

双歧杆菌 22-5 胞外多糖(EPS)的分离、纯化及纯度鉴定*

欧阳清波 李平兰 李伟欣 孙成虎

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,教育部功能乳品重点实验室,北京,100083)

摘要 为了得到双歧杆菌 22-5 胞外多糖(EPS)的纯品,对 EPS 分离纯化方法进行了摸索,得到 EPS 产量较高的分离条件:发酵上清液中加入 3 倍体积 95% 冷乙醇,−20℃ 沉淀 12h 以上,8 000 r/min 离心 4 次,热水溶解后用 Sevag 法去蛋白 6 次,通过 Sepharose CL-6B 凝胶过滤得到的吸收峰,经紫外光谱扫描和 HPLC 分析,鉴定为单一多糖组分。

关键词 双歧杆菌,胞外多糖,分离,纯化

乳酸菌胞外多糖(EPS)是指乳酸菌在生长、代谢过程中分泌到细胞外的粘液或荚膜多糖,成分和结构复杂,可分为同源多糖和异源多糖^[1]。乳酸菌胞外多糖可作为增稠剂、稳定剂、乳化剂、胶凝剂、填充剂和持水剂应用到食品、制药、石油化工以及生化等领域^[1]。通常认为,胞外多糖的主要生理功能是防护作用、改善菌株对肠道粘膜的吸附及抗肿瘤作用等^[1,2]。EPS 的生理功能是由其结构组成决定的,为了能更好地研究 EPS 的构效关系,首先要对 EPS 粗品进行纯化^[3,4]。

作者从世界第四长寿区——我国广西巴马百岁以上长寿老人肠道内分离得到一株高产 EPS 的双歧杆菌 22-5 菌株,并已对其合成条件进行了优化^[5]。本文在此基础上,对双歧杆菌 22-5 菌株产生的胞外多糖进行了分离、纯化,得到了纯度较高的产品,为进一步研究多糖的结构、组成、结构和功能的关系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、试剂及培养基

双歧杆菌 22-5(来源于长寿老人),由本实验室分离并保藏。MRS 培养基(分固、液两种),重蒸酚,浓硫酸,透析袋(8000~12000Da),透析夹,Sepharose CL-6B200mL(购自 Millipore 生物制品公司)等。

1.1.2 主要仪器与设备

亨盖特厌氧培养装置,722 型分光光度计,离心机,旋转蒸发仪,层析柱,LC-10AVP 高效液相色谱等。

1.2 试验方法

1.2.1 离心速度及次数的选择

向发酵上清液中加入 3 倍体积的 95% 冷乙醇,4℃ 沉淀过夜后^[6],选择 3 000、5 000、8 000、10 000 和 12 000 r/min,5 个不同的离心速度离心,苯酚-硫酸法检测多糖得率^[7]。

在确定的最适离心速度下,分析不同的离心次数对多糖得率的影响。

1.2.2 沉淀温度及时间的确定

向发酵上清液中加入 3 倍体积的 95% 冷乙醇^[3],分别采用 −20℃、4℃ 和 20℃ 三个沉淀温度,检测不同沉淀时间的 EPS 产量。

1.2.3 浓缩倍数对 EPS 得率的影响

分别将发酵上清液浓缩至原体积的 1/2、1/3、1/4、1/5 后,加入 3 倍体积 95% 冷乙醇后于 −20℃ 沉淀 12 h。苯酚-硫酸法检测 EPS 含量。

1.2.4 Sevag 法除蛋白

以 Sevag 试剂中 CHCl₃ 同正丁醇的比例、作用时间、提取次数以及多糖溶液同 Sevag 试剂的比例为因素,设计 4 因素 3 水平正交试验^[8],测定 OD_{280 nm}并计算蛋白质的去除率。

1.2.5 凝胶层析分级纯化

采用 80×1.6 cm 规格的层析柱,Sepharose CL-6B 为填料,采用 0.1 mol/L NaCl 作洗脱剂,30 mL/h 的洗脱速度,2 mL/管收集。苯酚-硫酸法检测吸收峰。

1.2.6 高效液相色谱

收集吸收峰处的样品,并利用 HPLC 检测其纯度。色谱柱:氨基柱,流动相为 75% 乙腈,柱温 38℃,池温 38℃,流速 1.0 mL/min。

1.2.7 数据分析

采用 SPSS 统计软件进行分析。

第一作者:硕士研究生(李平兰教授为通讯作者)。

* 国家 863 资助项目(2002AA248041)

收稿日期:2005-01-04,改回日期:2005-04-18

2 结果与分析

2.1 离心速度及次数的选择

离心醇沉溶液的离心速度和离心次数都会直接影响 EPS 产量。从图 1 中可以看出,在 3 000~8 000 r/min 的速度范围内,随着离心速度的增加,多糖的得率也随之增加。而在 8 000 r/min 以后,随着离心速度的增加,EPS 的产量变化不明显($P < 0.05$),说明此时的离心速度已可以充分沉淀多糖,继续增加转速不会明显提高 EPS 得率,还浪费能源,并影响 EPS 的生物活性。因此,选择 8 000 r/min 作为醇沉溶液的最适离心速度。

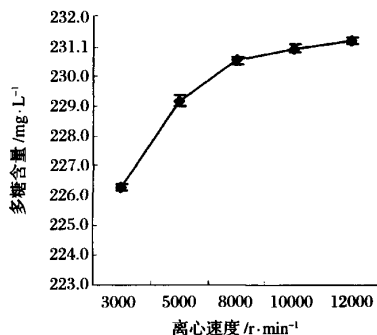


图1 不同离心速度对 EPS 产量的影响

在选定的离心速度下,对多糖溶液离心不同次数,检测 EPS 得率。结果发现,离心次数对 EPS 得率有较大影响,离心次数越多,EPS 得率越高。但达到 4 次时,再继续增加离心次数,不会显著提高 EPS 得率($P < 0.05$),还可能会引起多糖损失。选择离心 4 次比较合理(图 2)。

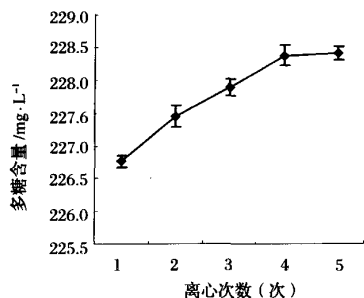


图2 不同离心次数对 EPS 得率的影响

2.2 沉淀温度及时间的确定

沉淀温度和时间都是影响多糖得率的重要因素。选择 -20℃、4℃、20℃ 三个温度,检测不同时间 EPS 的沉淀量,结果见图 3。

3 种温度条件下,EPS 得率随时间的变化趋势

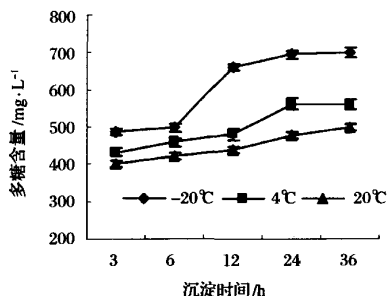


图3 不同沉淀温度和时间对 EPS 得率的影响

基本一致,即随着沉淀时间的延长,EPS 的得率不断增加。-20℃下,EPS 得率在 12 h 时即达到稳定,与 6 h 的得率存在显著差异($P < 0.05$)。而 4℃ 和 20℃ 下,在 24 h 后稳定。而且,-20℃下沉淀 3 h,EPS 的得率就接近于另 2 个温度下所能达到的最大值,且不存在显著差异($P < 0.05$)。说明沉淀温度能显著影响 EPS 产量。因此,选用 -20℃ 的温度沉淀 12 h 即可获得最大量的 EPS 沉淀。

2.3 浓缩倍数对 EPS 得率的影响

分别将发酵上清液浓缩至原体积的 1/2、1/3、1/4 和 1/5 后,加入 3 倍体积 95% 乙醇,于 -20℃ 沉淀 12 h,检测 EPS 含量,结果如图 4。

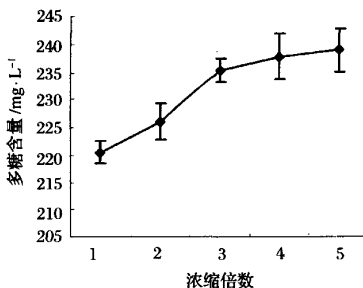


图4 不同浓缩倍数对 EPS 得率的影响

图 4 显示,不同的浓缩倍数会显著($P < 0.05$)影响多糖的得率。多糖的得率会随着浓缩倍数的提高而加大,主要是由于随多糖含量的提高溶液中的多糖越容易聚集成较大的颗粒,并随离心而沉淀下来。同时浓缩后可大大节省乙醇用量,并减少离心量,因此十分有益。但浓缩倍数过高,多糖得率未见显著提高($P < 0.05$),而且沉淀物中杂质含量增多,因此,浓缩比为 1:3 较理想。

2.4 Sevag 法条件的优化

Sevag 方法是去除蛋白质的经典方法^[9],其主要影响因素为:Sevag 试剂中 CHCl_3 同正丁醇的比例、作用时间、提取次数以及多糖溶液同 Sevag 试剂的比

例等。在此选用 Sevag 试剂中 CHCl_3 同正丁醇的比例为 A 因素,作用时间为 B 因素,提取次数为 C 因素,多糖溶液同 Sevag 试剂的比例为 D 因素,各取 3 个水平,以蛋白去除率为指标,进行正交试验。

表 1 Sevag 法正交试验因素水平及结果表

处理号	因 素				蛋白质去除率 /%
	A(v/v)	B(次)	C/min	D/(v/v)	
1	1(4:1)	1(2)	3(40)	2(1:1)	36.83
2	2(5:1)	1	1(20)	1(2:1)	37.50
3	3(9:1)	1	2(30)	3(1:2)	38.95
4	1	2(4)	2	1	36.94
5	2	2	3	3	37.17
6	3	2	1	2	37.17
7	1	3(6)	1	3	38.39
8	2	3	2	2	35.49
9	3	3	3	1	34.49
<hr/>					
K_1	106.35	99.55	102.30	103.5	
K_2	110.75	103.30	101.75	90.1	
K_3	90.85	105.10	103.90	114.35	
极差	19.90	3.75	2.15	24.25	

从表 1 可以看出,各因素对蛋白质去除效果的影响由大到小依次为:A>C>B。根据 SPSS 统计软件分析,处理 3 与处理 7 之间不存在显著差异($P<0.05$),但二者与其他处理间均存在显著差异($P<0.05$)。处理 7 中需对样品提取 6 次,严重影响 EPS 的得率,因此优先选择处理 3,即 $V(\text{CHCl}_3):V(\text{正丁醇})=9:1$,提取 2 次,每次振荡 30 min,多糖溶液同 Sevag 试剂的比例为 1:2,此条件下蛋白质的去除率可达到 38.95%。

2.5 EPS 的分级纯化

经 Sepharose CL-6B 凝胶过滤层析,苯酚-硫酸法检测 490 nm 下的吸光值,绘制曲线图,只有单一吸收峰出现,说明双歧杆菌 22-5 的 EPS 为单一多糖成分(图 5)。

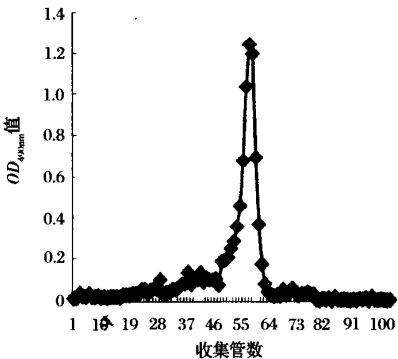


图 5 在凝胶柱上进行洗脱得到的层析图

2.6 纯度鉴定

2.6.1 紫外扫描

从图 6 可以看出,经 Sevag 法脱蛋白处理后的多糖样品,在 200 nm 处有最大吸收,而 260~280 nm 下吸光值很小,说明核酸和蛋白的含量很低,经 Sepharose CL-6B 凝胶过滤后得到的多糖样品已基本不含核酸和蛋白质,纯度较高。

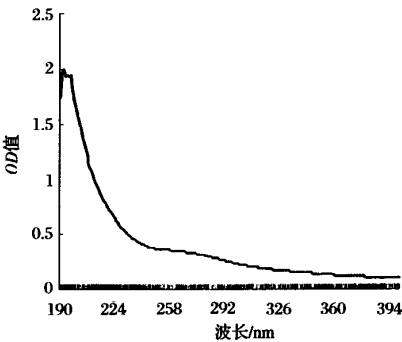


图 6 经 Sevag 法脱蛋白后的多糖紫外扫描图

2.6.2 高效液相色谱

图 7 显示,除溶剂峰以外只有 1 个吸收峰,说明通过凝胶层析分离得到的为单一多糖组分。以上 2 种纯度鉴定,证明了双歧杆菌 22-5 菌株所产的 EPS 经过一系列的分离纯化,已经得到纯品,可以进行分子结构及性能测定。

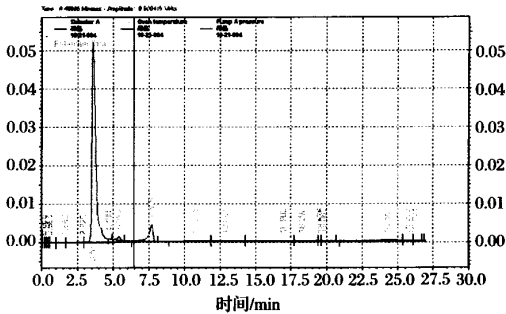


图 7 凝胶过滤后样品的 HPLC 图谱

3 讨论

乳酸菌 EPS 的分离通常先用离心法去除蛋白质和细菌体,然后用乙醇或丙酮分级沉淀^[7]。乙醇沉法安全无毒,是研究人员常用的方法。有时 EPS 结合部分蛋白质,可用酶,如胃蛋白酶和胰蛋白酶去除,也可用三氯乙酸或 Sevag 方法去除缔合蛋白质,并用扫描法鉴定蛋白质脱除效果^[7,10]。本实验中先用热水溶解多糖粗产品,这样可以使部分蛋白变性而容易离心去除,再利用 Sevag 方法进一步脱蛋白。此方法相对于三氯乙酸来说,带来的 EPS 损失较少,而相对

于酶法来说,成本较低,是较为理想的去蛋白方法。

用凝胶色谱进行粗多糖分级纯化后,可用葡聚糖凝胶电泳、高压电泳法、HPLC法和超速离心法等进行多糖的纯度鉴定^[7,10,11]。其中HPLC方法操作简单,重复性及可靠性较高,因此选用HPLC法。

4 小 结

针对双歧杆菌22-5菌株所产EPS分离纯化方法的摸索,本实验得到了EPS产量较高的分离条件,即:发酵上清液中加入3倍体积95%冷乙醇,-20℃沉淀12h以上,8000 r/min离心4次,热水溶解后Sevag法去蛋白6次,Sephrose CL-6B凝胶过滤,收集吸收峰处样品,经紫外分光光度计和HPLC鉴定为单一多糖组分。此研究为今后的EPS结构与功能的研究及构效关系的分析提供了必要的依据。

参 考 文 献

- Philippe D, Beat M. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry[J]. International Dairy Journal, 2001, 11:759~768
- Patricia R-M, Jeroen H, Pieterneela Z. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2002, 12:163~171
- 顾瑞霞. 乳酸菌胞外多糖生物合成及生理功能特性的研究[D]. 东北农业大学博士学位论文, 2000. 11
- Andaloussi S A, Talbaoui H, Marczak R, et al. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43:995~1000
- 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, 2:12~15
- Zhennai Y, Eine H, Mikael S, et al. Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming, *Actococcus lactis* ssp. *cremoris* strains[J]. International Dairy Journal, 1999, 9: 631~638
- 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科技出版社, 1999
- 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社, 2000. 360~366
- 诸葛健. 红曲霉胞外多糖的产量提高及纯化、结构研究[D]. 江南大学硕士学位论文, 2002. 3
- 陈惠黎. 糖复合物的结构与功能[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1997
- Brian J B Wood. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease[M]. London and New York: Elsevier Applied Sci, 1992

Isolation and Purification of Exopolysaccharides Produced by *Bifidobacterium* sp 22-5

Ouyang Qingbo Li Pinglan Li Weixin Sun Chenghu

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Functional Dairy Laboratory, Beijing, 100083, China)

ABSTRACT The isolation process of exopolysaccharides was presented and optimized in this paper to obtain pure EPS produced by *Bifidobacterium* sp 22-5. The optimum conditions were: remove cells and precipitated proteins by centrifugation for 10min at 8000r/min for 4 times, precipitate the EPSs by adding 3 times the volume of cold 95% ethanol and remove proteins using Sevag method. The crude EPSs were then filtrated by Sepharose CL-6B. The peak was detected by HPLC and UV Spectrum.

Key words *Bifidobacterium*, exopolysaccharide (EPS), isolation, purification

行业动态

伊利集团成立中国最大的乳业研究机构

近日,内蒙古乳业研究院揭牌仪式在呼和浩特市举行,这是伊利集团联手内蒙古自治区科技厅合作成立的国内第一个专业的省级乳业研究机构,据了解,这也是目前我国最大的乳业研发中心。

据了解,伊利是该研究院唯一的企业发起单位。在中国乳业竞争日趋同质化的今天,科技创新是提升企业核心竞争力的重要武器。由于该研究院办公室常设于伊利集团总部,作为投资方,伊利将提前享受到该研究院的最新科技成果。