Thin layer chromatography

微生物的胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 是微生物在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的粘液多糖或荚膜多糖,是具有增稠和胶体性质并能溶解或分散在水中的长链、高分子聚合物<sup>[1,2]</sup>。由于其独特的物理学特性及其良好的流变学特性,并且安全无毒,近年来,微生物的胞外多糖成为研究与开发的热点。

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 是一群能利用可发酵性碳水化合物产生大量乳酸的细菌,由于许多乳酸菌是天然的食品工业生产菌种,其代谢产物胞外多糖被广泛应用于食品工业和医药工业。其生物学活性主要为对肿瘤的抑制作用<sup>[3]</sup>。此外,不同的微生物多糖还具有广泛的药理作用,如抗衰老、抗放射、促进蛋白质及核酸的合成、抗溃

\* 山东省中青年科学家基金资助

通讯作者 Tel: 0535-6902379, E-mail: chen728@sina.com

收稿日期: 2004-10-14, 修回日期: 2005-03-04

疡作用、保肝作用、抗突变作用、抗血栓作用、延长凝血时间、降血糖血脂、抗炎等。在食品工业中,由于乳酸菌产生的胞外多糖具有较高的粘度和稳定性,可用作增稠剂,凝胶剂,填充剂和稳定剂。在乳制品中,对改善产品的质构及口感具有重要作用。因此,乳酸菌胞外多糖在开发新产品和改良产品品质方面具有广泛的应用前景。

目前,虽然产生胞外多糖的乳酸菌研究较多,但真正有价值并已商品化的胞外多糖却很少。除菌种的本身因素外,胞外多糖的产量又受许多因素的影响。本实验选取了一株从牙鲆消化道分离的乳酸菌,对其进行胞外多糖的提取和纯化以及一系列影响因素的分析。拓宽了乳酸菌胞外多糖应用的思路,为进一步研制和开发无细胞型微生物生态制剂提供了技术基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验菌株:乳酸菌 L15 分离自健康牙鲆的消化道,干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 为本实验室保存,发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) ATCC 367、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) ATCC 4356 均购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基:LBS 培养基。不同糖类对多糖产生的影响试验在 LBS 培养基中分别加入不同种类的糖,加入量与 LBS 培养基中的葡萄糖量相同。

### 1.2 方 法

1.2.1 乳酸菌产胞外多糖的鉴定分析:取乳酸菌培养物,离心去菌体,4℃透析,用苯酚-硫酸法检测直至蒸馏水不出现紫环现象<sup>[4]</sup>。透析液经浓缩后加入等体积冷的无水乙醇,同时以透析后的 LBS 培养基作对照,观察是否有沉淀产生。

1.2.2 乳酸菌产胞外多糖的定量检测:首先取葡萄糖制作苯酚-硫酸法糖标准曲线,然后采用苯酚-硫酸法,测定发酵液的吸光度,在标准曲线上查找对应的糖含量,即得乳酸菌及四种乳杆菌的胞外多糖产量。

1.2.3 乳酸菌产胞外多糖的影响因素的分析:(1) 温度对乳酸菌产 EPS 的影响:将乳酸菌分别在 25℃、30℃ 和 37℃ 下静置培养,于不同时间取样,并用苯酚-硫酸法测定发酵液中的糖含量变化。(2) 不同培养时间及菌体生物量对 EPS 产生的影响:接种乳酸菌,30℃ 下连续培养 72h,于不同时间取样,采用比浊法测定发酵液中菌体的生物量,并用苯酚-硫酸法测定发酵液中的糖含量变化。(3) 不同种类的糖对 EPS 产量的影响:在 LBS 培养基中加入不同种类的糖,接种乳酸菌后于 30℃ 下培养 40h,8,000r/min 离心去菌体,采用苯酚-硫酸法测定发酵液中含糖量的变化。

1.2.4 胞外多糖 EPS-II 的分离纯化:将乳酸菌在 30℃ 培养 40h 后,10,000r/min 离心,收集上清液。用旋转蒸发仪减压浓缩至适当体积,蒸馏水透析至少 48h,用苯酚-硫酸法检测透析液中无单糖存在后,再次浓缩。然后除蛋白(三氯乙酸)、30% 双氧水脱色、乙醇沉淀、透析、浓缩、冷冻干燥得粗品 EPS。

粗品 EPS 溶于少量 0.05mol/L 醋酸铵缓冲液,离心,上清液经 Sephadex G-200 凝胶柱,用苯酚-硫酸法检测收集含多糖组份,最后经真空浓缩、透析、冻干得 EPS-II。

1.2.5 胞外多糖的薄层色谱(TLC)定性分析:参考文献[5]的方法进行。首先以硅胶 H 为主要原料制备薄层板,然后用产品的最终提取液,即 EPS-II,点样,接着展

开、显色，定性分析 EPS-Ⅱ 的纯度。

2 结果

2.1 一株乳酸菌产胞外多糖的鉴定分析

在对乳酸菌的培养液进行透析、浓缩后加入无水乙醇，观察到有白色沉淀产生，说明该乳酸菌产生胞外多糖。而在 LBS 液体培养基中未见有沉淀产生。

2.2 不同乳酸菌胞外多糖产量的测定

如图 1 所示，实验乳酸菌的胞外多糖产量为 826.5mg/L，与其它乳酸菌的多糖产量比较，该菌株属高产胞外多糖的乳酸菌。

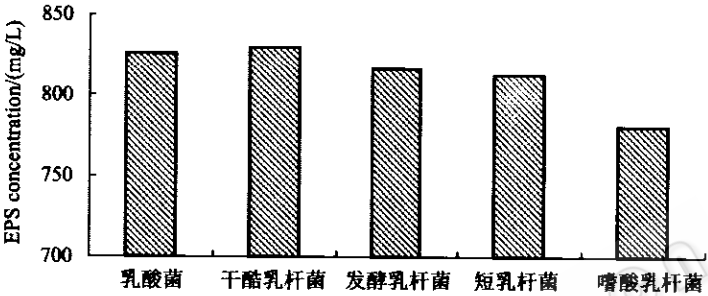


图 1 不同乳酸菌的胞外多糖产量

2.3 乳酸菌产胞外多糖影响因素的研究

2.3.1 不同培养温度对胞外多糖产量的影响：从图 2 可以看出，在不同培养温度下，乳酸菌 EPS 产量表现出显著的差异。在整个培养过程中，该菌株在 25℃ 下的多糖产量均明显比 30℃ 和 37℃ 的低。而 30℃ 和 37℃ 在 42h 和 48h 时均达到各自的最高值，且两者的最高产量相近，只是在 37℃ 时比在 30℃ 时先出现产量的高峰期。

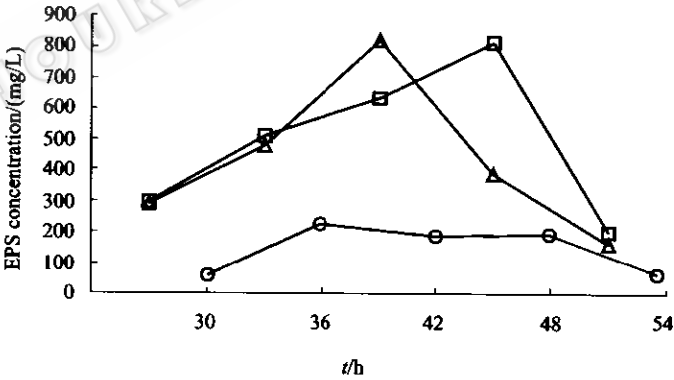


图 2 一株乳酸菌在不同培养温度时的胞外多糖产量

—○— 25℃, —□— 30℃, —△— 37℃

2.3.2 不同培养时间及生物量对胞外多糖产量的影响：在 30℃ 下，以葡萄糖为碳源培养乳酸菌，间隔一定时间测定菌体的生物量以及 EPS 的产量。可以看出，乳酸菌发酵培养 36h 之后，生长进入稳定期，菌体数量趋于稳定，生物量也基本维持平衡波动。因此，我们可以粗略确定，在培养时间达 40 ~ 48h 之间菌体生物量达到最大值，相应地，多糖的产量也大约在这个时期达到最大值。结果见图 3。

2.3.3 不同种糖类对胞外多糖产量的影响：如图 4 所示，不同种类的糖对乳酸菌产多

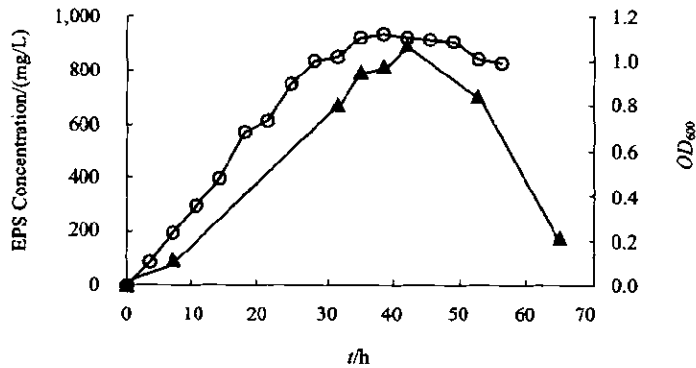


图 3 乳酸菌的生物量及胞外多糖产量随量间的变化曲线  
▲ 25℃, ○ 30℃

糖的量有显著的影响,其中以葡萄糖作为碳源所获到的多糖产量最高,达 805mg/L。其次为乳糖和果糖,以甘露糖的最低,为 78mg/L。

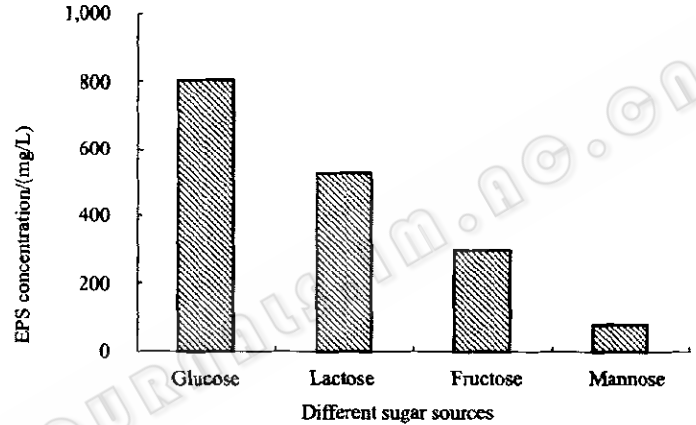


图 4 不同种类的糖对乳酸菌胞外多糖产量的影响

2.4 胞外多糖 EPS-II 的分离纯化

从图 5 可以看出:在洗脱进行到 700min 时开始出现一个很高的洗脱峰 EPS-II,该洗脱峰很大,无肩峰。说明经粗提获得的胞外多糖主要由单一的组分构成。在重复的试验过程中,胞外多糖除了含有 EPS-II,还包括另外一种成分 EPS-I,该洗脱峰在

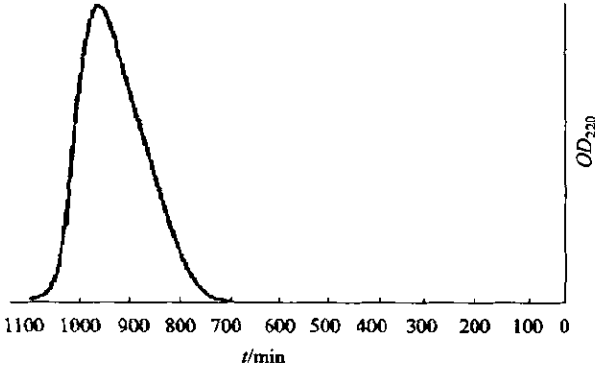


图 5 乳酸菌所产胞外多糖的 SephadexG-200 柱层析图

500min 左右出现。但由于这种成分的含量太小,当调节洗脱柱的灵敏度时,该洗脱峰在上图中便消失了。

## 2.5 胞外多糖 EPS- II 的纯度分析

薄层层析结果显示(图6),通过本实验方法提取的胞外多糖已达到了纯化的程度,适合进一步对该提纯的多糖进行化学性质和结构的分析。

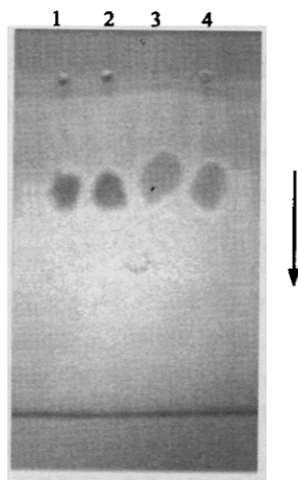


图6 胞外多糖 EPS- II 的薄层层析

1~4 均为同一提取的胞外多糖产品

## 3 讨论

本实验选取的菌株为从牙鲆消化道分离的乳酸菌,属于肠道的正常菌群成员。以其制备的微生态制剂在海水鱼类养殖中应用,具有提高饲料的品质,促进生长,提高动物抗病力,改善水质的作用。为利用其代谢产生的胞外多糖开发无细胞型微生态制剂,对其产生的胞外多糖进行提纯以及一系列影响因素的分析。经将该乳酸菌产生的多糖与发酵乳杆菌、短乳杆菌、干酪乳杆菌及嗜酸乳杆菌的相比,在多糖产量方面与它们不相上下,属于高产的菌株,适合作为多糖的生产菌株。

乳酸菌在生长过程中产生胞外多糖受多种因素的影响,本实验发现以葡萄糖作为碳源所得到的 EPS 的产量比其它糖类的高,这与国内外有关这方面的报导是一致的<sup>[6]</sup>。经查相关资料,发现主要原因是由于催化果糖-1, 6-二磷酸转化为果糖-6-磷酸的果糖二磷酸酶(FBPase)活性低,乳酸菌从果糖生物合成糖类核苷酸的必需阶段受到限制。证明 FBPase(二磷酸果糖激酶)的低活性限制了以果糖作为碳源的乳酸菌大量合成 EPS<sup>[7]</sup>。而且注意到 EPS 产量在达到最大时,细菌的生物量也最大。随培养时间的延长和 pH 值的下降,多糖的产量又会大幅度降低,特别是以 30℃ 时下降最明显。究其原因,可能是 EPS 在菌株生长过程中会逐渐被分解利用成单糖补充碳源使菌株又继续生长。

乳酸菌多糖的较低产量和培养过程中的高降解率已成为将这类食品级微生物产胞外多糖用于工业发酵生产的重要瓶颈,找出解决 EPS 产量过低的办法也将成为未来研究胞外多糖的一个方向<sup>[8]</sup>。细菌在较低温度下培养,有利于延长对数期和稳定期,从

而有利于胞外多糖产量的提高。本实验中, 我们采用比文献报道略低的温度, 得到了较高的多糖产量<sup>[9]</sup>。在培养温度为 30℃ 和 37℃ 时, 多糖的最高产量相近, 只是在 37℃ 时较在 30℃ 时更早地出现产量的高峰期, 但在 37℃ 下多糖的产量下降的更快。可能的原因是在 37℃ 下更适于酶发挥作用, 多糖的合成和分解速度均很快。因此, 从多糖的积累上看, 30℃ 更利于多糖的收获。由此可以得出, 该菌株产生多糖的最适条件是在 30℃ 下培养 48h。

最后, 本实验对提取胞外多糖的有效方法进行了研究。从薄层层析的结果可以看出本实验采用的方法合理、有效。但是, 在糖的分离纯化过程中, 蛋白质和其他带电荷的多糖极易彼此形成错综复杂的化学键而相互结合, 给多糖的分离纯化带来了难度<sup>[10]</sup>。正是由于大分子物质之间的吸附作用, 多糖在多次分离纯化过程中有相当量的损失。这成为多糖产量低和限制其应用的又一障碍。

### 参 考 文 献

- [1] 钟颜麟, 彭志英, 赵谋明. 中国乳品工业, 1999, 27 (4): 7~10.
- [2] Vuyst L D, Degeest B. FEMS Microbiology Reviews, 1999, 23: 153~177.
- [3] 顾笑梅, 孔 健, 王富生, 等. 微生物学报, 2003, 43 (2): 251~256.
- [4] 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术 (第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 1~540.
- [5] 王秀奇, 秦淑媛, 高天慧, 等. 基础生物化学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999. 26~68.
- [6] Macedo M G, Lacroix C, Gardner N J, *et al.* International Dairy Journal, 2002, 12: 419~426.
- [7] Looijesteijn P J, Trapet L, de Vries E, *et al.* International Journal of Food Microbiology, 2001, 64: 71~80.
- [8] Ceming J. FEMS Microbiological Review, 1990, 87: 113~130.
- [9] Zisu B, Shah N P. Journal of Dairy Science, 2003, 86 (11): 3405~15.
- [10] 李全阳, 夏文水. 食品与发酵工业, 2003, 29 (5): 86~90. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>