

米糠中植物脂多糖和 细菌脂多糖的分离鉴定

陈正行 姚惠源

(无锡轻工大学食品学院, 无锡 214036)

摘要 对米糠中细菌的计量和革兰氏阴性菌的分离、培养及其脂多糖的提取等研究表明: 尽管米糠含有众多革兰氏阴性菌, 但细菌脂多糖占米糠脂多糖总量的比例不足1%, 证实了米糠脂多糖为植物脂多糖而非细菌脂多糖。

关键词 米糠; 分离; 鉴定; 脂多糖; 革兰氏阴性菌

中图分类号 TS210.9

0 前 言

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁外膜的特征成分, 对其研究已有60多年的历史^[1]。本世纪90年代初日本学者杉源一郎等人首先从小麦面粉分离得到植物来源的小麦脂多糖。从此, 脂多糖区分为细菌脂多糖和植物脂多糖两类。与细菌脂多糖相比, 植物脂多糖毒副作用小, 对一些疑难顽症有一定的抑制和治疗作用^[2-6], 目前已成 为医学和免疫学的研究热点之一。

在以前的研究^[3]中, 作者已从米糠中分离纯化得到一种新物质米糠脂多糖。但此脂多糖为植物脂多糖还是细菌脂多糖, 或两者的混合物? 这个问题至今在国内外未见报道。

1 材料与方 法

1.1 器 材

头道米糠、二三道米糠	本校原粮油科学与工程系精洁米车间提供;
无热原水	无锡市第四制药厂提供;
手提式高压蒸汽消毒器	无锡第二医疗器械厂产品;
电热恒温水浴锅	江苏省医疗器械厂产品;
LD4-2离心机	江阴市科研器械厂产品;
保温培养箱	无锡第二医疗器械厂产品;
XS-B1实验室用显微镜	南京江南光学仪器厂产品

往复式摇床 本校生物工程学院发酵甘油研究室提供;
SCR20BC 高速冷冻离心机 日本HITACHI公司制;
L-24型冷冻干燥机 美国制;

1.2 方 法

1.2.1 脂多糖测定 TAL法^[3]。

1.2.2 革兰氏染色法 选用18~24 h的菌体培养物,操作按文献^[7]进行。

1.2.3 荚膜染色法 按文献^[8]进行。

1.2.4 显微摄影 按革兰氏染色法进行初染,风干后拍照。

1.2.5 斜面培养法 按文献^[9]进行,培养基采用适合细菌生长的牛肉膏蛋白琼脂培养基,培养基配方为:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,琼脂20 g,牛肉膏 3 g,水 1000 ml。

1.2.6 1:10米糠稀释液的制备 将米糠10 g置于含有100 ml无热原水和一些玻璃珠的瓶内,振荡20 min,即为1:10的均匀稀释液。

1.2.7 倍比稀释液的制备 用无菌移液管取1 ml的1:10米糠稀释液,加入有9 ml无热原水的试管内,摇匀即为1:100稀释液(倍比稀释液)。

1.2.8 微生物培养 用移液管取不同稀释度的稀释液1 ml入灭菌的二重皿中,加入灭菌的培养基,混匀并待琼脂凝固后,翻转平皿,置37℃保温箱内培养。同时以无热原水代替稀释液,做一空白试验。

1.2.9 液体培养方法 液体培养基采用葡萄糖牛肉膏蛋白胨培养基(pH 7.4),配方为:葡萄糖 10 g,蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 5 g,水1000 ml。培养按文献^[10]进行,具体操作为:培养基制备 500 ml的三角瓶分装 纱布封口 灭菌 接种 摇瓶培养(时间72h,摇瓶室温度32℃,摇瓶电机速率120 r/min)。

1.2.10 G-菌菌体提取 液体培养后的菌体混合液在温度4℃,以9500 r/min离心10 min,得到的菌体沉淀用无热原水洗涤,再离心,此操作进行两次。最后冻干菌体沉淀。

1.2.11 脂多糖提取 对Westphal^[12]的酚水法进行了修改,具体操作如下:将菌体干燥物按称重比1:17.5加入无热原水,制成悬浊液,置于68℃水浴中,另一只烧杯内加入等体积的90%的苯酚,也置于水浴中。当两只烧杯的内容物都达到68℃后,把苯酚倒入菌体悬浊液中,强烈搅拌混合物30 min。把混合物置于冰水浴中,冷却至10℃以下。混合物4℃离心30 min,收集上层水相,下层酚相置于68℃水浴中加入等体积同温度的无热原水,重复前面操作再提取一次。合并两次水相,用同体积的氯仿萃取水相中的苯酚3次。萃取苯酚后的水相经冻干得到脂多糖。

2 结果与讨论

2.1 米糠的带菌量

把新鲜的米糠和无热原水制得的米糠倍比稀释液,经37℃约24 h的培养,得到各稀释液的菌落数,见表1。空白试验则没有任何菌落。

由于一个菌落即为一个菌数,因此根据

表1 各道米糠的菌落总数

米糠	稀释倍数			菌落总数 (个/g)
	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	
头道	576	56	28	7.6 × 10 ⁶
	468	36	20	6.8 × 10 ⁶
二三道	680	64	44	6.4 × 10 ⁷
	568	36	36	3.6 × 10 ⁷

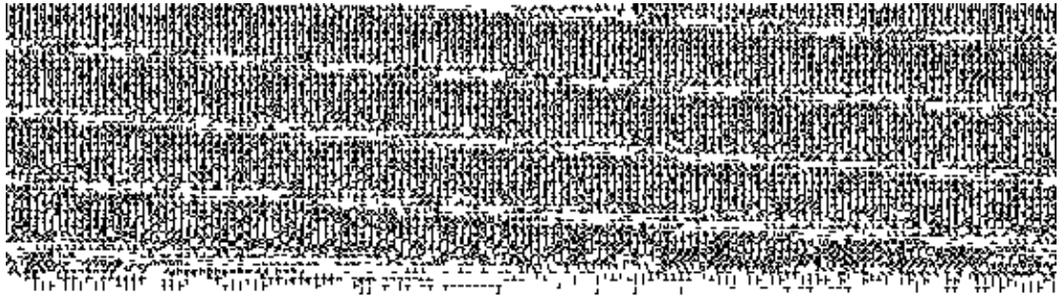
平行试验的结果,可计算出各样品的带细菌量:

$$\text{头道米糠的带细菌量} = \frac{7.6 + 6.8}{10 \times 2} \times 10^6 = 7.2 \times 10^5 \quad (\text{个/g})$$

$$\text{二三道米糠的带细菌量} = \frac{6.4 + 3.6}{10 \times 2} \times 10^7 = 5.0 \times 10^6 \quad (\text{个/g})$$

2.2 米糠中革兰氏阴性菌的分离培养及其形态观察

上述各米糠稀释液的培养菌落用革兰氏染色法染色后,用肉眼和显微镜观察,共发现4种G⁻菌,其菌落及细胞的形态、颜色、结构见图1.

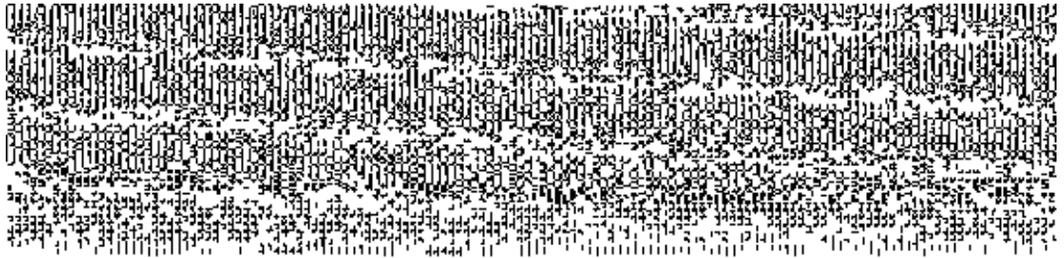


(× 630)

第1种革兰氏阴性菌

(× 630)

第2种革兰氏阴性菌



(× 630)

第3种革兰氏阴性菌

(× 630)

第4种革兰氏阴性菌

图1 米糠中革兰氏阴性菌显微摄影照片

第1种: 菌落呈滴状、乳白色、透明,表面光滑、黏稠,边缘完整,镜检为小球状;

第2种: 菌落呈鹅黄色圆形、透明,表面光滑、黏稠,镜检为短细杆状;

第3种: 菌落边缘粉红,中间乳白,侧面观呈脐状,表面结构规则,有圆心环,边缘完整,黏稠,镜检为小球状;

第4种: 菌落呈圆形,色泽比橙黄色略深,近似土色,透明,表面黏稠、光滑,镜检为细杆状。

所得的4种米糠G⁻菌经荚膜染色后,在显微镜下可看到黑色背景中的红色细胞,但没发

现细胞有无色圈,故4种G-菌细胞壁外围无荚膜,或粘性物质的边界不明显。

把上述采用稀释分离法得到的4种G-菌分别接种于4支试管斜面,经过24 h的培养,每支试管中菌落都为单一形态,而且都与所接种的G-菌相符。把这4支试管保存起来,作为菌种。

2.3 米糠革兰氏阴性菌提取脂多糖

液体培养以上4种米糠G-菌。约24 h后,培养液已明显混浊。培养72 h后,培养液混浊程度不再增加,可见细胞数量已从指数增加的生长期进入无净增加的最大静止期。此时停止培养,经冷冻离心、洗涤、冻干,

得到液体培养的G-菌菌体(表2)。菌体的颜色与原菌种菌落的颜色相符。

在Westphal 酚水法^[11]中,纯化脂多糖采用费时的透析法和超速冷冻离心(10 000 r/min, 4 , 4h)。为此,将Westphal 酚水法中的透析和超速冷冻离心等纯化脂多糖的步骤,改为氯仿萃取纯化并获得成功(表2)。

从菌体产量来看,4种菌种是不均等的,这可能与菌种的接种量和生长速率有关。从脂多糖产率上看,1号、2号、4号菌种的产率相接近,3号菌种的产率最低,说明在相同的提取条件下,不同的G-菌提取脂多糖的产率也不相同,这可能与各米糠G-菌的脂多糖含量有关。

2.4 米糠革兰氏阴性菌脂多糖对米糠脂多糖总量的贡献

以上研究表明,米糠中确实存在着众多G-菌,并都能提取脂多糖。米糠脂多糖中革兰氏阴性菌脂多糖含量的高低直接影响米糠脂多糖的研究开发价值。

从以前的研究知道,头道米糠的脂多糖含量为0.121%,二三道米糠为0.175%^[13]。依据 1×10^7 个细菌细胞中提取脂多糖的最大得率为 $0.3 \mu\text{g}^{[11]}$,以及头道米糠和二三道米糠的带细菌量分别为 7.2×10^5 个/g和 5.0×10^6 个/g的测定值,可得到G-菌脂多糖的最大含量,见表3和图2。

表3 LPS及细菌在米糠中的分布

米糠种类	LPS 含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	带细菌量 (个/g)	G-菌 LPS 含 量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
头道米糠	121	7.2×10^5	0.0216
二三道米糠	175	5.0×10^6	0.150

表2 米糠革兰氏阴性菌液体培养及其脂多糖提取

米糠G-菌菌种	液体培养		PS 提取 产量/g	LPS 产率 (质量分数)
	菌体情况	产量/g		
1	乳白色 黏稠	1.12	0.198	0.177
2	鹅黄色 黏稠	0.80	0.151	0.188
3	粉红色 黏稠	0.60	0.013	0.021
4	土色 黏稠	0.98	0.180	0.184

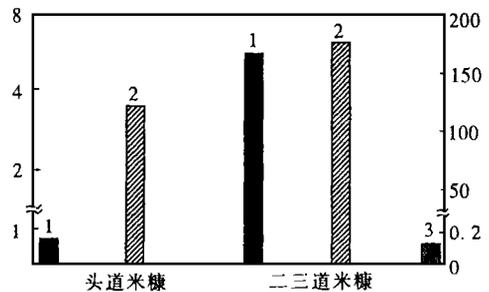


图2 米糠带菌量、米糠脂多糖测定值和根据细菌总数推算的细菌脂多糖含量
1—米糠带菌量 2—米糠中LPS实测量
3—米糠中LPS推算量

表3和图1表明,头道米糠中细菌脂多糖最大可能含量为 0.0216×10^{-6} ,占头道米糠脂多糖总量的0.179%;在二三道米糠中细菌脂多糖最大可能含量为 0.150×10^{-6} ,占二三道米糠脂多糖总量的0.857%。因此,G-菌来源的脂多糖对米糠脂多糖总量的贡献微不足道,都在1%以下水平。

由此结论,尽管米糠含有众多G-菌,但脂多糖来自于米糠本身,是米糠微量成分之一。

是植物性的脂多糖而不是细菌性的脂多糖。

参 考 文 献

- 1 Boivin, Mesrobianu. C R Soc Boil, 1933, 112: 76
- 2 和源一郎. 抗トキノブラブマ 剂. 日本, 公开特评公报, 0449 245. 1992年2月18日
- 3 陈正行. 植物脂多糖的开发利用: [博士学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1996
- 4 和源一郎. 抗ソエウマ 剂. 日本, 公开特评公报, 0449 241, 1992年2月18日
- 5 和源一郎. 抗消化性溃疡剂. 日本, 公开特评公报, 0449 240. 1992年2月18日
- 6 Soma, Gen-ichiro. Antidiabetic agents and veterinary antidiabetic agents, European Patent, Application, 462022. 1991年12月18日
- 7 朱曜. 食品病原微生物检验技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1987. 69
- 8 诸葛健等. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 237
- 9 Philipp G. 普通细菌学方法手册. 厦门大学生物系微生物教研室译. 厦门: 厦门大学出版社, 1989. 165
- 10 Philipp G. 普通细菌学方法手册. 厦门大学生物系微生物教研室译. 厦门: 厦门大学出版社, 1989. 198
- 11 Westphal O Meth. Carbohydr Chem. London: Academic Press INC LTD. 1965, 5: 83,
- 12 Nishizawa I. Homeostasis as Regulated by Activated Macrophage. Chem Pharm Bull, 1992, 40: 479

Separation and Certification of Lipopolysaccharide from Plant Origin and Bacterial Lipopolysaccharide in Rice Bran

Chen Zhenxing Yao Huiyuan

(School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract This paper presented the bacterial content assay, isolation and culture of gram-negative bacteria and extraction of its lipopolysaccharides (LPS) in rice bran. Results show that even though rice bran contained various gram-negative bacteria, bacterial LPS content was no more than one thousandth of LPS content in rice bran. So it can be concluded that LPS from rice bran was plant origin but bacterial origin.

Key words rice bran; separation; certification; lipopolysaccharide; gram-negative bacterium

(责任编辑: 秦和平)