

# 酸乳中乳酸菌胞外多糖的分离与纯化

李全阳<sup>1</sup> 夏文水<sup>2</sup> 张进山<sup>3</sup> 孙景珠<sup>3</sup> 张军鹏<sup>3</sup>

1(山东农业大学食品科学与工程学院,泰安,271018)

2(江南大学食品学院,无锡,214036) 3(山东省泰安市产品质量监督检验所,泰安,271000)

**摘要** 对酸乳中的乳酸菌胞外多糖采用蛋白酶水解、离心、乙醇沉淀进行初步分离提取,进一步采用三氯乙酸法去除蛋白,再经过透析、超滤、DEAE-Sephrose CL-6B 离子交换柱层析和 Sephrose CL-2B 凝胶柱层析使多糖得到纯化。最后得到一种纯化样品 EPS03-1gm,通过 HPLC 和凝胶柱层析鉴定,EPS03-1gm 分子大小和所带电荷都表现出较好的均一性,达到了进行化学结构鉴定的纯度要求。

**关键词** 乳酸菌,胞外多糖,离子交换柱层析,凝胶柱层析,HPLC

前期研究结果显示,嗜热链球菌粘性菌株(SGX03-3)与保加利亚乳杆菌产荚膜菌株(SGX03-1)混合发酵时,在同样的条件下,所形成的酸乳比对照的非粘性酸乳发酵剂所形成的酸乳粘度高,质量好<sup>[1]</sup>。以这种粘性酸乳为原料生产搅拌型酸乳,可以明显减少增稠剂的用量<sup>[2]</sup>。在测定各种不同粘性和非粘性酸乳中多糖含量(苯酚-硫酸法)时发现,它们之间多糖的含量并没有显著性差异,因此,很可能是多糖的其他特性在起作用。为了进一步研究其作用机理,有必要把其中的多糖分离出来,单独研究其特性。

有关乳酸菌胞外多糖(Lactic acid bacteria exopolysaccharide, LAB EPS)的分离及其结构特性的研究,国外报道较多<sup>[3~5]</sup>,从报道的结果看,不同乳酸菌以及相同乳酸菌不同菌株所生产的多糖特性都有差异。本研究所得到的菌株是自行筛选的菌株,其胞外多糖的特性是未知的,因此很有研究的必要。

## 1 试验材料和设备

### 1.1 主要材料及试剂

保加利亚乳杆菌 SGX03-1、嗜热链球菌 SGX03-3、SGX03-4、脱脂乳粉、全脂乳粉。

离子交换树脂(DEAE-Sephrose-CL-6B),Pharmacia 公司;琼脂糖凝胶(Sephrose-CL-2B),Pharmacia 公司;葡聚糖标准样(T-500),Pharmacia 公司;蛋白酶(精制中性蛋白酶),无锡杰能科生物工程公司。

### 1.2 主要设备

旋转式粘度计、高速冷冻离心机、分光光度计、自动部分收集器、恒流泵、真空旋转浓缩仪、超滤装置、

液相色谱仪等。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 粗多糖的分离

酸乳→蛋白酶水解→上清液离心→沉淀物乳化→离心回收上清液→合并上清液→浓缩→乙醇沉淀→沉淀物溶解→离心、醇沉多次→冷冻干燥→粗制 EPS

#### 1.3.2 粗多糖的纯化

粗 EPS 溶解→TCA 沉淀蛋白→透析→真空浓缩→冷冻干燥→样品分子组成分析→样品处理→真空浓缩→冷冻干燥→上分离柱

离子交换柱层析:选用 DEAE-Sephrose CL-6B 装入  $2.6 \times 30$  cm 色谱层析柱中,蒸馏水平衡凝胶至中性,再用磷酸盐缓冲液洗涤,完成平衡后上样分离。

凝胶柱层析:选用 Sephrose CL-2B 装入  $1.6 \times 100$  cm 层析柱中,首先用蒸馏水平衡凝胶至中性,用磷酸盐缓冲液洗涤,完成平衡后上样<sup>[6]</sup>。

糖含量的测定:采用苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>。

蛋白质含量测定:考马斯亮蓝 G250 染色法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.3 多糖纯度鉴定

A. 待测纯化样品。用  $0.1$  mol/L  $\text{NaNO}_3$  溶解样品,微孔滤膜过滤后,选用 Ultrahydrogel™ Linear ( $300 \times 7.8$ ) mm 色谱柱上样。

B. 待测冷冻干燥样品。用乙酸铵溶液溶解样品,微孔滤膜过滤后,选用 Sephrose CL-2B ( $100 \text{ cm} \times 1.6 \text{ cm}$ ) 凝胶层析柱进样分离。收集仪自动部分收集,流速  $12.5 \text{ mL/min}$ ,采用苯酚-硫酸法跟踪监测多糖含量。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 胞外多糖的初步纯化

第一作者:博士,副教授。

收稿日期:2005-05-19

分别测定不同批次分离的粗制 LAB EPS 含量, 结果发现, 糖含量在 20% ~ 30% 之间, 与植物多糖 69.82% 的提取结果<sup>[10]</sup>相比, 明显偏低。这可能是原料中蛋白含量高, 而蛋白酶质量较差所致。目前, 除去多糖中蛋白质的方法有 Sevag 法、三氯乙酸(TCA)法等, 国内许多研究者<sup>[9,10]</sup>认为, 三氯乙酸脱蛋白效果更好, 且可同时去除色素。本研究主要采用三氯乙酸脱除粗制 LAB EPS 中的蛋白质。

本研究对 3 个菌株所产的 EPS, 经过去除蛋白、透析、冷冻干燥等处理后, 用高效液相色谱(HPLC)进行了测定(见另文报道)。结果发现, 所筛选的 3 个酸乳生产菌株都能形成一定数量的 EPS, 但其分子量大小差异很大。SGX03-1 和 SGX03-4 发酵酸乳时所形成的 EPS 分子量较小, 对原料乳发酵时形成的酸乳相对粘度也较小, 而 SGX03-3<sup>[1]</sup>则能够生成分子量很大的 EPS, 而在酸乳的实际生产中, 使用 SGX03-3 时对所得酸乳的流变和质构特性有显著影响, 因此本研究暂不考虑 SGX03-1 和 SGX03-4 在乳中发酵形成的 EPS, 而把 SGX03-3 所形成的 EPS 作为研究重点, 以期对其进行进一步的分离纯化及结构解析。

## 2.2 LAB EPS 的 DEAE-Sephrose CL-6B 离子交换柱层析

对 SGX03-3 冻干样品复溶处理后上样, DEAE-Sephrose CL-6B 离子交换柱层析分离, 结果见图 1。

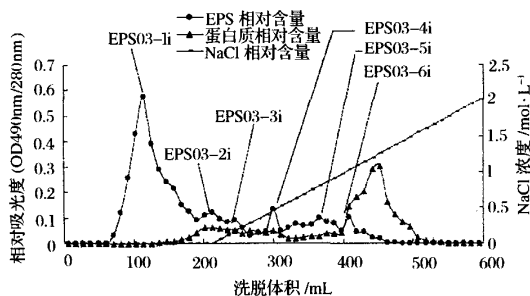


图1 SGX03-3 LAB EPS 离子交换柱层析洗脱曲线

图 1 中的分离结果显示, 样品经过 DEAE-Sephrose CL-6B 离子交换柱层析分离后大体可以分出 6 种 EPS 成分, 其中以 EPS03-1i 含量最高, 该峰中的绝大部分成分是在 NaCl 梯度洗脱之前被洗脱出来的, 最后的少部分与蛋白质的吸收峰有部分重叠。其他几种成分含量相对较少, 与蛋白质吸收峰重叠, 而且各个峰之间的分离效果也不理想, 其中 EPS03-5i 明显反映出含有不止一种成分。

由于 EPS03-1i 出峰较快, 结合分离工艺可以初步判断该成分是一种带有负电荷或不带电荷的多糖,

而且其分子量较大。根据国外资料报道, 一般情况下, 分子量越大, 多糖粘度越大<sup>[12~15]</sup>, 由此推测对酸乳的质构和流变特性产生影响的因子主要存在于第 1 峰中所包含的多糖成分中, 因此, 把第 1 峰(EPS03-1i)作为研究对象, 收集 EPS03-1i, 用蒸馏水透析, 冷冻干燥。

## 2.3 LAB EPS 的 Sepharose CL-2B 琼脂糖凝胶柱层析

从图 1 的结果还可看出, 离子交换柱层析得到的样品并不是纯净物质, 因此还要进一步分离纯化, 对冻干样品 EPS03-1i, 进一步采用 Sepharose CL-2B 凝胶柱层析, 分离结果见图 2。

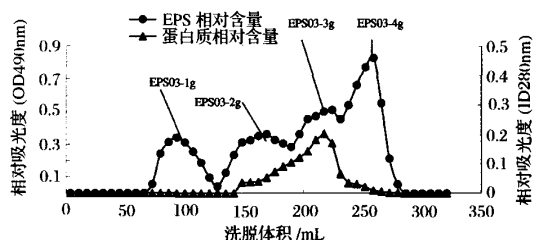


图2 SGX03-3 LAB EPS 一次凝胶柱层析洗脱曲线

图 2 显示, 经过离子交换柱层析所得到的 EPS 再经过凝胶层析后大体分离出 4 个成分(图 2), 同时对样品中蛋白质含量跟踪分析, 发现在洗脱体积接近 150 mL 时蛋白质被洗脱出来。考虑样品的分离效果和蛋白质含量, 仅收集第 1 个分离峰中所包含的成分 EPS03-1g, 对样品浓缩, 适当改变条件后进一步用 Sepharose CL-2B 凝胶柱分离, 最终洗脱结果见图 3。

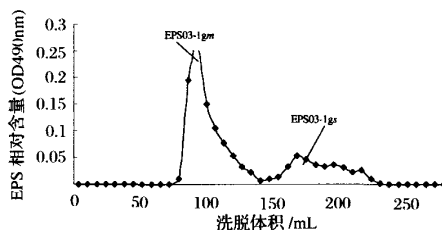


图3 SGX03-3 LAB EPS 二次凝胶柱层析洗脱曲线

图 3 显示, 通过对缓冲液和 pH 调整后进一步的分离试验, 结果显示, Sepharose CL-2B 凝胶柱已经能够较好地最主要多糖成分与其他成分分开, 把此时得到的最主要的多糖成分命名为 EPS03-1gm。

重复以上实验, 以备纯度检验。

## 2.4 EPS03-1 gm 的纯度检验

纯度鉴定方法 1 检测结果:

将待测样品溶解,通过微孔滤膜过滤,选用 Ultrahydrogel™ Linear 300×7.8 mm 色谱柱上样检测。经过高效液相色谱仪分析,结果如图 4 所示。

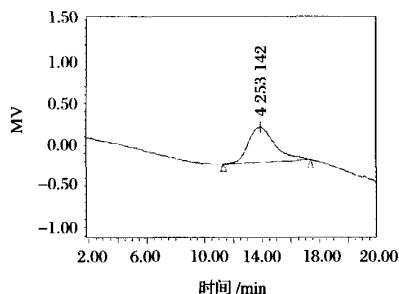


图 4 EPS03-1gm HPLC 图谱

图 4 显示,分离得到的 LAB EPS 经过 HPLC 后基本上呈单一的对称峰,说明纯化后的 EPS03-1 gm 各种成分经过筛分后,仍然能够相对集中地被洗脱出来,证明该种物质的各种成分的分子大小和带电特性具有相对较高的一致性。

纯度鉴定方法 2 检测结果:

将凝胶柱完成平衡,将待测样品 EPS03-1gm 溶解,缓冲液中样品浓度控制在 5 mg/mL 左右,进样量控制在 3~5 mL,自动分步收集仪收集样品,采用苯酚-硫酸法跟踪测定 EPS 含量,洗脱样品检测结果见图 5。

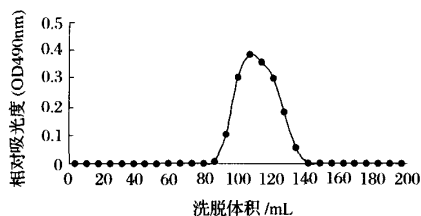


图 5 EPS03-1gm 凝胶柱层析纯度鉴定

图 5 的结果也显示,分离得到的 LAB EPS 采用经过 Sepharose CL-2B 凝胶层析柱分离后,所洗脱得到的成分相对吸光度基本上呈单一的对称峰,从而进一步证明 EPS03-1gm 的组成成分的分子大小和带电特性具有相对较高的一致性。因此认为该研究分离得到的样品为其化学结构解析奠定了基础。

### 3 结 论

(1) 探索得到一种分离纯化酸乳中的乳酸菌胞外多糖的途径。酸乳样品经过蛋白酶水解、离心、乙醇沉淀、三氯乙酸法去除蛋白质得到粗制品,对粗多糖进行透析、超滤,再经过 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换柱层析和 Sepharose CL-2B 凝胶柱层析可以

将样品得到纯化。

(2) 纯化多糖样品经过 HPLC 和凝胶柱层析 2 种方法鉴定,结果显示所得成分的分子大小和所带电荷情况都表现出良好的均一性,表明已经达到相对纯净的程度,为进一步结构鉴定奠定了良好的基础。

### 参 考 文 献

- 1 李全阳,夏文水. 酸乳中乳酸菌所产胞外多糖特性的初步研究[J]. 食品科学,2004,25(2): 80~84
- 2 李全阳,夏文水. 酸乳流变学特性的初步研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(12):35~39
- 3 Micheli D, Uccelletti C, Palleschi V, et al. Isolation and characterization of a rosy lactobacillus strain producing the exopolysaccharides kefirin[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999(53): 69~74
- 4 Luc De Vuyst, Filip De Vin, Frederik Vaningelgem, et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2001 (11): 687~707
- 5 Tomasz Lipin ski, Christopher Jones, Xavier Lemerminier, Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide[J]. Carbohydrate Research, 2003 (338):605~609
- 6 汪家政,范明主编. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2002
- 7 张维杰主编. 糖复合物生化研究技术(第二版)[M]. 杭州:浙江农业大学出版社,1994
- 8 赵亚萍. 生物化学实验技术教程[M]. 华南理工大学, 2000
- 9 张拥军. 南瓜中降血糖活性成分的筛选鉴定及降糖机理的研究[D]. 江南大学博士研究生论文,2002.3
- 10 王仲孚. 钝顶螺旋藻糖缀合物的结构与生物活性的研究[D]. 华南农业大学博士研究生论文,2001.6
- 11 章银良,李红旗,高 峻,等. 螺旋藻多糖提取新工艺的研究[J], 1999,25(2): 15~18
- 12 L De Vuyst, M Zamfir, F Mozzia, et al. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks[J]. International Dairy Journal, 2003,13: 707~717
- 13 Ruas-Madiedo P, Tuinier R, Kanning M, et al. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* on the viscosity of fermented milks[J]. International Dairy Journal, 2002(12): 689~695
- 14 Tuinier R, van Casteren W H M, Looijesteijn P J, et al. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* [J]. Biopolymers, 2001(59): 160~166
- 15 Faber E J, Zoon P, Kamerling J P, et al. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures[J]. Carbohydrate Research, 1998(310): 269~276