

一株胞外多糖产生菌的筛选鉴定及其多糖成分研究

陆娟¹,周慧¹,王贵生¹,余梅霞¹,唐俊^{1,2*}

¹阜阳师范大学生物与食品工程学院;²环境激素与生殖发育安徽省重点实验室,阜阳 236037

摘要:以菌落周围有粘稠分泌物为初筛标准从土壤中筛选胞外多糖产生菌,苯酚-硫酸法测定初筛菌胞外多糖的产量;将胞外多糖产生菌 LE-3 进行形态学观察、BIOLOG 分析与 16S rDNA 鉴定;提取菌株 LE-3 胞外粗多糖,该粗多糖经 Sevage 法除蛋白、透析和 CM-琼脂糖凝胶 FF、DEAE-琼脂糖凝胶 FF、丙烯葡聚糖凝胶 S-200HR 柱层析进行纯化,傅里叶红外光谱法、薄层层析法和高效液相色谱法分析胞外多糖的单糖组成。结果表明:从土壤中筛出 26 株符合初筛标准的菌株,3 株产糖量在 5 g/L 以上,其中菌株 LE-3 产量为 5.29 g/L;根据形态学特征、BIOLOG 和分子生物学分析,初步鉴定菌株 LE-3 为一株解淀粉芽孢杆菌亚种(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*);该菌株胞外粗多糖经 Sevage 法除蛋白、透析和三次柱层析纯化后,得到单一组分的 LE-3 胞外多糖;傅里叶红外光谱法、薄层层析法和高效液相色谱法分析确定该多糖为果聚糖。

关键词:胞外多糖;鉴定;芽孢杆菌;纯化;果聚糖

中图分类号:Q539;Q93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)9-1484-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.9.005

Screening and identification of an exopolysaccharide-producing strain and the investigation of its polysaccharide

LU Juan¹, ZHOU Hui¹, WANG Gui-sheng¹, YU Mei-xia¹, TANG Jun^{1,2*}

¹School of Biotechnology and Food Engineering, Fuyang Normal University;

²Anhui Province Key Laboratory of Environmental Hormone and Reproduction, Fuyang Normal University, Fuyang 236037, China

Abstract: Exopolysaccharide-producing bacteria were isolated from the soil according to the mucoid secretion around the colony, the yield of extracellular polysaccharide was determined by phenol-sulfuric acid method. The exopolysaccharide-producing strain LE-3 was identified based on morphological characteristics, Biolog analysis and 16S rDNA sequence analysis. The crude extracellular polysaccharide isolated from strain LE-3 was purified by Sevage method, dialysis and CM-Sepharose FF chromatography, DEAE-Sepharose FF chromatography and Sephacryl S-200HR chromatography. The monosaccharide composition of the polysaccharide was analyzed by FT-IR, TLC and HPLC. Results showed that among the 26 strains isolated from soil on the basis of the first screening standard, there were 3 strains that could produce exopolysaccharide more than 5 g/L, and the exopolysaccharide yield of strain LE-3 was 5.29 g/L. Strain LE-3 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* based on morphological characteristics, Biolog analysis and 16S rDNA sequence analysis. A single component of exopolysaccharide isolated from strain LE-3 was obtained after deproteinization, dialysis and chromatography. Finally, the polysaccharide was determined to be a fructan by FT-IR, TLC and HPLC analysis.

Key words: exopolysaccharide; identification; *Bacillus*; purification; fructan

多糖是单糖通过糖苷键结合而成的高分子聚合物,具有广泛的应用价值,可作为乳化剂、增稠剂、稳定剂、成膜剂、悬浮剂、保鲜剂、润滑剂、食品添加剂

和抗癌药品应用于食品^[1-3]、石油化工^[4]和医疗^[5,6]等多个领域。微生物多糖包括胞内多糖、胞壁多糖和胞外多糖,胞外多糖易与菌体分离,可通过深层发酵实现工业化生产而倍受研究者的青睐。目前,黄原胶、结冷胶、普鲁蓝多糖和果聚糖等多种微生物胞外多糖已被研究并开发应用。果聚糖可以作为功能性食品的重要组成部分,作为脂肪替代物用于制备

收稿日期:2020-02-14 接受日期:2020-08-10

基金项目:国家级大学生创新训练项目(201710371033)

* 通信作者 Tel:86-558-2593210; E-mail:tj751@163.com

营养食品,还可以作为生产低聚果糖类益生元最有潜力的原材料^[7]。浅井氏葡糖杆菌(*Gluconobacter albidus*)^[8]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[9,10]、布伦勒氏菌(*Brenneria* sp.)^[11]等多种微生物都可以产生果聚糖。

为了进一步寻找产胞外多糖的微生物,不断开发微生物多糖的潜能,仍需继续筛选、分离新的微生物多糖产生菌。本文筛选、鉴定多糖产生菌,纯化并分析多糖的单糖组成,丰富了胞外多糖产生菌资源,为该菌株的进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

仪器: BIOLOG GenIII 分析仪(Biolog 公司, 美国); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司, 中国); JS-680D 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司, 中国); T100 PCR 仪(Bio-rad 公司, 美国); 5430R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司, 德国); NICOLET IS50 傅里叶红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司, 美国); ZORBAX Carbohydrate 糖分析柱(安捷伦公司, 美国); YL9100 高效液相色谱仪(英麟公司, 韩国); FD-8 实验室型冻干机(SZM 公司, 美国); ZWY-2112B 恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器制造有限公司, 中国)。

试剂: SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生物工程股份有限公司); 牛血清白蛋白 V(北京索莱宝科技有限公司); CM-Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare 公司); DEAE-Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare 公司); Sephacryl S-200HR (美国 SIGMA 公司); Silica gel 60 F₂₅₄ 薄层层析板(德国 Merck 公司); 三氯甲烷、正丁醇等有机溶剂均为 AR 分析纯; 乙腈为色谱纯。

1.2 土壤来源

采集校园内阳光充足的桂花树、桃树、樟树下距树干 10 cm 处地面 10 cm 以下土壤、油菜田地面 10 cm 以下土壤, 置于无菌均质袋中带回实验室, 无菌操作混合土壤。

1.3 培养基

1.3.1 初筛培养基: 牛肉膏 3.0 g、胰蛋白胨 10.0 g、氯化钠 5.0 g、蔗糖 30.0 g、琼脂 20.0 g、自来水 1 000 mL、pH 7.4~7.6, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3.2 复筛培养基(种子培养基、发酵培养基)

牛肉膏 1.0 g, KH₂PO₄ 2.5 g, K₂HPO₄ 2.5 g, NaCl 1.0 g, 蔗糖 30 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/L, FeSO₄

· 7H₂O 0.001 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 115 °C 灭菌 30 min。

1.4 胞外多糖产生菌的筛选

1.4.1 初筛

在初筛培养基上, 以菌落周围有粘稠分泌物为标准进行筛菌。

称量土样 5 g 放入内装有适量玻璃珠和 45 mL 无菌水的锥形瓶内, 摇床振摇 15 min, 制备成 10⁻¹ 稀释度的土壤稀释液, 再吸取 1 mL 土壤稀释液加入盛有 9 mL 无菌水的试管内, 制备成 10⁻² 稀释度的土壤稀释液, 依此类推, 共制备成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 等不同稀释度的土壤溶液。将不同稀释度的土壤溶液涂布初筛培养基平板, 37 °C 培养 2 天。挑选符合初筛标准的单菌落, 在初筛平板上多次划线, 37 °C 培养 24 h 得到纯培养物, 4 °C 保存备用。

1.4.2 复筛

将初筛保存的菌种在 LB 斜面上活化, 各挑取两环活化菌接种种子培养基(20 mL/100 mL 三角瓶), 160 rpm、37 °C 培养 24 h。按 10% 的体积分数接种量吸取种子培养液接种发酵培养基(50 mL/250 mL 三角瓶), 160 rpm、37 °C 摇床内培养 48 h, 每菌株重复 3 次。届时, 取 10 mL 发酵液于 10 000 rpm、4 °C 离心 10 min, 取上清液, 加入 3 倍体积预冷的无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 离心(4 °C、10 000 rpm、10 min) 弃上清, 沉淀加入少量蒸馏水溶解后定容于 100 mL 容量瓶中, 苯酚-硫酸法测胞外多糖产量。以 $y = 95.76x - 0.0934$ ($R^2 = 0.9995$) 为葡萄糖标准方程, 式中 x 为 490 nm 处吸光值, y 为葡萄糖量。

1.5 菌株 LE-3 的鉴定

1.5.1 形态学观察

将菌株 LE-3 划线培养, 观察菌落形态, 并进行革兰氏染色和芽孢染色观察。

1.5.2 BIOLOG 分析

菌株 LE-3 用 BIOLOG GenIII 微孔板进行鉴定, 具体方法按照说明书进行。

1.5.3 16S rRNA 基因序列分析

提取菌株 LE-3 基因组, 以通用引物(27f: 5'-AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACCT-TGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系含有: PCR buffer 5 μL, 200 nmol/L dNTPs 1 μL, 正向引物反向引物各 2 μL, 模板 2 μL, Taq DNA 聚合酶 1 μL, MgCl₂ 3 μL, 超纯水 34 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 1 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30

s, 72 °C 延伸 2 min, 37 个循环。PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司进行测定, 利用 BLASTN 软件进行序列分析, 寻找具有较高同源性的 16S rDNA 序列, 利用 MEGA 7.0 软件进行系统发育分析, Neighbor-joining 方法构建系统发育树, Bootstrap (1 000 次重复) 进行检验。

1.6 菌株 LE-3 胞外多糖的提取

将菌株 LE-3 按照复筛条件活化、发酵培养 48 h, 10 000 rpm, 4 °C 离心 10 min, 取上清液, 加入 3 倍体积预冷的无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 离心弃上清, 沉淀加入少量蒸馏水溶解, 真空冷冻干燥得到粗多糖。

1.7 LE-3 胞外多糖的纯化

1.7.1 Sevage 法除蛋白

取 0.3 g LE-3 胞外多糖粗品溶解于 40 mL 蒸馏水, 按照三氯甲烷和正丁醇的体积比为 4:1 配制 Sevage 液, 将粗多糖溶液与 Sevage 液以体积比为 2:1 混合, 剧烈振摇 30 min, 去除水层与溶剂交界处的变性蛋白, 重复 5 遍。然后在自来水和蒸馏水中各透析 (MWCO 为 8 kD) 1 天, 10 000 rpm, 4 °C 离心 10 min, 取上清液, 苯酚-硫酸法测糖、考马斯亮蓝法测蛋白。以 $y = 130.84x - 2.661$ ($R^2 = 0.9956$) 为蛋白质标准方程, 式中 x 为 595 nm 处吸光值, y 为蛋白质含量。

1.7.2 雾喷显色剂法检测多糖

将 0.5% 3,5-二羟基甲苯溶解于 20% H_2SO_4 中即为显色剂, 将糖溶液 5 μ L 点样于薄层层析 (TLC) 板上, 雾喷显色剂, 120 °C 烘烤 30 s, 糖斑点显棕黄色。

1.7.3 柱层析法纯化多糖

1.7.3.1 CM-Sepharose FF 柱层析

称取 0.5 g LE-3 粗多糖, 溶解于 10 mL 蒸馏水中, 离心, 将上清液加入已经用蒸馏水平衡 2 个柱体积的 CM-Sepharose FF 柱 (1.6 \times 17 cm), 用蒸馏水洗脱约 2 个柱体积, 流速为 0.6 mL/min, 部份收集器收集, 每管 3 mL, 先雾喷显色剂法检测多糖, 再硫酸-苯酚法测糖 (以 OD_{490} 表示), 考马斯亮蓝法测蛋白 (以 OD_{595} 表示)。收集多糖峰的主要部分并浓缩至约 20 mL。

1.7.3.2 DEAE-Sepharose FF 柱层析

将 CM-Sepharose FF 柱层析得到的多糖溶液 5 mL 加入到预先用蒸馏水平衡 2 个柱体积的 DEAE-Sepharose FF 柱 (1.6 \times 16 cm), 蒸馏水洗脱约 2 个

柱体积, 流速为 0.6 mL/min, 部份收集器收集, 每管 3 mL, 先雾喷显色剂法检测多糖, 再硫酸-苯酚法测糖, 考马斯亮蓝法测蛋白。收集多糖峰的主要部分并浓缩至约 10 mL。

1.7.3.3 Sephacryl S-200HR 柱层析

将 DEAE-Sepharose FF 柱层析得到的浓缩多糖液 5 mL 加入预先用 0.1 mol/L NaCl 平衡 2 个柱体积的 Sephacryl S-200HR 柱 (1.6 \times 18 cm), 用 0.1 mol/L NaCl 进行洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 部份收集器收集, 每管 1.5 mL, 先雾喷显色剂法检测多糖, 再硫酸-苯酚法测糖, 考马斯亮蓝法测蛋白。收集多糖峰的主要部分, 蒸馏水透析 (MWCO 为 8 kD) 2 天, 冷冻干燥得到 LE-3 多糖纯品。

1.8 傅里叶红外光谱分析

称取冷冻干燥的 LE-3 多糖纯品 10 mg, 加入干燥的 KBr 粉末 100 mg, 混匀后研磨至样品呈细碎的粉末状, 压片, 在 NICOLET IS50 FT-IR 红外光谱仪上于 4 000 ~ 400 cm^{-1} 波长范围内进行扫描。

1.9 LE-3 胞外多糖的单糖组成分析

1.9.1 薄层层析分析

称取纯化的 LE-3 胞外多糖、葡萄糖、果糖各 40 mg, 置于 20 mL 的具塞试管中, 加入 1 mol/L 的硫酸溶液 8 mL, 100 °C 水解 2 h, 水解液中加入 $CaCO_3$ 中和至不冒泡。

将 2% 标准单糖 (葡萄糖、果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖) 溶液、纯化的 LE-3 胞外多糖、酸水解的多糖、酸后果糖和酸后葡萄糖点样于 TLC 板, 然后置于展层剂 (正丁醇: 乙醇: 蒸馏水 = 5:3:2, V/V) 中展层, 约 7 h 后取出, 雾喷显色剂后于 120 °C 烘箱中烘 5 min, 糖斑点显色较明显后进行扫描拍照。

1.9.2 高效液相色谱分析

配制 1 mg/mL 的标准单糖溶液和酸水解的 LE-3 多糖溶液, 经 0.22 μ m 滤器过滤后进行高效液相检测, 总进样量为 20 μ L, 进 3 次, 其中流动相为 78% 的乙腈, 流速为 1.0 mL/min, 喷射腔温度为 30 °C, 冲洗管温度为 60 °C, 恒温器温度为 25 °C。

2 结果与分析

2.1 胞外多糖产生菌的筛选

从土壤中筛出 26 株符合初筛标准的菌株, 复筛得到 3 株产糖量在 5 g/L 以上, 其中 LE-3 产量为 5.29 g/L。

2.2 LE-3 菌株的鉴定

色泽一致;菌体杆状,革兰氏阳性,芽孢中生(图 1)。

菌株 LE-3 菌落大而圆,乳白色,易挑取,正反面

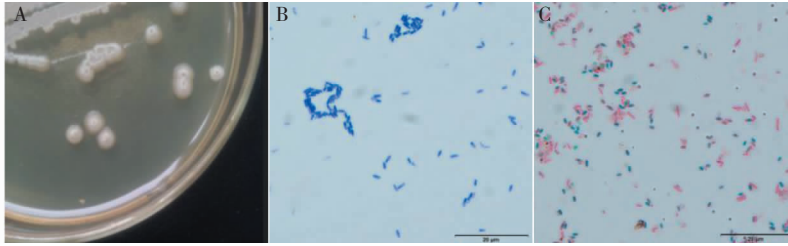


图 1 LE-3 菌落形态及菌体染色

Fig. 1 Colony morphology and bacterial staining of strain LE-3

注:A. LB 平板上的 LE-3;B. 革兰氏染色;C. 芽孢染色。Note:A. Colony morphology of strain LE-3 on LB plate;B. Gram staining of strain LE-3;C. Spore staining of strain LE-3.

BIOLOG 微生物鉴定系统对菌株 LE-3 的鉴定结果为 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, SIM 值为 0.660。通常 BIOLOG 微生物鉴定时 24 h 培养读取结果的 SIM 值 ≥ 0.5 是可以接受的标准^[12]。将提取的基因组进行琼脂糖凝胶电泳,LE-3 基因组片段大小约 23 kb;以该基因组为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,获得产物大小约为 1.5 kb,将 PCR 产物进行测序,并将测得

的序列通过 BLASTN 软件进行比对,结果显示菌株 LE-3 是芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),在进化树中与相似度为 99%的解淀粉芽孢杆菌亚种 KF689544.1 聚在一起(图 2)。因此,结合 BIOLOG 和 16S rRNA 结果,初步确定菌株 LE-3 是一株解淀粉芽孢杆菌亚种。菌株 LE-3 已保存于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏号为 GDMCC No. 60884。

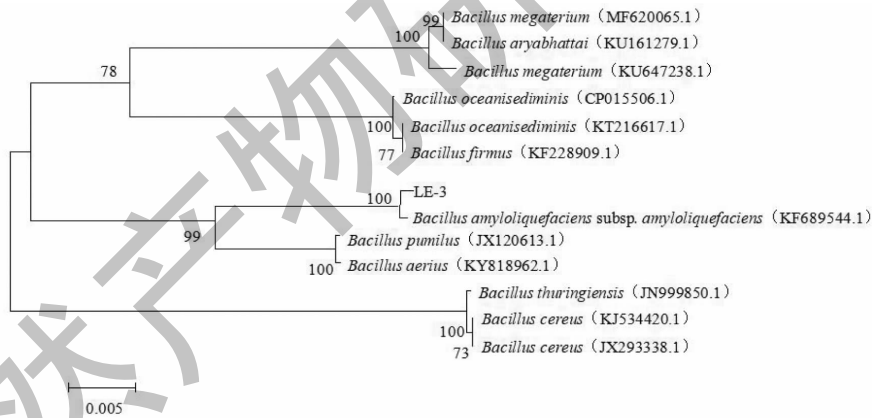


图 2 基于 NJ 法构建的菌株 LE-3 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on NJ method based on strain LE-3

2.3 LE-3 胞外多糖的纯化

2.3.1 Sevage 法除蛋白

用 Sevage 法除蛋白后,处理后样品与未处理样品(对照)相比,多糖含量变化较小但蛋白质含量明显下降。未处理的蛋白质为 0.807 ± 0.032 mg/mL,处理后为 0.108 ± 0.168 mg/mL,两者差异显著(图 3);未处理的多糖为 6.397 ± 0.428 mg/mL,处理后为 6.164 ± 0.248 mg/mL,两者差异不显著(图 3)。

2.3.2 CM-Sepharose FF 柱层析

LE-3 胞外多糖溶液经 Sevage 法除蛋白、透析后,加样于 CM-Sepharose FF 柱,洗脱,测定各收集管中液体 OD₄₉₀和 OD₅₉₅。在由蒸馏水洗脱得到的 1~13 管出现一个多糖峰,表明该多糖是不带正电荷的多糖,含少量蛋白质(图 4)。

2.3.3 DEAE-Sepharose FF 柱层析

收集、浓缩 CM-Sepharose FF 柱层析得到的多糖峰,加样于 DEAE-Sepharose FF 柱,洗脱,测定各收

集管中液体 OD₄₉₀ 和 OD₅₉₅。在由蒸馏水洗脱得到的 6~14 管出现一个多糖峰,表明该多糖是不带负电荷的多糖,且蛋白质含量较低(图 5)。

2.3.4 Sephacryl S-200HR 柱层析

收集、浓缩 DEAE-Sepharose FF 柱层析得到

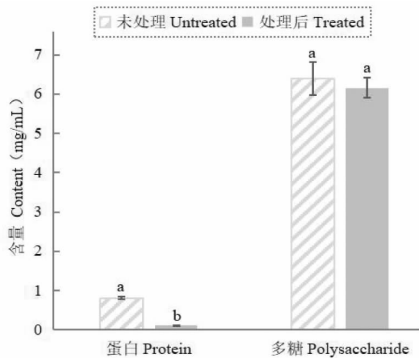


图 3 LE-3 粗多糖 Sevage 法除蛋白分析

Fig. 3 Analysis of crude polysaccharide LE-3 after deproteinization by Sevage

注:与对照未处理比较,^a 差异不显著;^b 差异显著 ($P < 0.05$)。
 Note: Compared with control (untreated), ^a no significant difference; ^b significant difference ($P < 0.05$).

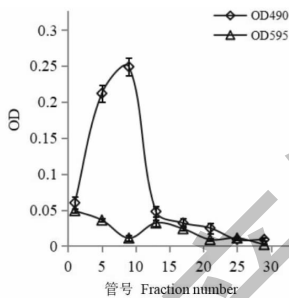


图 4 CM-Sepharose FF 柱层析
 Fig. 4 CM-Sepharose FF column chromatography of polysaccharide LE-3

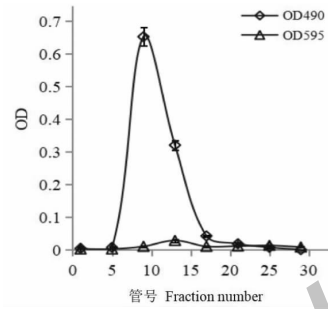


图 5 DEAE-Sepharose FF 柱层析
 Fig. 5 DEAE-Sepharose FF column chromatography of polysaccharide LE-3

的多糖峰,加样于 Sephacryl S-200HR 柱,洗脱,测定各收集管中液体 OD₄₉₀ 和 OD₅₉₅。在 9~37 管出现一个多糖峰,表明 LE-3 多糖只存在一个多糖组分,且分子量较大,此时多糖中蛋白质含量较低(图 6)。

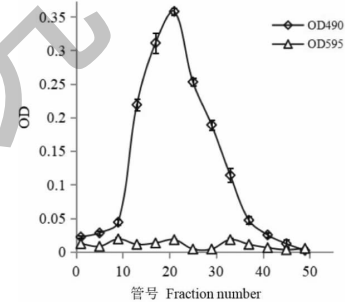


图 6 Sephacryl S-200HR 柱层析
 Fig. 6 Sephacryl S-200HR column chromatography of polysaccharide LE-3

2.4 多糖的红外检测

如图 7 所示,在红外光谱扫描中,样品在

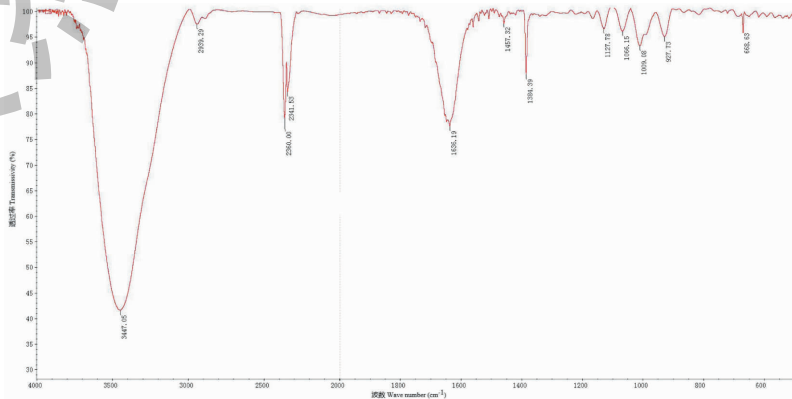


图 7 LE-3 胞外多糖的 FT-IR 图谱

Fig. 7 FT-IR spectrum of polysaccharide LE-3

3 447.05 cm^{-1} 处的吸收峰,是由 O-H 伸缩振动引起的,而 2 939.29 cm^{-1} 处是 C-H 的吸收峰,这是多糖的特征吸收峰。1 636.19 cm^{-1} 处是结合水的吸收峰,927.73 cm^{-1} 处的吸收峰表明该多糖含有呋喃环,初步判断该多糖为果聚糖。

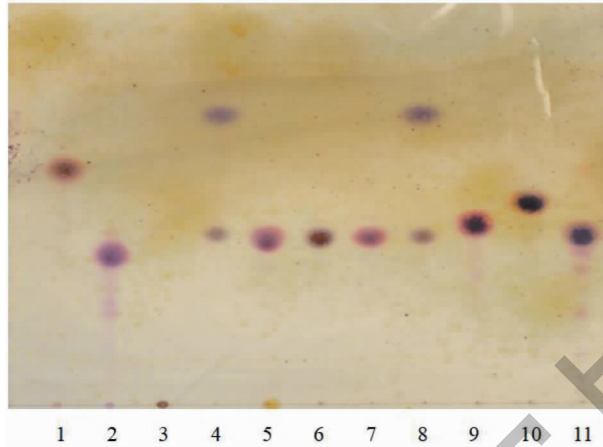


图 8 LE-3 多糖组分的薄层层析分析

Fig. 8 TLC analysis of polysaccharide LE-3

注:1. 鼠李糖;2. 半乳糖;3. LE-3 多糖;4. 酸后 LE-3 多糖;5. 葡萄糖;6. 果糖;7. 酸后葡萄糖;8. 酸后果糖;9. 甘露糖;10. 木糖;11. 阿拉伯糖。

Note: 1. Rhamnose; 2. Galactose; 3. Polysaccharide LE-3; 4. Polysaccharide LE-3 desposing by Hcl; 5. Glucose; 6. Fruccose; 7. Glucose desposing by Hcl; 8. Fruccose desposing by Hcl; 9. Mannose; 10. Xylose; 11. Arabinose.

2.5.2 高效液相色谱分析

从图 9 可以看出:果糖、酸后果糖、葡萄糖和酸后葡萄糖的 HPLC 保留时间分别为 15.7、15.7、21.3 和 21.3 min,酸后多糖的保留时间为 16.13 min,该保留时间与果糖接近,说明 LE-3 菌株胞外多糖含有果糖、没有葡萄糖,确认 LE-3 菌株胞外多糖为果聚糖。

3 讨论

果聚糖包括菊粉类果聚糖 (inulin) 和 levan 果聚糖,菊粉类果聚糖主要由 β -(2,1) 果糖苷键组成,主要来源于植物;levan 果聚糖分子中含有大量 β -(2,6) 果糖苷键主链及少量 β -(2,1) 果糖苷键的支链,主要来源于植物或微生物。菊粉类果聚糖具有免疫增强^[13] 和抗氧化的作用^[14];作为脂肪替代品、糖替代品和功能性食品,它在乳制品、面制品和油脂类食品等中得到了较好的应用^[1-3]。微生物来源的 levan 果聚糖具有抗肿瘤^[15]、抗糖尿病^[16]、降血脂^[17] 和免疫增强^[10] 等功能。多种微生物都可以产生 levan 果聚糖,如地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)^[10]、肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)^[18] 和副凝聚小短杆菌 (*Brachybacterium para-*

2.5 LE-3 多糖的单糖组成分析

2.5.1 薄层层析分析

如图 8 所示,LE-3 胞外多糖中不含有鼠李糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖,含有大量果糖,但是否含有葡萄糖还不能确定,还需进一步实验确认。

conglomeratum)^[19] 等。

本试验通过初筛和复筛从土壤中筛选得到一株胞外粗多糖产量为 5.29 g/L 的 LE-3 菌株,经过形态学观察、BIOLIG 分析和 16S rDNA 分析,菌株 LE-3 被鉴定为 *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*。解淀粉芽孢杆菌亚种 LE-3 的胞外多糖经 Sevage 除蛋白、CM-Sepharose FF、DEAE-Sepharose FF 和 Sephacryl S-200HR 柱层析纯化得到一种多糖,经傅里叶红外光谱、TLC 和 HPLC 分析,确定该多糖是一种果聚糖。目前,未见有 *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* 产果聚糖的报道。

不同菌株发酵生产果聚糖的产量不同,当蔗糖浓度在 60 ~ 250 g/L 时,levan 果聚糖的产量一般在 15 ~ 50 g/L 范围内^[7]。当蔗糖浓度为 100 g/L 时,副凝聚小短杆菌的 levan 果聚糖产量仅为 2.13 ~ 2.63 g/L,当蔗糖浓度增加为 500 g/L 时,该菌株的 levan 果聚糖产量可以高达 45.23 g/L^[19]。本试验解淀粉芽孢杆菌亚种 LE-3 的 levan 粗多糖产量仅为 5.29 g/L,较其它菌株低,可能与菌株不同、蔗糖浓度较低和其它发酵条件不同有关,将培养条件优化后该菌株的果聚糖产量提高至 18.36 g/L^[20]。同

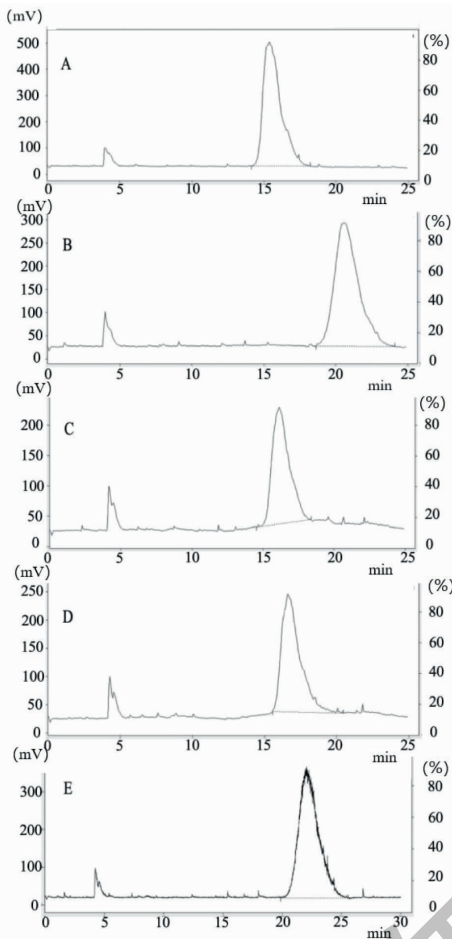


图9 五种糖的高效液相色谱图

Fig.9 HPLC analysis of five sugar

注:A.果糖;B.葡萄糖;C. 酸后多糖;D. 酸后果糖;E. 酸后葡萄糖。Note:A. Fructose;B. Glucose;C. Polysaccharide LE-3 desposing by Hcl;D. Fruucose desposing by Hcl;E. Glucose desposing by Hcl.

时,菌株 LE-3 发酵的果聚糖是菊粉类果聚糖还是 levan 果聚糖及其生物学活性,有待进一步研究和证实。

参考文献

- Shoairb M, Shehzad A, Omar M, et al. Inulin: properties, health benefits and food applications[J]. Carbohydr Polym, 2016, 147:444-454.
- Xiong ZW, Luo QQ, Hui JM, et al. Research progress of the application of inulin in fat food and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40:318-321.
- Karimi R, Azizi MH, Ghasemlou M, et al. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer [J]. Carbohydr Polym, 2015, 119:85-100.

- Huang CD, Bai XF, Du YG. Xanthan Gum: production, properties and application [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2005, 32:91-97.
- Chiang CJ, Wang JY, Chen PT, et al. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82:445-451.
- Wang J, Shi Q, Sui J J, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharide from *Oudemansiella furfuracea* on murine macrophages [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:845-850.
- Lu J, Tang J, Xiao M, et al. Progress on the application and production of levan [J]. J Biol (生物学杂志), 2013, 6:86-90.
- Ua-Arak T, Jakob F, Vogel RF. Characterization of growth and exopolysaccharide production of selected acetic acid bacteria in buckwheat sourdoughs [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 239:103-112.
- Ragab TIM, Malek RA, Elsehemy IA, et al. Scaling up of levan yield in *Bacillus subtilis* M and cytotoxicity study on levan and its derivatives [J]. J Biosci Bioeng, 2019, 127:655-662.
- Liu CH, Lu J, Lu LL, et al. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 [J]. Bioresour Technol, 2010, 101:5528-5533.
- Xu W, Liu Q, Bai Y, et al. Physicochemical properties of a high molecular weight levan from *Brenneria* sp. EniD312 [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 109:810-818.
- Cheng C, Yang M, Li JX, et al. Biolog microbial identification system- study on the operating regulation of bacteria identification [J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业), 2006, 32:50-54.
- Vogt L, Meyer D, Pullens G, et al. Immunological properties of inulin-type fructans [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015, 55:414-36.
- Shang HM, Zhou HZ, Yang JY, et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin [J]. PLoS One, 2018, 13:e0192273.
- Dahech I, Belghith KS, Belghith H, et al. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 51:329-335.
- Dahech I, Belghith KS, Hamden K, et al. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats [J]. Int J Biol Macromol, 2011, 49:742-746.