

内蒙古酸马奶中植物乳植杆菌 NM18 胞外多糖的结构特征

刘明超, 王荣平, 何宇星, 杨晓凤, 于靖和, 乌云达来*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要: 胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS) 是具有不同糖残基的高分子聚合物, 其在医药、食品、环境等不同领域都有广泛应用。该研究对植物乳植杆菌 NM18 所产胞外多糖采用乙醇沉淀、阴离子交换法和凝胶过滤层析法进行纯化得到 6 种组分 (EPS-1A、EPS-1B、EPS-2、EPS-3、EPS-4 和 EPS-5), 并对其一级结构进行鉴定。组分 EPS-1A、EPS-1B、EPS-2 均由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成; 组分 EPS-3 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、岩藻糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺组成; 组分 EPS-4 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、*N*-乙酰葡萄糖胺组成; 组分 EPS-5 由甘露糖、半乳糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺组成, 含有微量的岩藻糖及阿洛糖。组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的甲基化反应结合 GC-MS 分析表明, 组分 EPS-1A 和 EPS-1B 糖链主要由 $\rightarrow 3$ -*D*-GlcP-(1 \rightarrow , $\rightarrow 6$)-*D*-GalP-(1 \rightarrow , $\rightarrow 4$)-*D*-GlcP-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 6$)-*D*-Manp-(1 \rightarrow 组成, 末端为 GlcP-(1 \rightarrow ; 组分 EPS-2 糖链主要由 $\rightarrow 6$ -*D*-Galp-(1 \rightarrow 和 $\rightarrow 6$)-*D*-Manp-(1 \rightarrow 组成, 末端为 *D*-GlcP-(1 \rightarrow 。组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的糖苷键构型为 α 型和 β 型的混合物。综上, 该研究将会为菌株 NM18 所产胞外多糖的生物活性研究及应用提供理论依据。

关键词: 植物乳植杆菌; 胞外多糖; 单糖; 结构特征; 甲基化

文章编号: 1673-9078(2022)07-133-142

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1349

Structural Characteristics of Exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* NM18 of Koumiss in Inner Mongolia

LIU Mingchao, WANG Rongping, HE Yuxing, YANG Xiaofeng, YU Jinghe, Wuyundalai*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Exopolysaccharides (EPSs) are macromolecules with different sugar residues and are widely used in medicine, food, environment, and other fields. In this study, six components (EPS-1A, EPS-1B, EPS-2, EPS-3, EPS-4, and EPS-5) of the exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* NM18 were purified using ethanol precipitation, anion exchange method, and gel filtration chromatography, and their primary structures were identified. Components EPS-1A, EPS-1B, and EPS-2 comprised mannose, glucose, and galactose. Component EPS-3 comprised mannose, glucose, galactose, rhamnose, trehalose, and *N*-acetyl-*D*-glucosamine. Component EPS-4 comprised mannose, glucose, galactose, and *N*-Acetyl-*D*-glucosamine. Component EPS-5 comprised mannose, galactose, and *N*-acetyl-*D*-glucosamine, and contained trace amounts of fucose and allose. The methylation reaction of EPS-1A, EPS-1B, and EPS-2 combined with GC-MS analysis showed that EPS-1A and EPS-1B carbohydrate chains mainly comprised $\rightarrow 3$ -*D*-GlcP-(1 \rightarrow , $\rightarrow 6$)-*D*-Galp-(1 \rightarrow , $\rightarrow 4$)-*D*-GlcP-(1 \rightarrow and $\rightarrow 6$)-*D*-Manp-(1 \rightarrow , with the terminus being GlcP-(1 \rightarrow . The EPS-2 carbohydrate chains mainly comprised $\rightarrow 6$ -*D*-Galp-(1 \rightarrow and $\rightarrow 6$)-*D*-Manp-(1 \rightarrow , with the terminus being *D*-GlcP-(1 \rightarrow . Components EPS-1A, EPS-1B, and

引文格式:

刘明超,王荣平,何宇星,等.内蒙古酸马奶中植物乳植杆菌 NM18 胞外多糖的结构特征[J].现代食品科技,2022,38(7):133-142

LIU Mingchao, WANG Rongping, HE Yuxing, et al. Structural characteristics of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* NM18 of koumiss in inner mongolia [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 133-142

收稿日期: 2021-11-29

基金项目: 内蒙古自治区科技计划重大专项项目 (2020CG0012); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY19054); 内蒙古农业大学教育教学改革研究重点项目 (JGZD201813)

作者简介: 刘明超 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 2640450848@qq.com

通讯作者: 乌云达来 (1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物及其生物技术, E-mail: wydl@imau.edu.cn

EPS-2 have a mixture of α and β type glycosidic bonds. In conclusion, this study provides theoretical basis for further study and application of the biological activity of exopolysaccharides produced by strain NM18

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*; exopolysaccharides; monosaccharide; structural characterization; methylation

酸马奶是一种产于中亚和东欧地区的发酵马奶饮料,在蒙古语中酸马奶被称为“策格”^[1,2],又叫马奶酒,它是鲜马乳为原料,利用天然发酵剂和传统发酵技术发酵而成^[3]。其风味独特,醇香浓郁,营养价值很高,具有驱寒、活血、舒筋、消食、健胃等功能^[1]。酸马奶中的有益微生物主要由乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)和酵母菌(Yeast)组成^[4,5],在酸马奶中发现了各种乳酸菌菌株,包括干酪乳杆菌、植物乳植杆菌、发酵乳杆菌、瑞士乳杆菌等^[6,7]。乳酸菌作为一大类益生菌,具有免疫调节、抑制胃肠道病原菌等多种生物活性,其所产的胞外多糖因来源安全、类型多样、性能优异等特点受到人们的广泛关注^[8,9]。酸马奶的诸多医用价值主要取决于其中所含有的益生菌及其代谢产物(如抗生素、细菌素、胞外多糖等)以及马奶降解产物(如多肽、有机酸等)等。

胞外多糖(Exopolysaccharides, EPSs)是由一些微生物(细菌、真菌、放线菌、蓝藻等)在代谢过程中分泌的一类具有不同糖残基的高分子聚合物,一般由单糖通过糖苷键以直链或支链形式连接而成^[10],其功能多样,质量稳定,受自然地理和气候环境的影响小,具有较高的性价比和广阔的应用前景^[11,12]。由于胞外多糖具有独特的物理和流变性能,即成胶、增稠、乳化及絮凝剂等,使其在食品、化妆品、胶粘剂、废水处理、油回收以及药理学行业方面得到了广泛应用^[13-15]。此外,胞外多糖对于改善机体肠道微生态、抗肿瘤^[16]、免疫调节^[4]、降低血液胆固醇^[17,18]等都有所裨益。基于乳酸菌胞外多糖的一系列生理生化特点,本研究将对从内蒙古酸马奶中分离纯化的一株产胞外多糖植物乳植杆菌NM18进行相关胞外多糖结构的研究,完善关于产胞外多糖酸马奶源乳酸菌的特异性筛选和鉴定,对于后续实现植物乳植杆菌胞外多糖的工业化应用及其在机体内的益生作用提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和主要试剂

1.1.1 菌株来源

菌株分离自内蒙古酸马奶样品中一株产胞外多糖的植物乳植杆菌 *Lpb. plantarum* NM18^[19]。

1.1.2 主要试剂

Cellulose DE-52, Whatman 公司; Sepharose CL-6B,

Pharmad 公司; 截流膜, Solarbio 公司; 葡聚糖系列标准品, 美国 Sigma 公司; TSK-GEL GM PWXL 柱, Tosoh Corp 公司; Agilent 7890B GC system-5977A MSD, Palo Alto 公司; HP-5 毛细管柱, CA 公司; Bruker AVANCE AV-500 型, Fällanden 公司。

1.2 菌株活化

将甘油保藏的菌株 NM18 接种于脱脂乳培养基中, 37 °C 恒温活化。

1.3 胞外多糖的分离纯化

分离胞外多糖按照 Zhu 等^[20]的方法, 稍作修改。待脱脂乳培养基凝固后(12 h)用接种环接于 MRS 液体培养基中, 37 °C 恒温传 2 代培养, 每代 12~24 h, 离心除去菌体和凝结蛋白等杂质。取上清液, 加入 80% (*m/V*) 三氯乙酸(TCA)使其最终浓度为 4% (*m/V*), 4 °C 静置放置 12 h, 离心(10000×g, 20 min, 4 °C)去除蛋白沉淀, 50 °C 旋转蒸发浓缩上清液, 用 80% (*V/V*) 乙醇在 4 °C 下沉淀多糖 24 h。离心(12000×g, 30 min, 4 °C)收集多糖沉淀; 用去离子水中透析 48 h 并冻干得到粗多糖(CEPS)。

对 CEPS 采用 DEAE-Cellulose 52 (2.6×30 cm) 离子交换色谱分级纯化。称取 CEPS 于去离子水中充分溶解后使用 0.45 μ m 滤膜过滤, 然后上样于 DEAE-Cellulose 52 离子交换层析柱中, 依次用不同浓度 NaCl 溶液(0、0.1、0.3、0.5 和 0.7 mol/L)梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 收集(10 min/管)后用苯酚-硫酸法检测各管的多糖含量^[21]。收集、浓缩、透析和冻干后用 Sepharose CL-6B 凝胶柱(1.6×40 cm)进一步纯化, 用去离子水以 0.5 mL/min 的流速洗脱。收集(10 min/管), 透析后冻干。

1.4 纯度和分子量的测定

采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪配备 TSK-GEL GM PW_{XL} 柱和差示检测器(RID), 通过高效排阻色谱(HPSEC)测定胞外多糖的纯度和平均分子量(M_w)。将各纯化组分(1.0 mg/mL, 10 μ L)用 0.1 mol/L 的乙酸铵溶液在 25 °C 下洗脱(流速为 0.5 mL/min)。通过使用葡聚糖标准($M_w=12000$ u、55000 u、150000 u、270000 u 和 670000 u)绘制的校准曲线计算这六种胞外多糖的 M_w 。

1.5 基本成分及单糖组分分析

总糖含量采用苯酚-硫酸法^[14]测定;测定蛋白质含量按 Bradford 等^[22]的方法;测定糖醛酸含量^[23]和硫酸盐基含量^[24]按 Nelly 等^[23]的方法,稍作修改;采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法测定其单糖组成。将样品用 4 mol/L 的三氟乙酸(TFA)在 120 °C下水解 2 h,使得到的单糖转化为糖腈乙酸酯衍生物。然后使用 Agilent 7890B GC system-5977A MSD 配备 HP-5 毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm),温度梯度以 3 °C/min 从 120 °C到 210 °C,使用火焰离子化检测器(FID)进行检测。

1.6 紫外及红外光谱分析

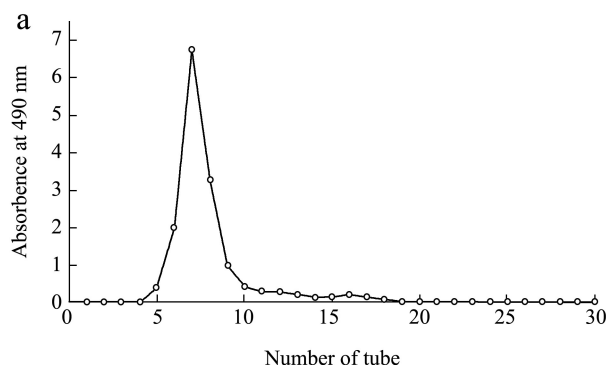
使用 SHIMADZU UV-2450 型紫外-可见分光光度计在 190~500 nm 波长范围内记录 EPSs 的紫外光谱。将纯化后的 EPSs 与 KBr 粉混合,研磨压制成粉末,使用 IRAffinity-1 型傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR)在 4000~400 cm⁻¹ 内的范围进行扫描。

1.7 甲基化分析

将胞外多糖甲基化的方法参考文献稍作修改^[25]。组分分离和单糖转化为相应的甲基化糖醇醋酸酯的过程参考文献稍作修改^[26]。甲基化糖醇醋酸酯的糖键的气相色谱-质谱分析采用 HP-5 毛细管柱,以温度梯度为 3 °C/min,将温度升至 210 °C,接口温度为 250 °C,载气为氦(He),流率为 1.0 mL/min,样品体积为 10.0 μL,图谱使用 NIST 11 谱库行检索。

1.8 核磁共振分析

将冷冻干燥的 *Lpb. plantarum* NM18 所产各 EPS 纯化组分充分溶解于 D₂O 中,用 Bruker AVANCE AV-500 型核磁共振仪进行分析,以四甲基硅烷(TMS)为内标,25 °C测定,在 313 K 下记录 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱,化学位移(δ)用 10⁻⁶表示。



1.9 数据处理

实验数据结果以 $\bar{X} \pm SD$ 表示;使用 OriginPro 2019 进行各曲线的绘制;GC-MS 图谱、核磁共振谱图使用自带的色谱工作站进行分析;方差分析用 IBM-SPSS 20 处理。

2 结果与分析

2.1 胞外多糖的分离纯化

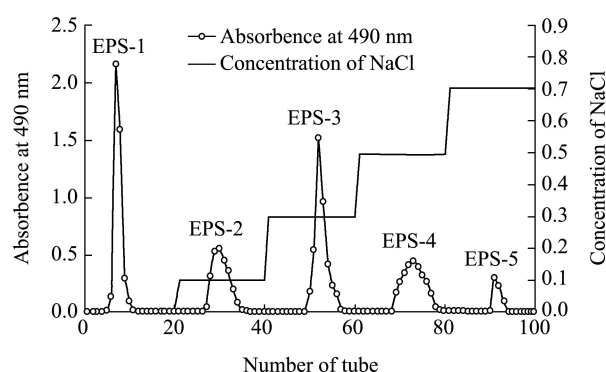


图1 *Lpb. plantarum* NM18 CEPS 经 DEAE-Cellulose 52 梯度洗脱曲线

Fig.1 Stepwise elution curve of CEPS from *Lpb. plantarum* NM18 on DEAE-Cellulose 52

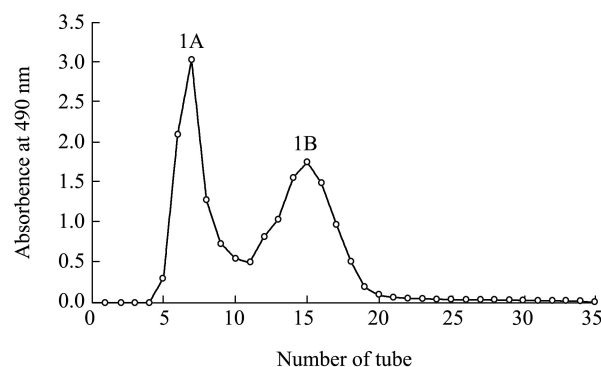
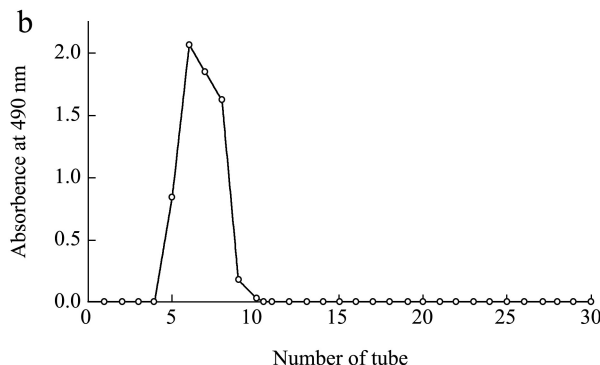


图2 组分 EPS-1 经 Sepharose CL-6B 洗脱曲线

Fig.2 Elution curves of fraction EPS-1 on Sepharose CL-6B



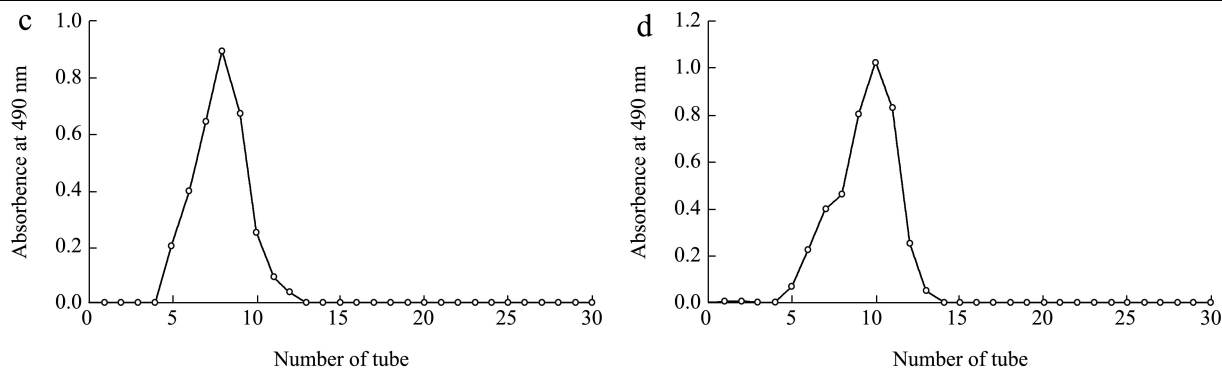


图3 组分 EPS-2 (a)、EPS-3 (b)、EPS-4 (c) 和 EPS-5 (d) 经 Sepharose CL-6B 洗脱曲线

Fig.3 Elution curves of fraction EPS-2 (a), EPS-3 (b), EPS-4 (c) and EPS-5 (d) by Sepharose CL-6B

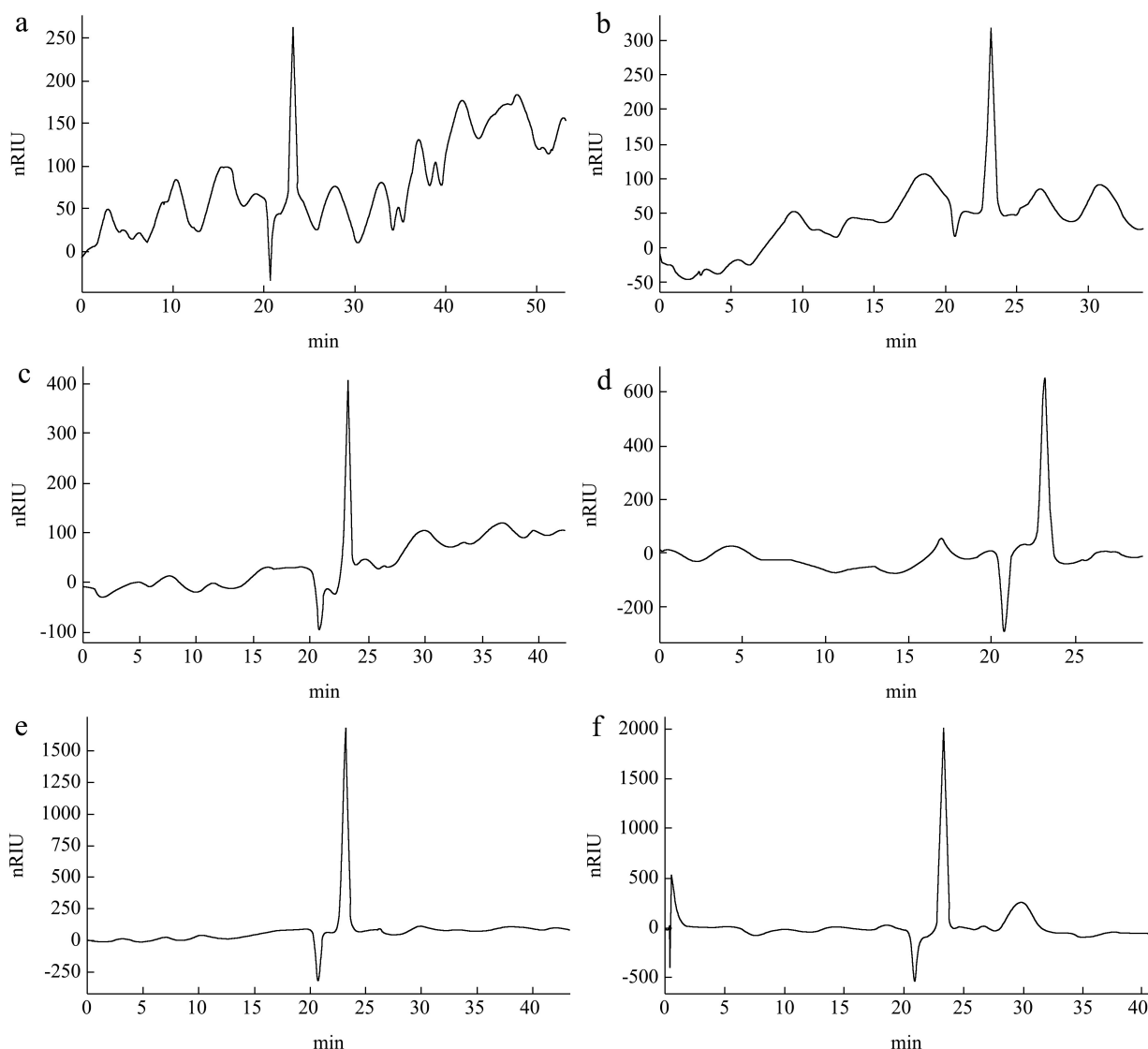


图4 *Lpb. plantarum* NM18 各 EPS 纯化组分相对分子质量的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC spectrum of relative molecular weight of *Lpb. plantarum* NM18 purified EPSs

注: a: EPS-1A; b: EPS-1B; c: EPS-2; d: EPS-3; e: EPS-4; f: EPS-5。图 6、7 同。

Lpb. plantarum NM18 的 MRS 发酵液培养经离心除菌体蛋白、乙醇沉淀多糖、去离子水复溶透析、真空冷冻干燥等过程得到 295.0 mg 的 CEPS。然后用不同浓度的 NaCl 洗脱后共得到 5 种组分 (图 1)，分别

标为 EPS-1~5。组分 EPS-1 用去离子水洗脱，为中性多糖；其余组分用不同浓度的 NaCl 洗脱，为酸性多糖或者带有酸性基团的糖复合物。对 5 种组分使用 Sepharose CL-6B 柱进行进一步纯化 (图 2、图 3)，

洗脱后最终得到 6 种组分 (EPS-1A、EPS-1B、EPS-2、EPS-3、EPS-4、EPS-5)，浓缩、透析和冻干备用。

2.2 各 EPS 纯化组分的纯度鉴定和分子量测定

Lpb. plantarum NM18 所产各 EPS 纯化组分相对分子质量的高效液相色谱图 (图 4) 中可知, 6 种组分经过 HPSEC 均得到一个单一的洗脱峰, 峰形尖锐对称, 所以各 EPS 组分纯化为单一多糖。以葡聚糖为标准, 按分子量由小到大依次进样求得回归方程, 得到平均相对分子质量分别为 2.11×10^5 、 2.04×10^5 、 2.02×10^5 、 2.17×10^5 、 2.09×10^5 、 1.93×10^5 u。

2.3 组分成分分析

胞外多糖组分成分分析 (表 1) 可知, CEPS 和组分 EPS-1A、EPS-1B、EPS-2、EPS-3、EPS-4 和 EPS-5 的总糖含量分别为 75.25%、96.88%、95.98%、94.67%、80.06%、84.32% 和 70.38%。利用“考马斯亮蓝法”测定 CEPS 的蛋白质含量为 1.13%, 组分 EPS-4 的蛋白质含量高达 7.22%, 其他组分中未检出蛋白质。以“氯化钡-明胶比浊法”测定硫酸根含量分别为 1.40%、0.22%、0.31%、0.26%、0.42%、6.30% 和 0.27%。用“硫酸-吡唑法”测定的糖醛酸含量分别为 3.24%、0.23%、0.34%、0.25%、0.43%、0.54% 和 0.85%。

2.4 紫外及红外光谱分析

菌株 NM18 所产胞外多糖的紫外及红外光谱分析 (图 5) 中得知, 组分 EPS-4 在 260~280 nm 有一个较强的吸收峰, 说明组分 EPS-4 的蛋白质含量高于其他组分 (EPS-1A、EPS-1B、EPS-2、EPS-3 和 EPS-5 在该区域没有吸收峰, 说明它们不含蛋白质)。组分 EPS-1A、EPS-1B、EPS-2、EPS-3、EPS-4 和 EPS-5 的 FT-IR 光谱 (图 6) 显示, 所有光谱均有明显的多糖吸收峰, 表明均存在吡喃糖环。组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 具有非常相似的 FT-IR 光谱, 具有 α -D-Galp 和 α -D-Glcp 基团; 而组分 EPS-4 具有 N-H 弯曲振动和 S=O 伸缩振动, 都具有较高的蛋白质和硫酸盐基含量。

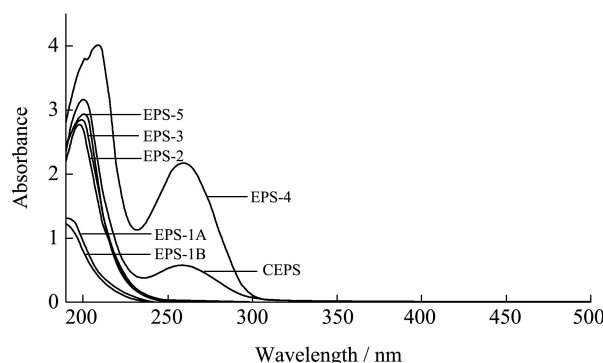


图 5 纯化后胞外多糖的紫外光谱

Fig.5 Uv spectrum of purified exopolysaccharide

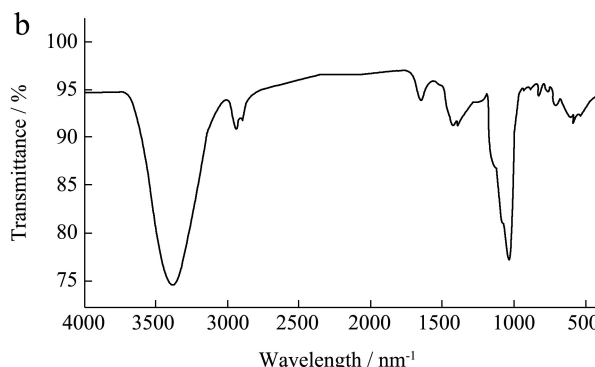
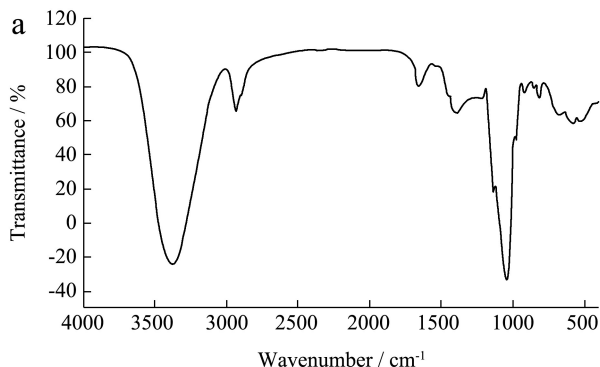
注: CEPS 为粗胞外多糖。

表 1 CEPS 和各 EPS 纯化组分的成分分析

Table 1 Component analysis of CEPS and the purified EPS

Component	Total sugar/%	Protein/%	Sulfuric acid root/%	Uronic acid/%
CEPS	75.25±0.26 ^b	1.13±0.00 ^a	1.40±0.43 ^d	3.24±0.62 ^f
EPS-1A	96.88±0.28 ^g	-	0.22±0.01 ^a	0.23±0.00 ^a
EPS-1B	95.98±0.40 ^f	-	0.31±0.0 ^b	0.34±0.20 ^b
EPS-2	94.67±0.40 ^e	-	0.26±0.00 ^{ab}	0.25±0.20 ^a
EPS-3	80.06±0.34 ^c	-	0.42±0.02 ^c	0.43±0.20 ^c
EPS-4	84.32±0.51 ^d	7.22±0.06 ^b	6.30±0.10 ^e	0.54±0.01 ^d
EPS-5	70.38±0.49 ^a	-	0.27±0.02 ^{ab}	0.85±1.02 ^e

注: “-”表示未检出; 不同字母间差异显著 ($p < 0.05$)。



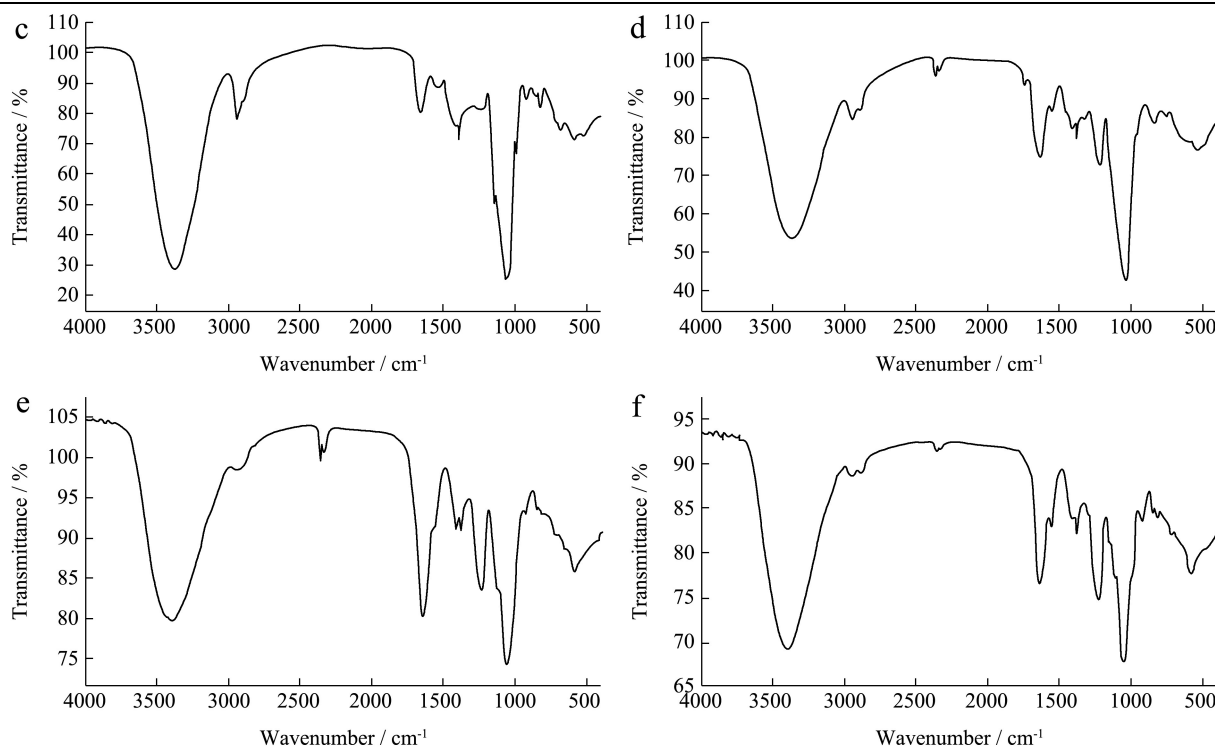


图 6 纯化后胞外多糖的 FT-IR 光谱

Fig.6 FT-IR spectra of purified expolysaccharide

表 2 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的甲基化分析

Table 2 Methylation analysis of EPS-1A, EPS-1B and EPS-2

Serial number	Methylated fragments	Glycosidic bond type	Molar ratio		
			EPS-1A	EPS-1B	EPS-2
A	2,4,6-Me ₃ Glc _p	→3)-D-Glcp-(1→	1.00	1.00	0.00
B	2,3,4-Me ₃ Gal _p	→6)-D-Galp-(1→	4.21	14.63	1.00
C	2,3,4,6-Me ₄ Glc _p	D-Glcp-(1→	1.38	9.90	1.52
D	2,3,6-Me ₃ Glc _p	→4)-D-Glcp-(1→	2.58	27.03	0.00
E	2,3,4-Me ₃ Man _p	→6)-D-Manp-(1→	4.93	6.72	1.72

2.5 单糖成分分析

气相色谱-质谱分析(图 7)显示,组分 EPS-1A 由三种单糖组成,分别是 *D*-Man (RT 26.906)、*D*-Glc (RT 27.247) 和 *D*-Gal (RT 27.938), 比值为 8.64:2.63:1。组分 EPS-1B 也由 *D*-Man (RT 26.966)、*D*-Glc (RT 27.372) 和 *D*-Gal (RT 28.012) 组成, 但比例为 3.22:2.68:1。组分 EPS-2 由 *D*-Man (RT 27.088)、*D*-Glc (RT 27.281) 和 *D*-Gal (RT 27.969) 组成, 比值为 8.23:1.03:1。因此,组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 与 *L. plantarum* KF5^[27]、*L. plantarum* MTCC 9510^[28] 和 *L. plantarum* 7081^[21] 的单糖组成相似。组分 EPS-3 由 *L*-Rha (RT 18.683)、*L*-Fuc (RT 19.59)、*D*-Man (RT 26.816)、*D*-Glc (RT 27.253)、*D*-Gal (RT 27.927) 和 *N*-Acetyl-*D*-glucosamine (RT 31.237) 组成, 比值为 0.16:0.18:0.74:5.47:1.04:1。组分 EPS-4 由 *D*-Man (RT

26.815)、*D*-Glc (RT 27.19)、*D*-Gal (RT 27.912) 和 *N*-Acetyl-*D*-glucosamine (RT 31.219) 组成, 比值为 1.49:0.36:1:2.49。组分 EPS-5 由 *L*-Fuc (RT 19.595)、*D*-Man (RT 26.813)、*D*-Allose (RT 27.19)、*D*-Gal (RT 27.969) 和 *N*-Acetyl-*D*-glucosamine (RT 31.316) 组成, 比例为 0.91:1:0.11:6.73:4.82。根据以往研究, *S. thermophilus* MR-1C^[29] 含有岩藻糖, *L. helveticus* TY 1-2^[30]、*L. lactis* subsp. *Cremoris* LC330^[31]、*L. acidophilus* LMG9433^[32]、*L. rhamnosus* GG 和 *L. suebicus* CUPV225/226 含有 *N*-乙酰葡萄糖胺。

2.6 甲基化分析

甲基化和气相质谱分析(表 2)显示,组分 EPS-1A 和 EPS-1B 均由 →3)-*D*-Glc_p-(1→、→6)-*D*-Gal_p-(1→、→4)-*D*-Glc_p-(1→ 和 →6)-*D*-Man_p-(1→ 组成, 末端残基为 *D*-Glc_p-(1→。组分 EPS-2 由 →6)-*D*-Gal_p-(1→ 和

→6-*D*-Manp-(1→组成, 末端残基也为 *D*-Glc p-(1→。结合一维核磁共振的结果, 组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的糖环为吡喃糖, 包含 α 和 β 糖苷键。结果表明, 与组分 EPS-1A 和 EPS-1B 相比, 组分 EPS-2 的糖苷键类型更少。

2.7 核磁共振光谱 (NMR) 分析

从组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的 ^1H 的 NMR 图 (图 8) 可知, 4.7×10^{-6} 附近的谱峰对应水峰, $3.2\times 10^{-6}\sim 4.0\times 10^{-6}$ 之间的峰值对应 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 质子信号叠加, 不易解析。在 $4.8\times 10^{-6}\sim 5.5\times 10^{-6}$ 的组分 EPS-1A 光谱中, 有 5 个与异头质子对应的化学位移, 信号分别为 5.17×10^{-6} 、 5.01×10^{-6} 、 4.99×10^{-6} 、 4.97×10^{-6} 和 4.92×10^{-6} , 分别对应于组分 EPS-1A 的五个糖残基 (分别标记为 A~E)。从异头信号的化学位移和耦合常数来看, A、B、C 和 D 处于 α 构型, 而 E 处于 β 构型。

在 $4.8\times 10^{-6}\sim 5.5\times 10^{-6}$ 的组分 EPS-1B 光谱中, 也有 5 个异头质子对应的化学位移, 信号分别为 5.26×10^{-6} 、 5.16×10^{-6} 、 4.98×10^{-6} 、 4.90×10^{-6} 、 4.83×10^{-6} , 分别对应于组分 EPS-1B 的 5 个糖残基 (分别标记为 A~E)。再从化学位移和耦合常数来看, A、B 和 C 是 α 构型, D 和 E 是 β 构型。

在 $4.8\times 10^{-6}\sim 5.5\times 10^{-6}$ 的组分 EPS-2 光谱中, 在 5.18×10^{-6} 、 5.00×10^{-6} 和 4.93×10^{-6} 的非均相质子中有三个化学位移, 表明组分 EPS-2 糖链中含有三个糖残基 (分别标记为 A、B 和 C)。我们得出结论 A 和 B 是 α 构型, C 是 β 构型。

组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的 ^{13}C 核磁共振谱图 (图 9) 可知, 组分 EPS-1A 中有 5 种不同的碳信号分别对应甘露糖、葡萄糖和半乳糖残基的 α 或 β 构型, 而 C-1 残基对应的峰值分别为 105.29×10^{-6} 、 102.16×10^{-6} 、 102.12×10^{-6} 、 102.10×10^{-6} 和 100.50×10^{-6} 。

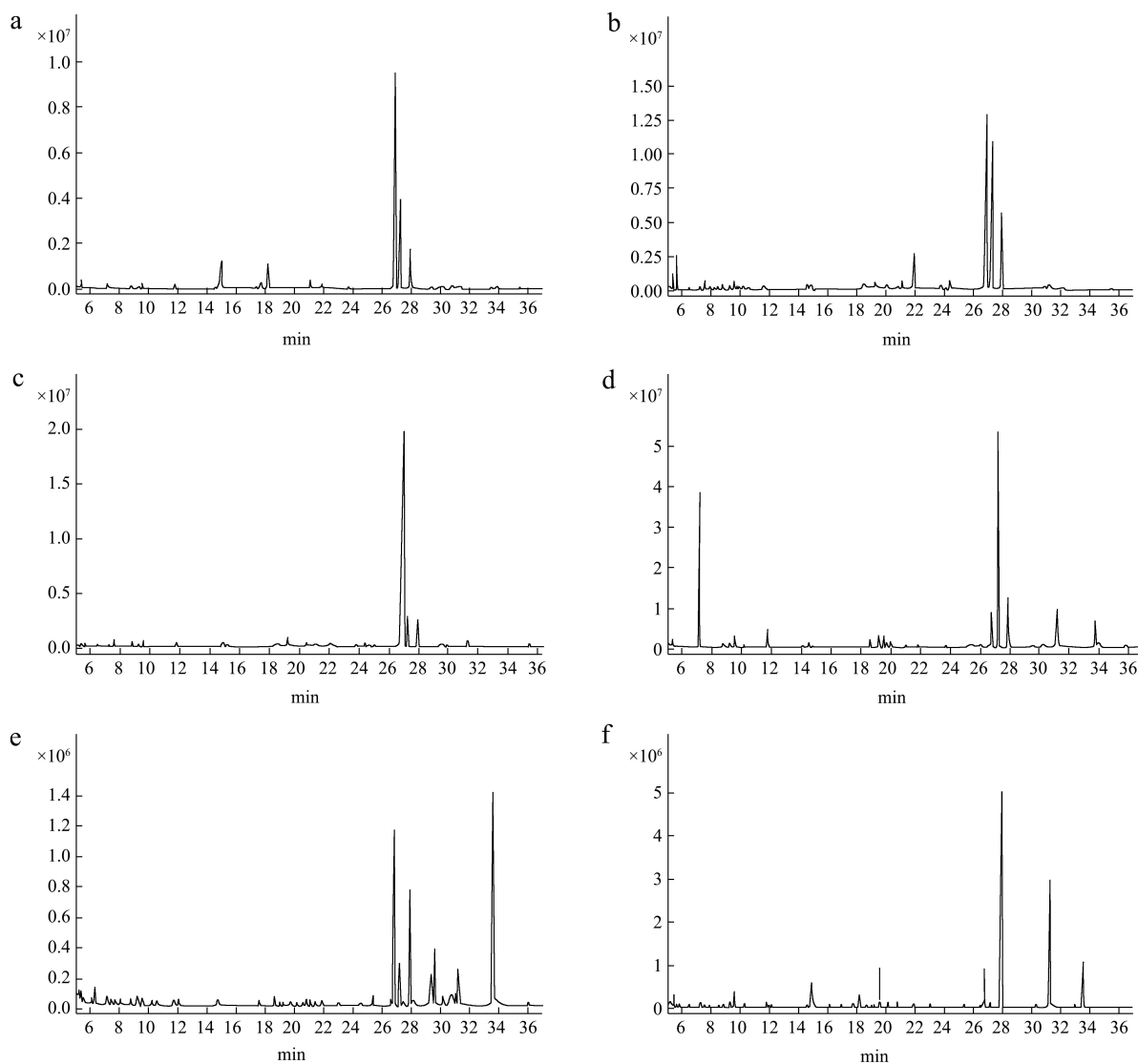


图 7 六种 EPSs 醛腈醋酸酯衍生化的总离子色谱

Fig.7 Total ion chromatography of six EPSs aldehydonitrile acetate derivatives

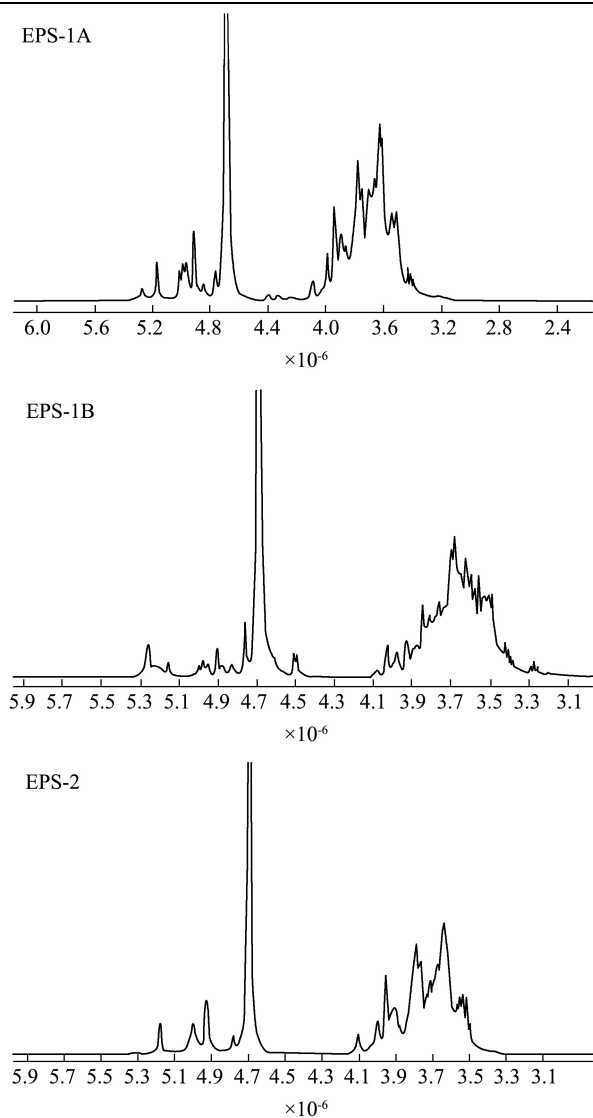


图8 500-MHz 下的 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的 ¹H NMR 谱
Fig.8 ¹H NMR spectra of EPS-1A, EPS-1B and EPS-2 at 500-MHz

同样, 组分 EPS-1B 中有 5 种不同的碳信号分别对应甘露糖、葡萄糖和半乳糖残基的 α 或 β 构型, C-1 残基对应的峰分别为 105.24×10^{-6} 、 105.05×10^{-6} 、 104.27×10^{-6} 、 102.08×10^{-6} 和 100.46×10^{-6} 。最后, 组分 EPS-2 中有三个对应 α 或 β 构型的峰, C-1 糖残基对应的峰分别为 105.05×10^{-6} 、 102.11×10^{-6} 和 100.49×10^{-6} 。

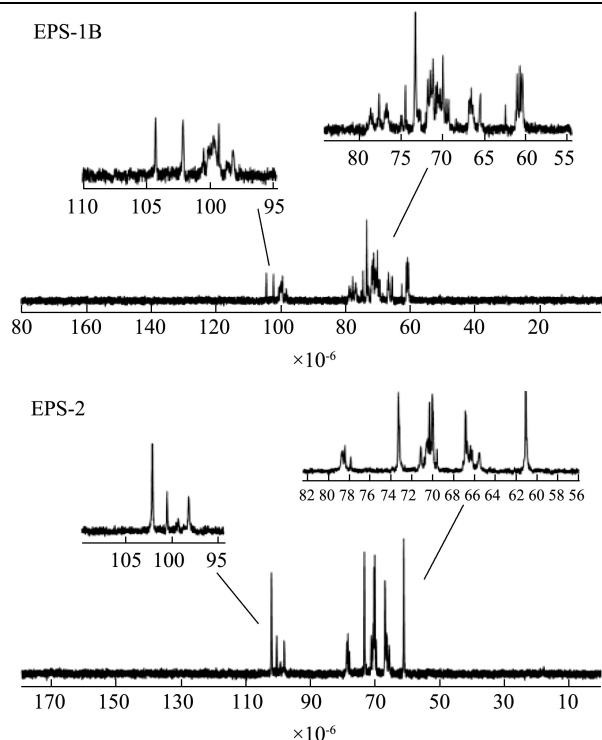
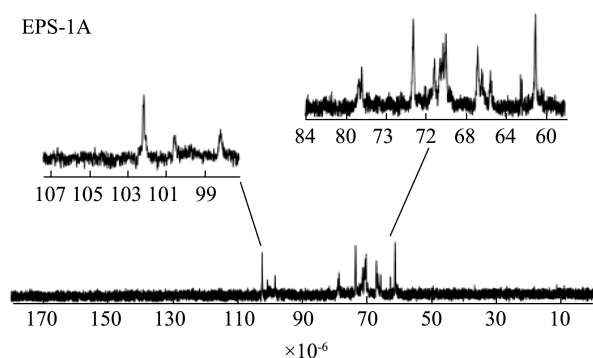


图9 500-MHz 下的 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的 ¹³C NMR 谱
Fig.9 ¹³C NMR spectra of EPS-1A, EPS-1B and EPS-2 at 500-MHz

3 结论

本研究从 *Lpb. Plantarum* NM18 发酵液中分离出 6 种胞外多糖组分, 其中含两个中性组分 (EPS-1A 和 EPS-1B)。经 GC-MS 分析得知, 组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成; 组分 EPS-3 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺组成, 还含有微量的鼠李糖和岩藻糖; 组分 EPS-4 由甘露糖、葡萄糖、半乳糖、*N*-乙酰葡萄糖胺和岩藻糖组成; 组分 EPS-5 由阿洛糖、半乳糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺组成。本研究报道 *Lpb. plantarum* 胞外多糖含有岩藻糖和 *N*-乙酰葡萄糖胺, 组分 EPS-5 中含有罕见的阿洛糖, 在乳酸菌胞外多糖中尚未见研究。对组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 进行甲基化分析, 结合 FT-IR 光谱和 NMR 光谱分析得知, 尽管相对摩尔比不同, 组分 EPS-1A 和 EPS-1B 具有相同的 $\rightarrow 3$ -*D*-Glc_p-(1 \rightarrow , $\rightarrow 6$ -*D*-Gal_p-(1 \rightarrow , $\rightarrow 4$ -*D*-Glc_p-(1 \rightarrow , $\rightarrow 6$ -*D*-Man_p-(1 \rightarrow 和 *D*-Glc_p-(1 \rightarrow 的结构。同时, 组分 EPS-2 主要由 $\rightarrow 6$ -*D*-Gal_p-(1 \rightarrow , $\rightarrow 6$ -*D*-Man_p-(1 \rightarrow 和 *D*-Glc_p-(1 \rightarrow 组成。组分 EPS-1A、EPS-1B 和 EPS-2 的糖环为吡喃糖, 糖苷键构型为 α 和 β 型的混合物。不同乳酸菌产生不同的胞外多糖, *Lpb. plantarum* NM18 所产胞外多糖的单糖组成和摩尔比明显丰富, 因此值得期待做进一步分析。

参考文献

- [1] Guoqiang Y, Qiuwen H, Wenyi Z, et al. Single molecule, real-time sequencing technology improves the sensitivity for detecting bacteria in koumiss, a traditional fermented mare milk product [J]. Science Bulletin, 2020, 65(24): 2065-2067
- [2] Gesudu Q, Zheng Y, Xi X, et al. Investigating bacterial population structure and dynamics in traditional koumiss from Inner Mongolia using single molecule real-time sequencing [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(10): 7852-7863
- [3] Yuecheng M, Xuliang C, Zhehang S, et al. Exploring core microbiota responsible for the production of volatile flavor compounds during the traditional fermentation of koumiss [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 135: 1-8
- [4] Saadat Y R, Khosroushahi A Y, Gargari B P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217: 79-89
- [5] Yi L, Dang Y, Wu J, et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang, China [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(9): 7002-7015
- [6] Laiño J, Villena J, Kanmani P, et al. Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: new insights into molecular interactions with host cells [J]. Microorganisms, 2016, 4(3): 27
- [7] Nishiyama K, Ueno S, Sugiyama M, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCpilin subunit binds to the carbohydrate moieties of intestinal glycoconjugates [J]. Animal Science Journal, 2016, 87(6): 809-815
- [8] Venkataraman D, Sharavan R, Mohammed B R, et al. *In vitro* evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2016, 52(2): 163-173
- [9] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2): 163-171
- [10] Youssef M M M, Mona M G S, Samir A M A. Production, characterization and bio-emulsifying application of exopolysaccharides from *Rhodotorula mucilaginosa* YMM19 [J]. 3 Biotech, 2021, 11(7): 1-12
- [11] Longzhan G, Xiaoguang L, Heming Z, et al. Preparation, characterization and functional properties of a novel exopolysaccharide produced by the halophilic strain *Halomonas saliphila* LCB169T [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 372-380
- [12] Raman K, Poonam B, Jasbir S, et al. Purification, partial structural characterization and health benefits of exopolysaccharides from potential probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 [J]. Process Biochemistry, 2020, 99: 79-86
- [13] Francesca V, Rita B A, Mariaelena D B, et al. Effect of amaranth and quinoa flours on exopolysaccharide production and protein profile of liquid sourdough fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1-16
- [14] Asgher M, Urooj Y, Qamar S A, et al. Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: optimization and structural/functional characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 984-992
- [15] Mengmeng W, Xin Z, Yaqi S, et al. Efficient simultaneous utilization of glucose and xylose from corn straw by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 to produce microbial exopolysaccharide [J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 1-9
- [16] Jiayi W, Yuheng Z, Ling Y, et al. The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides *in vitro*: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 253: 1-56
- [17] Akturk O. Colloidal stability and biological activity evaluation of microbial exopolysaccharide-levan-capped gold nanoparticles [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2020, 192: 1-33
- [18] Jia W, David R S, Rajesh K S. Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: characterization and bioactivities [J]. New Biotechnology, 2021, 61: 29-39
- [19] 高亚娜. 乳酸菌产胞外多糖的表征、生物活性以及应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019
- GAO Yana. Characterization, biological activity and application of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019
- [20] Zhu L, Lu Y, Sun Z, et al. The application of an aqueous two-phase system combined with ultrasonic cell disruption extraction and HPLC in the simultaneous separation and analysis of solanine and *Solanum nigrum* polysaccharide

- from *Solanum nigrum* unripe fruit [J]. Food Chemistry, 2020, 304: 1-9
- [21] Wang K, Li W, Rui X, et al. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 71-78
- [22] Marion M B M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254
- [23] Nelly B, Gustav A-H. New method for quantitative determination of uronicacids [J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489
- [24] Kawai Y, Seno N, Anno K. A modified method for chondrosulfatase assay [J]. Analytical Biochemistry, 1969, 32(2): 314-321
- [25] Zhang W H, Wu J, Weng L, et al. An improved phenol-sulfuric acid method for the determination of carbohydrates in the presence of persulfate [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 227: 1-6
- [26] Das D, Mondal S, Maiti D, et al. Structural characterization of dietary fiber of green chalcumra (*Benincasa hispida*) fruit by NMR spectroscopic analysis [J]. Natural Product Communications, 2009, 4(4): 547-552
- [27] Wang Y, Li C, Liu P, et al. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet kefir [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 895-903
- [28] Bindhumol I, Madhavan N K. Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(12): 4012-4018
- [29] Deborah L, Jeffrey A A, Diane H, et al. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(6): 2147-2151
- [30] Yoshihiro Y, Shinji M, Ryo Y, et al. Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2 [J]. Carbohydrate Research, 1994, 261(1): 67-78
- [31] Marshall V M, Cowie E N, Moreton R S. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcuslactis* subsp. *cremoris* LC330 [J]. Journal of Dairy Research, 1995, 62(4): 621-628
- [32] Robijn G W, Gallego R G, Berg D J C V D, et al. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433 [J]. Carbohydrate Research, 1996, 288(0): 203-218

(上接第 18 页)

- [27] Qin Z, Chunhui S, Wen S, et al. Transcriptome analysis of starch and sucrose metabolism change in Gold Queen Hami melons under different storage temperatures [J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 174: 111445
- [28] Carillon J, Notin C, Schmitt K, et al. Dietary supplementation with a superoxide dismutase-melon concentrate reduces stress, physical and mental fatigue in healthy people: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Nutrients, 2014, 6(6): 2348-2359
- [29] Wang T, Sistrunk L A, Leskovar D I, et al. Characteristics of storage reserves of triploid watermelon seeds: association of starch and mean germination time [J]. Seed Science and Technology, 2011, 39(2): 318-326
- [30] 任国翠,宋雪萍,李俊杰,等.不同肥料配施对甜瓜产量及品质的影响[J].农学学报,2017,7(10):30-33
- REN Guocui, SONG Xueping, LI Junjie, et al. Effects of combined application of different fertilizers on yield and quality of melon [J]. Journal of Agronomy, 2017, 7(10): 30-33
- [31] 王小平,何纲,许建.采前杀菌剂处理对哈密瓜贮藏品质及生理指标的影响[J].农学学报,2020,10(9):43-47
- WANG Xiaoping, HE Gang, XU Jian. Effects of pre harvest fungicide treatment on storage quality and physiological indexes of Hami melon [J]. Journal of Agronomy, 2020, 10(9): 43-47
- [32] 张冉冉,段艳欣,李培环,等.硬肉桃果实成熟前后可溶性糖含量和蔗糖转化酶活性的变化及其与果实硬度的关系[J].植物生理学报,2015,51(12):2109-2113
- ZHANG Ranran, DUAN Yanxin, LI Peihuan, et al. Changes of soluble sugar content and sucrose invertase activity before and after fruit ripening and their relationship with fruit hardness [J]. Journal of Plant physiology, 2015, 51(12): 2109-2113