

嗜热链球菌在传代培养中产胞外多糖的稳定性分析

Analysis on stability of producing exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* during multiplication

鲍志宁¹ 吴锦羽² 林伟锋² 陈中²

BAO Zhi-ning¹ WU Jin-yu² LIN Wei-feng² CHEN Zhong²

(1. 广州市微生物研究所, 广东 广州 510663; 2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510641)

(1. Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663, China; 2. Institute of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China)

摘要:为探究 3 株嗜热链球菌 ST-5P、ST-7P、ST-134P 产胞外多糖(EPS)的稳定性,将其分别接种到胞外多糖选择性培养基中连续传代培养 30 个周期(24 h/周期)。结果表明:3 株菌在传代过程中的增殖和产酸能力均保持稳定;但其产胞外多糖能力的稳定性不同,ST-7P 的稳定性显著高于 ST-5P 和 ST-134P。SPSS 软件的相关性分析表明,活菌数、pH 值与 EPS 产量之间没有显著相关性。

关键词:嗜热链球菌;胞外多糖;稳定性

Abstract: For the purpose of exploring the stability of producing exopolysaccharides (EPS) for *Streptococcus thermophilus*, 3 different strains (ST-5P, ST-7P, ST-134P) fermented in the exopolysaccharides selection medium for 30 periods (24 hours for each period) multiplication. The results showed that the proliferation and acid production of ST-5P, ST-7P and ST-134P were stable. The stability of producing EPS among these three strains was different. The EPS production of ST-7P was significantly more stable than those of ST-5P and ST-134P. The correlation analysis in SPSS showed that there was no direct correlation between EPS concentration and viable cell numbers or pH value.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*; exopolysaccharides; stability

胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是乳酸菌在发酵过程中利用生长基质中的碳源产生的一种天然高分子聚合物。EPS 对酸奶起到提高黏度、增强口感、改善质地、抑制乳清析出等作用^{[1][2]515}。但是乳酸菌产胞外多糖性状多不稳定^{[1][2]524}。Cerning 等^[3]发现同一株嗜热链球菌在相同试验

条件下,不同时间内 EPS 产量从 45 mg/L 增加到 340 mg/L。Jolly 等^[4]指出在重复多代培养或者高温培养的条件下,菌株的产胞外多糖性状容易丢失,而该性状丢失的原因因菌株不同而不同。De Vuyst 等^[1]认为嗜中温乳酸菌(Mesophilic LAB)调控 EPS 合成的 *eps* 基因簇在质粒中,质粒随着传代培养的丢失是这类乳酸菌产粘性状丢失的主要原因;嗜热乳酸菌(Thermophilic LAB)不含调控 EPS 生物合成的质粒,其 *eps* 基因簇位于染色体上,基因的丢失或重组是引起 EPS 的结构、组成和产量变化的主要原因,因此,通过多次连续传代可以反映嗜热链球菌产 EPS 性状遗传的相对稳定性^{[5]6-7}。张丽^[6]将嗜热链球菌 zlwTM11-2 进行 6 次传代,发现当传代次数超过 3 时 EPS 产量下降,其认为菌种发生退化。但该试验传代次数太少,即使 6 次传代亦不足以反映菌株产 EPS 性状遗传的稳定性。因此本试验拟通过长时间多次连续传代培养来研究 3 株嗜热链球菌产 EPS 的稳定性,旨在筛选产 EPS 高稳定性酸奶发酵菌株提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

嗜热链球菌(ST-L134-5-P, ST-L134-7-P, ST-L134-13-P, 以下简称 ST-5P, ST-7P, ST-134P);华南理工大学轻工与食品学院实验室保存;

脱脂奶粉:双城雀巢有限公司;

细菌学蛋白胨、酵母抽提物:生物试剂,广东环凯微生物生物科技有限公司;

无水葡萄糖:分析纯,上海伯奥生物科技有限公司;

三氯乙酸(TCA)、乙醇、苯酚、硫酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 培养基配方

胞外多糖选择性培养基 ESM(exopolysaccharides selec-

基金项目:广东省省级科技计划项目(编号:2015B040403004)

作者简介:鲍志宁(1983—),女,广州市微生物研究所工程师,博士。

E-mail: janinebao@gmail.com

通讯作者:林伟锋

收稿日期:2015-07-30

tion medium)^[7]: 脱脂乳粉 5%, 葡萄糖 5%, 酵母抽提物 0.35%, 蛋白胨 0.35%, 去离子水 89.3%, 调节 pH 6.2 ± 0.2。

1.3 仪器与设备

pH 计: PHS-25 型, 上海雷磁仪器公司;

超净工作台: SZX 型, 苏州净化设备有限公司;

恒温培养箱: PYX-DHS·400-BS 型, 北京市医疗设备厂;

高速台式冷冻离心机: Eppendorf 5424R 型, 北京智杰方远科技有限公司;

紫外可见分光光度计: UV759 型, 上海精密科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 传代周期的确定 将 ST-5P、ST-7P、ST-134P 按 2×10^6 CFU/mL ($6.3 \lg$ CFU/mL) 分别接入 ESM 中, 绘制 3 株菌的生长曲线, 选取 3 株菌均位于稳定期的某个时间点作为传代培养 1 个周期的时间。

1.4.2 传代试验方法 将 ST-5P、ST-7P、ST-134P 按 2×10^6 CFU/mL 分别接入 50 mL ESM 培养基中, 30 °C^[8] 下培养 24 h 后为第 1 周期, 从第 1 周期样品中取 1 mL 接入 50 mL 空白 ESM 培养基中培养 24 h 得第 2 周期样品, 依次传代进行 30 次试验。测定每个周期样品的活菌数、pH 值、EPS 含量。

1.5 测定方法

1.5.1 活菌数和传代次数的测定 在 MRS 固体培养基上采用平板计数法^[9] 测定菌落总数。计数结果取对数 (\lg CFU/mL)。每个样品平行 3 次。

1.5.2 pH 值的测定 用 PHS-25 型酸度计测定样品的 pH 值, 每个样品平行 3 次。

1.5.3 EPS 的测定 将样品在 100 °C 下加热 10 min 灭酶灭菌; 冷却至室温后取 10 mL 样品, 加入 80% TCA 至 TCA 终浓度为 10%, 振荡混匀 1 min, 室温下静置 12 h; 13 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 加入 3~4 倍体积的 95% 乙醇, 4 °C 沉淀 12 h; 13 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀并用温水复溶; 将所得溶液置透析袋(截留分子量 8 000~14 000) 中透析 24 h, 期间换 3~4 次水。将透析后溶液定容至 10 mL, 为胞外粗多糖溶液, 用苯酚—硫酸法测定总糖含量。用未接种样品作为空白样品, 测定值扣除空白样后即得到 EPS 的含量 (mg/L)。

苯酚—硫酸法^[10] 测定总糖: 配置 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液, 分别选取 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 加入比色管中, 用去离子水补齐至 2.0 mL; 加入 6% 苯酚 1 mL 摇匀, 后迅速加入 5 mL 浓硫酸立即摇匀; 静置冷却后于 490 nm 处测定吸光值并绘制标准曲线(图 1)。

1.6 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 进行方差分析、显著性分析以及相关分析, 同时利用平均值、标准差、离散系数对传代试验各项数据进行离散性分析, 从离散程度判断数据的稳定性。其中:

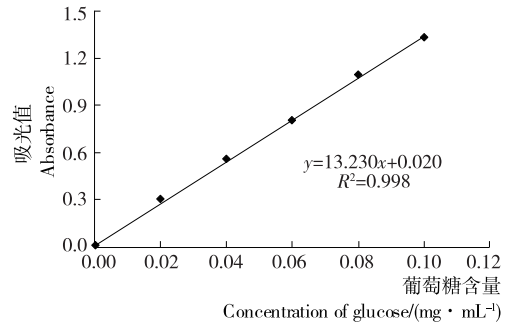


图 1 葡萄糖标准曲线

Figure 1 Standard curve of glucose

$$\text{离散系数} = \frac{\text{标准差}}{\text{平均值}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 传代周期的确定

图 2 为 ST-5P、ST-7P、ST-134P 在 ESM 培养基中的生长曲线。由图 2 可知: 在 0~6 h, 3 株菌均处在适应环境的迟滞期; 8 h 后菌株进入快速繁殖的对数期, 生长速率 ST-134P > ST-7P > ST-5P; 20 h 后菌株活菌数变化趋于平缓, 24 h 时 ST-5P、ST-7P、ST-134P 的活菌数对数值增至 9.36, 9.20, 9.63, 其后便不再明显增长, 故 24~32 h 为菌株生长繁殖的稳定期。32 h 后 ST-134P 生长速率开始下降, 推测其后将进入衰亡期。在稳定期初期, 菌群总数和菌体活力均处于一个相对稳定的状态, 代谢产物大量积累, 是最有利于菌株传代与保藏的时期^{[5]19-20}。因此, 通过以上对 ST-5P、ST-7P、ST-134P 生长曲线的分析, 确定后续传代试验的周期为 (24.0 ± 0.5) h。24 h 是菌株生长繁殖的稳定初期, 便于长时间连续传代的试验操作。

2.2 不同嗜热链球菌在连续传代过程中的发酵特性

2.2.1 活菌数的变化 EPS 是在菌体分泌的一系列酶的催化作用下合成和分泌的^[11], 因此菌株在传代过程中保持稳定的增殖能力是研究菌体产 EPS 稳定性的前提和基础。图 3 显示了 ST-5P、ST-7P、ST-134P 在 30 个周期的传代过程中活菌数的变化情况。3 株菌的初始接种量均为 $6.3 \lg$ CFU/mL, 在 ESM 培养基中经过 24 h 的活化、增殖后活菌数均达到 $8.0 \lg$ CFU/mL 以上。其中 ST-5P 在 2 个周期

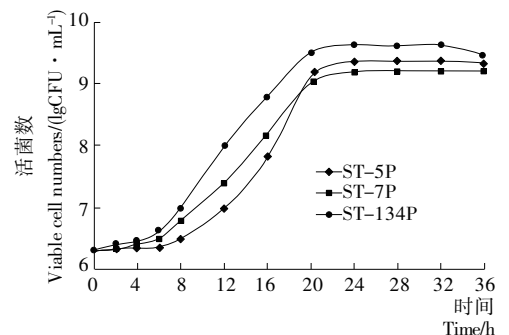


图 2 不同菌株的生长曲线

Figure 2 Grown curve of different *Streptococcus thermophilus*

后的传代培养中活菌数稳定在 9.3 lgCFU/mL 左右;ST-7P 经过 4 个周期后在传代培养中活菌数达到 9.0 lgCFU/mL 以上,并稳定在 9.0~9.2 lgCFU/mL;ST-134P 对环境的适应能力略强于 ST-5P 和 ST-7P,第 1 个周期就增殖至 9.4 lgCFU/mL,其后在 9.6 lgCFU/mL 附近保持稳定。

表 1 对 3 株菌的传代活菌数进行了离散性分析。3 株菌 30 个传代周期的平均活菌数分别为 9.32, 9.12, 9.63 lgCFU/mL,由此可见 ST-134P 具有较强的增殖能力。3 株菌活菌数的离散系数分别为 2.40%, 1.83%, 1.27%,总体上数据的离散程度均较小,可以判定 ST-5P、ST-7P 和 ST-134P 在 30 个周期的传代过程中菌体增殖能力基本保持稳定。

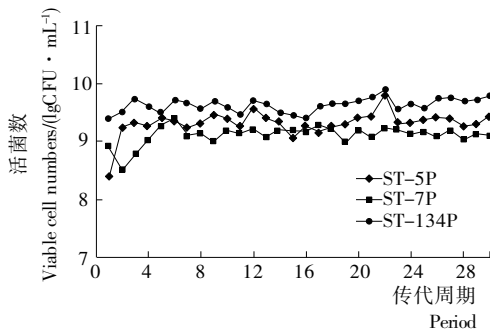


图 3 传代过程中活菌数的变化

Figure 3 Change of viable cell numbers along with the period extension

表 1 传代过程中活菌数的稳定性分析

Table 1 Stability analysis of viable cell numbers along with the period extension

菌株编号	平均值	标准差	离散系数/%
ST-5P	9.32	0.22	2.40
ST-7P	9.12	0.17	1.83
ST-134P	9.63	0.12	1.27

2.2.2 pH 值的变化 pH 值是影响微生物生长代谢的一个重要理化因素。图 4 显示了 ST-5P、ST-7P 和 ST-134P 在 30 个周期中每个周期发酵终点培养基 pH 值的变化情况。ESM 培养基的初始 pH 值均为 6.20,经过 24 h 培养后,乳酸的大量积累致使 pH 值均降低至 4.30 以下。30 个周期内,ST-5P 使发酵终点 pH 值稳定在 3.80~4.10,ST-7P 使发酵终点 pH 值稳定在 3.90~4.10,ST-134P 使发酵终点 pH 值稳定在 3.90~4.20,3 株菌都显示出十分稳定的产酸能力,且菌株之间产酸能力的差异性较小。由表 2 可知:3 株菌的离散系数都在 2% 以下,数据偏离平均值的程度很小,表现出高度的稳定性;平均值差异不显著,说明不同菌株之间差异性小。pH 的变化会引起细胞膜表面电荷的排布和膜的通透性,从而影响底物进入胞内参与多糖的合成过程和胞内多糖分泌到胞外的过程。此外,pH 值的改变还将影响酶的活力和酶促反应的速率从而影响胞外多糖的产量^[11]。本试验中同一菌株不同周期的 pH 环境保持基本稳定,不同菌株之

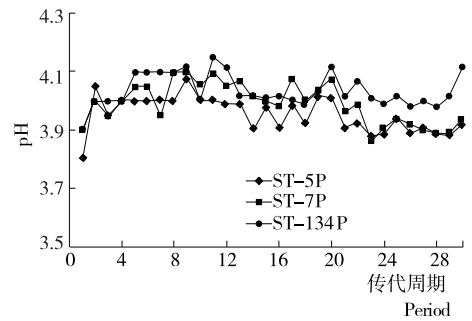


图 4 传代过程中 pH 值的变化

Figure 4 Changes of pH value along with the period extension

表 2 传代过程中 pH 值的稳定性分析

Table 2 Stability analysis of pH value along with the period extension

菌株编号	平均值	标准差	离散系数/%
ST-5P	3.95	0.06	1.56
ST-7P	3.99	0.07	1.80
ST-134P	4.04	0.06	1.43

间的 pH 环境无显著差异,因此在研究 ST-5P、ST-7P、ST-134P 产胞外多糖的稳定性时,可将 pH 这一因素的影响视为统一。

2.2.3 EPS 含量的变化 图 5 为 ST-5P、ST-7P、ST-134P 在 30 个周期中发酵终点 EPS 含量的变化情况,并根据各菌株 EPS 变化作其对数趋势线。由图 5 可知,ST-5P 产 EPS 的情况总体上呈下降趋势。ST-5P 在第 1 周期的 EPS 产量为 132.21 mg/L,传代培养至第 6 周期 EPS 产量下降至 90.49 mg/L,第 7~15 周期 EPS 产量的波动较大,最高达 137.62 mg/L,最低至 86.93 mg/L,传代培养 15 周期之后 EPS 产量不再回升并维持在较低水平(91.92~51.09 mg/L)。ST-134P 产 EPS 的趋势线总体上呈现较 ST-5P 更为缓和的下降趋势。但不同周期时 ST-134P 产 EPS 含量呈现较大幅度的波动,前 5 个周期 EPS 产量从 139.13 mg/L 降至 96.08 mg/L,第 6 周期开始反复出现回升—下降—回升的无规律变化。ST-7P 产 EPS 的情况总体上保持平稳中略有升高的趋势,ST-7P 产 EPS 的量在整个传代培养过程中保持在 91.24 mg/L 以上,在维持较高产量水平基础上呈现上下波动。

由表 3 可知,ST-7P 在传代过程中平均 EPS 产量为 123.82 mg/L,高于 ST-5P 和 ST-134P 的平均产量水平,说明 ST-7P 具有较高的产 EPS 能力,这与图 5 中趋势分析一致;3 个试验组的离散系数分别为 22.82%, 11.98%, 18.51%,均表现出产胞外多糖的不稳定性,但 ST-7P 组的离散系数相对较小,可认为 ST-7P 产胞外多糖的稳定性高于 ST-5P 和 ST-134P。

2.2.4 相关性分析 用 SPSS 软件对连续传代培养过程中的活菌数、pH 值和 EPS 产量之间简单相关性分析见表 4。

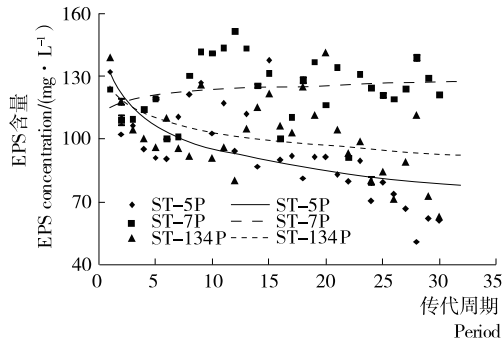


图5 传代过程中EPS含量的变化及变化趋势

Figure 5 Changes and trends of concentration along with the period extension

表3 传代过程中EPS含量的稳定性分析

Table 3 Stability analysis of EPS concentration along with the period extension

菌株编号	平均值	标准差	离散系数/%
ST-5P	93.02	21.23	22.82
ST-7P	123.82	14.83	11.98
ST-134P	101.62	18.81	18.51

表4 活菌数、pH值与EPS含量之间的相关性分析[†]

Table 4 Correlation analysis between viable cell numbers, pH value and EPS concentration ($n=30$)

菌株编号	活菌数与EPS含量	pH值与EPS含量
	Pearson相关性	Pearson相关性
ST-5P	-0.426*	0.427*
ST-7P	-0.014	0.162
ST-134P	-0.375*	-0.164

[†] *表示在0.05水平(双侧)上显著相关。

由表4可知,ST-5P、ST-134P的Pearson相关性为 $0.3 < |r| < 0.5$,呈现低度负相关;ST-7P的Pearson相关性 $|r| < 0.3$,相关程度弱,可认为基本不相关。乳酸菌在大量增殖的过程中大量产酸导致体系pH的降低,从而影响参与胞外多糖合成与分泌的酶系统活性;而菌体数量增加相当于加工生产胞外多糖的“工厂”数目增加从而促进EPS产量的增加,因此活菌数对EPS产量的影响效应较为复杂,从现有数据分析中尚不能确定二者之间的相关性。从pH值与EPS含量之间的相关性看,ST-7P、ST-134P组的Pearson相关性 $|r| < 0.3$,基本不相关;ST-5P组的Pearson相关性为0.427,呈低度相关。而2.2.2的数据离散性分析指出:传代过程中培养基的终点pH值高度稳定,而3株菌产EPS的能力均不稳定,因此可认为传代过程中pH值与EPS含量之间基本不相关。

3 结论

本研究在前人研究基础上,通过提高传代周期来反映乳

酸菌菌株产EPS性状遗传的稳定性并进行菌株筛选。通过对比3株嗜热链球菌ST-5P、ST-7P、ST-134P在连续传代培养30个周期过程中菌体增殖、产酸和产胞外多糖的稳定性,综合分析认为ST-7P具有产酸和产EPS高稳定性的特性,为适于工业化生产酸奶的发酵菌株,在乳酸菌发酵剂中具有较好的应用前景。同时本研究结果表明菌株活菌数、pH值与EPS产量之间无显著直接相关性,为其他产EPS性状遗传稳定的菌株筛选以及探究与EPS产量相关因素提供参考。

参考文献

- [1] De Vuyst L, F De Vin, F Vaningelgem. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(9): 687-707.
- [2] Kongo M. Lactic acid bacteria for food health and livestock purposes[M]. Rijeka: InTech, 2013.
- [3] Cerning J, C Bouillanne, M Desmazeaud. Exocellular polysaccharide production by *streptococcus thermophilus* [J]. Biotechnology Letters, 1988, 10(4): 255-260.
- [4] Jolly L, S J Vincent, P Duboc. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 82(1/2/3/4): 367-374.
- [5] 白梅. 益生菌 *Lactobacillus casei* zhang 长期连续传代过程中遗传稳定性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [6] 张丽. 嗜热链球菌胞外多糖的多样性与发酵乳黏度相互关系研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012: 35.
- [7] Sanni A I, Onilude A A, Ogunbanwo S T. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Nigeria[J]. Eur. Food Res. Technol., 2002, 214(5): 405-407.
- [8] 泰米迈 A Y, 罗宾 R K, 姜竹茂. 酸乳科学与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 248-270.
- [9] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85-86.
- [10] 范丽平, 王亚峰, 霍贵成. 产胞外多糖乳酸菌的鉴定及发酵性能研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 14-17.
- [11] 励建荣, 封平. 乳酸菌产胞外多糖的研究[J]. 食品与机械, 2005, 21(1): 70-73.

更正启事

刊登于2015年第5期第261页《杨梅气调贮藏及运输包装研究进展》一文的第一作者蒋巧俊的工作单位应为温州市农业科学研究院,特此更正。

《食品与机械》编辑部