

• 论 著 •

乳酸菌胞外多糖产生菌的 筛选与初步研究

李嘉文¹, 刘达¹, 刘党生¹, 王昆², 谢明蓉²

1. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016;

2. 成都绽妍生物技术有限公司, 四川 成都 610041

摘要:目的 从牧区传统乳制品中分离获得胞外多糖产量较高的菌株, 并对胞外多糖的结构和功效进行初步研究, 以期能为将来生产乳酸菌胞外多糖的可行性提供数据和依据。方法 通过涂布平板法从内蒙古传统发酵乳制品中分离乳酸菌, 并测定胞外多糖产出量, 从中筛选胞外多糖高产菌株, 通过生理生化试验和 16S rRNA 测序鉴定菌株。采用紫外光谱法和高效液相色谱法对胞外多糖的结构进行初步分析。通过测定胞外多糖的吸湿能力和保湿能力初步评价其吸湿保湿性能。结果 共分离出 90 株菌株, 筛选出 1 株胞外多糖高产菌株, 并鉴定出该菌株为嗜热链球菌。通过分析得出该菌株产生的胞外多糖主要由 4 种单糖组成, 分别为甘露糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖, 其摩尔比为 0.25 : 3.10 : 3.70 : 0.10, 分子量范围为 $1.897 \times 10^6 \sim 7.257 \times 10^6$ Da。通过保湿性能的测定, 初步确定该嗜热链球菌产生的胞外多糖有良好的保湿性。结论 本实验筛选出的胞外多糖高产菌株嗜热链球菌属于益生菌, 有广泛的应用价值。

关键词: 乳酸菌; 胞外多糖; 保湿

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1005-376X (2019) 09-1027-07

DOI 编码: 10.13381/j.cnki.cjm.201909007

Screening of and preliminary research on exopolysaccharides producing strain

LI Jiawen*, LIU Da, LIU Dangsheng, WANG Kun, XIE Mingrong

* School of Life Science and Bio-pharmaceutics,

Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016, China

Corresponding author: LIU Dangsheng, E-mail: 320shiyanshi@sina.com

Abstract: Objective To isolate strains with high exopolysaccharides yield from traditional dairy products in pastoral areas, and study the structure and efficacy of exopolysaccharides, so as to provide data and basis for the feasibility of producing lactobacillus exopolysaccharides in the future. **Methods** Lactic acid bacteria were isolated from traditional fermented milk from Inner Mongolia using spread plate technique. High-yield exopolysaccharides-producing strains were screened by comparing the yield of exopolysaccharides of each strain, and identified using biochemical tests and 16S rRNA sequencing. Then the elementary structure of the exopolysaccharides was determined with ultraviolet spectroscopy and high performance liquid chromatography. The moisturizing property of the exopolysaccharides was evaluated by testing their properties of moisture absorption and moisture retention. **Results** Ninety strains were isolated in total and a strain with high-yield of exopolysaccharides was selected. The strain was identified as *Streptococcus thermophilus* afterwards. The exopolysaccharides it produced were mainly composed of mannose, glucose, galactose and arabinose, with a molar ratio of 0.25 : 3.10 : 3.70 : 0.10, and a molecular weight range from 1.897×10^6 to 7.257×10^6 Da. Meanwhile, the exopolysaccharides had good moisturizing performance, similar to that of sodium hyaluronate. **Conclusion** *Streptococcus thermophilus*, a strain with high-yield exopolysaccharides-producing ability screened in this study, is a probiotics and has wide application value.

Key words: Lactic acid bacteria; Exopolysaccharides; Moisture

作者简介: 李嘉文 (1992-), 女, 硕士, E-mail: carmenlee1992@outlook.com

通信作者: 刘党生 (1961-), 男, 博士, 硕士生导师, E-mail: 320shiyanshi@sina.com

乳酸菌胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS) 是乳酸菌生长代谢过程中分泌到细胞外的多糖类化合物, 属于微生物多糖的一种。其被广泛研究的原因是基于两个方面, 其一是 EPS 的物理化学特性, EPS 作为食品添加剂添加到食品中、或在发酵食品中由乳酸菌直接发酵产生, 都可以改善食品的流变性、质构、稳定性、持水性和口感等; 其二是 EPS 的生物活性, EPS 具有很多对人体健康有利的生物活性物质, 如作为益生元调节肠道菌群、免疫调节活性、抗肿瘤活性、降低胆固醇活性和抗氧化等^[1]。产 EPS 的乳酸菌来源广泛, 绝大部分来源于乳制品, 如酸奶、奶酪和 Kefir 制品等, 还有一些来源于发酵肉制品和蔬菜。目前已经报道的产 EPS 的乳酸菌有嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、乳酸乳球菌、瑞士乳杆菌和明串珠菌等^[2]。内蒙古牧区的传统乳制品具有悠久的历史食用历史和益生性, 故本研究拟从牧区传统乳制品中分离获得胞外多糖产量较高的菌株, 并对胞外多糖的结构和功效进行初步研究, 以期能为将来生产乳酸菌胞外多糖的可行性提供数据和依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

乳糖、葡萄糖、吐温-80、氢氧化钾、苯酚、蔗糖、麦芽糖 (天津市恒兴化学试剂制造有限公司); 蛋白胨、牛肉膏、肌醇 (北京奥博星生物技术有限公司); 大豆蛋白胨、酵母浸粉 (安琪酵母股份有限公司); 发酵专用多聚蛋白胨 (北京索莱宝科技有限公司); 抗坏血酸 (东北制药集团沈阳第一制药厂); 结晶硫酸镁、结晶乙酸钠、硫酸锰、柠檬酸三铵 (天津博迪化工股份有限公司); 磷酸氢二钾、过氧化氢 (西陇化工股份有限公司); 琼脂、D-山梨醇、丙三醇、冰乙酸、三氯乙酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 氯化钠、草酸铵、甲醇、乙酸异戊酯、三氯甲烷 (天津市大茂化学试剂厂); 结晶紫 (沈阳市第三十六中学化工厂); D-甘露糖 (默克公司); D-果糖 (天津光复精细化工研究所); D-半乳糖 (上海恒信化学试剂有限公司); D-(+)-棉子糖 (上海瑞永生物科技有限公司); L-(+)-阿拉伯糖 (Sigma 试剂); β-甘油磷酸二钠、海藻糖、马尿酸、D-纤维二糖、D-(一)-水杨苷、菊糖、甘露糖、D-核糖、枸橼酸铁 (上海源叶生物科技有限公司); D-木糖 (天津市化学试剂公司); 木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇 (山东福田药业有限公司); 脱脂奶粉 (新西兰纽瑞滋乳品公司); 浓硫酸、盐酸 (天津市凯信化学试剂); 1-苯基-3-甲基-5-吡

啉酮 (麦克林试剂); 葡聚糖分子量标准物质 (北京中科质检生物技术有限公司); 乙腈 (J&K SCIENTIFIC LTD)。

表 1 奶制品样品的采集信息

样品编号	样品类型	奶源	采集地点	采集时间
NMG1	稀酸奶	牛奶	内蒙古兴安盟	2017 年 2 月
NMG2	稠酸奶	牛奶	内蒙古兴安盟	2017 年 2 月
NMG3	奶豆腐	牛奶	内蒙古兴安盟	2017 年 2 月

1.2 实验设备

电热恒温水浴锅 DK-98-II 型 (天津市泰斯特仪器有限公司); 电热恒温培养箱 DH6000 II 型 (天津市泰斯特仪器有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9090A (上海精宏实验设备有限公司); 离心机 TDZ5-WS 型 (湘潭湘仪仪器有限公司); 超净工作台 SW-CJ-1C (苏州安泰空气技术有限公司); 冰箱 BCD-312 型 (青岛海尔股份有限公司); 灭菌锅 YX280A 型 (上海申安医疗器械有限公司); 电子显微镜 XSZ-H 型 (重庆光学仪器厂); 高效液相色谱仪 1100 (安捷伦科技有限公司); 紫外检测器 1260 (安捷伦科技有限公司); 多角度激光检测器 WEA-02 (Wyatt Technology); 示差折光检测器 (Waters Corporation), 高速微量离心机 LG15-W (北京医用离心机厂); 冷冻干燥机 FD-1A-50 (北京博医康仪器有限公司); 2XZ-2 型旋片式真空泵 (临海市谭氏真空设备有限公司)。

1.3 培养基与溶液配制^[3]

(1) M17 培养基: 乳糖 5.0 g、大豆蛋白胨 5.0 g、聚蛋白胨 5.0 g、牛肉膏 2.5 g、酵母浸粉 5.0 g、抗坏血酸 0.5 g、β-甘油磷酸二钠 19.0 g、1.0 mol/L MgSO₄ · 7H₂O 1.0 mL、琼脂 15.0 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, 调节 pH 至 7.1, 115 °C 灭菌 30 min。(2) MRS 培养基: 蛋白胨 10.0 g、酵母浸粉 5.0 g、牛肉膏 8.0 g、葡萄糖 20.0 g、硫酸锰 0.05 g、碳酸钙 10.0 g、乙酸钠 5.0 g、柠檬酸三铵 2.0 g、磷酸氢二钾 2.0 g、硫酸镁 0.2 g、吐温-80 1.0 g、琼脂 15.0 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, 调节 pH 至 6.2, 115 °C 灭菌 30 min。(3) MC 培养基: 大豆蛋白胨 5.0 g、牛肉膏 5.0 g、酵母浸粉 3.0 g、葡萄糖 20.0 g、乳糖 20.0 g、碳酸钙 10.0 g、1% 中性红溶液 5.0 mL、琼脂 15.0 g、加蒸馏水至 1 000 mL, 营养成分溶解后, 调节 pH 至 6.0 ± 0.2 后加入中性红溶液, 115 °C 高压灭菌 30 min。(4) 10% 脱脂奶还原乳发酵培养基: 脱脂奶粉 100 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, 115 °C 灭菌 15 min。(5) 糖发酵管: 牛肉膏 5.0 g、蛋白胨

5.0 g、酵母浸粉 5.0 g、吐温-80 0.5 mL、琼脂 1.5 g、1.6% 溴甲酚紫酒精溶液 1.4 mL，加蒸馏水至 1 000 mL，按 0.5% 加入所需糖类，并分装小试管，121 °C 高压灭菌 15~20 min。(6) 七叶苷培养基：蛋白胨 5.0 g、磷酸氢二钾 1.0 g、七叶苷 3.0 g、枸橼酸铁 0.5 g，加蒸馏水至 1 000 mL，将上述成分加入蒸馏水中，加热溶解，121 °C 高压灭菌 15~20 min。(7) 结晶紫染色液：结晶紫 1.0 g 用 20 mL 95% 乙醇溶解后，加入 1% 草酸铵水溶液 80 mL 混合均匀。

1.4 实验方法

1.4.1 样品中乳酸菌的分离方法^[4-5] 于无菌条件下称取一定样品至打碎装置（三角瓶中加入适量玻璃珠）中，加入 0.85% 的生理盐水，强烈震荡弄碎样品，混合均匀，用 0.85% 的生理盐水进行梯度稀释至适宜浓度，连续 3 个稀释度取 0.1 mL 稀释液进行涂布平板，从而分离样品中的乳酸菌。M17 培养基平板于 43 °C 中厌氧培养 48 h，用于分离奶制品中的链球菌属。MRS 培养基平板于 37 °C 中厌氧培养 48 h，用于分离奶制品中的乳杆菌属和乳球菌属。每个样品每种培养基挑取 15 个菌落，挑取出来的菌落分别保存于斜面和甘油管中，斜面于 4 °C 中保存，甘油管于 -20 °C 中保存，以便以后相关研究使用。

1.4.2 多糖高产菌株的筛选 将活化后的菌株接种于 10% 脱脂奶还原乳发酵培养基中，37 °C 厌氧培养 8 h，取出后沸水浴处理 20 min，2 810 × g 离心 15 min，取 1 mL 上清液，加入 5 倍体积的无水乙醇，4 °C 沉淀 12 h，2 810 × g 离心 15 min，弃去上清，加入 2 mL 无水乙醇洗涤沉淀 2 次，2 810 × g 离心 15 min，弃去上清，挥干乙醇，于 40 °C 烘箱中烘干，加水加热复溶，使用苯酚硫酸法测定多糖产量，比较各个菌株胞外多糖产量高低，选出胞外多糖产量相对较高的菌株。

1.4.3 菌株形态学鉴定 菌落形态：观察菌落在 MRS（厌氧培养）、M17（厌氧培养）和 MC（需氧培养）培养基上的菌落形态、颜色以及是否产生溶钙圈。镜下形态：挑取少量菌落制成涂片，干燥，固定，用结晶紫染色 1 min，流水冲去染料，干燥后于油镜下观察菌株形态。

1.4.4 菌株生理生化鉴定 触酶试验：从斜面上取适量菌体涂在干净无菌的玻璃板上，滴加 3% 过氧化氢溶液，观察是否产生气泡，产生气泡为接触酶阳性，无气泡产生为阴性。氢氧化钾拉丝试验：取 1 滴 4% 氢氧化钾溶液于洁净载玻片上，取新鲜菌落

少许，于氢氧化钾溶液混匀，并每隔几秒钟上提接种环，观察能否拉丝，拉黏丝者为革兰阴性菌，不拉黏丝者为革兰阳性菌。糖发酵试验：挑取 3 个或以上的单个菌落接种于糖发酵管中，置 37 °C ± 1 °C 厌氧培养，观察并记录糖发酵管中的颜色变化，若为紫色则不利用该种糖类，若变为黄色则利用该种糖类。

1.4.5 胞外多糖高产菌株分子生物学测定 将多糖高产菌株 NMG 115 进行纯化，由北京六合华大基因科技股份有限公司进行 16S rRNA 测序，将测序结果提交至数据库 EZBioCloud 网站 (<https://www.ezbiocloud.net/dashboard>) 进行序列对比。

1.4.6 苯酚硫酸法测定多糖含量^[6] 分别吸取葡萄糖标准溶液（40 μg/mL）0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 至刻度试管中，补水至 1.0 mL，然后加入 6% 苯酚 0.6 mL 及浓硫酸 3.0 mL，摇匀，80 °C 水浴加热 15 min，凉水冷却至室温，以零管为空白，于 490 nm 处测定吸光度值，绘制标准曲线或计算线性回归方程。取 1 mL 样液按上述步骤操作，测定吸光度值，代入线性回归方程中计算多糖含量。

1.4.7 胞外多糖的提取与纯化^[7] 发酵液沸水浴预处理 35 min，过滤，于冷冻干燥机中浓缩 10 h，加入无水乙醇调节酒精浓度至 80%，4 °C 沉淀过夜，2 810 × g 离心 30 min，沉淀用适量的无水乙醇清洗，2 810 × g 离心 30 min，取沉淀，挥干溶剂后 40 °C 烘干得粗品。胞外多糖粗品加水于 80 °C 溶解（1:10, w/v），2 810 g 离心 20 min，取上清液，边搅拌边加入 80% 三氯乙酸溶液，使三氯乙酸终浓度为 5%，4 °C 静置 30 min，2 810 × g 离心 20 min，取上清液，加入饱和 NaOH 调节 pH 至 6.0，并将溶液置于截留分子量为 7 000 Da 的透析袋中，用蒸馏水透析 24 h，每 8 h 换 1 次水，将透析后的多糖溶液置于直径 15 cm 的平皿中冷冻干燥得多糖精制品。

1.4.8 胞外多糖紫外光谱分析 将胞外多糖样品配制成 1 mg/mL 的溶液，取一定量于比色皿中，蒸馏水作为空白，在 190~400 nm 范围内进行扫描，观察其 260 nm 和 280 nm 处的吸收峰。

1.4.9 胞外多糖单糖组成分析 称取 15 mg 多糖精制品，精密称重，置 5 mL 安瓿瓶中，加入 1 mL 0.5 mol/L HCl，封口，120 °C（沙浴）水解 2 h。自然冷却后，打开安瓿瓶加入 2 mol/L NaOH 300 μL 调 pH 至中性。取 80 μL 标准品溶液和水解液分别置于 EP 管中，加入 160 μL 0.25 mol/L PMP（1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮）甲醇溶液，再加入 160 μL 0.2 mol/L NaOH，漩涡震荡 30 s，置于 70 °C 水浴

30 min。取出 EP 管，自然冷却，加入 160 μL 0.2 mol/L HCl 中和至中性，漩涡 30 s。加入 500 μL 乙酸异戊酯，漩涡 30 s，3 800 \times g 离心 5 min，弃上层有机液，重复此操作 1 次。加入 500 μL 氯仿，漩涡 30 s，3 800 \times g 离心 5 min，取水相层，重复此操作 1 次。取水相层，用 0.22 μm 有机滤膜过滤后注入高效液相色谱仪分析，以外标法计算多糖中单糖含量。HPLC 检测条件：色谱柱：固定相为十八烷基键合硅胶（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ；迪马）；流动相：0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液（CH₃COONa-NaOH，pH 6.66）：乙腈 = 83：17（v/v）；检测器：紫外检测器；检测波长：250 nm；柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：1 mL/min；进样量：5 μL 。

1.4.10 胞外多糖分子量和纯度的测定 称取多糖精制适量，配制为浓度 8 mg/mL 的多糖溶液，以葡聚糖分子量标准物质溶液为对照，用 0.22 μm 有机滤膜过滤后注入高效液相色谱仪分析。HPLC 检测条件：色谱柱：TSK-GEL G4000PWXL（7.8 mm \times 30 cm）多糖专用凝胶柱；保护柱：TSK gel Guard column pwxl；流动相：乙酸钠缓冲液（乙酸钠 3.74 g，加水溶解，加冰醋酸 6.9 mL 加水至 1 000 mL）；检测器：示差折光检测器，多角度激光检测器；柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；流速：0.6 mL/min；进样体积：50 μL 。

1.4.11 保湿性能的测定（1）吸湿率试验^[8]：取干燥的具塞扁形称量瓶（外径 50 mm，高为 15 mm），于试验前一天置于适宜的（25 \pm 1） $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥器（下部放置饱和碳酸钠或饱和硫酸铵溶液），精密称定质量 m_1 。取供试品适量，平铺于上述称量瓶中，供试品厚度约为 1 mm，精密称定质量 m_2 。将称量瓶敞口，连同瓶塞一起放置于相对湿度（RH）分别为 43%（饱和碳酸钠）和 81%（饱和硫酸铵）保干器中，并放入温度为（25 \pm 1） $^{\circ}\text{C}$ 放置一段时间（1、2、3、4 和 5 d）后，精密称定质量 m_3 。吸湿率 [Ra] = ($m_3 - m_2$) / ($m_2 - m_1$) \times 100%。（2）失水率试验^[9-10]：取干燥的具塞扁形称量瓶（外径 50 mm，高为 15 mm），于试验前一天置于适宜的（25 \pm 1） $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥器（下部放置饱和碳酸钠或饱和硫酸铵溶液）。准确称取一定质量的供试品，放入扁形称量瓶内，精密称定质量 m_1 。加入 10% 的水，精密称定质量 m_2 。将称量瓶敞口，连同瓶塞一起放置于温度为（25 \pm 1） $^{\circ}\text{C}$ ，RH 分别为 43%（饱和碳酸钠）的恒温恒湿干燥箱和以硅胶为干燥剂的干燥器内恒温放置一段时间（1、2、3、4 和 5 d）后，精密称定质量 m_3 。保湿率 [Rh] = ($m_3 - m_2$) / ($m_2 - m_1$) \times 100%。

2 结果

2.1 胞外多糖高产菌株的筛选 本实验从 3 份样品中一共分离出 90 株菌株，测定各个菌株的胞外多糖产量，选出胞外多糖产量相对较高的菌株。据文献报道，乳酸菌的胞外多糖的产量一般为 0.05~0.60 mg/mL^[11]。从表 2 可以得知，菌株 NMG 115 的多糖产量最高，为 1.46 mg/mL。该菌株是从 M17 培养基分离出来。将胞外多糖高产菌株 NMG 115 进行糖发酵能力测定，测定结果见表 3。通过糖发酵试验结果显示，该菌株能发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖和菊糖。

表 2 菌株多糖产量及其形态学、生理生化鉴定表

菌株编号	样品来源	培养基来源	镜检形态	革兰染色	触酶试验	多糖产量 (mg/mL)
NMG115	NMG1	M17	球状	+	-	1.46
NMG222	NMG2	MRS	杆状	+	-	0.75
NMG229	NMG2	MRS	杆状	+	+	0.53
NMG113	NMG1	M17	球状	+	-	0.49
NMG329	NMG3	MRS	杆状	+	-	0.47
NMG324	NMG3	MRS	杆状	+	-	0.33

注：表中只列出多糖产量高的菌株前 6 位。

表 3 菌株 NMG 115 主要糖类发酵结果

糖的种类	结果	糖的种类	结果
D-葡萄糖	+	D-(+)-棉子糖	-
蔗糖	+	L-(+)-阿拉伯糖	-
乳糖	+	海藻糖	-
麦芽糖	-	马尿酸	-
D-甘露醇	-	D-纤维二糖	-
肌醇	-	D-(-)-水杨苷	-
D-果糖	-	菊糖	+
D-半乳糖	-	甘露糖	-
D-核糖	-	赤藓糖醇	-
D-木糖	-	麦芽糖醇	-
木糖醇	-		

注：+代表阳性，-代表阴性。

2.2 胞外多糖高产菌株形态学鉴定 由图 2 的镜下形态可以看出菌株 NMG 115 为球形，并且成链状。图 2 为菌株 NMG 115 分别在 MRS、M17 和 MC 培养基上的菌落形态，该菌株在 MRS 培养基上为白色菌落，边缘整齐，能溶解 CaCO₃ 形成溶钙圈，说明该菌株有一定的产酸能力。在 M17 培养基上为白色菌落，边缘整齐。在 MC 培养基上为红色菌落，没有形成溶钙圈。

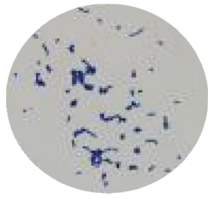


图 1 菌株 NMG 115 镜下形态 (10×100 倍)



图 2 菌株 NMG 115 培养基上菌落形态 (从左到右分别为 MRS、M17、MC 培养基)

2.3 胞外多糖高产菌株分子生物学测定 将菌株 NMG 115 测序所得的 16S rRNA 序列, 提交数据库 EZBioCloud 网站 (<https://www.ezbiocloud.net/dashboard>) 进行序列对比, 该菌株与 *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 相似度为 99.93%, 故确定菌株 NMG 115 为嗜热链球菌。

2.4 胞外多糖紫外光谱分析 常用的紫外光谱是指 200~400 nm 的紫外区光谱, 虽然对多糖结构分析用处不大, 但是多糖复合物常采用紫外光谱扫描的方法, 目的是观察多糖在 260 nm 或 280 nm 有无特征吸收峰出现, 从而判断多糖样品中是否含核酸或蛋白质。若无特征吸收峰, 则可以说明多糖样品中无核酸和蛋白质; 若有特征吸收峰, 则证明该样品中有蛋白质或核酸。由图 3 可知, 多糖精制品的紫外光谱中, 在 260 nm 和 280 nm 处无特征吸收, 说明样品中不含核酸和蛋白质。

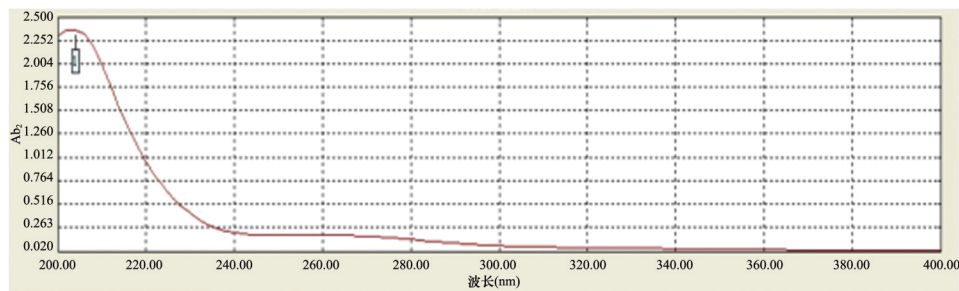


图 3 胞外多糖紫外光谱图

2.5 胞外多糖单糖组成分析 由图 4 可以得知, 嗜热链球菌胞外多糖主要由 4 种单糖组成, 分别为甘

露糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖, 通过计算其摩尔比为 0.25 : 3.10 : 3.70 : 0.10。

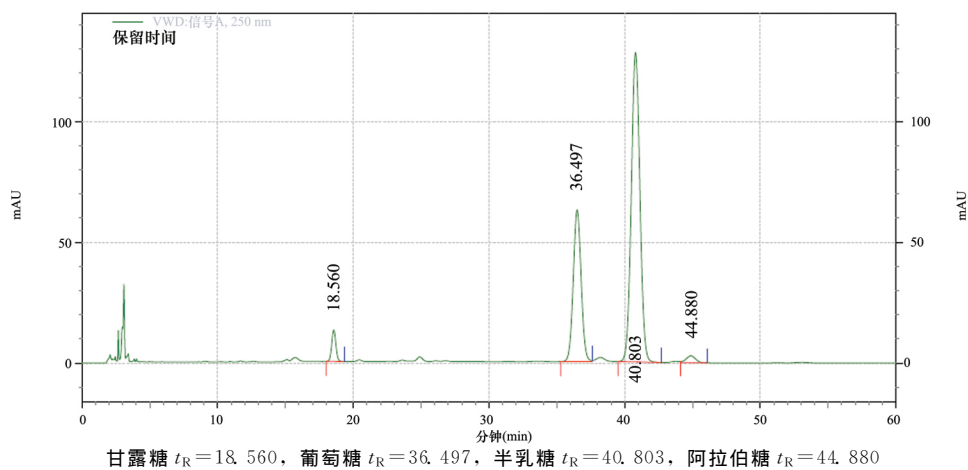


图 4 多糖样品单糖组成色谱图

2.6 胞外多糖分子量和纯度的测定 根据表 4 可知, 该胞外多糖由 3 种多糖组成, 分子量分别为

1.897×10^6 、 2.780×10^6 和 7.257×10^6 Da, 其分子量范围为 $1.897 \times 10^6 \sim 7.257 \times 10^6$ Da。

表 4 胞外多糖组成和分子量分析

重均分子量 [Mw (Da)]	数均分子量 [Mn (Da)]	多分散性指数 (Mw/Mn)
1. 897×10 ⁶	1. 893×10 ⁶	1. 0021
2. 780×10 ⁶	2. 699×10 ⁶	1. 0300
7. 257×10 ⁶	5. 989×10 ⁶	1. 2117

2.7 保湿性能的测定 本实验室所提取的胞外多糖为天然大分子，推测其应具有一定的保湿能力，故本实验拟通过模拟不同的条件，考察并评价该胞外多糖的保湿性能。

2.7.1 吸湿率试验 由图 5 可知，在温度 25℃、相对湿度 81% 条件下，各样品的吸湿率为甘油>透明质酸钠>胞外多糖。由图 6 可知，在温度 25℃、相对湿度 43% 条件下，各样品的吸湿率为甘油>透明质酸钠>胞外多糖。

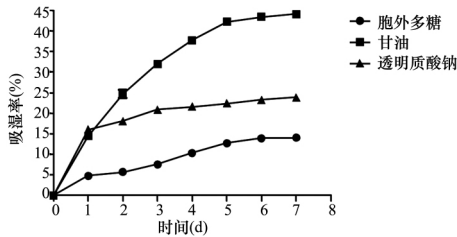


图 5 样品吸湿率时间变化图 (温度 25℃、相对湿度 81%)

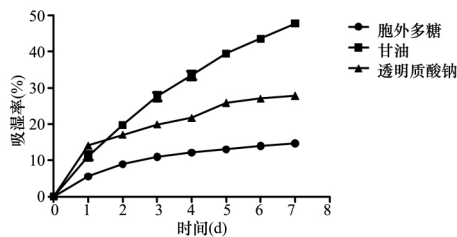


图 6 样品吸湿率时间变化图 (温度 25℃、相对湿度 43%)

2.7.2 保湿率试验 由图 7 可知，在温度 25℃、相对湿度 43% 条件下，各样品的保湿率为透明质酸钠>胞外多糖>甘油。由图 8 可知，在温度 25℃、硅胶为干燥剂的条件下，各样品的保湿率为透明质酸钠>胞外多糖>甘油。

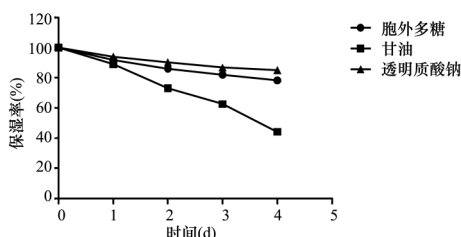


图 7 样品保湿率时间变化图 (温度 25℃、相对湿度 43%)

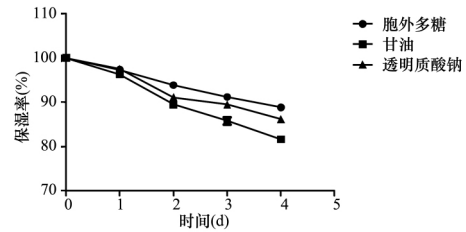


图 8 样品保湿率时间变化图 (温度 25℃、硅胶为干燥剂)

综上所述，胞外多糖有一定的吸湿性，但其吸湿性低于透明质酸钠和甘油，而保湿性明显优于甘油并且与透明质酸钠相近。

3 讨论

3.1 实验总结 本实验从内蒙古牧区自制酸奶中分离出 90 株菌，并从中筛选出 1 株胞外多糖高产菌株 NMG 115，其胞外多糖平均产量为 1.46 mg/mL，通过生理生化试验确定该菌株产酸，镜下形态为链球状，革兰染色阳性，触酶试验阴性，能产酸，能发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖和菊糖。通过 16S rRNA 测序，确定其为嗜热链球菌。该菌株产生的胞外多糖主要由 4 种单糖组成，分别为甘露糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖，其摩尔比为 0.25 : 3.10 : 3.70 : 0.10，胞外多糖的分子量范围为 1.897 × 10⁶ ~ 7.257 × 10⁶ Da。

保湿剂性能的评价主要通过两方面，一是吸收水分的能力 (吸湿能力)，二是保持水分的能力 (保湿能力)。本实验通过保湿性能的测定，其吸湿性低于透明质酸钠和甘油，而保湿性明显优于甘油，与透明质酸钠相近，初步确定该嗜热链球菌产生的胞外多糖具有良好的保湿性能。

3.2 应用展望 保湿材料广泛用于食品、化妆品和制药等行业。传统的保湿剂如甘油、丙二醇等具有良好的吸湿能力，但其保湿能力相对较差。新型的保湿剂具有良好的保湿能力，主要为亲水性的天然高分子材料。目前应用的天然高分子保湿材料的来源主要有三种：一是动物来源，如透明质酸 (动物提取) 和壳聚糖，存在来源和制备工艺复杂、稳定性差、易携带病毒等问题；二是植物来源，如阿拉伯胶、葡甘聚糖等，存在来源有限和受季节影响等问题；三是微生物发酵来源，如葡聚糖、透明质酸 (某些链球菌发酵)、γ-聚谷氨酸等，拥有易于实现工业化生产和质量可控等优点。所以微生物发酵产品是未来发展的趋势。本实验筛选出的胞外多糖高产菌株嗜热链球菌属于益生菌，遗传背景清晰，为公认的可食用的安全性菌株，广泛应用于乳制品行

业, 相信其在商业化应用有广阔的前景。

根据查阅的资料所得, 目前胞外多糖的应用研究主要集中于化妆品保湿材料、天然食品添加剂(稳定和增稠作用)和膳食益生元这三个方面。除此之外, 也有文献报道, 部分多糖具有抑菌活性、抗炎活性、抗氧化活性和免疫调节作用等^[12-16]。故笔者认为, 由于本研究得到的多糖仍属于不同分子量范围的多糖混合物, 也并未对多糖的结构进行准确的解析, 后续应该对分离所得的胞外多糖进行分离纯化, 对不同分子量范围的多糖进行结构确认、理化性质测定, 以及功效研究。同时, 对多糖的发酵、分离提取工艺尚需进一步优化完善, 提高多糖收率, 以适应工业化生产。

参考文献

- [1] YANG Yong, LIU Huiping. Process in lactic acid bacteria exopolysaccharides research[J]. China Dairy Industry, 2006, 34(10): 55-58. (in Chinese)
杨勇, 刘会平. 乳酸菌胞外多糖的研究进展 [J]. 中国乳品工业, 2006, 34(10): 55-58.
- [2] GUO Benheng, LIU Zhenmin. Probiotics[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 189. (in Chinese)
郭本恒, 刘振民, 等. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 189.
- [3] GB 4789. 35—2016. 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会和国家食品药品监督管理局, 2016.
- [4] 徐威. 微生物学实验[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 101-103.
- [5] 郭兴华, 凌代文. 乳酸细菌现代研究实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 51-76.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 浙江: 浙江大学出版社, 1999: 11.
- [7] 张宇. 中药多糖提取分离鉴定技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 99-100.
- [8] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 2015 年版第四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 378-379.
- [9] 曹高. 化妆品功效评价实验[M]. 北京: 科学出版社, 2017: 41.
- [10] Li YP, Zhang GL, Du CY, et al. Characterization of high yield exopolysaccharide produced by *Phyllobacterium* sp. 921F exhibiting moisture preserving properties[J]. Int J Biolog Macromol, 2017, 101(1): 562-568.
- [11] 霍贵成. 乳酸菌的研究与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 49.
- [12] Srikanth R, Siddartha G, Sundhar Reddy CH, et al. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526 and its statistical optimization[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 123(1): 8-16.
- [13] Liang TW, Wu CC, Cheng WT, et al. Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU 029[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(2): 933-950.
- [14] Roca C, Alves VD, Freitas F, et al. Exopolysaccharides enriched in rare sugars: Bacterial sources, production, and applications[J]. Front Microbiol, 2015, 6(1): 1-7.
- [15] Nwodo UU, Green E, Okoh AI. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11): 14002-14015.
- [16] Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities [J]. Marine Drugs, 2010, 8(6): 1779-1802.
- 收稿日期: 2019-03-16 修回日期: 2019-04-27 本文编辑: 李兵
- *****
- (上接第 1026 页)
- [16] FU Jinjian, ZHANG Yu, LI Honghui. Important roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder[J]. Chin J Child Health Care, 2017, 25(3): 255-257. (in Chinese)
傅锦坚, 张玉, 李红辉. 孤独症与肠道菌群失衡的研究进展 [J]. 中国儿童保健杂志, 2017, 25(3): 255-257.
- [17] CHI Zhaochun. Ecological imbalance of intestinal flora and irritable bowel syndrome[J]. Chin J Gastroenterol, 2015, 20(3): 188-190. (in Chinese)
池肇春. 肠道菌群生态失衡与肠易激综合征[J]. 胃肠病学, 2015, 20(3): 188-190.
- [18] Horie M, Miura T, Hirakata S, et al. Comparative analysis of the intestinal flora in type 2 diabetes and nondiabetic mice[J]. Exp Anim, 2017, 66(4): 405-416.
- [19] FANG Daiqiong, GU Silan, SHI Ding, et al. Relationships between human gut microbiota and occurrence and development of diseases and the mechanisms: research progress[J]. Chin J Microecol, 2016, 28(5): 614-617. (in Chinese)
方戴琼, 顾思岚, 石鼎, 等. 人体肠道微生态与疾病发生发展的关系及机制研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2016, 28(5): 614-617.
- [20] YANG Lanping, ZHENG Liyong, RAO Yu, et al. Research progress of active components, health function and development of sea cucumber viscera[J]. J Food Safety & Quality, 2018, 9(10): 2426-2432. (in Chinese)
杨兰苹, 郑立勇, 饶煜, 等. 海参内脏的活性成分、保健功能与开发研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2426-2432.
- [21] 冯巧巧, 谢纪珍, 樊红延, 等. 低分子量海参多糖胶囊对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 卫生研究, 2018, 47(1): 146-147.
- 收稿日期: 2019-04-04 修回日期: 2019-05-15 本文编辑: 李兵