

培养条件对双歧杆菌 EPS 各组分产量及比例的影响

旭日花^{1,2} 马世敏¹ 刘丽莎¹ 李平兰^{1*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

(2. 内蒙古大学 生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘 要: 【目的】动物双歧杆菌 RH 产生的胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)经阴离子交换柱层析可获得 EPSa 和 EPSb 两个组分。得到可提高 EPS 的总产量,尤其是 EPSb 产量的最佳培养基和培养条件。【方法】对培养基类型、氮源、碳源、碳源浓度、培养基初始 pH 值、培养温度和时间对双歧杆菌 EPSa 和 EPSb 产量的影响进行分析。【结果】在初始 pH 值调整为 7.0 的含 5%蔗糖的 PTYG 培养基上,在 35 °C 温度下厌氧培养 60 h 时动物双歧杆菌 RH 的 EPSa 和 EPSb 产量分别为 0.982±0.003 g/L 和 0.312±0.001 g/L。【结论】在上述条件下 EPS 总产量高且可获得较多的 EPSb。

关键词: 双歧杆菌, 胞外多糖, 阴离子交换层析, 产量

Effect of cultivation conditions on the yield and proportion of exopolysaccharide fractions produced by *Bifidobacterium*

XU Ri-Hua^{1,2} MA Shi-Min¹ LIU Li-Sha¹ LI Ping-Lan^{1*}

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China)

Abstract: [Objective] Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium animalis* RH were

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31271827); 内蒙古大学高层次引进人才基金项目(No. 115114); 北京市自然科学基金项目(No. 5122018)

*通讯作者: Tel: 86-10-62738678; 信箱: lipinglan@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-12-04; 接受日期: 2013-03-19

fractionated into two peaks by anion exchange chromatography, named as EPSa and EPSb. The aim of the study was to obtain the optimal conditions for high yield of total EPS, especially EPSb. **[Methods]** In this paper, the effects of medium types, nitrogen source, carbon source, carbon concentration, initial medium pH, cultivation temperature and cultivation time on the yield and proportion of EPSa and EPSb were evaluated. **[Results]** The highest yield and favorable proportion were obtained in PTYG broth medium (pH 7.0) containing 5% sucrose when *B. animalis* RH was anaerobically cultivated at 35 °C for 60 h. **[Conclusion]** Under these conditions, the yield of EPSa and EPSb were 0.982 ± 0.003 g/L and 0.312 ± 0.001 g/L, respectively.

Keywords: *Bifidobacterium*, Exopolysaccharide, Anion exchange chromatography, Yield

胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)是微生物在生长代谢过程中分泌到细胞外的长链多糖。据报道,多种乳酸菌均可产生 EPS。乳酸菌 EPS 结构复杂、功能多样,除了对于菌体有保护作用外还具备抗肿瘤、抗溃疡、免疫调节、降胆固醇和调节血压等作用^[1]。关于乳酸菌 EPS 的研究国外起步较早,涉及到合成条件优化、理化性质、生理功能研究、初级结构分析等方面。近年来的研究内容还包括通过代谢和基因调控来提高产量及构建高产工程菌等方面。国内对乳酸菌 EPS 的研究目前正处于发展阶段,主要涉及高产 EPS 乳酸菌的筛选、合成条件优化、初级结构及生理功能分析等方面。另外,相对于乳杆菌、乳球菌和链球菌产生的 EPS,双歧杆菌 EPS 的相关研究国内外报道不多。

乳酸菌 EPS 的生物合成除受遗传因素即菌株自身因素影响外,还受微生物培养环境、培养基组成、pH 值、培养温度、金属离子(K、Na、Mg、Mn、Fe)、氨基酸、黄嘌呤和恒定的氧压浓度等环境因素的影响。乳酸菌不同菌株产 EPS 的合成条件有所差别,在何种条件下更有利于试验菌株的生长和多糖合成,是乳酸菌 EPS 结构分析和生物活性评价等研究中首先需要解决的问题之一。前期研究中,动物双歧杆

菌(*Bifidobacterium animalis*) RH 所产 EPS 粗品经 DEAE-Sephrose Fast Flow 离子交换柱进行分离纯化时可产生两个 EPS 组分,分别命名为 EPSa 和 EPSb^[2]。通常,乳酸菌产生一种 EPS,但也有产生 2–3 种 EPS 的报道,但只涉及分离纯化和结构分析。对于产几种 EPS 的乳酸菌,培养基组分和培养条件对乳酸菌和双歧杆菌 EPS 各组分的产量及比例的影响研究尚未见报道。

我们在前期研究中发现,在体外和体内试验中 EPSb 表现出比 EPSa 更强的抗氧化功能^[3],但 EPSb 的产量远少于 EPSa 的产量,严重制约了我们对两组分在同样条件下同时进行结构分析和功能评价的研究。为此,本文选择不同培养基、氮源、碳源、碳源添加量、初始 pH 值、培养温度和培养时间,目的在于考察它们对双歧杆菌 EPS 在离子交换柱层析上各组分产量的影响,以探讨这些因子对双歧杆菌 EPS 产量的影响规律,建立高产 EPS 的培养条件,并获得产量高比例适宜的 EPS 各组分,利于进一步对两组分同时进行结构鉴定和功能评价。

1 材料与方法

1.1 菌种

双歧杆菌 RH, 分离自广西巴马长寿老人肠

道,由中国农业大学食品科学与工程学院微生物实验室分离并保存。该菌株经生理生化试验和 16S rDNA 序列分析鉴定为动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)。

1.2 主要培养基和试剂

改良 MRS 培养基是在 MRS 培养基^[4]基础上添加(g/L): 玉米浆 3-4 和半胱氨酸盐 0.3-0.4; 产糖培养基是中国农业大学食品科学与工程学院微生物实验室在改良 MRS 培养基基础上优化获得(主要区别是 10.00 g 蛋白胨改为 29.97 g 大豆蛋白胨, 20.00 g 葡萄糖改为 50.06 g 蔗糖)。无水乙醇、Tris-HCl、苯酚和浓硫酸均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

玻璃离子交换柱(2.6 cm×20.0 cm)、填装 DEAE-Sepharose Fast Flow, Pharmacia 公司; UV-2102PC 型紫外可见分光光度计, 尤尼科(上海)仪器有限公司; DHL-A 电脑恒流泵、TH-500 梯度混合器、BS-100A 自动部分收集器, 上海青浦沪西仪器厂; ML54/02 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; FD-1D 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司。

1.4 不同条件下的双歧杆菌培养液的制备

采用单因素实验, 选择不同培养基(MRS 培养基、PTYG 培养基、TPY 培养基^[4]、改良 MRS 培养基、产糖培养基)、不同氮源(蛋白胨、胰蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、鱼蛋白胨)、不同碳源(葡萄糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖)、碳源添加量(0.625%、1.25%、2.5%、5%、10%)、培养基 pH (5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)、培养温度(20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C)、培养时间(12、24、36、48、60 h)对双歧杆菌进行厌氧培养获得不同培养条件下的双歧杆菌培养液。每一个因素实验都在上一个指标的最优条件下依次进行。

1.5 双歧杆菌 EPS 的制备

双歧杆菌培养液采用浊度法检测 600 nm 处的吸光值, 表示菌体生长量的情况。

将不同条件下的双歧杆菌培养液分别以 8 000 r/min 离心 8 min 去除菌体; 收集上清液, 浓缩后加入 3 倍体积无水乙醇, 4 °C 沉淀过夜; 8 000 r/min 离心 8 min, 去上清, 将沉淀用少量蒸馏水复溶后, 装入 8 000-14 000 Da 透析袋于 4 °C 对水透析 48 h, 每 8 h 换一次水, 透析袋内溶液真空冷冻干燥后得 EPS 粗品, 避光干燥保存备用。

1.6 离子交换柱层析

分别准确称取 50 mg 上述 EPS 粗品, 配制成 10 g/L 糖溶液, 用 0.45 μm 膜过滤后, 经 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析, 依次用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)和含 1 mol/L NaCl 的同样 Tris-HCl 缓冲液线性梯度洗脱, 洗脱速度为 4 mL/min, 每管 8 mL 部分收集, 逐管检测多糖含量(苯酚-硫酸法 A_{490}), 按多糖含量检测值分别合并收集单一峰组分, 并采用苯酚-硫酸法检测各组分多糖含量。

2 结果与分析

2.1 培养基类别对 EPS 各组分的影响

DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换柱中, 先后用 Tris-HCl 缓冲液洗脱和含 1 mol/L NaCl Tris-HCl 缓冲液线性梯度洗脱时, 得到两个组分, 第一个组分直接由缓冲液洗脱, 第二个组分由缓冲液洗脱时先吸附到层析柱上再由含 0-1.0 mol/L NaCl 缓冲液线性洗脱, 表明第一组分是不带负电荷的中性糖(EPSa), 而第二组分为带负电荷的酸性糖(EPSb)^[2]。

为考察培养基类别对动物双歧杆菌 RH 合成的不同 EPS 组分的影响, 选用了 TPY、PTYG、MRS 培养基以及本实验室优化获得的改良 MRS

培养基和产糖培养基等 5 种培养基。本试验以 2% 接种量将在改良 MRS 培养基中 37 °C 发酵 24 h 的动物双歧杆菌 RH 接种不同培养基, 培养 24 h 后检测 EPS 粗品的产量及该 EPS 粗品经阴离子交换柱层析后各组分的含量, 结果见表 1。

在 5 种供试培养基中, 动物双歧杆菌 RH 在 PTYG 培养基上的 EPS 总产量最高, 为 0.959 g/L; 改良 MRS 培养基次之 0.947 g/L, MRS 上的产量仅为 0.882 g/L (表 1)。但是从菌体生长量来看, 改良 MRS 培养基比 PTYG 培养基更有利于菌体的生长, 因此其最适产生 EPS 的培养基与最适生长培养基并不一致。该结论与 *L. casei* LC2W 的报道情况一致^[5]。从 EPSa 和 EPSb 产量来看, PTYG 培养基和改良 MRS 培养基上两组分的产量均比其他几种培养基高。考虑到 EPS 总产量和两组分的产量, 本文选择 PTYG 培养基为基础培养基。

此外, 在产糖培养基上动物双歧杆菌 RH 产生大量的中性糖, 几乎不产生酸性糖。原因可能在于产糖培养基的营养成分不同, 尤其是其中蔗

糖的含量远高于其他培养基。据报道, 碳源的类型不仅会影响 EPS 的产量, 而且也可能影响 EPS 的分子量大小^[6]。因此, 选择适合的碳源对于提高 EPS 产量并保持其聚合度及组成稳定具有重要意义。

2.2 氮源类别对 EPS 各组分的影响

本实验中选择了在实验室和发酵工业中较常用于乳酸菌培养的有机氮源: 普通蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨等, 考察氮源类别对 EPS 产量及各组分比例的影响。上述氮源以 2% 分别加入 PTYG 培养基中, 以 2% 接种动物双歧杆菌 RH, 发酵 24 h 后检测 EPS 粗品的产量及该 EPS 粗品经阴离子交换柱层析后各组分的含量, 结果见表 2。

从表 2 可以看出, 在 EPS 产量与菌体生长状况上, 各氮源并不存在显著性差异($P>0.05$)。考虑到添加大豆蛋白胨时 EPS 总产量最高, 为 0.959 g/L, 且大豆蛋白胨廉价易得, 因此选择大豆蛋白胨作为氮源, 添加量为 2%。

表 1 培养基类别对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响 Table 1 Effect of medium types on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
Medium	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
TPY medium	0.861±0.002	0.717±0.002	0.094±0.001	7.2:0.9	0.575±0.001
PTYG medium	0.959±0.011	0.762±0.056	0.162±0.012	7.6:1.6	0.606±0.045
MRS medium	0.882±0.032	0.718±0.019	0.115±0.003	7.2:1.2	0.625±0.028
Producing EPS medium	0.918±0.032	0.858±0.030	0.004±0.001	8.0:0.04	0.614±0.022
Improved MRS medium	0.947±0.010	0.760±0.001	0.160±0.001	7.6:1.6	0.642±0.001

表 2 氮源类别对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响 Table 2 Effect of nitrogen source on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
Nitrogen source	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
Fish peptone	0.861±0.002	0.485±0.001	0.230±0.001	4.9:2.3	0.765±0.006
Peptone	0.907±0.057	0.598±0.044	0.185±0.014	6.0:1.9	0.691±0.009
Tryptone	0.924±0.031	0.664±0.029	0.213±0.009	6.6:2.1	0.636±0.002
Casein peptone	0.918±0.032	0.595±0.021	0.196±0.007	6.0:2.0	0.579±0.001
Soya peptone	0.959±0.001	0.578±0.001	0.216±0.001	5.8:2.2	0.640±0.013

2.3 碳源类别对 EPS 各组分的影响

对乳酸菌胞外多糖的研究普遍认为,碳源对 EPS 的产量具有较大影响^[7]。本试验选择适合于乳酸菌利用的葡萄糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖作为碳源,以 2%的含量添加,探讨其对双歧杆菌 EPS 生物合成及不同组分产量的影响。结果如表 3 所示。

经单因素方差分析,不同碳源对 EPS 产量及菌体生长的影响存在显著性差异($P<0.05$)。其中,添加 2%蔗糖时 EPS 总产量(1.033 g/L)和菌体生长量均高于其他碳源,并且酸性糖的含量(即 EPSb)较原来含葡萄糖的培养基提高了 55.0%,有利于 EPS 各组分纯品的收集和积累,因此选择以蔗糖为添加碳源。

2.4 碳源添加量对 EPS 各组分的影响

为考察不同碳源添加量对 EPS 合成的影响,本试验在含不同浓度蔗糖的 PTYG 培养基上,

同样接种动物双歧杆菌 RH 并发酵 24 h,通过检测 EPS 总产量和各组分 EPS 产量,确定有利于获得高产 EPS 的蔗糖添加量。结果如表 4 所示。

从表 4 可见,随着蔗糖添加量的提高,双歧杆菌 EPS 的总产量也逐渐提高,在碳源浓度达到 5%时达到最高 1.157 g/L。不同碳源浓度下,各组 EPS 的总产量之间差异显著($P<0.05$),但对菌体生长状况没有显著性差异($P<0.05$)。碳源浓度为 5%时组分比例达到了较好的平衡,为 6.7:3.0,故选择 5%的蔗糖添加量进行下一步的培养条件优化。

2.5 培养基 pH 对 EPS 各组分的影响

在上述实验确定的含 5%蔗糖和 2%大豆蛋白胨的 PTYG 培养基上,以 2%接种量接种动物双歧杆菌 RH 发酵 24 h,通过 EPS 总产量及各组分的中性糖和酸性糖比例,确定适宜的培养基初始 pH 值。

表 3 碳源类别对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响 Table 3 Effect of carbon source on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
Carbon source	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
Glucose	1.009±0.009	0.554±0.005	0.306±0.003	5.5:3.1	0.572±0.005
Galactose	0.906±0.007	0.501±0.004	0.270±0.002	5.0:2.7	0.097±0.002
Lactose	0.903±0.003	0.505±0.002	0.276±0.001	5.1:2.8	0.465±0.002
Sucrose	1.033±0.018	0.547±0.010	0.360±0.006	5.5:3.6	0.805±0.008
Maltose	0.987±0.026	0.555±0.014	0.339±0.009	5.6:3.4	0.487±0.002

表 4 碳源浓度对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响 Table 4 Effect of carbon concentration on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
Carbon concentration (%)	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
0.625	0.763±0.023	0.421±0.013	0.206±0.006	4.2:2.1	0.797±0.005
1.250	0.790±0.023	0.466±0.014	0.204±0.006	4.7:2.0	0.788±0.008
2.500	1.004±0.018	0.632±0.012	0.212±0.004	6.3:2.1	0.799±0.003
5.000	1.157±0.011	0.674±0.007	0.299±0.003	6.7:3.0	0.815±0.042
10.000	1.028±0.026	0.545±0.014	0.358±0.009	5.5:3.6	0.805±0.008

如表 5 所示, 培养基的不同初始 pH 值对 EPS 产量及菌体生长状况均有着显著性差异 ($P<0.05$)。pH 7.0 时 EPS 产量与菌体生长均优于其他, 且 EPSa 和 EPSb 组分比例适宜, 故选择 pH 7.0 作为下一步实验条件。

2.6 培养温度对 EPS 各组分的影响

将上述 PTYG 培养基 pH 值调整至 7.0, 以 2%接种量接种动物双歧杆菌 RH, 分别在不同温度下培养 24 h, 检测 EPS 总产量、各组分产量及菌体生长量, 考察培养温度对 EPS 总产量及各组分 EPS 比例的影响。

不同温度下 EPS 产量及菌体生长量见表 6。

由表 6 可知, 不同培养温度对 EPS 的浓度有着显著影响($P<0.05$), EPS 的浓度随着温度的升高而增大, 但 35 °C 与 40 °C 差异并不明显 ($P>0.05$)。故下一步选择 35 °C 培养动物双歧杆菌 RH 以利于 EPS 的积累。培养温度对菌体生长也具有显著影响($P<0.05$), 菌体在 40 °C 时生长达到最大化。EPS 产量最高的培养温度明显低于菌体最适生长温度, 这与文献报道培养温度低于最适生长温度有利于 EPS 的产生相一致^[8-9], 可能较低的温度使菌体生长速度慢, 细胞壁合成也变慢, 从而使较多的 EPS 生物合成和细胞壁大分子合成所竞争的磷酸异戊二烯用于 EPS 合成。

表 5 培养基初始 pH 值对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响					
Table 5 Effect of initial medium pH value on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
pH	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
5.0	1.031±0.006	0.696±0.004	0.165±0.001	7.0:1.6	0.550±0.021
5.5	1.045±0.049	0.729±0.034	0.140±0.007	7.3:1.4	0.691±0.013
6.0	1.106±0.003	0.786±0.002	0.180±0.001	7.9:1.8	0.768±0.011
6.5	1.104±0.021	0.778±0.015	0.203±0.004	7.8:2.0	0.837±0.011
7.0	1.131±0.002	0.812±0.001	0.189±0.001	8.1:1.9	0.913±0.003

表 6 培养温度对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响					
Table 6 Effect of cultivation temperature on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
Temperature (°C)	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
20	0.221±0.029	0.138±0.018	0.051±0.007	1.4:0.5	0.022±0.019
25	0.904±0.003	0.559±0.002	0.199±0.001	5.6:2.0	0.130±0.002
30	1.005±0.019	0.639±0.012	0.226±0.004	6.4:2.3	0.411±0.106
35	1.086±0.003	0.684±0.002	0.237±0.001	6.8:2.4	0.565±0.044
40	1.043±0.003	0.651±0.002	0.245±0.001	6.5:2.5	0.644±0.013

表 7 培养时间对 EPS 各组分产量(g/L)及菌体生长量的影响					
Table 7 Effect of cultivation time on EPS fractions production (g/L) and cells growth					
Time (h)	Total yield of EPS	Yield of EPSa	Yield of EPSb	EPSa:EPSb	OD ₆₀₀
12	0.867±0.014	0.691±0.011	0.104±0.002	6.9:1.0	0.571±0.002
24	0.950±0.022	0.720±0.017	0.128±0.003	7.2:1.3	0.958±0.006
36	1.340±0.001	0.951±0.001	0.179±0.001	9.5:1.8	0.885±0.006
48	1.368±0.003	1.010±0.002	0.192±0.001	10.1:1.9	0.942±0.001
60	1.395±0.004	0.982±0.003	0.312±0.001	9.8:3.1	0.944±0.008

2.7 培养时间对 EPS 各组分的影响

在上述 PTYG 培养基中, 接种动物双歧杆菌 RH, 并在 35 °C 条件下培养 60 h, 期间每隔 12 h 检测 EPS 总产量及各组分 EPS 产量, 获得 EPS 合成水平及菌体生物量。

由表 7 可知, 不同培养周期的 EPS 浓度存在显著差异($P<0.05$), EPS 浓度随培养时间的延长而逐渐增长, 在 36–60 h 时, 即处于该双歧杆菌生长的稳定期达到最高值。从 EPSa 和 EPSb 的比例来看, 60 h 时两组分的比例较为均衡, 有利于积累较多的 EPSb。

在初始 pH 值调整为 7.0 的含 5% 蔗糖的 PTYG 培养基上, 35 °C 厌氧培养 60 h 是动物双歧杆菌 RH 合成 EPS 总产量高且各组分比例均衡的最优条件。在此条件下, 该双歧杆菌 EPSa 和 EPSb 的产量分别为 982 ± 0.003 g/L 和 0.312 ± 0.001 g/L。

3 讨论

不同的乳酸菌产生 EPS 的能力存在明显的差异, 生长条件(如 pH、温度和培养时间)以及培养基的组成(碳源、氮源和其他营养物质)都能影响 EPS 的产量与糖基的组成。目前, 用于生产细菌 EPS 的氮源主要是硫酸铵、亚硝酸钠、尿素、蛋白胨和酵母膏等。其中, 有机氮源的使用往往可以获得较快的生长速率和较高的 EPS 产量, 这可能与其含有的微量生长因子和所含部分碳源有关^[10]。但由于细胞生长和 EPS 合成在底物和能量方面有竞争, 因此通常认为在较低浓度的氮源条件下 EPS 产量较高。本实验中, 动物双歧杆菌 RH 在含不同有机氮源的培养基上 EPS 总产量差异不显著, 而菌体生长情况差异显著。

葡萄糖、果糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、乳清、淀粉等都可以作为碳源生产乳酸菌 EPS。但是, 碳源的类型会影响 EPS 产量, 而且其单

糖组成也可能会受到影响。*L. delbrückii* 能够利用不同碳源合成不同的 EPS, 以果糖为碳源时, 产生 25 mg/L 含有摩尔比为 1.0:2.4 的葡萄糖和半乳糖的 EPS; 当以果糖和葡萄糖为混合碳源时, 产生 80 mg/L 含有摩尔比为 1.0:7.0:0.8 的葡萄糖、半乳糖和鼠李糖的 EPS^[11]。不过随后也出现了不同的报道, 认为碳源类别不会影响 *L. delbrückii* 产生的 EPS 单糖组成, 但在不同的发酵条件下, 这些单糖组分所占的相对比例会发生变化^[12]。对于双歧杆菌 EPS 的研究中也有类似报道, *B. longum* 在 PY 培养基中合成的 EPS 的葡萄糖、半乳糖和糖醛酸的摩尔比为 4:4:1, 而在脱脂乳培养基中的摩尔比为 3:4:1^[13]。与此类报道相同的是, 不同的碳水化合物不会改变 *S. thermophilus* 产生的 EPS 组成, 但碳源的改变会影响 EPS 的总产量^[14–15]。本实验中, 动物双歧杆菌 RH 在含葡萄糖的培养基上均可产生两种 EPS, 而在含 5% 蔗糖产糖培养基中产生大量的 EPSa 和少量的 EPSb, 这可能与添加碳源不同有关。随后在 PTYG 培养基上 EPSa 的含量随着蔗糖浓度的提高而逐渐上升, 但添加 2% 葡萄糖或蔗糖时, 两组分的含量比例基本相同, 表明培养基中其他成分也在影响动物双歧杆菌 RH 两组分 EPS 的比例, 需要进一步考察其他营养成分的因素。

对于影响 EPS 产量的温度条件, 通常认为产 EPS 嗜温乳酸菌在低于最适生长温度的条件下可生产更多的 EPS。*L. lactis* 合成 EPS 的最优温度为 25 °C, *S. thermophilus* 的 EPS 合成最优温度也低于 37 °C^[16], *L. rhamnosus* 在 20 °C–25 °C 时产生的 EPS 产量高于最适生长的 30 °C–37 °C 时的产量^[17]。前期研究中也发现, 双歧杆菌 22-5 EPS 在 25 °C 培养时虽然细菌生长缓慢但 EPS 产量却高于 37 °C 培养时的产量^[18]。本实验中, 动物双歧杆菌 RH 在略低于

37 °C 培养时的 EPS 产量较高, 也与上述报道一致。从乳酸菌的 EPS 生物合成途径来看, EPS 合成与细胞壁大分子的生物合成利用相同的脂质载体以及糖核苷酸前体物质, EPS 合成条件与细胞生长条件不一致可能是由于竞争相同底物和载体造成。但与此类报道相左的是, *L. acidophilus* 和 *L. casei* 在最适生长温度时 EPS 产量最高^[12,19]。

对于影响 EPS 产量的 pH 条件, 最适 pH 值在乳酸菌不同菌株间差异较大。*L. reuteri* ATCC 55730 的最高 EPS 产量出现在 pH 4.5 的 MRS 培养基中, 并随着 pH 值的升高而降低, 在 pH 6.5 时没有检测到 EPS^[20]。另外, 在发酵过程中控制 pH 值可能会使 EPS 产量更高一些。在生物反应器中, 将 *L. pentosus* LPS26 的 pH 值控制在 5.0 或 6.0 时, EPS 产量均高于未控制 pH 值时的产量^[21]。本实验中, 动物双歧杆菌 RH 的产 EPS 最适 pH 值是 7.0, 均高于上述报道的最适 pH 值, 该结果可能是因为双歧杆菌属的生长最适 pH 值比乳酸菌其他属的 pH 值高, 造成其产 EPS 的最适 pH 值就高于其他属。另外, 对双歧杆菌 22-5 在 5 L 发酵罐上发酵时, 发现其最适产 EPS 的 pH 值也是 7.0^[22]。此外, 发酵时间的延长, 可能会因为 EPS 被酶降解或者培养基中的物理参数发生改变的原因, EPS 的产量常会下降。本实验中, 动物双歧杆菌 RH 在 36–60 h 期间 EPS 产量无明显变化, 表明该 EPS 在现有条件下不易被降解。

参 考 文 献

- [1] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2/3): 163–171.
- [2] Xu RH, Shen Q, Ding XL, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH[J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(2): 231–241.
- [3] Xu RH, Shang N, Li PL. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Bifidobacterium animalis* RH[J]. Anaerobe, 2011, 17(5): 226–231.
- [4] 凌代文, 东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85, 108.
- [5] Ai L, Zhang H, Guo B, et al. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 353–357.
- [6] Laws AP, Chadha MJ, Chacon-Romero M, et al. Determination of the structure and molecular weights of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* 5e2 when grown on different carbon feeds[J]. Carbohydrate Research, 2008, 343(2): 301–307.
- [7] Mozzi F, Rollán G, Savoy de Diori G, et al. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(1): 160–167.
- [8] Gassem MA, Schmidt KA, Frank JF. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(207): 171–173.
- [9] Looijesteijn PA, Hugenholtz J. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(2): 178–182.
- [10] Kumar AS. Bacterial exopolysaccharides—a perception[J]. Journal of Basic Microbiology, 2007, 47(2): 103–117.
- [11] Grobbsen GJ, Smith MR, Sikkema J, et al. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46(3): 279–284.
- [12] Petry S, Furlan S, Crepeau MJ, et al. Factors affecting

- exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3427–3431.
- [13] Andaloussi SA, Talbaoui H, Marczak R, et al. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(6): 995–1000.
- [14] Degeest B, De Vuyst L. Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3519–3527.
- [15] Escalante A, Wachter-Rodarte C, Garcia-Garibay M, et al. Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84(1): 108–114.
- [16] Cerning J, Bouillanne C, Landon M, et al. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75(3): 692–699.
- [17] Gamar L, Blondeau K, Simonet JM. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 83(3): 281–287.
- [18] 欧阳清波, 李平兰. 长双歧杆菌22-5胞外多糖(EPS)合成条件的优化[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(2): 12–15.
- [19] Mozzi F, Oliver G, De Giori GS, et al. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria[J]. Milchwissenschaft-Milk Science International, 1995, 50(2): 80–82.
- [20] Årsköld E, Svensson M, Grage H, et al. Environmental influences on exopolysaccharide formation in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 159–167.
- [21] Sánchez JI, Martínez B, Guillén R, et al. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7495–7502.
- [22] 丁薛龙, 沈骞, 陈倩, 等. 双歧杆菌22-5产胞外多糖发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 214–217.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 *Mean*。标准差用英文小写 s , 不用 *SD*。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 *SE*。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希腊小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。