

细菌胞外多糖的研究进展

The progress on extracellular polysaccharide of bacteria

李江¹, 陈靠山², 郝林华², 李光友²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局生物活性物质重点实验室 山东 青岛 266061)

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2006)04-0074-04

多糖在自然界高等植物、藻类、细菌及动物体内均有存在, 分布极广。通常植物和藻类来源的多糖较为普遍, 但近些年来, 微生物来源的多糖越来越引起人们的广泛注意^[1]。尤其是细菌和真菌的胞外多糖, 因其易于分离纯化而且产量高等优点在工业生产中颇受人们青睐^[2]。

不论是在自然或是病理条件下, 多数细菌均被胞外多糖所包被。这些胞外多糖的存在可能是菌体对环境中普遍存在的抗菌物质的反应, 如, 表面活性物质、细菌毒素、噬菌体、抗生素、抗体以及吞噬细胞等, 所以包被于野生菌株表面的胞外多糖对细菌的粘附以及在竞争环境中的存活和生长都具有重要的作用^[3]。近年来研究发现多种细菌的胞外多糖具有很强的生物学活性。作者就胞外多糖的概念、性质、功能、结构、合成机制及应用等, 结合自己的工作, 做一简单综述。

1 胞外多糖的概念

胞外多糖(extracellular polysaccharides)简称EPSs, 是指广义的细菌胞外多糖, 即细菌细胞外的含糖的结构^[4], 包括革兰氏阴性菌细胞膜外的多糖成分以及革兰氏阳性菌的肽聚糖。为了避免混淆, 有人认为胞外多糖应该用ECPSs表示。ECPSs通常包括两个部分: 荚膜多糖(capsular polysaccharides, 简称CPSs)和一部分混合的多糖(mixed group of polysaccharides, 简称PSs), 该部分与细胞膜松散结合甚至根本不结合, 主要是一些粘液和EPSs。CPSs和EPSs是很难区分的, 因为CPSs通常会失去与细胞膜的结合而溶到介质中^[5]。

2 胞外多糖的性质

研究表明, 通常在自然条件下, 细菌表面均被一层厚的、连续的且高度有序的水合多聚阴离子胞外

多糖所包被, 该结构可能会影响细胞对一些大分子物质及离子(包括质子)的摄取^[6]。

细菌的胞外多糖通常是高度水合的多聚物, 其纤维结构的排列方式, 源于体外培养的大肠杆菌的水合胞外多糖的X射线衍射图^[7]。

细菌荚膜层的组成可以是简单的同聚物, 也可以是许多单糖的异聚物, 这些多糖主要是中性己糖、 α -脱氧己糖、多元醇、糖醛酸和氨基糖, 另外还有磷酸盐、甲酸、丙酮酸和琥珀酸等作为一些替代物。对于胞外多糖的化学成分分析有时会有一些偏差, 因为从培养物中收集粘液时会不可避免地混杂一些水解的细胞成分, 如, 核酸、细胞质多糖等。

3 胞外多糖的结构和功能

3.1 胞外多糖的结构

革兰氏阳性菌的胞外多糖通常很复杂, 而革兰氏阴性菌胞外多糖的结构相对比较简单, 通常是同多糖(一般是由D葡聚糖组成)或杂多糖。后者通常是由双糖至八糖形成的规则的重复单位构成, 而这些重复单位则是由2~4种单糖所组成, 其中许多糖被乙酰基团所修饰。最常见的乙酰基团是乙酸酯和丙缩酮, 但有些EPS则具有琥珀酰半缩酯。由于缩酮或是糖醛酸的存在, 使多聚阴离子糖链得以形成。只有细菌的藻酸缺乏规则的结构, 在这些多聚物的随机排列的结构中发现了D甘露糖、L古洛糖残基, 而且多数甘露糖残基被乙酰化。还有一些多糖具有较大的重复

收稿日期: 2005-04-05; 修回日期: 2005-12-20

基金项目: 国家863计划项目(2002AA244031)

作者简介: 李江(1972), 男, 河北宣化人, 博士研究生, 研究方向: 海洋活性物质的分离提取, E-mail: lijia2565@126.com; 陈靠山, 通讯联系人, E-mail: ksc313@126.com



单位和其它的乙酰基团,其中包括根瘤杆菌属(*Rhizobium*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*)细菌分泌的琥珀多糖,它由D葡萄糖和D阿拉伯糖组成的八糖重复单元构成,并且带有 α -乙酰基、 α -琥珀酰半缩酯和丙缩酮基团^[8]。

3.2 胞外多糖的功能

Costerton 等人^[3]主要研究细菌的生物膜,认为胞外多糖的产生及作用是生物膜形成的机制之一。在早期的工作中,也观察到了细菌胞外多糖使细菌群集形成砖墙样有序结构^[9]。关于胞外多糖在医学微生物学中的作用较多:胞外多糖使细菌群集抵抗吞噬,能够保护细菌不与抗体结合;形成群集内细菌交替性生长,Cheng 等^[10]称之为隐性生长;胞外多糖还可以帮助细菌群体向周围获得足够营养。另外,蓝细菌的胞外多糖还具有特有的生物学活性,包括抗辐射、抗氧化等特性以及潜在的抗肿瘤、抗病毒、降低胆固醇含量等作用^[11]。海洋和其它水生环境的流动性迫使有些生物必须具备相应的粘性结构或粘性物质,以保证海洋生物有一个相对稳定的生态环境。已证实,在海洋环境中细菌胞外多糖在不可逆的粘附作用中起到了非常重要的作用。细菌总是倾向于群集的、固着的而不是游动的方式,Tjojo 等人^[12]早在20世纪就认识到水生细菌的这个生活特性。细菌的这种倾向是普遍存在的,而且较同种的浮游的细菌相比具有很强的生存优势^[13, 14]。除此之外,胞外多糖形成的膜结构能防止细胞脱水,增强致病菌的感染力,有些还能吸引海洋无脊椎动物幼虫栖息,形成了有生机的小生态,胞外多糖还能与重金属结合,保护细胞不受毒素影响^[15]。

3.3 胞外多糖结构和功能的关系

任何微生物胞外多糖的物理特性都取决于它的初级、二级和三级结构。如,黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)多糖,由于支链的存在形成一个聚集体,从而增加溶解度成为可溶的纤维素。支链的存在使得线性多糖大分子结构的混乱度增加,通过抑制其有序的聚合而增加溶解度。酰基和其它非糖取代基(比如糖醛酸)也能很大程度地改变糖的性质,一些大分子由于没有糖醛酸而成为不溶性物质。当然其溶解性主要还是取决于糖链骨架的连接方式,如在右旋构象中,B(124)键要比A(122)键的刚性大。在黄单胞菌多糖的深入研究中,许多带有不同酰基的胞外多糖已经从不同的变异菌株中得到,这些黄单胞菌多糖的正常的有序结构是一种双螺旋结构,但是它们的变性温度却有很大差异(50~90e),主要是由其所带的酰基类型、乙酰化的程度和溶液中盐离子的浓度决定的。在变性过程中,丙酮酸和乙酸分别能够增加和降低有序结构的稳定性,此外,盐离子能够增加其稳定性的同时提高变性温度。

藻酸盐的单体排列顺序以及乙酰化程度对其物理化学性质的影响,提供了另一个胞外多糖结构和功能关系的例子。有人对产气巴斯德氏菌(*Pasteurella aerogenes*)和棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)菌株中提取的胞外多糖与海洋藻类商品多糖进行了比较,未被酰基化的藻酸盐显示出了较强的、选择性地结合 Ca^{2+} 和 Sr^{2+} 的能力,而*A. vinelandii*菌株中的藻酸盐被酰基化后对离子的结合能力大大下降,另外对 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的结合也缺乏选择性。

另外从类杆菌属(*Bacteroides fragilis*)9343中分离的PSA1和PSB,从*B. fragilis*638中分离的PSA2以及肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的荚膜多糖Sp1,尽管它们结构各不相同,但却具有相似的生理特性。PSA1和PSA2是中性多糖,而PSB和Sp1却是多聚阴离子结构,但它们都具有相似的免疫活性。对于具有不同结构却能激发相似的免疫反应现象的解释是,构成多糖免疫活性的结构基础是其三维构象和空间带离子的结构。由于不同结构的多糖具有相同的三维构象从而构成相似的离子支架供离子附着。为了验证该假设,对PSA2和Sp1的三维结构进行了NMR扫描、分子力学和分子动力学测定。PSA2形成一种外延的螺旋结构,每个螺旋包含两个重复单元,螺距为20!埃,所有的离子都有规律地暴露在該多聚物的外侧,这种结构使得其很容易与其它分子结合,螺旋之间形成的大沟布满了成对的兼性离子。令人吃惊的是,Sp1形成的螺旋结构以及阳离子的空间分布与PSA2非常相似。该结果很好地支持了前面的假设,即多糖的三维结构和所带离子的分布方式决定了其特有的免疫活性^[16]。

4 胞外多糖的生物合成机制

有些细菌在其生长的全过程中均能分泌EPS,有些细菌则只在其对数生长期和稳定期分泌。胞外多糖在营养不平衡(如,高的CBN比)和较低培养温度的条件下有利于其合成,通气量、离子浓度对其合成也会造成影响^[17]。

细菌胞外多糖的合成机制不是完全相同的,一些革兰氏阳性菌其胞外多糖多聚物是在细胞表面或在溶媒中生成的,而且在同聚物的生成过程中也不需要核苷酸二磷酸糖前体和脂类载体的参与,但它们需要外源的蔗糖或其它双糖作为糖基供体^[18]。而革兰氏阴性菌胞外多糖(包括杂多糖和同多糖)的合成则是在细胞内合成的,在革兰氏阴性菌胞外多糖的合成过程中,核苷酸二磷酸糖起了关键的作用。核苷酸二磷酸糖不仅提供了活化的同多糖,而且使得菌体内的各种同多糖通过差相异构、脱氢、脱羧反应相互转化。胞外多糖的合成包括以下四步:首先,同多糖的激活,其激活是通过糖核苷酸来实现的;接下来是单糖有序地加到类异戊二烯酯上,形成重复单元,与此同时加



入乙酰基团(如果有乙酰基团存在);在重复单元形成多聚物后经由细胞壁或细胞膜复合分泌物分泌到外环境中。高度特异的糖载体,影响同多糖和乙酰基团向位于原生质膜上的类异戊二烯酯受体的转运,而类异戊二烯酯的活性则是合成胞外多糖的关键所在。因而低的培养温度和低的生长速度,使得更多的类异戊二烯酯受体用来合成胞外多糖。

5 重要的胞外多糖及其应用

5.1 胞外多糖在食品领域的应用

黄原胶(*Xanthomonas campestris* 菌的胞外多糖),可作为色拉调味汁、熟食、半熟食和方便食品的稳定剂和粘稠剂。在烘烤食品中,可以提高淀粉颗粒的粘合,还可以在不损失水分的情况下保持外形,延长保质期。还有在冷冻食品中,黄原胶的加入可以锁住游离水分提高产品品质,同时限制冰晶的生长保持产品风味^[19]。吉兰糖胶在很多类食品中也有应用,如布丁、甜食、冷冻食品、饮料、奶产品、水果酱、面包填充物、冰激凌、香肠等^[20]。

还有作为食用菌的乳酸菌,其产生的 EPSs 在安全性食品添加剂的应用方面具有巨大潜力,不仅可以提高天然发酵奶产品的品质和粘度还可以抑制其凝固^[21]。

5.2 胞外多糖的生物学活性

有报道称,乳酸菌的 EPS 具有免疫激活^[22]和抗肿瘤作用^[22],其磷酸基团在激活巨噬细胞和淋巴细胞方面发挥了重要的作用^[23~25]。顾笑梅^[26]从坚韧肠球菌(*Enterococcus durans*) Z222 的发酵液中分离提取了胞外多糖 EPS1,并将该多糖用于治疗荷肉瘤 S180 的小鼠,发现 EPS1 能增强免疫力低下的荷肉瘤小鼠的免疫功能;体外细胞免疫试验进一步表明 EPS1 对体外小鼠免疫细胞具有调节作用。

Umezawa^[27]对 1 063 株从海洋中分离的细菌做了较为系统的研究,结果发现 167 株菌株产生大量的胞外聚合物,其中湿润黄杆菌(*Flavobacterium uligi2 nasum*)产生的胞外多糖 marinactan 具有明显的抗癌活性,体内实验在低剂量 10~50 mg/kg 对实体瘤 S180 的抑瘤率可达 70%~90%。Okutani 和 Shige2 ta^[28]从海洋假单胞菌属(*Pseudomonas*) H A2318 分离到的多糖,具有很强的抗 HIV 活性。另外,黄耀坚^[29]等从厦门海区潮间带的动植物体及底泥分离筛选到一株高产胞外多糖的菌株 1 202,其产生的胞外多糖可显著地促进昆明种小白鼠脾淋巴细胞 II22 的合成,并对小鼠 S180 肉瘤具有较强的抑制作用。

另有报道,从海洋弧菌属提取的胞外多糖具有抗肿瘤活性。小鼠试验表明,该糖对白血病 P388 和肉瘤 180 细胞均有一定的抗性^[30]。一株海洋假单胞杆菌属细菌 WAK21 可以产生粘多糖和硫酸化的胞

外多糖。在对它们抗病毒活性的测试中发现,后者显示出了抗 HSV21 活性^[31]。

5.3 在其它领域的应用

细菌胞外多糖因其特殊的流变学性质,在化妆品和医药等行业也有重要的应用,比如微生物培养基、植物组织培养基、室内装潢、药物的缓释剂、防晒霜、润肤液、头发定型剂、牙膏等^[20]。

6 展望

随着有活性的细菌胞外多糖的不断发现,胞外多糖的研究也越来越引起人们的关注。而且为了获取新型的胞外多糖,越来越多的新的菌种不断被发现。早在七八十年代人们就把研究的领域扩展到了海洋,并且相继发现了许多具有重要应用价值的菌种,其中也包括产生胞外多糖的菌种。随着研究范围的进一步扩展,人们已经把眼光投入到极地中,自 1980 年 Ekebf 首次报道在南极分离出微生物后,各国的微生物学家相继在南极地区进行了大量的研究工作,证实了在南极冰、雪、水、土壤及岩石样品中广泛存在着各种类型的微生物。南极是一个潜在的、重要的微生物资源库,它不仅是微生物新种属的生存繁衍地,也是具有独特生态系统微生物的生存繁衍地,更是产新型生物活性物质和先导化合物(如酶、抗生素、多糖及脂类等)菌株的潜在种源地^[32]。有报道称在南极大陆土壤中分离的丝状真菌 CCFEE 5080 不但能够产生胞外多糖,而且能够利用多种碳源,最高产量可达 13.6 g/L^[33]。这些报道加之南极有利于胞外多糖合成的气候条件,如寡营养、低的生长温度等,增强了人们从南极细菌种中寻找具有独特结构、高活性的胞外多糖的信心,作者所在的实验室已开始该领域的研究,以期获得特殊意义的南极菌胞外多糖。

参考文献:

- [1] Elena L, Israel R, Anzeles S M. Extracellular poly2 saccharides production by *Arthrobacter viscosus* [J]. *Journal of Food Engineering*, 2003, 60: 462~467.
- [2] Adilma S, Daniela M, Heloiso F, et al. Structural studies of CV270 polysaccharide [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1997, 21: 1152~121.
- [3] Costerton J W, Irvin R T, Cheng K J. The bacterial glycocalyx in nature and disease [J]. *Annu Rev Micro2 biol*, 1981, 35: 299~305.
- [4] Igor M S, Vladimir V I. Extracellular polysaccharides and polysaccharide2 containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant root [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 165: 223~229.
- [5] Costerton J W, Irvin R T, Cheng K J. The role of bacterial surface structures in pathogenesis [J]. *Crit*

- Rev Microbiol, 1981, 8: 30338.
- [6] Cheng K J, Ingram J M, Costerton J W, Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH [J]. *Bacteriol*, 1970, 104: 748753.
 - [7] Moorehouse R, Winter W T, Arnott S, et al. Con2 formation and molecular organization in fibers of the capsular polysaccharide from *Escherichia coli* M41 mutant[J]. *Mol Boil*, 1977, 109: 37391.
 - [8] Sutherland I W. Microbial polysaccharides from Gram2 negative bacteria [J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11: 663674.
 - [9] 徐启旺. 烫伤创面绿脓杆菌定植动态的实验研究 [J]. *中国微生态杂志*, 1989, 1: 34239.
 - [10] Cheng K J, Irvin R T. Autochthonous and pathogen2 ic colonization of animal tissues by bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1981, 27: 462464.
 - [11] 黄泽波, 刘永定. 蓝细菌多糖及应用研究概况 [J]. *生物技术通报*, 1997, 4: 26232.
 - [12] Tojo M N, Yamashita D, Goldmann N, et al. Isola2 tion and characterization of a capsule polysaccharide adhesion from *Staphylococcus epidermidis* [J]. *In2 fect Dis*, 1988, 157: 713722.
 - [13] Costerton J W, Cheng G G, Geesey T I, et al. Bact2 erial biofilms in nature and disease [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41: 433464.
 - [14] Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P. Bact2 erial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284: 13181322.
 - [15] Wrangstadh M, Szewzyk U, Ostling J, et al. Star2 vation2specific formation of a peripheral by a marine *Pseudomonas* sp., strain S9 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(7): 20632072.
 - [16] Arthur T, Julia Y. Biological chemistry of immuno2 modulation by zwitterionic polysaccharides [J]. *Car2 bohhydrate Research*, 2003, 338: 25322538.
 - [17] Fletcher M, Floodgate G D. An electron2microscop2 ic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surface [J]. *Gen Microbiol*, 1973, 74: 32334.
 - [18] Gibbons R J, Nygaard M. Inter bacterial aggregation of plaque bacteria. [J]. *Arch Oral Biol*, 1968, 13: 124921262.
 - [19] Barbara K. Properties and applications of xanthan gum [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59: 8284.
 - [20] Chandrasekaran R, Radha A. Molecular archite2 ctures and functional properties of gellan gum and r2 elated polysaccharides [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, 5(6): 1432148.
 - [21] Hosono J, Lee A, Amenati M, et al. Characteriza2 tion of a water soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M10124 [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, 61: 312316.
 - [22] Ebina T, Ogata N, Murata K. Antitumor effect of *Lactobacillus bulgaricus* 878R [J]. *Biotherapy*, 1995, 9: 6370.
 - [23] Kitazawa H, Harat T, Uemura J, et al. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysacchar2 ides from *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, 40: 162175.
 - [24] Kitazawa H, Ishii Y, Uemura J, et al. Augmenta2 tion of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharides from *Lactobacillus del2 brueckii subsp bulgaricus* [J]. *Food Microbiol*, 2000, 17: 102118.
 - [25] Nishimura2Uemura J, Kitazawa H, Kawai Y, et al. Functional alteration of murine macrophages stimula2 ted with extracellular polysaccharides from *Lactoba2 cillus delbrueckii subsp bulgaricus* OL1073R21 [J]. *Food Microbiol*, 2003, 20: 262273.
 - [26] 顾笑梅, 王富生, 孔键, 等. 乳酸菌 Z222 产胞外多糖 (EPS1) 对免疫细胞功能的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(6): 442445.
 - [27] Umezawa H, Okami Y, Kurasawa S, et al. Marin2 actan, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria [J]. *Antibiot*, 1983, 36(5): 4712477.
 - [28] Okutani K, Shigeta S. Inhibitory effect of sulfated derivatives of a marine bacterium polysaccharide on replication of human immunodeficiency virus invitro [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59(8): 143321448.
 - [29] 黄耀坚, 黄益丽, 刘三震, 等. 具有免疫活性多糖海洋细菌菌株的筛选 [J]. *台湾海峡*, 2004, 23(1): 38242.
 - [30] Matsuda M, Shigeta S, Okutani K. Antiviral activ2 ties of marine pseudomonas polysaccharides and their oversulfated derivatives [J]. *Marine Biotechnology*, 1999, 1(1): 68273.
 - [31] Okutani K. Antitumor and immunostimulant activ2 ties of polysaccharide produced by a marine bacterium of the genus *Vibrio* [J]. *Bull Jap Soc Sci. Fish/Nissu2 ishi*, 1984, 50(6): 103521037.
 - [32] 曾胤新, 陈波. 南极低温微生物研究及应用前景 [J]. *极地研究*, 1999, 11(2): 1432152.
 - [33] Selbmann L, Onofri S, Fenice M, et al. Production and structural characterization of the exopolysaccha2 ride of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFE E5080 [J]. *Research in Microbiology*, 2002, 153(9): 85292.

(本文编辑: 张培新)