

嗜酸乳杆菌胞外多糖提取工艺优化

刘齐,刘爱红,孙美玲,李孚杰

(湖北大学知行学院,生物工程系,湖北 武汉,430011)

摘 要 微生物的胞外多糖是微生物在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏液多糖或荚膜多糖,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。试验以嗜酸乳杆菌胞外多糖为研究对象,对提取时间、提取的乙醇体积分数和提取的料液比进行单因素实验,并利用 sas 软件对其提取工艺进行优化,得到在 80% 体积分数的乙醇下,以 1:1.8(体积比)的料液比抽提 12 h,得到的多糖的产量为 1.91 g/L。

关键词 嗜酸乳杆菌,胞外多糖,提取工艺,优化

近年来,由于细菌发酵多糖具有安全无毒、结构与功能稳定、生产成本低、生产不受地域和病虫害限制等优点而日益受到人们的广泛关注^[1-2]。目前,在世界范围内微生物多糖产量的年增长率维持在 10% 左右,主要以絮凝剂、悬浮剂的形式应用于食品、制药和化工等多个领域^[9],同时也有文献报道,细菌胞外多糖在抑制肿瘤的产生方面有明显的效果,这更加大和拓宽了细菌胞外多糖的功能性应用。

与真菌多糖比较,嗜酸乳杆菌胞外多糖在改变溶液的流变状态上有许多优势。例如,在低浓度的状态下,能有效增加溶液的黏性同时又不会形成凝胶;在很小的切应力作用下就能够增加溶液的流动性,而当外界切应力消失的时候,又能回复原本的黏度等等。嗜酸乳杆菌胞外多糖不仅对乳制品的质构和风味具有重要影响,而且有可能成为食品级多糖的一个极好的来源而广泛应用于各种食品的增稠、稳定、乳化、胶凝及保湿^[4-5]。

本实验针对嗜酸乳杆菌胞外多糖提取工艺中可能产生的影响因素为研究对象,以提取料液比、提取温度和提取液浓度这 3 个不同的因素对嗜酸乳杆菌胞外多糖的分离提取做优化试验,建立模拟方程,同时对提取分离出来的多糖进行初步分析,为工业化生产提供理论依据^[13-14]。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*),实验室分离,保存。95% 乙醇(AR),无水乙醇(AR),浓硫酸

(AR),葡萄糖(AR),重蒸苯酚(AR),透析带,MRS 培养基^[12]、DEAE-Cellulose 52、Sephadex G-200。

1.2 仪器与设备

UV-7504 紫外可见分光光度计,上海欣茂仪器有限公司;CS101 型电热鼓风干燥箱,重庆实验设备制造厂;超速冷冻离心机,美国 Beckman,恒温水浴锅、磁力搅拌器、偷袭带、冷冻干燥器、气相色谱、核算蛋白检测仪等。

1.3 葡萄糖标准曲线的制作

分别取葡萄糖标准液 0.5 mL,1 mL,1.5 mL,2 mL,2.5 mL,3 mL 于带刻度的比色管中,用蒸馏水定容至 20 mL,另取 20 mL 的蒸馏水于带刻度的比色管中作为空白样,分别在各比色管中加入 5 mL 5% 的苯酚溶液,摇匀后立即在每个比色管中分别加入 25 mL 浓硫酸,用力振荡,沸水浴放置 2 h,于 490 nm 处进行吸光值的检测,每个试样测定 5 次,取平均值,绘制标准曲线,通过 EXCEL 分析得到葡萄糖浓度与吸光度值 A 间的回归方程^[6]。

1.4 嗜酸乳杆菌胞外多糖提取单因素试验

先利用 95% 的乙醇分别按照 1:1,1:2,1:3,1:4,1:5(体积比)的料液比例提取 24h,在其他提取条件不变的情况下进行分离提取,分析胞外多糖产量。然后以乙醇体积分数为 95%,料液比为 1:3(体积比),分别抽提 6,15,25,35 和 45 h,测定胞外多糖含量。最后分别按照 50%,60%,70%,80%,95% 的乙醇体积分数,按 1:3(体积比)的料液比抽提 24 h,测定胞外多糖含量。

1.5 嗜酸乳杆菌胞外多糖的提取优化方法

将嗜酸乳杆菌接种于 MRS 液体培养基中,37℃ 培养 24 h^[10],将嗜酸乳杆菌胞外多糖的发酵液按旋转正交试验设计(表 2)分别给予的不同提取温度、料

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2010-02-04,改回日期:2010-07-02

液比和时间进行试验。测定最后多糖含量,实验重复2次,每次3个平行取平均值。

1.6 分析方法

经发酵得到的发酵液,通过低温高速离心机在12 000 r/min(4℃)条件下离心30 min,取上清液,按照试验规定的条件利用乙醇沉淀,将上清液再次于低温高速离心机中以12 000 r/min(4℃)条件离心30 min,离心得到的沉淀物和酒精沉淀一同归并溶于蒸馏水中,4℃条件下透析48 h。对该溶液采用苯酚硫酸法测定多糖含量。

1.7 分离纯化

将上述得到的粗多糖使用规格为1.6 cm × 60 cm离子交换柱(DEAE-Cellulose 52)分离纯化,分离条件为:上样浓度0.3 g/L,上样体积1 mL,利用0.1 mol/L的NaOH溶液洗脱,流速为10 mL/h,采用分步收集方式,每管收集1.5 mL,利用苯酚硫酸法检测多糖含量并将其中含量较高成分冷冻干燥备用。将含量较高的成分收集起来,利用Sephadex G-200进行分离纯化。柱子规格1.6 cm × 60 cm、上样浓度为10 mg/mL,用蒸馏水洗脱,上样体积为1 mL,流速为10 mL/h,每管收集1.5 mL,苯酚硫酸法和核酸蛋白仪跟踪检测获得组分A,并且冷冻干燥留作分析备用。

1.8 组分A的气相分析

将上述分析得到的含量最多组分A进行相应前处理,在HT-5,30 m × 0.32 mm × 0.25 μm的分离柱下检测分析。具体条件如下:

气流速度为25 mL/min(N_2 : H_2 :空气之比为1:1.5:20)。程序升温:160 ~ 180 ℃,10 ℃/min,2 min;180 ~ 208 ℃,3 ℃/min,2 min;208 ~ 210 ℃,1 ℃/min,4 min。检测器温度:280 ℃。进样量为1 μL。以标准单糖分子气相色谱图为对照。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线

将标曲试验所得数据以标准葡萄糖液的浓度作为横坐标,在490 nm下吸光值(以0.2 ~ 0.8为有效数据)为纵坐标做图,由分析软件得到该标准曲线的线形方程 $y = 14.567x + 0.0039$,同时其线性回归系数 R^2 为0.9994。由此可以判定该标准曲线在吸光值0.2 ~ 0.8有很好的线性,能够通过其精确计算出多糖产量。

2.2 嗜酸乳杆菌胞外多糖提取单因素实验

2.2.1 料液比对嗜酸乳杆菌胞外多糖提取效果的影响

在体积分数为95%的乙醇体积分数下以不同料液比提取24 h;料液比对胞外多糖提取的影响见图1。从图1多糖含量变化趋势可以看出,当提取多糖溶剂(酒精)浓度和抽提时间一定的情况下,嗜酸乳杆菌胞外多糖的含量在料液比为1:3(体积比)之前随着料液比的增大而增大,在料液比为1:3(体积比)附近时出现拐点,随后伴随料液比的增大其产量呈下降趋势。因此选择提取的料液比为1:3(体积比)。

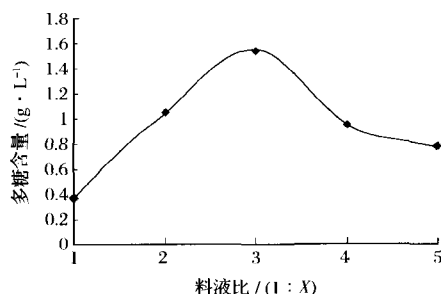


图1 料液比对多糖提取的影响

2.2.2 提取时间对嗜酸乳杆菌胞外多糖提取效果的影响

乙醇体积分数为95%,料液比为1:3,时间对胞外多糖提取的影响见图2。从图2多糖含量变化趋势可以看出,当浸提时间在24 h之前多糖含量明显增加,在24 h附近出现拐点,而在24 h之后趋近平缓。说明当料液比和浸提液(酒精)浓度确定之后,在浸提时间少于24 h的时候,多糖还没有完全被浸提出来,而超过大约24 h之后,其基本抽提完全。因此,本实验选择浸提时间为24 h。

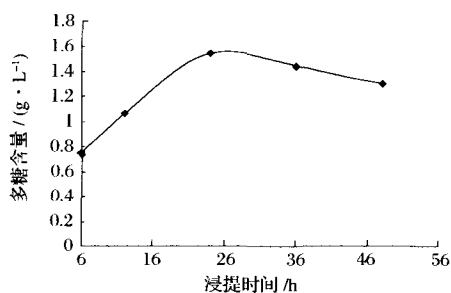


图2 浸提时间对多糖提取的影响

2.2.3 乙醇体积分数对嗜酸乳杆菌胞外多糖提取效果的影响

在采用不同浓度的溶剂(乙醇),以1:3(体积比)的比例抽提24 h。乙醇体积分数对胞外多糖的影响(图3)。从图3可以看出当浸提时间和料液比一定时,在乙醇体积分数在70%以下时,随着浓度的

增大,嗜酸乳杆菌胞外多糖的提取效果明显增大,而超过 70% 以后其提取效果的增加幅度明显减缓,最后趋于稳定,维持在 1.5 g/L 左右。因此,考虑到整个提取过程中成本问题,试验选取浸提乙醇体积分数为 70%。

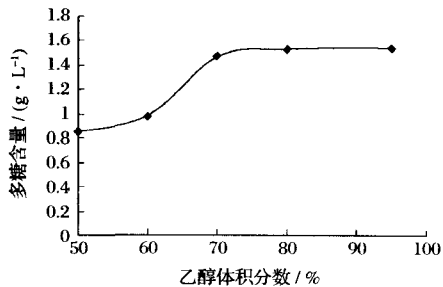


图 3 乙醇体积分数对多糖提取的影响

2.3 旋转正交优化嗜酸乳杆菌胞外多糖的提取工艺

2.3.1 三因子二次正交旋转试验设计试验结果

实验采用 3 因素二次旋转正交组合设计方案,以优化提取工艺参数。将上述单因素试验所获得的最佳值(料液比 1:3,浸提时间 24 h,乙醇体积分数 95%)为基础,为每个试验因素选取 5 个水平进行旋转正交实验。旋转正交实验水平设计如表 1 所示。试验所得数据如表 2 所示。

表 1 因素水平编码

X	乙醇体积分数/%	料液比(体积比)	时间/h
-γ	60	1:1	12
-1	64	1:2	17
0	70	1:3	24
+1	76	1:4	31
γ	80	1:5	36

表 2 旋转正交数据

编号	乙醇体 积分数/%	料液比 (1:X)	时间/h	产量/ (g · L ⁻¹)		编号	乙醇体 积分数/%	料液比 (1:X)	时间/h	产量/ (g · L ⁻¹)	
1	76	4.2	31	1.35	1.38	13	70	3.0	36	1.72	1.54
2	76	4.2	17	0.94	1.13	14	70	3.0	12	1.28	1.28
3	76	1.8	31	0.61	0.61	15	70	3.0	24	1.15	1.15
4	76	1.8	17	1.21	1.21	16	70	3.0	24	1.04	1.05
5	64	4.2	31	1.11	1.11	17	70	3.0	24	1.14	1.08
6	64	4.2	17	0.71	0.65	18	70	3.0	24	1.14	1.12
7	64	1.8	31	0.81	0.81	19	70	3.0	24	1.05	1.12
8	64	1.8	17	0.45	0.49	20	70	3.0	24	1.02	1.18
9	80	3.0	24	1.73	1.73	21	70	3.0	24	1.04	1.09
10	60	3.0	24	0.86	0.86	22	70	3.0	24	1.08	1.13
11	70	5.0	24	1.26	1.26	23	70	3.0	24	1.13	1.15
12	70	1.0	24	0.50	0.50						

通过 sas 软件对旋转正交实验所得数据进行分析,得出经过不同提取方式得到的嗜酸乳杆菌胞外多糖产量(C)与乙醇体积分数(X)、浸提时间(Y)和料液比(Z)的三元二次方程: $C = 1.092\ 734 + 0.323\ 974X + 0.294\ 948Y + 0.136\ 121Z + 0.028\ 276X \times X + 0.030\ 059Y \times X - 0.386\ 224Y \times Y - 0.367\ 432Z \times X + 0.361\ 421Z \times Y + 0.189\ 776Z \times Z$ 。同时该方程拟合检验发现其 F 值为 13.24,远远大于 $F_{0.01}(9,13) = 4.19$ 。因此,可以认为本实验所完成的数学模型能够很好的模拟酒精浓度、料液比、浸提时间对于整个嗜酸乳杆菌提取过程中的影响情况。

在该模拟方程中,可以清楚的看到 X、Y、Z、Y²、X × Z、Z × Y、Z² 的 P 值都小于 0.05,说明这几项之间存在显著性差异,而其余几项都不存在显著性差异。也就是说,乙醇体积分数、浸提时间、料液比、酒精浓度和料液比、浸提时间和料液比的交互作用对于整个

抽提过程存在有较大的影响。为了方便分析和优化,本实验将公式简化为如下形式:

$$C = 1.092\ 734 + 0.323\ 974X + 0.294\ 948Y + 0.136\ 121Z + 0.189\ 776Z \times Z - 0.367\ 432Z \times X + 0.361\ 421Z \times Y。$$

表 3 方程中各参数的回归系数

参数	自由度	标准差	t 值	Pr > t	系数
常数	1	0.039 254	27.84	<0.000 1	1.092 734
X	1	0.031 885	6.04	<0.000 1	0.323 974
Y	1	0.031 885	5.50	<0.000 1	0.294 948
Z	1	0.031 885	2.54	0.015 6	0.136 121
X × X	1	0.029 556	0.34	0.737 2	0.028 276
Y × X	1	0.041 662	0.26	0.800 2	0.030 059
Y × Y	1	0.029 556	-4.62	<0.000 1	-0.386 224
Z × X	1	0.041 662	-3.12	0.003 6	-0.367 432
Z × Y	1	0.041 662	3.07	0.004 1	0.361 421
Z × Z	1	0.029 556	2.27	0.029 3	0.189 776

表4显示在乙醇体积分数、料液比、抽提时间这3个因素中,对于嗜酸乳杆菌胞外多糖的影响显著性次序应当是:料液比($F = 15.26$) > 乙醇体积分数($F = 11.6$) > 浸提时间($F = 7.68$),即料液比对于嗜酸乳杆菌胞外多糖提取效果的影响力大于酒精浓度而抽提时间的影响力最小。

表4 各因素的F值大小

因素	自由度	平方和	均方	F值	Pr > F
X	4	1.288 293	0.322 073	11.60	<0.000 1
Y	4	1.695 385	0.423 846	15.26	<0.000 1
Z	4	0.852 956	0.213 239	7.68	0.000 1

2.3.2 交互关系分析

令其中某一个因子为0,此时能够得到除此因子之外另外2个因素对于整个嗜酸乳杆菌胞外多糖提取效果影响的交互效应方程: $C = 1.092\ 7 + 0.324X +$

$0.136Z + 0.028X \times X + 0.189Z \times Z - 0.367Z \times X$; $C = 1.092\ 7 + 0.295Y + 0.136Z - 0.386Y \times Y + 0.189Z \times Z + 0.361Z \times Y$; $C = 1.092\ 7 + 0.324X + 0.295Y + 0.028X \times X - 0.386Y \times Y + 0.03X \times Y$ 。通过sas分析软件作出各因素之间的两两交互关系。

2.3.3 最佳工艺参数

对方程进行进一步优化得到其值最大化编码组合。即:利用最80%的乙醇按1:1.8的比例提取12 h能够得到大产量。其胞外多糖产量为1.91 g/L。通过检验试验得到产量为1.85 g/L。

2.3.4 胞外多糖的分离纯化

所得到的粗多糖经DEAE-Cellulose 52和Sephadex G-200分离的结果见图4。

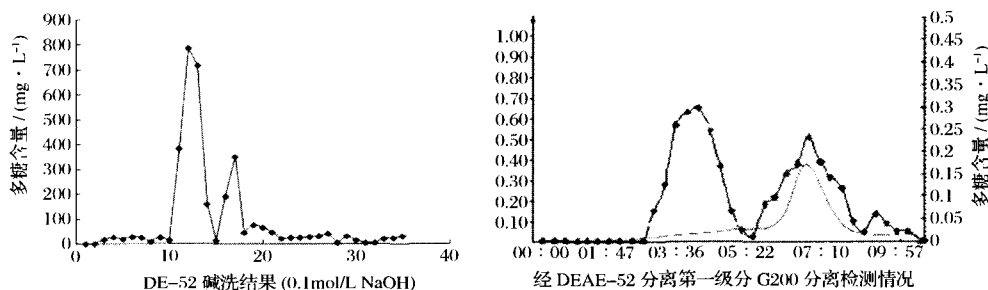


图4 粗多糖经DE-52和Sephadex G-200分离情况

在DE-52分离柱中,利用0.1 mol/L的NaOH溶液洗脱分别得到2种胞外多糖组分,第1个组分出现在1.5~2 h(10~15管)和2.3~3h(15~18管)的时候,最高峰值分别能够达到0.8 g/L和0.35 g/L。当洗脱超过3 h之后基本没有明显的多糖成分被洗脱下来。将分离过程中含量较高的第1组份(10~15管)集中收集起来,放入透析带中4℃透析48h,冷冻干燥留作Sephadex G-200继续分离。其结果见图4,从图4可以看出用DE-52收集得到的组分A再继续分离后又得到3个组,其分别出峰时间为2小时45分钟到5小时,含量接近0.35 mg/mL;第2个峰出现在5~8 h,其产量达到0.25 mg/mL;第3个峰出现在8 h之后,产量很小只有0.05 mg/mL。同时由核算蛋白测定仪检测发现第2个峰中含有明显的蛋白质。由此可以判断在粗多糖经过DE-52和Sephadex G-200分离之后的第2个组分是糖蛋白的复合物。同时收集Sephadex G-200分离得到含量较多的组分(A组分)冷冻干燥留作备用。

2.3.5 组分A的气相分析

将鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖的单糖标准样品进行气相色谱,分析发现A组分的糖链中含有的单糖有:鼠李糖、木糖、甘露糖、葡萄糖,它们的相对含量为3.35:1:1:1。

3 结论

采用乙醇分级沉淀的方法,建立起酒精沉淀提取嗜酸乳杆菌胞外多糖的模拟方程: $C = 1.092\ 734 + 0.323\ 974X + 0.294\ 948Y + 0.136\ 121Z + 0.028\ 276X \times X - 0.386\ 224Y \times Y + 0.189\ 776Z \times Z - 0.367\ 432Z \times X + 0.361\ 421Z \times Y + 0.030\ 059X \times Y$ 。通过对方程的回归系数检验得知在利用酒精提取嗜酸乳杆菌胞外多糖的时候提取时间,乙醇体积分数,料液比3个影响因素的主次关系是:料液比 > 乙醇体积分数 > 浸提时间。

在单因素的基础之上采用旋转正交的方法对多糖的提取量进行最大化的工艺优化,得到在80%(体积分数)的酒精按1:1.8(体积比)的比例提取12 h能够得到最大产量。其胞外多糖产量为1.85 g/L。

将得到的粗多糖经 DE-52 和 Sephadex G-200 分离之后得到其中含量最大的组分 A, 并利用气相色谱仪对其进行分析发现其糖链是由鼠李糖、木糖、葡萄糖、半乳糖所组成。其单糖分子含量之比为 3.35:1:1:1。同时气相分析发现在嗜酸乳杆菌胞外多糖中有一个组分是明显的蛋白糖复合体。

参 考 文 献

- [1] 邓丽等. 益生菌的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(B11): 84-87.
- [2] 包海泉等. 微生态制剂的发展及应用前景[J]. 畜牧与饲料科学, 2004, 25(3): 11-12.
- [3] 吕嘉枋等. 嗜酸乳杆菌 LAJ90 菌株部分生物学特性的研究[J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2003, 21(4): 10-12.
- [4] 张帆, 王建华, 刘立恒, 等. 菊粉寡糖促进嗜酸乳杆菌生长的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 49-51.
- [5] 刘振民等. 嗜酸乳杆菌的生理特性及应用[J]. 中国乳业, 2003(5): 28-30.
- [6] 董群, 郑丽伊, 方积年. 改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 9(31): 550-553.
- [7] 张卫华等. 国内外益生菌产品发展状况[J]. 口岸卫生控制, 2004, 9(5): 44-46.
- [8] 郭本恒. 嗜酸乳杆菌在乳品中的应用技术[J]. 食品工业, 1999(1): 18-19.
- [9] 郝生宏. 国内外益生菌生产应用现状[J]. 饲料研究, 2004(6): 19-21.
- [10] 赵斌. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 8.
- [11] 郭兴华. 乳酸菌应用与基础[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 141-159.
- [12] Vinderola C G, Reinheimer J A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria[J]. International Dairy Journal, 1999, 9: 497-505.
- [13] SAS Release 8.01 TS Level 01M 0, SAS Institute Inc [M]. Cary, NC, USA. Copyright(c), 1999-2000.
- [14] Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building[M]. New York: John Wiley and Sons, 1990.

The Optimization of Extrapolysaccharides of *Lactobacillus acidophilus* in Extraction

Liu Qi, Liu Ai-hong, Sun Mei-ling, Li Fu-jie

(Department of bioengineering, Zhi Xing college of HuBei University, Wuhan 430011, China)

ABSTRACT *Lactobacillus acidophilus*, which is recognized as a safe fermentation creature, is probiotics which can stay in human intestinal wall. Many strains have been the stars in the food industry for a long time. The extrapolysaccharides of bacteria are macromolecule polymers which are secreted during the incubation or in the cell wall to protect the bacteria during incubation. The polysaccharides are diluted in the water. Its perfect characteristics in rheology and physics has put it on the stage for research and production. The extrapolysaccharides of lactobacilli are not only important for flavor and quality of dairy, but also a secure source of polysaccharides, because of its capability of stabilizing and emulsifying the humidity of dairy product. In this article, extraction of the extrapolysaccharides of *Lactobacillus acidophilus* is optimized with the SAS software. The yield of polysaccharides is 1.91 g/L by extraction 80% ethanol (1:1.8) for 12 hours.

Key words *Lactobacillus acidophilus*, extrapolysaccharide, extraction optimization