

文章编号:1009-038X(2004)06-0013-05

不同碳源对 *Lactococcus* FML02-8 合成胞外多糖的影响

陈晓红¹, 董明盛^{1*}, 黄文利², 刘小莉¹

(1. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: FML02-8 分别以葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳清粉为碳源合成不同量、不同结构的胞外多糖, 经红外光谱分析, 波形、特征吸收波段、波峰强度均有差别; 用 HPLC 法测得的相对分子质量分别为: 41 092, 54 029, 45 468, 46 996, 46 257, 45 468; 用气相色谱法分析得到的单糖组成及摩尔比均不同。结果表明, 碳源不仅影响 FML02-8 合成 EPS 的产量, 而且影响 EPS 的结构, 包括相对分子质量、单糖组成及摩尔比等。

关键词: 乳球菌; 碳源; 胞外多糖; 产量; 相对分子质量; 单糖组成

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Effect of Carbon Sources on Exopolysaccharides Produced by *Lactococcus* FML02-8

CHEN Xiao-hong¹, DONG Ming-sheng^{1*}, HUANG Wen-li², LIU Xiao-li¹

(1. School of Food Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. School of Food Science & Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Strain FML02-8 can use different carbon sources to synthesize EPS with different amounts and structures. EPS_G, EPS_F, EPS_L, EPS_S, EPS_M, EPS_W from different carbon sources were measured by infrared spectroscopic method to analyze their structures preliminarily. All of infrared spectroscopic results showed characteristic band of EPS. The bands were identified as pyranose, mostly in the form of α -conformation, but the band shape, characteristic absorption region and intensity of peak were different. Peak molecular weight (M_p) of different EPS were measured through HPLC, and the results were 41 092, 54 029, 45 468, 46 996, 46 257, 45 468 respectively. EPS were also measured by GC to analyze the composition and mole rate of monosaccharides. The results indicated that, besides the yield of EPS, different carbon sources also affect the structures of EPS, including molecular weight, monosaccharide composition and their mole rate, etc.

Key words: *Lactococcus*; carbon sources; exopolysaccharides; production; molecular weight; monosaccharide composition

收稿日期: 2004-08-18; 修回日期: 2004-09-20.

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)(2002AA248041)和江苏高技术研究发展计划(BG2004322)资助课题。

作者简介: 陈晓红(1968-), 女, 江苏淮安人, 讲师, 食品微生物与生物技术博士研究生; * 责任作者。

乳酸菌胞外多糖(EPS)对于提高发酵乳制品的产品质地和生理功能具有重要意义^[1~3],目前许多关于乳酸菌EPS的研究也集中在提高乳品物理品质(如流变学特性、持水性等)及产量的菌种筛选^[3,4]。对多数乳酸菌而言,培养基中的碳源、氮源及盐类不仅影响EPS的合成量,而且可能影响EPS的结构^[5~8],而乳酸菌胞外多糖的理化特性及结构分析对研究其结构与功能的关系非常重要^[1,2]。中外学者已对嗜酸乳杆菌、米酒乳杆菌、瑞士乳杆菌、乳酸乳球菌乳酸亚种、嗜热链球菌等合成的EPS的结构进行了分析^[8~11]。作者在前期研究的基础上,获得了*Lactococcus* FML02-8以不同碳源产生的不同产量的胞外多糖,采用HPLC法测定各多糖的相对分子质量,用气相色谱法测定多糖的单糖组成及摩尔比,用红外光谱法分析了各结构单位的链接方式,证明了FML02-8以不同碳源合成的多糖的结构、单糖组成及相对分子质量均有差别,这可能是导致它们技术功能和生理功能特性不同的原因,为进一步进行多糖构效关系的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种与培养基 *Lactococcus* FML02-8:由作者所在实验室分离自藏灵菇、鉴定并保藏;

发酵培养基(组分g/dL):糖2.0,蛋白胨2,酵母浸出氮0.5,乙酸钠0.5,柠檬酸三铵0.2,吐温80 0.1, $MgSO_4$ 0.01, $MnSO_4$ 0.005, K_2HPO_4 0.2。pH 7.0。

纯品多糖:FML02-8分别以葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳清粉为碳源发酵合成,用TCA法脱蛋白质,乙醇沉淀法提取,Sephrose 4B纯化,经浓缩后对去离子水透析脱盐,冻干后为纯品,对应纯品多糖代号分别为EPS_G, EPS_F, EPS_L, EPS_S, EPS_M, EPS_W。

1.1.2 试剂 标准多糖为葡聚糖, Sigma公司产品,相对分子质量分别为828, 2 900, 10 000, 70 000, 188 000, 482 000, 2 000 000。

标准单糖:D-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖等,均为Sigma公司产品;气相色谱试剂:OV-1701(固定液)、吡啶、盐酸羟胺、醋酸酐、肌醇六乙酸酯(内标物),均为色谱纯。

1.2 主要仪器

红外光谱仪(5DXB-FT-IR Spectrometer):美国Nicolet公司制造;气相色谱仪:日本岛津 Shi-

madzu GC14A制造;高效液相色谱仪(600/2410):Waters公司制造;真空冷冻干燥机(ALPHA1-2):德国CHRIST公司制造;高速冷冻离心机(64RL):美国BECKEMAN公司制造。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵液中EPS测定 硫酸-苯酚法^[12]。

1.3.2 FML02-8EPS红外光谱分析 KBr压片法^[13]。

1.3.3 HPLC测定FML02-8EPS的相对分子质量

1) 柱的标定及标准曲线制作:取不同相对分子质量的多糖标准品,临用前用流动相NaAc溶液配成标准溶液,10 000 r/min离心10 min,取上清液制作标准曲线,分别按次序由小分子到大分子进样。

2) HPLC检测条件:色谱柱为Water Ultra-hydrogel TM Linear 7.8 mm×300 mm两根串联;流动相为0.1 mol/L $NaNO_3$;体积流量为0.9 mL/min;柱温45℃。

1.3.4 完全酸水解及气相色谱分析 取待分析多糖样品,每5 mg加入2 mol/L HCl(0.1~0.25 mL)封管,105℃水解2.5 h,真空冻干,得黄色片状物,而后进行衍生化。

衍生物的制备(糖腈乙酸酯衍生法):称取10 mg固体水解糖样、10 mg盐酸羟胺和7 mg内标,加入0.5 mL吡啶,放入90℃水中加热30 min并振荡。取出后冷却至室温,加入0.5 mL醋酸酐,在90℃下继续反应30 min进行乙酰化,反应产物直接用于气相色谱分析。

气相色谱检测条件:色谱柱为弹性石英毛细管柱OV-1701 30 m×0.32 mm;程序升温:185(3)-240(25)/3;载气: N_2 ;压力0.60 kg/cm²;体积流量:1 mL/min;燃气: H_2 , 压力0.65 kg/cm²;助燃气(空气)压力0.50 kg/cm²;分流比为30:1;检测器:FID;汽化室温度:260℃;检测器温度:260℃。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对菌体生长和EPS合成量的影响

选择葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳清粉6种碳源,结果见表1。

表1表明,FML02-8能利用供试的6种碳源生长并合成EPS,其中以葡萄糖为碳源时EPS产量最大,达到264.15 mg/L。由表1还可看出,生物量和EPS产量呈现出一定的相关性,生物量高的培养基中EPS的合成量也较大。

表 1 碳源对多糖合成的影响
Tab. 1 Effect of C sources on OD₆₀₀ and EPS

碳源	生物量(OD ₆₀₀)	EPS 产量/(mg/L)
葡萄糖	1.768±0.031	264.15±1.09
果糖	1.403±0.027	230.77±1.01
乳糖	1.388±0.010	209.32±1.23
蔗糖	1.572±0.033	235.77±1.17
麦芽糖	1.610±0.028	244.76±2.35
乳清粉	1.338±0.011	192.54±3.25

2.2 不同碳源合成的多糖的红外光谱分析

EPS_G, EPS_F, EPS_L, EPS_S, EPS_M, EPS_W 的红外光谱图的官能团分析表明:6 个样品均呈现多糖的特征吸收峰,即 3 000~2 800 cm⁻¹ 和 1 410~1 200 cm⁻¹ 波段吸收;样品在 3 600~3 200 cm⁻¹ 出现的宽峰是 O—H 的伸缩振动,表明各多糖均存在分子内或分子间的氢键.振动谱分析表明:6 个多糖样品均为 α-型的端基差向异构体(C—H 取平伏键),为吡喃糖.

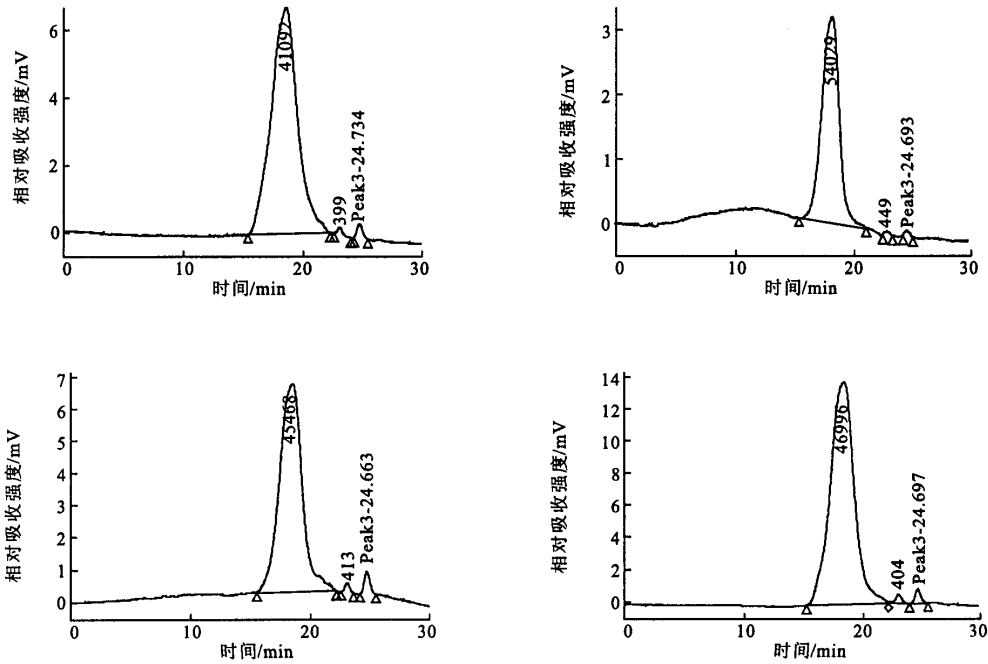
2.3 不同碳源合成的胞外多糖的相对分子质量

多糖在色谱柱上的洗脱体积或保留时间与其相对分子质量密切相关.在一定相对分子质量范围

内,洗脱体积或保留时间与相对分子质量的对数呈线性关系.作者以相对分子质量分别为 828,2 900, 10 000,70 000,188 000,482 000,2 000 000 的标准多糖制作多糖相对分子质量标准曲线,在相同检测条件下测定 EPS_G,EPS_F,EPS_L,EPS_S,EPS_M,EPS_W 的相对分子质量,HPLC 图谱见图 1.通过系统自动分析得出 EPS_G,EPS_F,EPS_L,EPS_S,EPS_M,EPS_W 的相对分子质量分别为:41 092,54 029,45 468,46 996,46 257,45 468.可见,FML02-8 以不同碳源合成的胞外多糖的相对分子质量显示了一定的差异,而以乳糖和乳清粉为碳源时相对分子质量则表现了惊人的一致,但二者的性质到底有无不同或者说是否同一物质仍需要进行进一步的研究.这些结果可以说明 FML02-8 以不同碳源合成的多糖相对分子质量不同.

2.4 不同碳源合成胞外多糖的单糖组成及摩尔比

以标准单糖 D-鼠李糖、D-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖得到标样的气相色谱图.样品 EPS_G,EPS_F,EPS_L,EPS_S,EPS_M,EPS_W 经酸水解并干燥后经糖腈乙酸酯衍生化,在标样的气相色谱检测条件下测得的气相色谱见图 2.由图 2 分析得到的 EPS_G,EPS_F,EPS_L,EPS_S,EPS_M,EPS_W 的单糖组成及摩尔比见表 2.



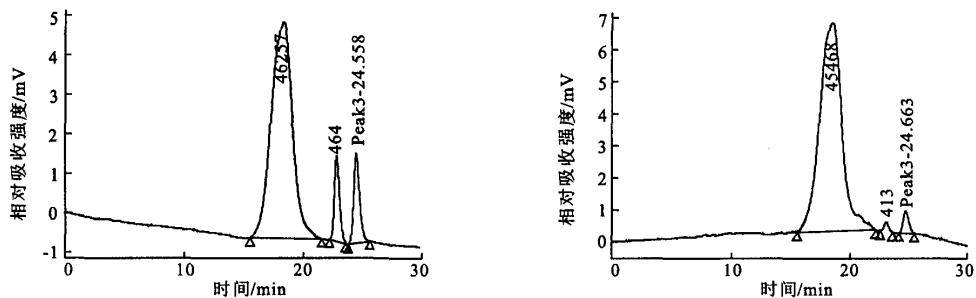


图 1 多糖 $\text{EPS}_C, \text{EPS}_F, \text{EPS}_L, \text{EPS}_S, \text{EPS}_M, \text{EPS}_W$ 相对分子质量的 HPLC 图谱及峰值相对分子质量

Fig. 1 Chromatograms and Mp of $\text{EPS}_C, \text{EPS}_F, \text{EPS}_L, \text{EPS}_S, \text{EPS}_M, \text{EPS}_W$ determined by HPLC

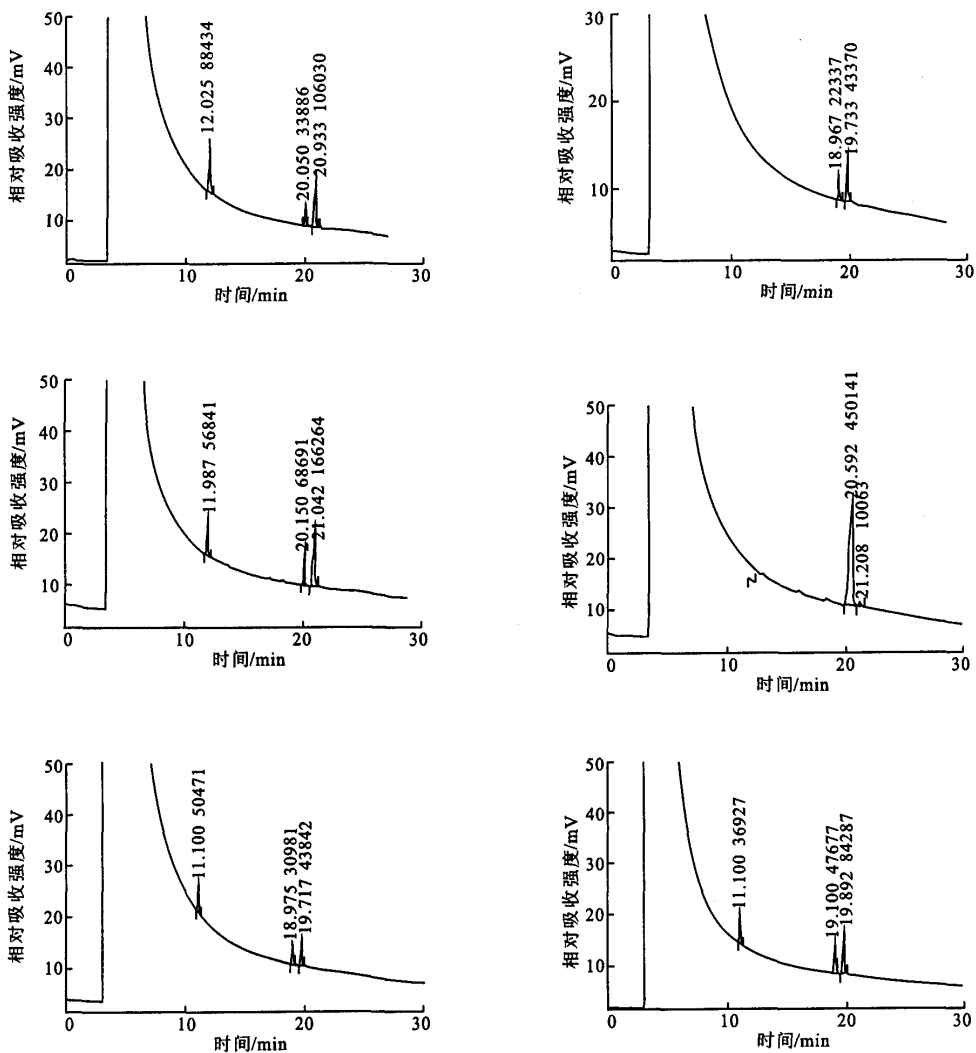


图 2 $\text{EPS}_C, \text{EPS}_F, \text{EPS}_L, \text{EPS}_S, \text{EPS}_M, \text{EPS}_W$ 的气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatograms of $\text{EPS}_C, \text{EPS}_F, \text{EPS}_L, \text{EPS}_S, \text{EPS}_M, \text{EPS}_W$

表 2 不同碳源合成的多糖的单糖组成及摩尔比
Tab. 2 Monosaccharide composition and their mole rate of EPSs produced by FML02-8

多糖	单糖及摩尔比
EPS _G	半乳糖:鼠李糖:葡萄糖=3.01:1.88:1
EPS _F	葡萄糖:甘露糖=1.98:1
EPS _L	半乳糖:葡萄糖:鼠李糖=4.03:1.29:1
EPS _S	半乳糖形成的半乳聚糖
EPS _M	葡萄糖:鼠李糖:甘露糖=1.41:1.60:1
EPS _W	半乳糖:葡萄糖:鼠李糖=2.26:1.33:1

结果表明,FML02-8 以不同碳源合成的 EPS 在单糖组成及比例上均有差别.在 2.2 的结果中乳糖和乳清粉合成的多糖 EPS_L,EPS_W 相对分子质量完全相同,但在这里,二者的单糖组成相同比例却不同.与乳糖相比,乳清粉中还含少量蛋白质和微

量的盐类,而在产量的研究中二者相比又表现了不同的 EPS 合成量,说明 FML02-8 合成 EPS 的产量及性质不仅受到碳源的影响,还可能受到氮源、盐类等的影

3 小 结

研究了不同碳源对 *Lactococcus* FML02-8 合成胞外多糖的产量及其分子组成的影响.结果表明,*Lactococcus* FML02-8 可利用不同的碳源合成不同产量的胞外多糖,HPLC 法测定结果表明,不同碳源合成的多糖相对分子质量不同;完全酸水解的气相色谱表明,多糖分子的单糖组成及摩尔比也不同.这一结果与近期国外的有关报道^[8,14,15]一致,对于该菌株所产胞外多糖的结构和功能的关系研究以及用于发酵剂的生产有重大意义.

参考文献:

- [1] Patricia Ruas-Madiedo, Jeroen Hugenholtz. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12: 163—171.
- [2] Petronella J Looijesteijn, Lionel Trapet. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus Lactis*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64(2): 71—80.
- [3] Philippe Duboc, Beat Mollet. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11: 759—768.
- [4] Patricia Ruas-Madiedo, Remco Tuinier. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* on the viscosity of fermented milks[J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12: 689—695.
- [5] Escalante A, Wachter-Rodarte C, Garcia-Garibay M. Enzymes involved in carbohyarte metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*[J]. *J Appl Microbiol*, 1998, 84(9): 108—114.
- [6] Alan D Welman, Lan S Maddox. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(6): 269—274.
- [7] Andrew Laws, Yucheng Gu, Valerie Marshall. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19: 597—625.
- [8] Ingeborg C Boels, Richard van Kranenburg. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11: 723—732.
- [9] Valerie M Marshall, Hellen Dunn. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 331(4): 413—422.
- [10] Elisabeth J Faber, Johannes P Kamerling. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *Burgaricus* 291[J]. *Carbohydrate Research*, 2001, 331(3): 183—194.
- [11] M Terese Due, Miguel A Rodr. Structural analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus spp.* G-77[J]. *Carbohydrate Research*, 1998, 307(1): 125—133.
- [12] Dubois M, Gillis K A. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Anal Chem*, 1965, 28: 350—356.
- [13] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 74—76.
- [14] Michiel Kleerebezem, Ingeborg C Boels. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*; the impact of genomics and metabolic modeling[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 98: 199—213.
- [15] Michiel Kleerebezem, Jeroen Hugenholtz. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14: 232—237.

(责任编辑:李春丽)