

干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖提取工艺研究

刘翠平¹, 叶 蕾², 吴正钧¹, 王荫榆¹, 郭本恒^{1,2}

(1. 光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200072; 2. 上海水产大学 食品学院, 上海 200090)

摘要: 对影响干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖提取的主要工艺参数进行了研究。发酵液经超滤浓缩, 三氯乙酸脱蛋白, 乙醇沉淀等处理, 得到粗多糖。单因素和正交试验结果表明, 用截留分子量为 10 kDa 的超滤膜将发酵上清液浓缩 4 倍后, 用终浓度 6 % 的三氯乙酸脱蛋白, 再用 5 倍体积 95 % 乙醇 4 沉淀 24 h, 多糖提取效果较佳。在此条件下, 蛋白脱除率可达 88.35 %, EPS 提取率可达 92.17 %。

关键词: 干酪乳杆菌; 胞外多糖; 提取

中图分类号: TS24 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 7091(2008)增刊 - 0118 - 04

Optimization of Preparation Procedures for Exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W

LIU Cui-ping¹, YE Lei², WU Zheng-jun¹, WANG Yin-yu¹, GUO Ben-heng^{1,2}

(1. Technical Center of Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200072, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The parameters involved in preparation of exopolysaccharides (EPS) from *Lactobacillus casei* LC2W were studied. Supernatant fermented MRS broth by *Lb. casei* LC2W containing EPS was firstly concentrated by ultrafiltration, then proteins in the retentate were eliminated by addition of trichloroacetic acid, and finally exopolysaccharides were precipitated by alcohol. Results of single factor test and orthogonal experiments showed the optimized EPS preparation procedure was as the following: the supernatant of cultured MRS broth was firstly ultrafiltered to 1/4 of original volume by using MWCO of 10 kDa membrane, the proteins in the retentate was eliminated by TCA at an ultimate concentration of 6 % (m/V), and finally 5 volumes of 95 % ethanol alcohol of the retentate were added and the EPS was allowed to precipitate at 4 °C for 24 h. During this procedure, 88.35 % of the proteins was eliminated and the EPS recovery rate was reached to 92.17 %.

Key words: *Lactobacillus casei*; Exopolysaccharide; Preparation

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 是一类能利用碳水化合物并产生大量乳酸的细菌, 胞外多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 即是这类细菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的黏多糖或荚膜多糖。大量研究表明, 乳酸菌胞外多糖不仅可以用做增稠剂、凝胶剂和稳定剂, 对人体健康也有促进作用, 如: 降低胆固醇, 抗癌, 抗溃疡, 改善肠道微生态环境, 增强人体免疫力或作为益生元等^[1-3]。

在研究乳酸菌多糖的功能和结构的过程中, 首先接触的就是 EPS 的制备。采用不同的提取工艺,

对发酵液中所制备的乳酸菌胞外多糖的提取率、蛋白含量均有重大的影响。本试验对影响干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖提取的主要工艺参数进行了优化, 从而确定干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖提取的有效手段, 为后续分离纯化, 研究其功能特性以及结构分析提供部分技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

干酪乳杆菌 LC2W (*Lactobacillus casei* CGMCC

收稿日期: 2008 - 08 - 06

基金项目: 上海市农业攻关重点项目 (沪农科攻字 (2004) 6 - 1 - 1)

作者简介: 刘翠平 (1979 -), 女, 山东济宁人, 硕士, 主要从事食品生物技术的研发。

通讯作者: 郭本恒 (1963 -), 男, 山东潍坊人, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究。

NO.0828):由光明乳业股份有限公司技术中心提供,采用添加 15 % (V/V) 甘油的 MRS 肉汤于 - 84 保存,经过 MRS 肉汤活化 2 次后使用。

葡萄糖、柠檬酸氢二铵、K₂HPO₄、Tween-80、MgSO₄·7H₂O、乙酸钠、苯酚、浓硫酸、三氯乙酸、95 % 乙醇等均为分析纯,酵母提取物、牛肉浸出粉、酪蛋白胨为生化试剂。

种子培养基:MRS 肉汤(Merck 公司,德国);

发酵用培养基:配方见文献[4]。

高速冷冻离心机(J-30I,Beckman Coulter Co Ltd.),透析袋(华美生物工程公司),数显恒温搅拌循环水箱 HH-60(常州国华电器有限公司),5 L 发酵罐(Bio G- Micron Korea),超滤装置(德国 Sartorius)。

1.2 试验方法

1.2.1 胞外多糖测定方法 苯酚 - 硫酸法^[5],以葡萄糖为标准。

1.2.2 蛋白质含量测定 溶液中蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[6],以牛血清蛋白为标准。

1.3 干酪乳杆菌 LC2W EPS 的提取

1.3.1 超滤浓缩倍数的选择 用截留分子量为 10 kDa 的超滤膜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 %乙醇 4 沉淀 24 h 后,12 000 ×g 离心 15 min,取沉淀,去离子水热溶解后离心(15 min,12 000 ×g,4),取上清液,置透析袋(截留分子量 12 000 ~ 14 000 Da)内去离子水透析 3 d,每 8 h 换水 1 次,苯酚-硫酸测定 EPS 的含量计算提取率。

超滤浓缩多糖提取率 A (%) =

$$\frac{\text{沉淀粗多糖质量}}{\text{原发酵液体积} \times \text{发酵液多糖含量}} \times 100 \%$$

1.3.2 三氯乙酸终浓度的选择 在超滤浓缩发酵液中加入 80 %三氯乙酸至终浓度含量为 2 %,4 %,6 %,8 %,10 %,4 放置 12 h,离心去沉淀,等体积定容测定蛋白含量,计算蛋白脱除率。

蛋白脱除率 (%) =

$$\frac{\text{超滤浓缩液中蛋白含量} - \text{离心上清液中蛋白含量}}{\text{超滤浓缩液中蛋白含量}} \times 100 \%$$

1.3.3 乙醇沉淀法提取胞外多糖的正交试验 正交试验设计具有优良的均衡分散性和整齐可比性,设计的试验点具有强烈的代表性,往往能以较少的试验次数,分析出各因素的主次顺序以及对试验指示的影响规律,筛选出满意的结果,从而提高了试验的效率和分析质量^[7]。

以乙醇浓度(V/V)、沉淀温度、沉淀时间为影响因素,以 EPS 提取率为指标,设计 L₉(3⁴) 正交试验,确定乙醇沉淀法最适提取条件,试验因素水平见表

1.将不同浓度乙醇在不同温度和时间沉淀的超滤浓缩发酵液离心(15 min,12 000 ×g,4),取沉淀,等体积去离子水热溶解,离心(15 min,12 000 ×g,4),取上清液,置透析袋(截留分子量 12 000 ~ 14 000 Da)内去离子水透析 3 d,每 8 h 换水一次,苯酚-硫酸测定多糖含量与超滤浓缩液中多糖含量相比计算 EPS 提取率。

$$\text{乙醇沉淀多糖提取率 } B (\%) = \frac{\text{粗多糖含量}}{\text{超滤浓缩液中多糖含量}} \times 100 \%$$

表 1 L₉(3⁴) 正交试验因素水平

水平 Levels	因素 Factors		
	乙醇浓度/ (V/V) Ethanol concentration A	沉淀温度/ Precipitate temperature B	沉淀时间/ h Precipitate time D
1	3	4	16
2	4	25	20
3	5	37	24

2 结果与分析

2.1 超滤浓缩倍数的选择

粗多糖发酵提取液浓缩一般采用超滤浓缩或旋转蒸发浓缩,采用超滤浓缩过程中还可以去除部分色素、单糖和小分子的蛋白。而旋转蒸发浓缩则只是单纯起到一种浓缩作用,色素、单糖和小分子蛋白质也一起随发酵液浓缩,为粗多糖的提取增加了难度和工作量,另外浓缩时采用的温度对多糖的活性和结构也会有一些负面影响,因此选用超滤浓缩更为经济有效。

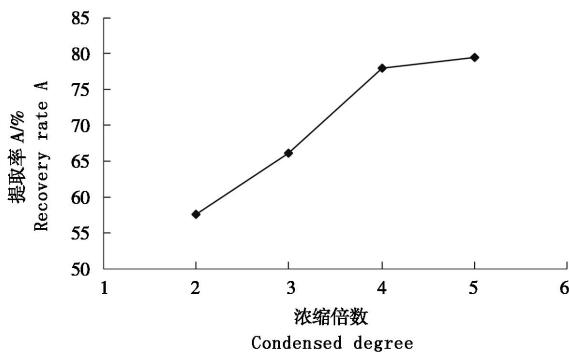


图 1 超滤浓缩倍数对 EPS 提取率的影响

Fig.1 Effect of condensed degree on the recovery rate of EPS

由图 1 可以看出,EPS 的提取率会随着浓缩倍数的提高而增加,浓缩倍数由 2 或 3 倍提高到 4 倍时 EPS 的提取率明显增加,而由 4 倍提高到 5 倍 EPS 的提取率却增加不大。这是由于在加入乙醇沉淀时,随着溶液中多糖含量的增加,多糖更容易聚集

成较大的颗粒,从而使 EPS 沉淀颗粒增大,并随离心而沉淀下来。而且,浓缩后可使乙醇的使用量大大减少,离心次数减少,可以降低成本,节约能耗。但是浓缩倍数越高,沉淀物中的色素以及杂质也会增多,综合考虑,选择将发酵上清液浓缩到原来的 1/4,即浓缩 4 倍。

2.2 三氯乙酸终浓度的选择

由图 2 可以看出,随着三氯乙酸浓度的增加,蛋白的脱除率增加,当三氯乙酸终浓度达 6 % 以上时,效果增加不再显著,而且,高浓度的三氯乙酸可能会导致多糖的降解,造成多糖损失,所以选择终浓度 6 %

的三氯乙酸脱蛋白,蛋白脱除率可达 88.35 %。

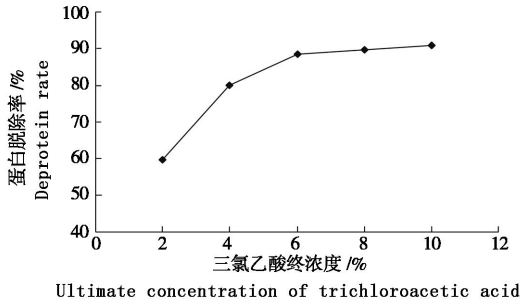


图 2 三氯乙酸终浓度的选择
Fig.2 Effect of deprotein by different ultimate concentration trichloroacetic acid

表 2 L₉(3⁴) 正交试验设计及实在验结果
Tab.2 L₉(3⁴) orthogonal experimental design and results

试验号 No.	因素 Factors				EPS 提取率/ % Recovery rate
	A 浓度/ (V/ V) Concentration	B 沉淀温度/ Temperature	C 空列	D 沉淀时间/h Time	
1	1	1	1	1	69.879
2	1	2	2	2	72.929
3	1	3	3	3	62.530
4	2	1	2	3	85.616
5	2	2	3	1	76.118
6	2	3	1	2	70.572
7	3	1	3	2	91.855
8	3	2	1	3	87.557
9	3	3	2	1	76.811
K ₁	68.446	82.450	75.471	74.269	-
K ₂	77.435	78.868	77.944	78.452	-
K ₃	85.408	69.971	76.465	78.568	-
R	16.962	12.479	2.473	4.299	-

2.3 乙醇沉淀法提取胞外多糖的正交试验结果

由表 2 及图 3 可以看出,影响 EPS 提取率的因素主次顺序为 A > B > D,乙醇浓度和沉淀温度是影响 EPS 提取率的重要因素,各因素的最佳水平组合为 A₃B₁D₃,即 5 倍体积 95 %乙醇,4 沉淀 24 h。

2.4 正交试验方差分析

从表 3 可以看出,乙醇浓度和沉淀温度两因素的影响显著,与直观分析结果相符。

2.5 验证试验及结果

根据正交试验确定的乙醇沉淀最佳提取工艺参数进行试验,浓缩发酵液中 5 倍体积 95 %乙醇,4

沉淀 24 h,对优化结果进行验证,在此条件下,多糖提取率可达 92.17 %。

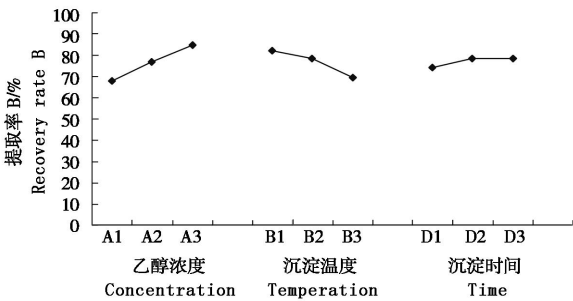


图 3 正交试验趋势图
Fig.3 Tendancy of each level in orthogonal experiment

表 3 L₉(3⁴) 正交试验方差分析

因素 Factors	偏差平方和 Square of deviance	自由度 Degree of freedom	F	F(0.05)	显著性 p
A	423.750	2	45.618	19.000	*
B	241.582	2	26.007	19.000	*
D	27.514	2	2.962	19.000	-
误差	9.29	2	-	-	-

注: * .表示差异显著 ,p < 0.05。
Note: * . Indicated significant difference at p < 0.05.

3 结论

通过试验确定了干酪乳杆菌 LC2W 发酵产胞外多糖的提取条件：用截留分子量为 10 kDa 的超滤膜将发酵上清液浓缩至原体积的 1/4，即浓缩 4 倍，能够获得较好的多糖提取率，浓缩过程中还可以去除大部分色素、单糖和小分子的蛋白。选择终浓度 6 % 的三氯乙酸脱蛋白，蛋白脱除率可达 88.35 %。乙醇沉淀提取胞外多糖的最佳条件为 4 沉淀 24 h，5 倍体积 95 % 乙醇，乙醇浓度和沉淀温度两因素的影响显著，EPS 提取率最高可达 92.17 %。

参考文献：

- [1] 侯爱香,周传云. 乳酸菌胞外多糖的研究进展[J]. 现代食品科技,2006,22(2):282-284.
- [2] Patricia Ruas-Madiedo, Jeroen Hugenholtz, Pieterneela Zoon.

An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2002,12:163-171.

- [3] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京:化学工业出版社,2004:27-29.
- [4] 刘翠平,郭本恒,吴正钧,等. 营养因子对干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖合成的影响[J]. 工业微生物,2008,38(2):11-14.
- [5] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry,1956,28:350-356.
- [6] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976(72):248-254.
- [7] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002.

www.cnki.net