

XIZANG LINGGU

孟利◆著

西藏灵菇

西藏灵菇是一种古老的发酵乳制品，来源于西藏，是将乳放在山羊皮或绵羊皮袋中自然发酵而成的，长期发酵后会在袋子中形成独特的菌粒。现今流行的西藏灵菇是以自然产生的菌粒为菌种发酵鲜乳或脱脂乳而成的乳制品。西藏灵菇菌系栖息于自身分泌的胞外多糖基质上，在乳中长期培养仍能保持菌相平衡，具有增殖再生能力，这是微生物领域中的奇迹。



黑龙江大学出版社

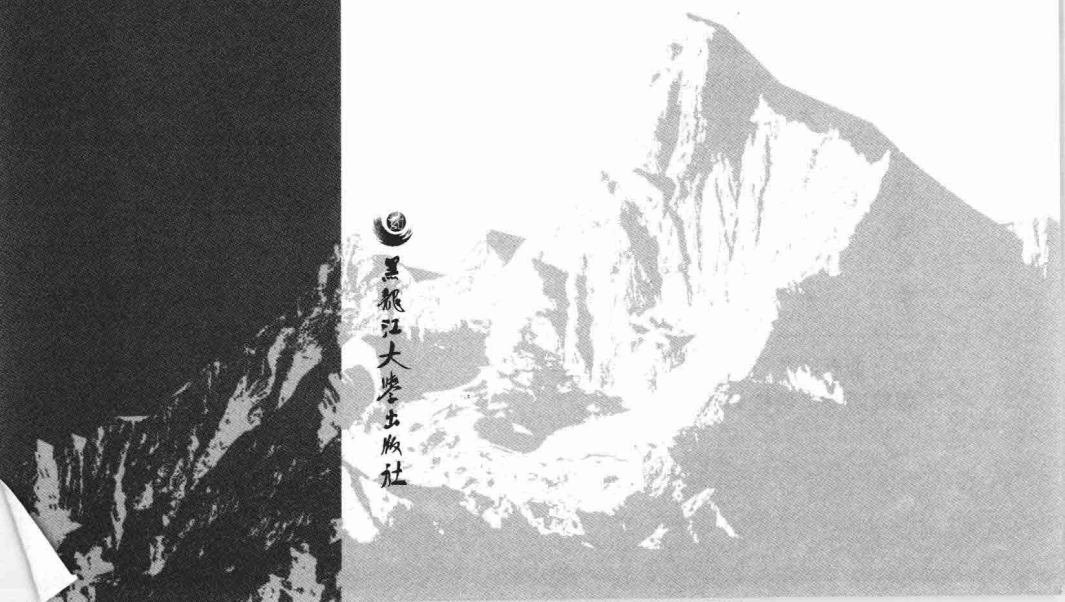
孟利◆著

XIZANG LINGGU

西藏灵菇



黑龙江大学出版社



图书在版编目(CIP)数据

西藏灵菇 / 孟利著. -- 哈尔滨 : 黑龙江大学出版社, 2010.7

ISBN 978 - 7 - 81129 - 300 - 5

I. ①西… II. ①孟… III. ①发酵食品:乳制品 - 研究 - 西藏 IV. ①TS252.54

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 115197 号

书 名 西藏灵菇
著作责任者 孟利
出 版 人 李小娟
责 任 编 辑 赵丽华
出 版 发 行 黑龙江大学出版社(哈尔滨市学府路 74 号 150080)
网 址 <http://www.hljupress.com>
电 子 信 箱 hljupress@163.com
电 话 (0451)86608666
经 销 新华书店
印 刷 哈尔滨海天印刷设计有限公司
开 本 880 × 1230 1/32
印 张 5.5
字 数 127 千
版 次 2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 300 - 5
定 价 19.80 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

前 言

西藏灵菇(Tibetan Mushroom, TM)又称西藏雪莲,是我国的传统乳制品发酵剂。西藏灵菇是以微生物胞外多糖为基质,栖息有大量乳酸菌、酵母菌和醋酸菌的微生物共生体。根据资料报道,西藏灵菇具有增强人体抵抗机能,改善动脉硬化,降血压,治疗胰、肝、胆疾病等功效,而西藏灵菇胞外多糖是否为西藏灵菇上述功能的物质基础尚不清楚。

本研究以实验室保存的西藏灵菇为材料,通过对西藏灵菇菌粒的发酵培养,对西藏灵菇胞外多糖的测定、提取、分级试验,得到西藏灵菇分泌的西藏灵菇胞外多糖的主要组分,并对其免疫调节作用及机制和化学结构进行研究,据此初步筛选胞外多糖生产菌株。

本研究证实了西藏灵菇胞外多糖具有免疫调节作用,并发现其组分和结构不同,其免疫调节作用也不同,这为研究西藏灵菇胞外多糖的结构与功能之间的关系打下了基础。西藏灵菇提取工艺、分级工艺的建立以及对其免疫调节作用的证实,对西藏灵菇的开发和利用有着重要意义。分离到的西藏灵菇胞外多糖

产生菌株有望为干酪、酸奶等乳制品的生产提供新的菌株。

由于笔者学术视野和学术功底所限,书中的错误和不足之处在所难免,恳请广大读者批评指正。

孟利

2010年4月

目 录

1 绪 论	1
1.1 西藏灵菇菌系	2
1.2 开菲尔菌系的研究	3
1.3 开菲尔及西藏灵菇生理功能的研究	5
1.4 开菲尔基质及其产生菌株的研究	6
1.5 乳酸菌胞外多糖的研究进展	9
小 结	34
2 西藏灵菇菌粒储存与发酵特性的研究	36
2.1 西藏灵菇储藏特性的研究	37
2.2 西藏灵菇发酵特性的研究	41
小 结	45
3 西藏灵菇胞外多糖测定方法的研究	46
3.1 总糖含量的测定	46
3.2 西藏灵菇胞外多糖的测定	49
3.3 还原糖含量的测定	53
3.4 相对分子质量的测定	55
小 结	58

4	西藏灵菇胞外多糖提取研究	59
4.1	提取胞外多糖工艺流程	59
4.2	提取胞外多糖参数的研究	60
4.3	聚酰胺法去除发酵液中蛋白质的研究	65
4.4	西藏灵菇胞外多糖分级工艺的研究	73
	小 结	87
5	免疫调节作用及机制的研究	88
5.1	试验动物分组	88
5.2	ZLW1 和 ZLW2 对迟发型变态反应的影响	90
5.3	ZLW1 和 ZLW2 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的 影响	92
5.4	ZLW1 和 ZLW2 对小鼠血清溶血素的影响	94
5.5	ZLW1 和 ZLW2 对小鼠 NK 细胞活性的影响	97
5.6	ZLW1 和 ZLW2 对小鼠脏体指数的影响	100
5.7	ZLW1 与 ZLW2 对小鼠腹腔巨噬细胞中 COX-2 和 Erk 蛋白表达的影响	101
5.8	ZLW1 与 ZLW2 对巨噬细胞杀伤胃癌细胞能力的 影响	105
	小 结	109
6	ZLW1 与 ZLW2 结构的研究	111
6.1	ZLW1 和 ZLW2 单糖组成的测定	111
6.2	ZLW1 和 ZLW2 结构分析	122
	小 结	131

7 西藏灵菇菌系产胞外多糖菌株的分离	132
7.1 西藏灵菇菌系菌落计数与分离	132
7.2 胞外多糖相对分子质量分析	140
小 结	142
参考文献	143
附 录	154
附录 I 试验用仪器	154
附录 II 试验用试剂	155
附录 III 培养基	157
附录 IV 溶液的配制	158
附录 V SDS 聚丙烯酰胺凝胶的配制	160

1 绪 论

多糖是除核酸和蛋白质外的一类重要的生命物质,多糖生物学被称为“生物化学最后的巨大前沿之一”。20 世纪 80 年代以来,由于现代分离、分析技术及生物技术的发展,人们对体内糖链结构惊人的复杂性与多样性才有了基本的认识,了解了糖作为信息分子参与生命体内的识别过程。越来越多的资料表明,在生命过程中,糖及其复合物的的重要性同蛋白质和核酸具有同等的地位。

多糖、寡糖以及它们与蛋白质、脂类等结合形成的糖复合物涉及到细胞,特别是多细胞生命的全部时间和空间过程。首先,它们作为信息分子参与细胞的各种识别过程,如传递生物信息、参与机体的免疫调节与细胞分化、受精、胚胎发育、感染、衰老等。因此,对生命体中的生物信息调控因子糖类的研究是必不可少的。

国内对多糖的研究起步较晚,主要对中药材来源的多糖研究较多,从灵芝、黑木耳、裂褶菌、安络小皮伞、雷丸、针裂蹄、蜜环菌、亮菌、斜顶菌、冬虫夏草、猴头菌、山药、汉防己、芦荟和碧叶中提取出具有显著生理活性的多糖均一体,如云芝糖肽、银耳多糖、刺五加多糖、交联淀粉、苦豆子胶、田薯胶。

发酵乳制品的保健作用日益受到关注,研究发现多种发酵

乳制品具有降血压、抑制肿瘤等生理功能,这些生理功能与发酵乳制品中的乳酸菌及其代谢产物有关,如乳酸菌的定植、改善肠道内环境与乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)有关,特别是完整细胞壁肽聚糖具有抗肿瘤的作用。微生物学家正致力于选育具有更加全面的保健功能、发酵性能优良的乳酸菌菌种。乳酸菌胞外多糖在用于改善发酵乳的组织状态的同时,也是潜在的生物活性载体,并且可以直接应用到食品当中,这也使得它作为一个新的研究热点正渐渐兴起。寻找具有生理功能的特殊的乳酸菌胞外多糖一直是研究人员关心的问题。而国内这方面的研究只在近几年才有少数报道,其内容涉及少数乳酸菌的生物合成^[1]、生理功能^[2-3]及在酸乳中的加工特性^[4-6]。

西藏灵菇发酵乳具有的生理功能及菌系组成越来越受重视,而关于西藏灵菇菌粒胞外多糖的结构特点及生理功能的报道却很少。对其胞外多糖的组成及结构,以及不同结构的多糖所具有的生理功能的研究,可以为西藏灵菇菌系、胞外多糖的开发利用提供科学依据,也可为揭示西藏灵菇菌粒的形成、菌系的和谐共生、多糖的构效关系提供重要的理论依据。

1.1 西藏灵菇菌系

西藏灵菇是一种古老的发酵乳制品,来源于西藏,是将乳放在用山羊皮或绵羊皮制成的皮袋中自然发酵而成的,长期发酵后会在袋子中形成独特的菌粒(如图1-1所示)。现今流行的西藏灵菇是以自然产生的菌粒为菌种发酵鲜乳或脱脂乳而成的乳制品。西藏灵菇菌系栖息于自身分泌的胞外多糖基质上,在乳中长期培养仍能保持菌相平衡,具有增殖再生能力,这是微生

物领域中的奇迹。在民间,人们认为西藏灵菇能够增强人体抵抗机能,治疗心脏病,改善动脉硬化,降血压,降低胆固醇;治疗胰、肝、胆疾病如胆囊炎、胆结石等;缓解胃溃疡、十二指肠溃疡炎症;治疗肾病,延缓衰老,消除疲劳。西藏灵菇发酵乳的生理功能少数几项已被科学研究证实,而对西藏灵菇胞外多糖生理功能的研究目前国内才刚刚开始^[3]。



图 1-1 西藏灵菇菌粒

目前,关于西藏灵菇菌系的研究报道较少。孙培灵^[7]用孟加拉红培养基分离酵母菌,用 SL 改良培养基分离乳杆菌,用 EI-likar 培养基分离乳球菌,用碳酸钙豆芽汁琼脂分离醋酸菌,并用生理生化试验初步鉴定得到了纯化的菌株,表明西藏灵菇菌系中有明串珠菌、短乳杆菌、瑞士乳杆菌、醋酸菌、球拟酵母、毕赤酵母和克鲁维酵母。

1.2 开菲尔菌系的研究

从现有的资料来看,西藏灵菇的形态、菌相组成与开菲尔粒(kefir)相似。开菲尔来源于高加索山脉,而西藏灵菇来源于我

国西藏。目前,对开菲尔菌系的研究比较广泛,研究人员认为开菲尔菌系中含有乳酸菌(包括乳球菌属、乳杆菌属、明串珠菌属)、酵母菌、醋酸菌,这些菌密切共生,并能长期保持菌系平衡。目前对这些菌的共生关系研究得还比较少,一般认为,酵母菌和醋酸菌可以利用蛋白胨生成维生素,将乳酸菌激活,乳糖非发酵型的酵母和醋酸菌在由乳酸菌分解乳糖所产生的乳酸中生长。随着 pH 值的降低,同型发酵乳酸菌的生长赋予了开菲尔特殊的风味和特征^[8]。

大量的研究表明,不同的菌株来源、不同的发酵条件和生产工艺下,西藏灵菇菌粒的活力受到抑制,酵母菌产生酒精的速度也随之减慢。它们代谢产生的乳酸、乙醇和 CO₂ 的量将影响上述菌相的平衡。开菲尔粒是一个巨大的益生菌库,是分离纯化食品工业上具有优良特性微生物的重要来源,其主要菌相组成如表 1-1 所示。

表 1-1 开菲尔菌系的组成

分类	菌株名称
乳球菌	乳酸乳球菌乳酸亚种(<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)、乳酸乳球菌丁二酮乳酸亚种(<i>Lactis</i> subsp. <i>diacetilactis</i>)、乳酸乳球菌乳脂亚种(<i>Lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>)
乳杆菌	嗜酸乳杆菌(<i>L. acidophilus</i>)、德氏乳杆菌(<i>L. delbrueckii</i>)、德氏乳杆菌乳酸亚种(<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>)、瑞士乳杆菌(<i>L. helveticus</i>)
肠膜明串珠菌	肠膜亚种(<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>)、肠膜明串珠菌葡聚糖亚种(<i>L. mesnteroides</i> ubsp. <i>dextranicum</i>)
酵母菌	乳酸酵母(<i>Saccharomyces lactis</i>)、脆壁酵母(<i>Saccharomyces fragilis</i>)、马克斯克鲁维酵母(<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
醋酸菌	纹膜醋酸杆菌(<i>Acetobacter aceti</i>)、醋酸杆菌(<i>A. sancens</i>)

1.3 开菲尔及西藏灵菇生理功能的研究

开菲尔菌系可以分解乳糖产生乳酸,并且 $L-(+)$ -乳酸的含量较高,故开菲尔乳品适宜乳糖不耐症者饮用。同时,在 $L-(+)$ -乳酸作用下人体对钙、磷、铁的吸收可以得到改善,而且开菲尔中 B 族维生素(维生素 B_1 、维生素 B_2 、维生素 B_6 、维生素 B_{12} 、叶酸、尼克酸等)的含量亦比普通酸奶高。最近研究证实,开菲尔乳品具有较好的降血脂、降胆固醇和降血糖的功效。

姜岩给小鼠喂饲高脂饲料,将饮用开菲尔酸奶组与饮用普通酸奶及饮用水的对照组进行比较,发现开菲尔组小鼠血清中的甘油三酯和胆固醇的含量均比对照组及酸奶组低;在糖尿病模型鼠的试验中,开菲尔组小鼠的血糖含量显著降低^[9]。肖琳琳从西藏灵菇中分离筛选到 1 株高效降胆固醇乳酸菌 KM-16,在液体培养基中 KM-16 对胆固醇的降解能力达 51.8%,用 KM-16 灌胃高脂血症模型小鼠研究其对血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)的影响,结果表明:灌胃 14 d 后,试验组小鼠血清中 TC 和 TG 的浓度较对照组显著降低($p < 0.01$),同时 HDL-C 浓度有所增加,动脉硬化指数(AI)低于对照组的水平^[10]。

Rodrigues 等^[11]用角叉菜胶、葡聚糖、组胺诱导大鼠产生肉芽瘤和爪水肿,发现用开菲尔蔗糖水悬浮液($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、开菲尔多糖提取物的水溶液(0.1%)及开菲尔发酵乳都能够抑制肉芽瘤的增长,抑制率分别为 41%、34% 和 44%,三者对水肿也均有抑制作用。该作者还对开菲尔和开菲尔多糖(kefiran)抑制几种细菌和白色假丝酵母的作用和对大鼠局部皮肤损伤愈合的作

用进行了研究,发现开菲尔和 kefiran 对细菌和酵母菌均有抑制作用,对化脓链球菌的抑制作用尤为明显,对皮肤局部涂抹 7 d 可以收到比新霉素软膏更好的愈合效果。

Santos 等^[12]对从开菲尔中分离出的 58 种乳杆菌在人体肠道的存活能力和益生作用进行了评价,分别测定其对人的肠内 Caco-2 细胞的黏附作用、低 pH 值时的耐受性以及胆汁酸的耐受性、抗肠道致病菌 *Salmonella tybimurium* 与肠内 Caco-2 细胞黏附的作用。结果表明 *L. acidophilus* CYC10051 和 *L. kefiranofaciens* CYC10058 具有较好的上述益生作用。此外,kefiran 可以显著提高便秘小鼠粪便的湿度和重量,这说明 kefiran 具有改善肠道菌群的功能。

经研究证实,西藏灵菇具有消炎、抑菌、促进伤口愈合的功能。Diniz 等^[13]将西藏灵菇在糖蜜中发酵的上清液和西藏灵菇颗粒捣碎物的生理盐水溶液敷到肉芽瘤组织和水肿的小鼠爪上,试验证明二者均具有明显的消炎效果,并且上清液的效果比颗粒溶解物的效果好。

上述研究成果表明,开菲尔和西藏灵菇具有许多生理功能,其中的一些生理功能 kefiran 也具备,但对西藏灵菇及其胞外多糖的生理功能的研究报道较少。

1.4 开菲尔基质及其产生菌株的研究

La Riviere 和 Kooiman 等认为,开菲尔粒中含有 50% 的黏性多糖,该多糖是由葡萄糖和半乳糖以 1:1 的比例组成的中性多糖,该多糖称为 kefiran,并认为 *L. brevis* 是产生 kefiran 的菌株^[14-15]。人们后来发现 *S. mutans*, *L. mesenteroids* 和 *S. cremoris*

也可以产生胞外多糖。Kandler 等^[16]认为 *L. kefir* 是胞外多糖的主要产生菌。Fujiwara 等^[17]从开菲尔粒中分离出 *L. kefiranofaciens*, 并认为该菌株为主要的 kefiran 产生菌。Van den Berg 等^[18]对来源于格鲁吉亚的开菲尔粒进行了测定, 其中含蛋白质 2.0%、脂肪 1.7%、灰分 0.4%, 经凝胶过滤色谱研究发现多糖的相对分子质量为 1×10^6 左右 ($0.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$)。

后来, Yokoi 等^[19]直接对开菲尔菌系中的菌种产胞外多糖的能力和种类进行了研究, 结果见表 1-2, 表明在厌氧培养条件下, 用分离产荚膜多糖乳酸菌的培养基能分离出 KPB-167A, KPB-167B, KPB-167C, KPB-167D, KPB-167E。这几个菌株为革兰氏阳性、不运动、过氧化氢酶阴性、无芽孢、可形成 *D, L*-乳酸的杆菌, 主要产 *D*-乳酸, 产量为 $300 \sim 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而且 65%~85% 存在于发酵液中。

表 1-2 开菲尔中产胞外多糖菌株及胞外多糖特征

菌株	产量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$M_{\text{葡萄糖}}:M_{\text{半乳糖}}$	相对分子质量
KPB-167A	406.6	1.00:0.88	$4 \times 10^6, 1 \times 10^6, 1.5 \times 10^6$
KPB-167B	379.1	1.00:0.93	$4 \times 10^6, 1 \times 10^6, 1.5 \times 10^6$
KPB-167C	379.8	1.00:0.98	$4 \times 10^6, 1 \times 10^6, 1.5 \times 10^6$
KPB-167D	383.2	1.00:0.93	$4 \times 10^6, 1 \times 10^6, 1.5 \times 10^6$
KPB-167E	273.8	1.00:0.90	$4 \times 10^6, 1 \times 10^6, 1.5 \times 10^6$

Ginka 等^[20]研究了开菲尔粒中的乳酸菌产生的胞外多糖, 在含有 3% 的脱脂乳中培养筛选, 研究结果见表 1-3。结果表明: 9 株 *L. bulgaricus* 菌株中 50% 以上可以产生胞外多糖, 单糖组成(摩尔质量比)为 1.00: (0.91~0.98), 单菌株培养多糖产

量为 $472.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; *L. bulgaricus* HP1 与 *S. thermophilus* T15, *L. lactis* C15, *L. helveticus* MP12, *S. cerevisiae* A13 协同培养时, 多糖的产量最高为 $824.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此认为 *L. bulgaricus* HP1 为 kefiran 的产生菌。Ginka 还对其他菌株产生胞外多糖的能力进行了研究。下面是从开菲尔中分离到的具有产胞外多糖能力的菌株及其所产生的多糖的单糖组成及产量。

表 1-3 开菲尔中胞外多糖菌株及胞外多糖特征

菌株	产量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	葡萄糖/%	半乳糖/%	甘露糖/%
<i>L. bulgaricus</i> HP1	460.27	50.48	48.80	—
<i>L. bulgaricus</i> HP2	147.23	50.76	49.85	—
<i>L. bulgaricus</i> HP4	195.37	51.79	47.34	—
<i>L. bulgaricus</i> HP6	298.83	51.36	47.95	—
<i>L. bulgaricus</i> HP7	370.30	50.87	49.35	—
<i>L. helveticus</i> MP14	22.63	65.23	34.44	—
<i>L. helveticus</i> MP17	20.67	68.66	30.72	—
<i>S. thermophilus</i> T10	31.40	41.52	57.12	1.24
<i>S. thermophilus</i> T16	19.13	43.63	55.41	0.75

Micheli 等^[21]分离得到产荚膜多糖的 LM-17 菌株, 该菌株可以产生胞外多糖, 所产生的胞外多糖与 kefiran 相同, 测定其黏性为 Huggins 和 Kraemer 平均值 $5.45 \sim 2.69 \text{ Pa} \cdot \text{s}$, 1% 的胞外多糖其旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 $+64^{\circ}$, 该菌株培养后胞外多糖产量为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

上述研究表明, 具有荚膜的乳酸菌可以产生多糖, 组成 kefi-

ran 及从开菲尔中分离的菌株产生的胞外多糖的单糖可能有葡萄糖、半乳糖和甘露糖,其相对分子质量范围一般在 $0.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 之间。同样上述结果也提出了以下问题:

①开菲尔中是否只存在一种多糖,即是否还有具有某一相对分子质量或相似结构单元的多糖;

②开菲尔中固有的多糖是否是某一菌株的代谢产物或是几个菌株代谢产物的混合物,亦或是由整个菌系相互共生而产生的,所产生的多糖是否随着发酵条件、共生菌的存在与否等因素发生改变。

1.5 乳酸菌胞外多糖的研究进展

目前对西藏灵菇胞外多糖的研究较少,但对乳酸菌胞外多糖的研究在国内外相对较多。对乳酸菌胞外多糖的研究主要涉及提取、分离、生理功能、结构及在食品工业中的应用等方面。

1.5.1 乳酸菌胞外多糖提取方法研究

糖类是含有多羟基的一类化合物,极性大。单糖易溶于水,难溶于非极性的有机溶剂,而低聚糖基本保持着与单糖类似的物理性质,多糖的物理性质随其聚合度的加大而与单糖差异加大。多糖一般为非晶型结构,无甜味,难溶于水,或溶于热水成为胶体溶液。有的多糖不溶于水,甚至不溶于酸。糖类的提取与分离技术很复杂,纯化也比较困难,获得糖的粗提取液后,除去其中杂质,还要进行混合糖的分离纯化。要得到纯净的多糖样品,其工作量大,技术过程繁杂,常常需要综合考虑以下各种方法。乳酸菌胞外多糖一般易溶于水而不溶于乙醇,可在去除