

文章编号:1673-1689(2009)03-0289-05

提高乳酸菌胞外多糖产量的途径

李盛钰, 曾宪鹏, 杨贞耐*

(吉林省农业科学院 农产品加工研究中心, 吉林 长春 130124)

摘要: 乳酸菌胞外多糖(EPS)在改善发酵乳品流变学特性和质地等方面发挥重要作用,一些胞外多糖对人体健康还有促进作用,而胞外多糖的产量通常较低是限制其广泛应用的“瓶颈”因素。作者综述了通过优化发酵条件和基因工程技术提高乳酸菌胞外多糖产量的研究进展。

关键词: 乳酸菌; 胞外多糖; 生物合成; 基因工程

中图分类号: Q 935

文献标识码: A

Strategies for Increasing of Exopolysaccharide Production in Lactic Acid Bacteria

LI Sheng-yu, ZENG Xian-peng, YANG Zhen-nai*

(Center of Agro-Food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124, China)

Abstract: Exopolysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria (LAB) play an important role in the rheology and texture of fermented dairy products. It has been suggested that some exopolysaccharides may confer health benefits to the consumer. However, low yields of in situ production of exopolysaccharide are potential bottlenecks for the industrial applications. Increasing exopolysaccharide production by optimizing physical and chemical cultivation conditions and genetic engineering of lactic acid bacteria were reviewed in this paper.

Key words: lactic acid bacteria; exopolysaccharides; biosynthesis; genetic engineering

乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外常渗于培养基的一类糖类化合物:有的依附于微生物细胞壁形成荚膜多糖(capsular polysaccharides, CPS),有的则进入培养基中形成黏液多糖(ropy)。乳酸菌能产生多种化学组成和分子结构不同的胞外多糖,它们赋予发酵食品优良的功能特性。由于乳酸菌

发酵过程中产生的胞外多糖本身具有增稠、乳化、保湿和稳定等作用,同时还有助于改善发酵的流变学特性,减少发酵乳乳清析出现象,改善发酵乳质地和感官质量。同时,由于乳酸菌具有公认的食用安全性(GRAS)地位,产胞外多糖乳酸菌在食品工业中具有广阔的市场前景。然而,乳酸菌胞外多糖的产量一般来说都比较低(50 mg/L~425 mg/L)。

收稿日期:2008-08-25

基金项目:国家自然科学基金项目(30670057)。

作者简介:李盛钰(1977-),男,吉林通化人,理学博士,副研究员,主要从事食品生物技术研究。Email: lisy720@yahoo.com.cn

* 通讯作者:杨贞耐(1965-),男,江西广丰人,工学博士,研究员,主要从事乳品工艺与生物技术研究。

Email: zyang@cjaas.com

L)^[1],因此其应用也受到一定的限制。提高胞外多糖产量的研究,目前备受关注。通过筛选优良菌种,优化发酵条件,或对菌种进行改良可以在一定程度上提高胞外多糖的产率。近年来,随着一些乳酸菌全基因组序列的报道和胞外多糖合成相关基因簇的克隆和功能分析,使得利用基因工程技术提高胞外多糖的产量成为可能。目前,国内外在提高乳酸菌胞外多糖产量方面的研究不断取得新的进展,作者对这方面的研究成果综述如下。

1 通过优化发酵条件提高胞外多糖产量

乳酸菌胞外多糖的产量与菌种有密切关系,菌株不同胞外多糖合成能力差别很大,而同一菌株发酵条件不同胞外多糖的产量也有明显差异。培养基的成份(碳源和氮源)、生长条件(温度、pH、培养时间)等都可能影响乳酸菌胞外多糖的产量^[2],且不同营养条件和环境条件下产生的多糖的化学结构和生理功能也有差异^[3]。

1.1 优化发酵时间

通常乳酸菌胞外多糖产量在对数生长期和接近稳定期达到最高,当达到稳定期后产量不再增加^[4-5]。例如,Aslim^[6]等研究发现,德氏乳杆菌保加利亚变种(*Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)胞外多糖产量在18 h为最高,培养超过24 h后多糖产量显著降低。Pham^[7]等报道由于各种糖基转移酶的存在,鼠李糖乳杆菌(*Lb. rhamnosus*)胞外多糖的产量随发酵时间延长而降低。但也有例外,Lin等研究以脱脂乳为培养基,在pH 5, 37℃条件下,观察发酵时间对乳酸菌株瑞士乳杆菌BCRC14030、BCRC14076和嗜热链球菌BCRC14085胞外多糖产量的影响,结果延长培养时间达60 h多糖产量最高,分别为0.73 g/L, 0.93 g/L和0.93 g/L^[8]。

1.2 优化培养温度

获得高产胞外多糖的最佳发酵温度与乳酸菌培养的最适温度没有直接联系。温度对乳酸菌胞外多糖产量的影响因菌株不同而有差异。一些菌株在低温下胞外多糖产量较高,Mozzi等^[9]研究发现在30℃时德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热乳杆菌产胞外多糖的量达到最大,Gamar-Nourani等^[10]研究表明,当温度在25~37℃时,在开始的5 h内,可提高鼠李糖乳杆菌C83产EPS的量。顾瑞霞^[11]等对唾液链球菌嗜热亚种研究表明,37℃该菌的胞外多糖产量最大,温度高于47℃时该菌的胞外多糖合成能力迅速下降。Kmmel等^[12]人对德氏乳杆菌保加利亚亚种研究表明,该菌合成胞外多糖的最适发酵温度为38℃,该值比其最适生长温度40~43℃略低。另外,一些菌株在最适生长温度或较高温度下胞外多糖产量较高。Mozzi等发现^[13]嗜热乳酸菌CRL 870在最适生长温度(37~42℃)下胞外多糖的产量也最高。而Garcia-Garibay等研究结果表明德氏乳杆菌保加利亚亚种NCFB2772在脱脂乳及限制培养基上产胞外多糖的最适温度为48℃,高于生长最适温度(37~42℃)^[14]。

1.3 优化pH值

pH值会影响菌株的生长状况和胞外多糖的产量。不同菌株和培养条件下胞外多糖合成的最适pH值不同。很多研究证明,乳酸菌产胞外多糖的最适pH值在5~7左右。例如,Mozzi的一项研究发现在pH值6.0时,干酪乳杆菌CRL 87胞外多糖的产量最大为488 mg/L。对清酒乳杆菌O-1产胞外多糖的最适pH值为5.8^[15]。Ricciardi^[16]等报道嗜热链球菌SY在pH 6.4时胞外多糖产量最高。De Vuyst^[4]等报道了嗜热链球菌LY03在42℃和pH 6.2时胞外多糖产量最高。

1.4 优化碳源

碳源种类和添加量显著影响胞外多糖的产量和化学组成^[17]。Cerning^[18]等研究多种碳源(半乳糖、葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖和蜜二糖)对于干酪乳杆菌CG 11胞外多糖产量的影响。结果表明,葡萄糖是最佳碳源,半乳糖和乳糖碳源胞外多糖产量最低。碳源加入量在2 g/L~20 g/L范围内,胞外多糖产量随葡萄糖、蔗糖和麦芽糖的加入量增加而提高,说明碳源浓度影响多糖产量。一些研究结果也进一步验证以葡萄糖为碳源胞外多糖产量明显高于其它碳源。例如,德氏乳杆菌保加利亚亚种NCFB 2772以葡萄糖为碳源胞外多糖产量是果糖碳源的3倍^[19]。同样,乳球菌NIZO B40以葡萄糖碳源比果糖碳源胞外多糖产量提高9倍^[20]。对于德氏乳杆菌保加利亚亚种CNRZ 416,在不控制pH情况下,以10 g/L葡萄糖为碳源胞外多糖产量最高。而Gancel^[21]等人比较了蔗糖、乳糖、葡萄糖和果糖为碳源对嗜热链球菌(*Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*)产胞外多糖合成量的影响,发现用乳糖作为碳源胞外多糖生成量最大。以上结果说明,菌株不同产胞外多糖的最适碳源也不同,葡萄糖、乳糖、蔗糖和半乳糖是较常用的碳源。广泛筛选碳源对提高胞外多糖产量具有重要意义。

1.5 优化氮源

氮源的改变不仅影响胞外多糖的产量而且影响相对分子质量。近些年,一些研究着眼于在基础培养基中添加乳清有利于胞外多糖产量的提高。例如 Zisu 等在研究发酵条件对嗜热链球菌 1275 产胞外多糖影响时发现在 RSM 培养基中加入 0.5 g/dL 的乳清蛋白浓缩液(WPC)使胞外多糖的产量提高 2 倍多^[22]。在 pH 控制下,向嗜热链球菌 ST 111 乳基础培养基(MBM)中加入适量的水解乳清蛋白,使胞外多糖产量提高了 5 倍^[23]。

2 通过基因工程技术提高胞外多糖产量

2.1 调控核苷酸-糖复合物水平调节胞外多糖产量

乳酸菌胞外多糖的合成是从活化的核苷酸-糖复合物开始的,这些核苷酸-糖复合物的低水平表达是限制胞外多糖产量的瓶颈因素。而将葡萄糖-6-磷酸转化成葡萄糖-1-磷酸的磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase, PGM)和接下来催化 UDP-葡萄糖形成的焦磷酸化酶(pyrophosphorylase)是乳酸菌胞外多糖生物合成途径中的两类关键酶。可以通过调节胞外多糖合成途径关键酶的表达提高乳酸菌胞外多糖的产量。Levander^[24-27]等过量表达嗜热链球菌 LY03 *pgmA* 基因(磷酸葡萄糖变位酶基因)和 *galU*(UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因),使胞外多糖产量从 0.17 g/mol 提高到 0.31 g/mol。而只同源高效表达 *GalU* 基因,却不能提高胞外多糖产量。另外,一株利用半乳糖(Gal^+)的嗜热链球菌 LY03 突变菌株,通过增加 Leloir 酶活性可提高胞外多糖产量达 0.24 g/mol。同时,敲除 *pgmA* 基因,使胞外多糖产量进一步增加到 0.36 g/mol。胞外多糖产量提高可能是由于 Leloir 途径对糖酵解的解偶联作用。

由于 PGM 不表达,乳糖分解产生的葡萄糖被用于糖酵解,而半乳糖则可以通过 Leloir 途径合成胞外多糖。胞内代谢产物检测揭示 *pgmA* 基因敲除菌株葡萄糖-1-磷酸水平高于其它菌株,说明 Leloir 途径对胞外多糖前体的合成至关重要。过量表达 Leloir 酶和 UDP-半乳糖-4-差向异构酶可以提高乳酸菌胞外多糖产量^[28]。但是,一些研究试图通过高效表达乳球菌的葡萄糖激酶,磷酸果糖激酶,磷酸葡萄糖变位酶 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶和 UDP-半乳糖差向异构酶来提高胞外多糖产量,均未获得成功。说明乳球菌胞外多糖的合成存在具体影响因素^[29-30]。

万方数据

2.2 提高参与胞外多糖合成的糖基转移酶活性调节胞外多糖产量

目前,一些胞外多糖合成相关基因簇已经被克隆和鉴定。胞外多糖合成相关基因簇通常分成 4 个区域。第一区为含有调节基因的调控区,第二区编码检测聚合链长度的相关蛋白,第四区与多糖的聚合和运输有关,而第三区为合成胞外多糖重复单元的糖基转移酶(glycosyltransferase)基因。糖基转移酶通过转运糖-核苷酸复合物到脂质载体或增长链上来装配胞外多糖重复单元。首先,将糖-1-磷酸连接到脂类载体上,这一步骤是由参与多糖合成的第一个关键酶-引导糖基转移酶(priming glycosyltransferase)催化完成的。引导糖基转移酶对胞外多糖生物合成至关重要。引导糖基转移酶基因被阻断导致不产胞外多糖的乳酸菌突变菌株^[31,32]。利用基因工程技术,在乳酸菌内同源高效表达引导糖基转移酶,可以在一定程度上提高胞外多糖的产量。Van Kranenburg 在产胞外多糖乳酸球菌中过量地表达 *eps D* 基因(引导糖基转移酶),使胞外多糖产量提高 15%^[33]。同样,Stingele 等在嗜热链球菌、瑞士乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚变种中过量表达引导糖基转移酶基因,也提高了胞外多糖的产量^[34]。

2.3 胞外多糖合成相关基因簇的过量表达

Boels^[35]等在乳球菌中同源高效表达胞外多糖合成相关的整个基因簇(*eps*)来提高产量。该方法将胞外多糖基因簇克隆于表达型质粒中,通过提高质粒的拷贝数,使胞外多糖基因簇过量表达来调控多糖的合成。结果使质粒的拷贝数提高了 9 倍,而胞外多糖产量提高了 4 倍。碳源的利用量也随着胞外多糖的产量增加而增加。这是由于胞外多糖合成过程需要大量的糖-核苷酸前体而使糖代谢旺盛造成的。先前的研究表明,增加胞外多糖合成所必需的前体物质的浓度并不能提高乳球菌 NIZO B40 胞外多糖的产量。而通过构建 *eps* 基因过量表达菌株能显著提高胞外多糖产量,说明提高乳球菌 NIZO B40 胞外多糖产量的限制性因素主要是 *eps* 基因簇的表达水平而不是由糖-核苷酸前体的表达量来决定的。然而,通过提高荚膜多糖前体合成关键酶 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的表达能明显提高肺炎链球菌 3 型荚膜多糖在乳球菌(*L. lactis*)中的表达。说明胞外多糖合成的调控机制十分复杂^[36]。另外,*eps* 基因的过量表达导致乳酸菌生长率降低,活菌数减少,使宿主菌株的稳定性受到影响。可以采用异源表达的方式将携带 *eps* 基因簇的重组质粒

转化其它微生物获得产胞外多糖菌株。Stingele^[37]等把嗜热链球菌 Sfi6 的 *eps* 基因簇转入乳球菌 MG1363 中,并高效表达。

3 结 语

胞外多糖是乳酸菌生长过程中产生的重要代谢产物。它赋予发酵乳品特有的风味、质地、口感和营养价值。在食品工业作为增稠剂、乳化剂和稳定剂等具有广阔的应用前景。但胞外多糖的产量通常较低。近些年来,国内外在提高胞外多糖产量方面做了大量的研究工作。特别是产胞外多糖优良菌株的筛选和优化培养条件提高胞外多糖产量方面做了深入细致的研究。优化发酵条件提高胞外多糖产量主要依赖于菌种本身特性,通过优化产胞外多糖的最适培养条件,在一定程度上可以提高胞外多糖产量,但由于影响胞外多糖产量的各理化

因素不是孤立起作用,而是相互影响和相互依赖的关系,给条件优化带来一定难度。同时,由于培养条件的变化,乳酸菌产胞外多糖的相对分子质量、化学组成和理化性质也可能发生变化,使通过优化发酵条件的途径提高胞外多糖产量受到一定限制。近些年来,随着一些乳酸菌全基因组序列的报道以及胞外多糖生物合成机制和合成相关基因簇的结构和序列分析,使得利用基因工程技术提高胞外多糖的产量成为新的研究热点。然而,乳酸菌胞外多糖的生物合成途径和调控机制十分复杂。所以,利用基因工程技术提高胞外多糖的产量,需要在了解胞外多糖合成相关基因簇结构与功能的基础上,结合酶学、分子生物学及蛋白质组学等相关领域的研究方法和实验技术,研究胞外多糖合成的调控机制及其与其它代谢途径的关联性,使提高胞外多糖产量成为可能。

参考文献(References):

- [1] Bouzar F, Cerning J, Desmazeaud M. Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants[J]. *J Dairy Sci*, 1996, 79(2): 205-211.
- [2] Welman A D, Maddox I S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(6): 269-274.
- [3] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. *Intern Dairy J*, 2002, 12(2-3): 163-167.
- [4] De Vuyst L, Vanderveken F, Van de Ven S. et al. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis[J]. *J Appl Microbiol*, 1998, 84(4): 1059-1068.
- [5] Tallon R, Bressollier P, Urdaci M C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56[J]. *Res Microbiol*, 2003, 154(10): 705-712.
- [6] Aslim B, Yüksesdag Z N, Beyatli Y, et al. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21(5): 673-677.
- [7] Pham P L, Dupont I, Roy G, et al. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2302-2310.
- [8] Lin T Y, Chang Chien M F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time[J]. *Food Chemistry*, 2007, 100 (4): 1419-1423.
- [9] Mozzi F, de Giori G S, Oliver G, et al. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH[J]. *Biotechnol Lett*, 1996, 18(4): 435-439.
- [10] Gamar-Nourani L, Blondeau K, Simonet J M. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* C83[J]. *J Appl Microbiol*, 1998, 85(4): 80-82.
- [11] 顾瑞霞, 刘爱萍, 程涛, 等. 唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖合成条件的研究[J]. *食品科学*, 2000, 21(8): 18-21.
- GU Rui-xia, LIU Ai-ping, CHENG Tao, et al. Study on exopolysaccharide synthesis by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* LCX2001 grown in chemically defined medium[J]. *Food Science*, 2000, 21(8): 18-21. (in Chinese)
- [12] Kimmel S A, Roberts R F, Ziegler G R. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RR grown in a semidefined medium[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 659-664.
- [13] Mozzi F, Oliver G, de Giori G S, et al. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria[J]. *Milchwissenschaft*, 1995, 50: 80-82.
- [14] Garcia-Garibay M, Marshall V M E. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*[J]. *J Appl Bacteriol*, 1991, 70(2): 325-328.

- [15] Van den Berg D J C, Robjn G W, Janssen A C. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(8): 2840—2848.
- [16] Ricciardi, A, Parente E, Crudele M A, et al. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY; production and preliminary characterization of the polyme[J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 92(2): 297—306.
- [17] Gamar, L, Blondeau K, Simonet J M. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83[J]. *J Appl Microbiol*, 1997, 83(3): 281—287.
- [18] Cerning J, Renard C M G C, Thibault J F, et al. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994 60(11): 3914—3919.
- [19] Grobben G J, Van Casteren W H M, Schols H A, et al. Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and on fructose[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48:516—521.
- [20] Looijesteijn P J, Hugenholtz J. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NIZO B40 and optimisation of its exopolysaccharide synthesis[J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 88(2):159—163.
- [21] Gancel F, Novel G. Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus* cultures. 1. conditions of production[J]. *J Dairy Sci*, 1994, 77(3): 685—688.
- [22] Zisu B, Shah N P. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275[J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86:3405—3415.
- [23] Vaningelgem F, Zamfir M, Adriany T, et al. Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 in milk-based medium[J]. *J Appl Microbiol*, 2004, 97(6): 1257—1273.
- [24] Hugenholtz J, Kleerebezem M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria; overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 492—497.
- [25] Levander F, Svensson M, R dstr m P. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 784—790.
- [26] Levander F, R dstr m P. Requirement for phosphoglucumutase in exopolysaccharide biosynthesis in glucose- and lactose-utilizing *Streptococcus thermophilus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(6): 2734—2738.
- [27] Svensson M, Waak E, Svensson U, et al. Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 6398—6400.
- [28] Mozzi F, Savoy de Giori G, Font de Valdez G. UDP-galactose 4-epimerase; a key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus case* CRL 87 in controlled pH batch cultures[J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 94(2): 175—183.
- [29] Boels I C, Kleerebezem M, de Vos W M. Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 1129—1135.
- [30] Boels I C, Ramos A, Kleerebezem M, et al. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 3033—3040.
- [31] Low D, Ahlgren J A, Horne D, et al. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: (6):2147—2151.
- [32] van Kranenburg R, van Swam I I, Marugg J D, et al. Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*[J]. *Mol Microbiol*, 1997, 24(2):387—397.
- [33] van Kranenburg R, Vos H R, van Swam I I, et al. Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive Cocci: complementation, expression, and diversity[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(20): 6347—6353.
- [34] Stingle F, Eouard G J, Gilbert L. Lactic acid bacterial genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and encoded glycosyltransferases[P]. PCT International Application, WO9954475, 1999.
- [35] Boels I C, van Kranenburg R, Kanning M W, et al. Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 eps gene cluster[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 5029—5031.
- [36] Gilbert C, Robinson K, Le Page R W F, et al. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(6): 3251—3260.
- [37] Stingle F, Neeser J R, Mollet B. Identification and characterization of the eps (exopolysaccharide) gene cluster of *Streptococcus thermophilus* Sfi6[J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(6):1680—1690.

(责任编辑:朱明)