

乳酸菌胞外多糖的研究

李清春^{*1} 张景强² 贺稚非³

(1. 电子科技大学中山学院 广东 中山 528402; 2. 中山市中智医药有限公司 广东 中山 528402;
3. 西南农业大学食品学院 重庆 北碚 400716)

【摘要】分析了产胞外多糖乳酸菌的种类,同型胞外多糖和异型胞外多糖的生物合成途径与遗传调控,以及影响发酵生产的因素。总结了乳酸菌胞外多糖的分离、纯化、纯度鉴定的方法及乳酸菌胞外多糖的重要结构单元与功能之间的相互关系。揭示出乳酸菌胞外多糖在食品、医药领域巨大的潜在应用价值。

关键词 乳酸菌; 胞外多糖; 生物合成; 化学特性

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A

Advance in Exopoly Saccharide Research by Lactic Acid Bacterium

Li Qingchun¹ Zhang Jingqiang² He Zhifer³

(1. Zhongshan College, UEST of China Guangdong Zhongshan 528402; 2. Zhongshan Zhongzhi Pharmacy Co. Ltd Guangdong Zhongshan 528402;
3. College of Food Science Southwest Agricultural University Chongqing Beibei 400716)

Abstract This paper is aimed to provide an overview of the biosynthesis, extraction and purification, composition, physical and chemical properties, foreground and its application of exopolysaccharide produced by lactic acid bacterium.

Key words lactic acid bacterium; exopoly saccharides; biosynthesis; chemical properties

乳酸菌胞外多糖(Exopoly Saccharides, EPS)是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外常渗于培养基的一类糖类化合物,有的依附于微生物细胞壁形成荚膜,称为荚膜多糖;有的进入培养基形成粘液,称为粘液多糖,它们都是微生物适应环境的产物。近几十年来,由于微生物胞外多糖在产品结构、性能及生产方面所具有的特别优势而得到大力研究和开发,新的微生物胞外多糖的开发已成为工业微生物研究的热点之一。由于乳酸菌是食品级工业生产菌,与其他菌相比安全性高,所以近年来对乳酸菌胞外多糖的研究逐渐增多。但产量低,菌株稳定性差,仍是制约其大规模生产的主导因素。现在各国科学家试图用基因工程的手段构建高产菌株,但至今仍没成功。乳酸菌胞外多糖可赋予发酵乳制品特殊的质构和风味,起到安全的食品添加剂的作用^[1],它还有可能成为食品级多糖的一个良好来源而广泛用于各种食品的增稠、稳定、乳化、胶凝及持水^[2]。胞外多糖还具有生物活性如免疫活性、抗肿瘤和抗溃疡,可应用于医药领域。

1 EPS的生物合成

1.1 产胞外多糖的乳酸菌

按伯杰氏系统细菌学手册中的形态分类法,乳酸菌分为18个属^[3],目前对乳杆菌属、链球菌属、乳球菌属、明串珠菌属的胞外多糖研究较多。其中20世纪40年代开发出的由肠膜明串珠菌产生的右旋糖酐是最早被开发利用的乳酸菌胞外多糖,也是FDA批准的第一种可用于食品的微生物胞外多糖。

2003年9月1日收稿

* 女 28岁 硕士 主要从事食品微生物及发酵工程方面的研究

合成EPS的乳酸菌主要从发酵乳制品及发酵肉制品中分离得到。对600株乳酸菌进行研究筛选出30株产EPS的乳酸菌。对近20年来的研究结果的分析表明,不同乳酸菌的EPS生物合成量是不同的,结果如表1所示。此外,瑞士乳杆菌、嗜热链球菌嗜酸乳杆菌、肠膜明串珠菌、片球菌属也可产胞外多糖。

表1 不同乳酸菌EPS的合成量^[4]

乳酸菌	合成量/mg·L ⁻¹	菌种来源
乳酸乳球菌	80~600	发酵乳制品
开菲尔粒	300~400	开菲尔制品
干酪乳杆菌	488	发酵乳制品
德氏保加利亚乳杆	354	酸奶
清酒乳杆菌	1 375	香肠
唾液链球菌嗜热亚种	114	香肠
乳酸乳球菌乳脂亚种	500	香肠

1.2 EPS的生物合成及其遗传调控

1.2.1 EPS的生物合成

微生物胞外多糖的生物合成因菌种不同而发生在生长的不同阶段和环境条件下。按合成位点和合成模式的不同,微生物胞外多糖的合成分为位于细胞壁外的同型多糖的合成与位于细胞膜上的异型多糖的合成。同型多糖的合成不依赖C₅₅-lipid-pp的合成模式,异型多糖的合成则为依赖C₅₅-lipid-pp的合成模式。

1) 同型多糖的合成

同型多糖,如由肠膜明串珠菌生产的葡聚糖,是在胞外合成的,合成体系包含糖基供体(蔗糖)、糖基受体及葡聚糖蔗糖酶(E.C.2.4.1.5)。在葡聚糖的合成中需解决的问题包括:单链或多链反应、启动子、主链延长方向、链的终止、受体机制及支链连接方式等。葡聚糖的合成属单链反应机制,葡聚糖蔗糖酶是一个糖苷转移酶(蔗糖-6-葡萄糖基转移酶),它将供体(如蔗糖)的糖苷基团转移到受体即正在延长的葡聚糖主链上,蔗糖可启动其自身的多聚化反应,并不需要葡萄糖作为启动子。葡聚糖的合成特点是以蔗糖为唯一底物,合成所需的能量来自蔗糖的水解而不是糖基核苷酸,不需脂载体和独立的分支酶,产物分子量较大。

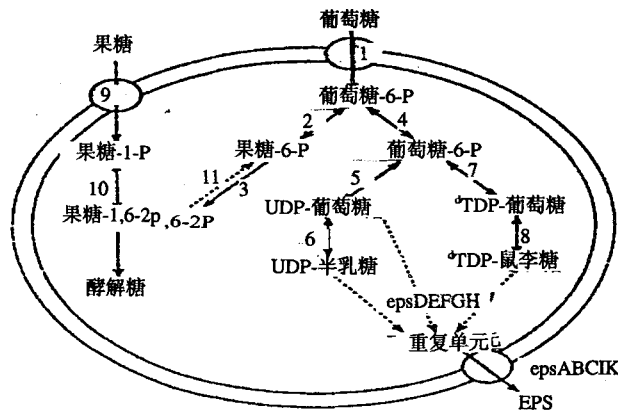
2) 异源多糖的合成

异源多糖是在细胞膜上合成的,它的合成体系包括糖-核苷酸、酰基供体、脂中间体、酶系统及糖基受体五个因子^[3]。在细胞膜上合成多糖需要的活性前体即各种高能态的单糖,这些高能态的单糖主要是糖基-二核苷酸,所有含葡萄糖的多聚物(除糖原外)均以UDP-D-葡萄糖为供体;乙酸、丙酮酸、3-羟基丁酸等的活性形式是酰基,为胞外多糖的合成所必需;异戊二烯脂中间体整合多糖的重复单元,在原核细胞多糖合成中起作用的是焦磷酸异戊二烯脂;酶系统包括己糖激酶、糖基-核苷酸合成及转移酶、糖基转移酶、聚合酶等。异源多糖的合成始于EPS前体(糖核苷酸)的胞内合成,之后糖核苷酸在液态载体中形成重复的单元,最后一步将重复单元从细胞膜运输到细胞外,使之聚合成几百到几千个重复的单元,形成EPS。乳酸链球菌产EPS途径如图1所示。

1.2.2 EPS合成的遗传调控

对大肠杆菌的研究表明,控制胞外多糖合成的基因簇有三个功能片段如图2所示。图中区1的功能是将完整的多糖运至细胞表面,其突变子表现为多糖在细胞内聚集;区2的功能与糖基-核苷酸合成的专一性酶有关如转移酶和聚合酶,其突变子表现为不能产胞外多糖;区3的功能与多糖达到细胞表面后胞外多糖的修饰有关。区1和区3的突变子妨碍了多糖在细胞表面的表达,但不能抑制聚合物合成的酶系。

对乳酸菌胞外多糖的生物合成的基因调控研究表明,嗜温乳酸菌产胞外多糖的特性受大小不一的各种质粒的控制,某些条件下(如高温、频繁传代)产胞外多糖的特性容易丢失。乳酸乳球菌乳脂亚种MS产胞外多糖特性受一个18.5-Mda的质粒的控制,该质粒还具有抗噬菌体的特性;干酪乳杆菌干酪亚种产胞外多糖的特性受一个4.5-Mda的质粒的控制;产胞外多糖的德氏乳杆菌保加利亚亚种不含质粒;乳酸链球菌NIZO B40产胞外多糖的特性受一个40 kb的质粒的控制。文献[5]发现充分表达fbp基因,以果糖为碳源时,EPS的产量提高,证明FBPase(二磷酸果糖激酶)的低活性限制了EPS的合成。



- 1. 甘露糖PEP PTS; 2. 磷酸葡萄糖异构酶; 3. 6-磷酸果糖激酶; 4. α -葡萄糖磷酸变位酶;
- 5. UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; 6. UDP-半乳糖-4-差向酶; 7. 脱氧-TDP-葡萄糖焦磷酸化酶;
- 8. 脱氧-鼠李糖合成酶系; 9. 果糖PEP PTS; 10. 1-磷酸果糖激酶; 11. 1,6-二磷酸果糖激酶

图1 乳酸链球菌产EPS途径

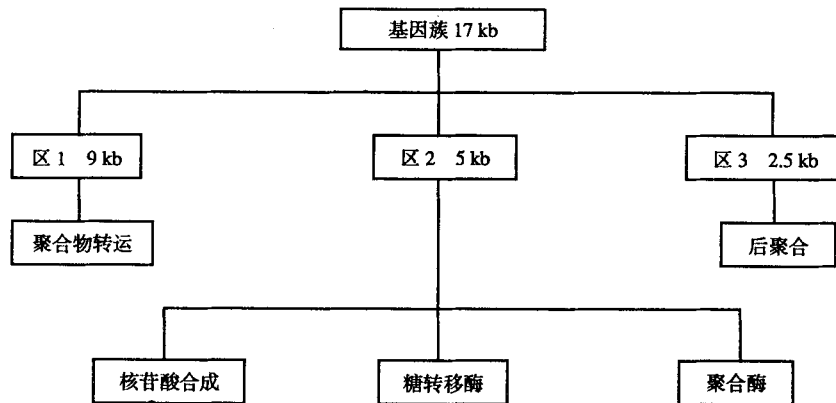


图2 控制大肠杆菌(E.coli)胞外多糖合成的基因

1.3 乳酸菌胞外多糖的发酵生产

右旋糖酐是最早商业化生产的乳酸菌胞外多糖。美国农业部北部地区研究室(NRRL)开发的肠膜明串珠菌NRRL B-512是右旋糖酐工业生产的代表菌株，中国医学院输血及血液学研究所筛选的肠膜明串珠菌1226已在20世纪60年代推广使用。右旋糖酐的生产方法已趋于成熟，其他乳酸菌胞外多糖的发酵生产条件因菌种不同而存在一定差异。

乳酸菌EPS的生物合成过程中糖的种类和含量对多糖的合成量有影响，德氏保加利亚乳杆菌存在时，EPS中乳糖含量升高。干酪乳杆菌CG11产胞外多糖的最佳碳源为葡萄糖。对唾液链球菌嗜热亚种发酵生产EPS发现，糖源为乳糖时EPS生成量最大。多数研究结果证实乳酸菌以10~20 g/L葡萄糖为碳源可得到最高的胞外多糖产量。

用响应面法优化半限制培养基上德氏乳杆菌保加利亚亚种RR产胞外多糖的条件，结果表明，该菌产胞外多糖的最适温度为38℃，在其生长的最适温度(37~40℃)内，最适pH值为5.0，氮源的最适浓度为30 g/L，胞外多糖的最高产量达354 mg/L。文献[6]报道唾液链球菌嗜热亚种LCX2001在最适温度47℃时产胞外多糖的能力下降，其最适条件为35℃，初始pH值6.5，发酵时间20 h。一般好气产胶菌在限制氮源条件下可增加胞外多糖的产量，但德氏乳杆菌保加利亚亚种除外，其产胞外多糖的氮源为其生长所需氮源的三倍^[7]。

在较低的温度下，细胞生长慢，细胞壁的合成也慢，从而使较多的磷酸类异戊二烯用于胞外多糖的合成，嗜温乳酸菌的研究支持这个假说。好气产胶菌(如野油菜黄单胞菌、少动鞘脂单胞菌等)也有类似表现。

异戊二烯脂的运载活性在pH值6.5~7.0，pH值的降低将使胞外多糖的合成因失去脂中间体而受阻，但绝大多数乳酸菌产胞外多糖的最适pH值低于上述值。

从现有研究结果可以得到如下结论:1) 当发酵温度低于最适生长温度时,有利于EPS的生物合成;2) 培养基在酸性环境下,接近于中性的初始pH值, EPS 合成量最大;3) 糖和盐的种类和含量对EPS有影响,不同乳酸菌要求不一样;4) 适当控制氮源有利于EPS的生物合成。

2 EPS的分离纯化

EPS的分离纯化的目的是分离浓缩发酵液得到稳定的、易使用的、容易再溶的多糖产品。它必须达到纯化产品、除去杂质,停止或破坏由酶或组分产生的颜色和异味的副反应。EPS的分离纯化一般包括分离、纯化和纯度鉴定三个步骤。

2.1 EPS的分离

乳酸菌EPS的分离常采用有机溶剂沉淀法。常用的溶剂有小分子醇类如甲醇、乙醇、异丙醇或丙酮,它们可降低多糖的溶解,有助于脱色及脱去无用的低分子量物质。异丙醇是FDA认可的适用于食品级多糖提取的最佳沉淀剂。异丙醇的最佳用量为45%~60%,在发酵液中加入KCl等盐类能中和多糖分子的表面电荷,促进其在醇溶剂中的沉淀,减少醇类的用量。低分子量醇类可满足大多数多糖的沉淀。乙醇的用量一般为提取液的2~3倍。为节约有机溶剂的用量,常对提取液减压浓缩后再进行沉淀。经有机溶剂沉淀获得的EPS中,还含有无机盐、有机溶剂等不溶的一些低分子量有机物、大分子蛋白质等杂质,所以分离所得物只能称为粗多糖。

2.2 EPS的纯化

纯化是指除去粗多糖中的杂质而获得单一多糖组分的过程。纯化首先是将多糖中的非多糖组分除去。一般的程序是先脱蛋白再除去其他小分子杂质。脱蛋白常用的方法有Sevag法和三氯三氯乙烷法。对于一些低分子量的杂质,如无机盐、脱蛋白残留剂、低聚糖等,常采用透析法、离子交换树脂法和凝胶过滤法将其除去。将多糖混合物中的目的单一组分分离出来,也就是常说的活性多糖的分级。常用的活性多糖的分级纯化方法有纤维素阴离子交换柱层析法、凝胶柱层析法和季铵盐沉淀法,其他用于多糖纯化的方法有分部沉淀法、盐析法、金属络合法、区带电泳法、亲和层析法以及超滤法等。

2.3 EPS的纯度鉴定

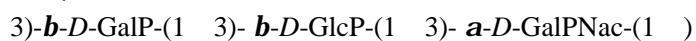
多糖的纯度只代表相似链长的多糖分子的平均分布。通常所谓的多糖纯品实际上是一定分子量范围的多糖的均一组分。目前常用于多糖纯度鉴定的方法有凝胶层析法、高压电泳法、超速离心法、旋光测定法和毛细管电泳法等。多糖纯度鉴定中应用最多的是凝胶层析法。凝胶层析得到一对称洗脱峰,则证明该多糖是均一组分,它的优点是准确度高。高压电泳法电泳结果显色后,如呈单一色斑,则表示该活性多糖为均一组分。高压电泳法鉴定多糖纯度早期用的较多,现在大多不再使用,原因是灵敏度不高。超速离心法是将多糖溶液进行密度梯度离心,待转速达到60 000 r/min以上后,间隔照相,如得到的结果是单一峰,则证明该活性多糖为均一组分。旋光鉴定法利用不同分子量的多糖在不同浓度低级醇中溶解度差别进行的,如果在不同浓度低级醇中得到的多糖的比旋光度相同,则证明多糖为均一组分。

3 EPS的结构与理化特性

3.1 乳酸菌EPS的结构及分子量

乳酸菌EPS中存在三种重要的结构单元:1) α -葡聚糖,主要是由 α -1,6和 α -1,3连接的葡聚糖残基,包括肠膜明串珠菌、链球菌突变株产生的低分子右旋糖酐;2) 果聚糖,主要由 β -2,6键连接的果糖分子,如唾液链球菌产生的果聚糖;3) 四聚糖,一般由 β -1,3键连接,由嗜热菌(乳酸乳球菌乳酸亚种、乳酸乳球菌乳脂亚种、嗜热链球菌)和嗜温菌(德氏乳杆菌亚种、瑞士乳杆菌)。

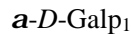
1989~1990年,第一次报导了嗜热链球菌EPS的结构,它由D-半乳糖、D-葡萄糖和2-乙酰胺基-2-脱氧-D-半乳糖以摩尔比2:1:1组成,其重复的四糖单元为



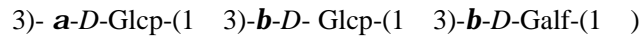
6



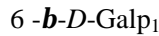
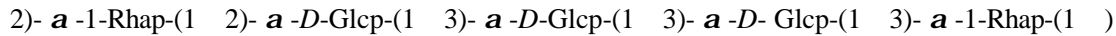
嗜热链球菌SFi39和SFi12产生的胞外多糖的分子量都大于 2×10^6 Da, SFi39产生的EPS包括D-葡萄糖和D-半乳糖,其摩尔比为1:1,结构为:



6



SFi12产生的胞外多糖由D-半乳糖、L-鼠李糖、D-葡萄糖组成,其摩尔比为3:2:1,其结构为:



德氏乳杆菌保加利亚亚种产生的EPS分子量约为 5×10^6 Da,包括半乳糖、葡糖糖、鼠李糖,其摩尔比为4:4:1,它还含有乙酸盐、硫酸盐、磷酸盐,黏度为407 dl/g;乳酸乳杆菌乳脂亚种产生的EPS分子量为 1.7×10^6 Da,糖类组成为鼠李糖、葡萄糖、半乳糖其摩尔比为1:1.45:1.75;保加利亚乳杆菌产生的EPS分子量为 5×10^5 Da;干酪乳杆菌CG11产生的EPS葡萄糖为75%,鼠李糖为15%;清酒乳杆菌EPS分子量为 6×10^6 Da,葡萄糖和鼠李糖的摩尔比为3:2,带有负电基团;乳酸乳球菌产生的EPS中重复单元为葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、磷酸盐,其摩尔比为2:1:2:1。

3.2 EPS的抗肿瘤活性^[4,8,9]

结构决定功能,但目前有关结构和功能之间的关系资料还不是太多,从有限的资料中可以得出:一级结构是**b**-(1 2)连接的葡聚糖、甘露聚糖、半乳聚糖,它们大都有一定的抑制肿瘤的活性;**b**-(1 3)葡聚糖、半乳聚糖有较明显抑制肿瘤的活性,有人经¹³C核磁共振分析推断,认为是**b**-(1 3)多糖链骨架上的多羟基基团对抗肿瘤活性起了重要作用;**b**-(1 3)为主链的葡聚糖如有(1 6)支链的,有的有抑制肿瘤活性,有的没有抑制肿瘤活性。近年来的一些研究表明,含乙酰化的(1 6)-**b**-D葡聚糖,有抗肿瘤活性,如果除去乙酰基,就丧失了抗肿瘤活性;D-葡聚糖残基的**b**-构型,由于具有螺旋结构,对于抑制肉瘤180是必需的,它们大都具有三股螺旋构象。(1 3)-**b**-D葡聚糖骨架上的多羟基基团,对抗肿瘤活性起重要作用。乳酸菌胞外多糖的抗肿瘤活性是通过增强和恢复免疫功能、影响血液供应、刺激一种器官或组织(如肾上腺和网状内皮系统)再分泌一种物质作用于肿瘤细胞以及中和细胞表面的负电荷来实现的,乳酸菌EPS对肿瘤的抑制作用举例如表2所示。

表2 乳酸菌EPS对肉瘤180(腹水)的抑制作用

乳 酸 菌	总饲喂量/ mg·kg ⁻¹	中间存活/ d	生命延长/ (%)	60天鼠存活比例
长双歧杆菌	40.50	34	283.30	2/7
德氏乳杆菌保加利亚亚种	56.25	760	7 166.00	5/7
瑞士乳杆菌约古特亚种	40.00	760	7 333.00	1/7
短乳杆菌	11.30	22	1 833.00	1/7

4 EPS的应用

目前,多糖已广泛应用于工农业生产的许多方面。由于国内外对乳酸菌EPS的研究还很不够,因此其应用报道还很少。但有几种EPS已广泛应用于生物技术产品,同时更多EPS还处于研究开发中。与植物多糖相比微生物多糖有独特的和优良的物理特性,如在低浓度下,能增大粘滞性,而不形成凝胶;微小的切变力,能很快增大流动性,并降低粘滞性,只要切变力消除,可迅速恢复原效应。由葡聚糖明串珠菌产生的葡聚糖可作为色谱柱材料、大分子改性剂等;右旋糖酐主要用作血浆代用品。但大多数乳酸菌EPS生产成本相当高,因此还不可能在工业上应用,就目前来看,乳酸菌EPS仍主要用于改善发酵乳制品和干酪品质。EPS的一些潜在应用如表3所示。

表3 乳酸菌EPS潜在应用举例

特性		应用
生物特性		抗肿瘤、眼和关节外科、肝素类似物、创伤敷料、血浆代用品
化学特性		酶底物
物理特性	乳化稳定性	食品、化妆品
	粘液形成	可食性食品膜
	絮凝剂	水的净化
	泡沫稳定剂	啤酒、灭火液
	胶凝剂	细胞和酶技术、食品、油的保护
	水合剂	化妆品、药品、发酵乳、干酪
	冰晶形成剂	冷冻食品、喉片、糖浆
	剪切力和粘度控制	石油、喷印、发酵乳
悬浮剂		食品、造纸、农业化学杀虫剂、含乳饮料

5 结 论

1) EPS结构与功能的关系问题,仍是今后研究的重点。由于多糖结构复杂,多糖结构与功能中的机理还不完全清楚。怎样的结构才具有免疫和抗肿瘤特性,多糖表现出来的良好物理、化学特性与结构关系如何,都是研究的重点。

2) 提高EPS产量。只有获得足够的EPS才能进行后序研究,也才有可能广泛应用于食品、化工和医药领域。目前应致力于EPS合成机制的研究,了解EPS合成受哪些基因控制,为构建高产菌株打下基础。

3) EPS工业是微生物发酵生产中较新的领域,由于高粘度的特性,在设备、发酵工艺、产物提取等方面有其特殊性,需要微生物学、化学、发酵工艺学、化学工程等各个学科工作者的协作,进一步提高发酵水平和产品质量,并开发新的胞外多糖产品及扩大产品的应用范围。

参 考 文 献

- [1] Pham P L, Dupont I. Production of exopolysaccharide by lactobacillus rhamnosus R and analysis of its enzymicdegradation during prolonged fermentation[J]. Appl.Environ.Microbiol, 2000, 66(6): 2 302-2 309
- [2] 金世琳. 乳酸菌的科学与技术[J]. 中国乳品工业, 1998, 20(2): 14-16
- [3] 杨洁彬, 郭兴华. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 1-3
- [4] 尤 新. 功能性发酵制品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000
- [5] Petronelca J. Regulation of exopolysaccharide production by lactococcus lactis subsp.cremoris bu the suger source[J]. ApplEnviron.Microbiol, 1999, 65(11): 5 003-5 008
- [6] 顾瑞霞. 唾液链球菌嗜热亚种LCX2001胞外多糖合成条件的研究[J]. 食品科学, 2000, 8: 18-22
- [7] 张 明, 陆杨森. 假单胞菌胞外多糖发酵条件的研究[J]. 生物学杂志, 1996, (5): 20-22
- [8] 顾瑞霞. 乳酸菌胞外多糖的研究进展[J]. 中国乳品工业, 1999, 2: 43-46
- [9] 顾瑞霞. 乳与乳制品的生理功能特性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000

编 辑 漆 蓉