

氮源对嗜热链球菌胞外多糖表型特征的影响

刘洋, 乔少婷, 李嘉雯, 田佳乐, 丹彤, 孙天松*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室
内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 乳酸菌胞外多糖(EPS)具有增加发酵乳黏度,防止乳清析出,增强凝乳强度等特性,是目前食品科学领域的研究热点之一。本研究以基础培养基 M17 为对照,以大豆蛋白胨、胰蛋白胨和酪蛋白胨替代 M17 液体培养基的复合氮源,探究不同氮源对嗜热链球菌 IMAU20561 胞外多糖的产量、分子质量及结构的影响。结果表明:嗜热链球菌 IMAU20539 以大豆蛋白胨为唯一氮源的 M17 培养基中胞外多糖产量达 480.7 mg/L,远高于其它 3 种培养基所得多糖的产量。不同氮源培养基所得粗 EPS 经纯化后收集的 EPS 组分不同,各 EPS 组分的分子质量也有显著差异,以酪蛋白胨为唯一氮源的 M17 培养基所得 EPS 分子质量最大(5.964×10^5 u),其次为基础培养基 M17(1.260×10^5 u)、大豆蛋白胨培养基(6.635×10^4 u)和胰蛋白胨培养基(1.192×10^4 u)。不同氮源培养基所得多糖结构有显著差异,大豆蛋白胨培养基所得 EPS 主要由半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖组成;胰蛋白胨培养基所得 EPS 主要由葡萄糖醛酸、葡萄糖和半乳糖组成;酪蛋白胨培养基和基础培养基 M17 所得 EPS 有相似的单糖组成,主要由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成,占比分别为 10.46:1.62:87.37 和 20.37:2.77:74.91。

关键词 乳酸菌;嗜热链球菌;胞外多糖;氮源;多糖结构

文章编号 1009-7848(2022)01-0058-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.007

多数乳酸菌(Lactic acid bacteria)是安全的(Generally recognized as safe, GRAS),具有多种潜在的益生功能,广泛应用于医药、乳制品等^[1]。乳酸菌在代谢过程中产生的次级代谢产物胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)属于大分子物质,结构复杂多样,不仅为机体提供生命活动的能量^[2],还可作为增稠剂、稳定剂等应用于发酵乳制品^[3]。据报道,乳酸菌胞外多糖具有抗氧化^[4]、抗肿瘤,降低胆固醇^[5],增强免疫力^[6]和改善肠道微生态环境等特性^[7]。如 Laiño 等^[8]研究表明乳酸菌与其所产生的胞外多糖以相互作用的方式可减少肠上皮细胞的炎症;Maeda 等^[9]发现开菲尔乳杆菌产生的 EPS,可降低血清胆固醇水平,抑制血压升高。

乳酸菌菌种、培养条件和培养基组分等因素的变化对胞外多糖的表型有影响^[10]。当前,关于培养基中碳源类型对胞外多糖产量影响的报道较多,如陈营等^[11]发现以葡萄糖为碳源时 EPS 的产

量相对较高,较低温度下更适合多糖的合成和积累。Aparna 等^[12]发现在 M17 培养基中添加 1%蔗糖后,嗜热链球菌 1275 胞外多糖的产量明显提高。刘晶等^[13]发现当培养基中果糖的添加量为 2%时,副干酪乳杆菌 VL8 的胞外多糖产量提高了 2.6 倍。然而,关于培养基中氮源类型对胞外多糖表型影响的报道较少。本研究以大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨分别替换 M17 培养基中复合氮源,以 M17 基础培养基为对照,采用凝胶渗透色谱(Gel permeation chromatography, GPC)测定嗜热链球菌 IMAU20561 胞外多糖各组分的分子质量,采用红外光谱(Infrared spectrum, IR)和高效液相色谱仪(High performance liquid chromatography, HPLC)研究胞外多糖不同组分的理化性质,分析培养基中不同氮源对嗜热链球菌胞外多糖产量、分子质量和结构的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

嗜热链球菌 IMAU20561 (*Streptococcus thermophilus*),由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库(Lactic acid bacteria collection center, LABCC)提

收稿日期:2021-01-08

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31860448);内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2018MS03010)

作者简介:刘洋(1994—),女,硕士生

通信作者:孙天松 E-mail: sts9940@sina.com

供。

大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、 β -甘油磷酸二钠、抗坏血酸钠、酵母粉、硫酸镁、95%无水乙醇、三氯乙酸、苯酚、盐酸、浓硫酸(均为分析纯级),天津市风船化学试剂科技有限公司;M17 液体培养基,海博生物技术(青岛)有限公司;透析袋 8 000~14 000 u,北京 Solarbio 公司;氯化钠、氢氧化钠,天津市汇杭化工科技有限公司;DEAE-Cel-lulose 52,Coolaber 公司;Sephrose CL-6B, 瑞士 Sigma 公司。

1.2 设备与仪器

超净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;电热恒温培养箱,上海坤天试验仪器有限公司;高压灭菌锅,日本 HIRAYAMA 公司;DHL-BN 型电脑恒流泵、TH-500A 梯度混合器、CBS-B 程控多功能全自动部分收集器,上海青浦沪西仪器厂;SCIENTZ-10N 型真空冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;DL-6M 型高速冷冻离心机,cence 湘仪集团;电子天平,上海浦春计量仪表有限公司;UV-1700 型紫外分光光度计、IR Affinity-1 型傅立叶变换红外光谱仪,日本 SHIMADZU 公司;ELEOS System 凝胶色谱仪,美国 Wyatt 公司;Agilent1200 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 IMAU20561 胞外多糖的制备及测定

1) 胞外多糖的制备 将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的 I-MAU20561 嗜热链球菌于 M17 液体培养基活化,以 1×10^{-7} CFU 的接种量接于不同氮源培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,24 h 培养两代。将发酵液以 $12\ 000\times g$ 离心 25 min,去菌泥,上清液加 80%三氯乙酸至终含量为 4%,充分搅拌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 10 h。将静置后的发酵液 $12\ 000\times g$ 离心 25 min,取上清液,加 3 倍体积无水乙醇, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, $12\ 000\times g$ 离心 25 min,取沉淀用少量蒸馏水复溶,在 8 000~14 000 u 的透析袋中透析 48 h,每 6 h 换 1 次水,将透析液 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻,真冷冻干燥得粗多糖。

2) 胞外多糖标准曲线绘制 分别吸取葡萄糖标准溶液 0.0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL 于具塞试管中,用蒸馏水补至 0.5 mL,使各管含糖量分别为 20,40,60,80,100 mg/L。每管加 1 mL 6%苯酚

溶液,迅速加入 5 mL 浓硫酸, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,在波长 490 nm 处测定吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线,如图 1 所示,回归方程为: $y = 0.0255x + 0.0109$ ($R^2 = 0.9969$)。

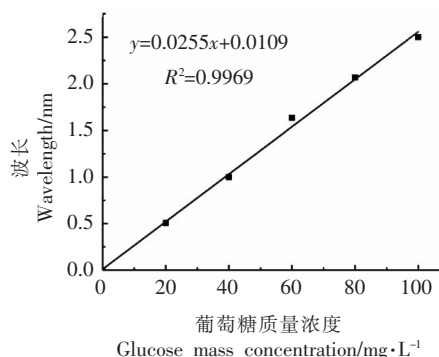


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

采用苯酚硫酸法^[14]测定胞外多糖含量,于波长 490 nm 处测定吸光度。以蒸馏水做空白对照,将所测吸光度值代入回归方程计算胞外多糖含量。

1.3.2 不同氮源对 IMAU20561 胞外多糖结构影响

1.3.2.1 胞外多糖的纯化 将冻干后的 20 mg/mL 粗多糖以的质量浓度于 DEAE Sepharose-52 纤维柱中进行第 1 次纯化,收集不同 EPS 组分并标记,将不同组分的 EPS 以 150 mg/mL 的质量浓度于 Sepharose CL-6B 凝胶柱中进行第 2 次纯化,收集纯化后的 EPS 冷冻干燥。

1.3.2.2 各组分胞外多糖的纯度及分子质量测定

采用凝胶色谱法(Gel permeation chromatography, GPC)对各组分 EPS 分子质量、纯度进行测定。色谱条件:流动相:水+0.02%Na₃N₃,色谱柱:Shodex OHpak 系列 SB-806 串 803,流速 1 mL/min,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 500 μL 。采用 GPC 软件计算分子质量,根据峰值的对称性及出峰时间分析胞外多糖的纯度及分子质量。

1.3.2.3 各组分多糖的红外光谱检测 取适量胞外多糖样品与一定量的 KBr 粉末充分混合研磨、压片。用傅里叶红外光谱仪测定,在 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 波段扫描。

1.3.2.4 各组分的单糖组成 采用高效液相色谱仪检测各组分的单糖组成。称取一定量样品于水解管中,加1 mL超纯水,1 mL 4 mol/L 三氟乙酸(Trifluoroacetate, TFA),充氮,110 °C水解2 h,冷却至室温。取0.1 mL于4 mL离心管中,在60 °C真空干燥箱中干燥2 h,向离心管内加入0.05 mL 0.3 mol/L NaOH,0.05 mL PMP 甲醇溶液,充氮,70 °C水浴60 min,冷却至室温,加0.5 mL 0.3 mol/L HCl,0.75 mL水,1.5 mL氯仿,充分振荡摇匀后静置分层,弃下层液体氯仿。萃取3次后,取水层,用0.45 μm 过滤膜除去杂质,用液相色谱仪分析。色谱条件:色谱柱为SHISEIDO C18柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:0.1 mol/L KH₂PO₄(pH 6.8)与乙腈体积比82:18,流速1.0 mL/min,柱温25 °C,波长245 nm。

2 结果与分析

2.1 IMAU20561 胞外多糖产量

以基础培养基 M17 作对照,采用苯酚硫酸法测定以大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨为唯一氮源的 M17 培养基中嗜热链球菌 IMAU20561 胞外多糖的产量(图2)。可以看出,基础培养基 M17 的胞外多糖产量为 150.8 mg/L,以大豆蛋白胨为唯一氮源时的产量为 480.7 mg/L,与基础培养基 M17 相比提高 2 倍多,胰蛋白胨培养基所产的 EPS 量为 175 mg/L,而酪蛋白胨培养基的 EPS 产量最低,仅为 28.1 mg/L。可见,不同氮源作培养基时嗜热链球菌 IMAU20561 胞外多糖产量差异较

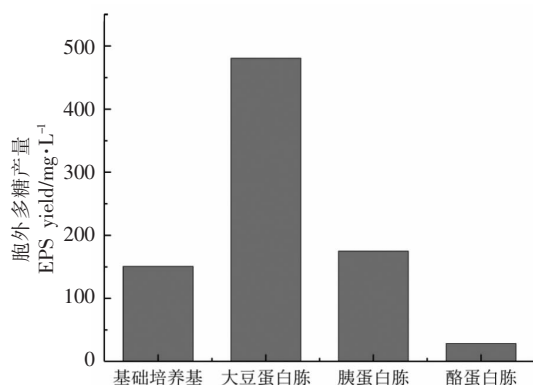


图2 不同氮源时胞外多糖的产量

Fig.2 EPS yield under different nitrogen sources

大,这主要是因氮源是乳酸菌生长过程中的重要营养物质,不同氮源中的营养成分影响胞外多糖合成途径中相关酶的活性^[15],从而影响胞外多糖的产量。近年来,关于氮源对胞外多糖的合成及产量的影响广受关注。如 Khanh 等^[16]发现酵母提取物、牛肉膏和蛋白胨等氮源能促进植物乳杆菌 T10 产胞外多糖。Almalki^[17]研究发现硫酸铵、酪蛋白、脱脂牛奶和燕麦粉等作为乳酸杆菌的氮源时 EPS 的产量明显增加;Fazilet 等^[18]研究发现硝酸钠和细菌学蛋白胨对不同菌株 EPS 产量的影响差异较大,特别是无机氮源硝酸钠会抑制乳酸菌胞外多糖的合成。

2.2 IMAU20561 胞外多糖的纯化分离

2.2.1 胞外多糖 DEAE-Cellulose 52 离子柱纯化

DEAE-Cellulose 52 纯化是利用分离物自身所带电荷不同,与离子交换剂结合能力的差异,经不同浓度的缓冲液洗脱,达到纯化的目的。嗜热链球菌 IMAU20561 在大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨为单一氮源的 M17 培养基中培养 24 h,提取的粗 EPS 经 DEAE-Cellulose 52 纯化得到的 EPS 组分如图 3 所示。大豆蛋白胨作唯一氮源时,M17 培养基所得粗 EPS 经去离子水洗脱收集,冷冻干燥得到 3 个组分:EPS 1-1 和 EPS 1-2 为中性多糖, EPS 1-3 为酸性多糖或带有酸性基团的糖复合物。胰蛋白胨作唯一氮源时 M17 培养基提取的粗多糖纯化得到 3 个组分:EPS 2-1 为不带电荷的中性多糖, EPS 2-2 和 EPS 2-3 为酸性多糖或带酸性基团的糖复合物。酪蛋白胨为唯一氮源时 M17 培养基提取的粗多糖经分离纯化得到 2 个组分,其中 EPS 3-1 为不带电荷的中性多糖, EPS 3-2 为带负电荷的酸性多糖或带有酸性基团的糖复合物。基础培养基 M17 所得粗多糖经离子交换柱纯化得到 2 个组分,分别为中性多糖 EPS 4-1 和酸性多糖 EPS 4-2。分别收集上述各组分中产量较高的 EPS 1-3, EPS 2-3, EPS 3-1, EPS 4-1 进行后续试验。

2.2.2 胞外多糖 Sepharose CL-6B 凝胶柱层析纯化 收集到的 EPS 1-3, EPS 2-3, EPS 3-1, EPS 4-1 经 Sepharose CL-6B 纯化,结果如图 4 所示。所得各组分均为单一峰,峰值对称,相对分子质量都较为均一。

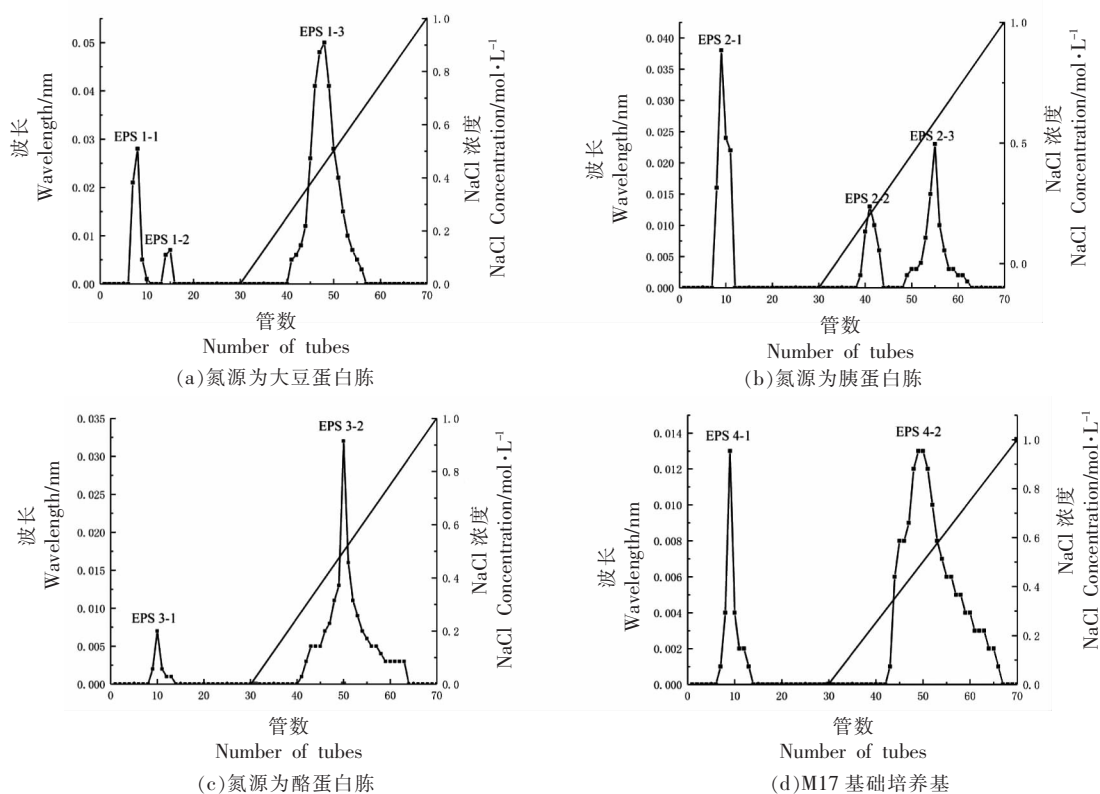


图 3 不同氮源粗 EPS 经 DEAE-Cellulose 52 离子交换色谱柱梯度洗脱曲线

Fig.3 Stepwise elution curve of crude EPS from different nitrogen sources on DEAE-Cellulose 52 chromatography column

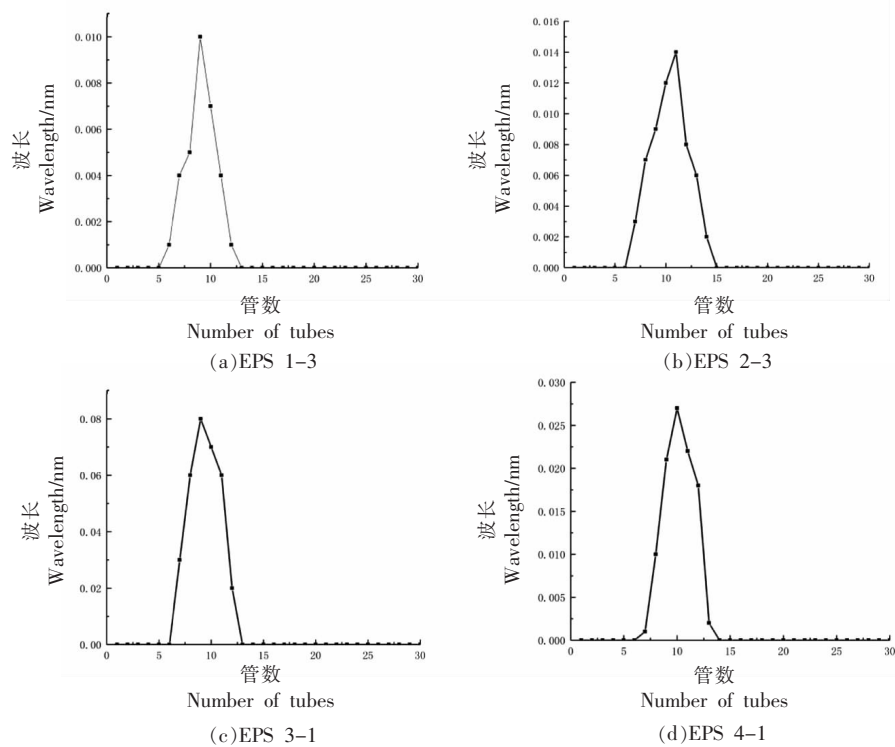


图 4 胞外多糖经 Sepharose CL-6B 色谱柱的洗脱曲线

Fig.4 Elution curves of EPS on Sepharose CL-6B chromatography column

2.3 IMAU20561 各组分胞外多糖分子质量

各组分胞外多糖分子质量的测定结果由图 5 所示。多糖组分 EPS 1-3, EPS 2-3, EPS3-1, EPS4-1

经凝胶色谱仪的双检测器检测后均为单一对称峰,4 种组分均为单一多糖与凝胶过滤色谱法所得结果一致。

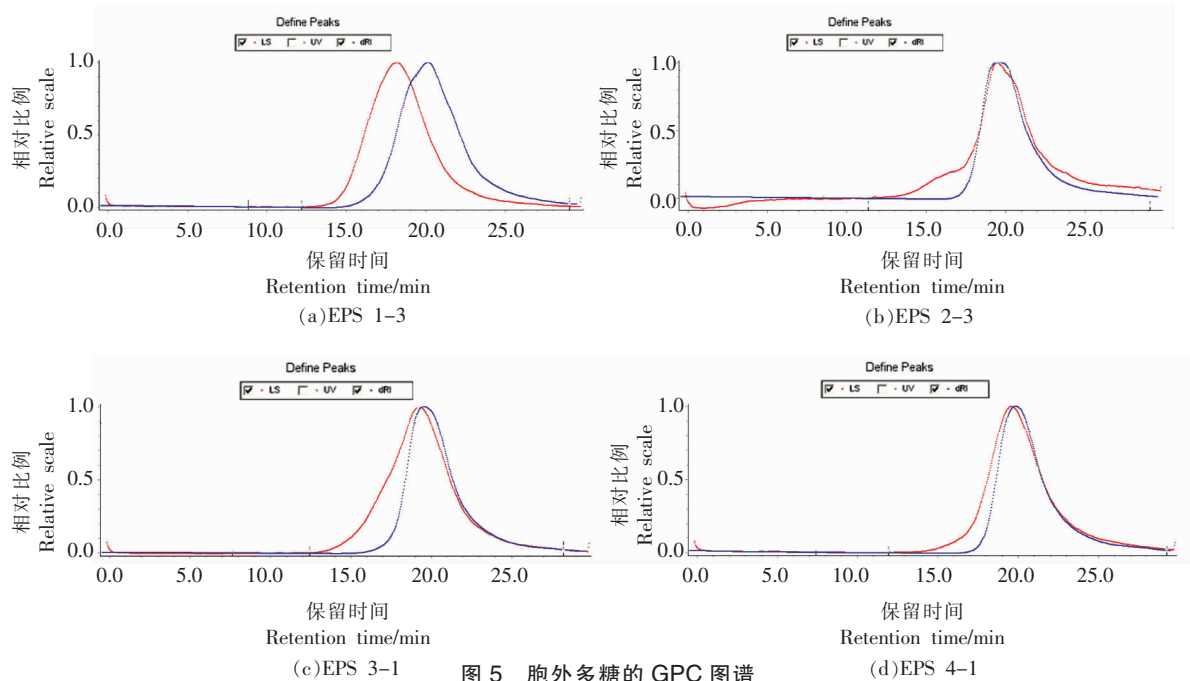


图 5 胞外多糖的 GPC 图谱

Fig.5 GPC chromatogram of EPS

各 EPS 组分的分子质量见表 2,4 种组分的 EPS 多分散系数(PDI, M_w/M_n)均小于 3,表明分子质量分布的范围都较均一^[19]。多糖的分子质量与胞外多糖水溶液的黏度呈正相关关系^[20]。本试验

中 EPS 3-1 的分子质量远高于其它 3 种多糖组分,说明酪蛋白胨作为唯一氮源时产生的多糖可增加乳制品中的黏度,可作为增稠剂、稳定剂等应用于乳制品生产中^[21]。

表 2 胞外多糖的分子特征

Table 2 The molecular characteristic of EPS

样品	M_w/M_n (PDI)	M_w/u	M_n/u	主要分子质量分布范围/ u (占比/%)
EPS 1-3	1.592	8.969×10^4	6.635×10^4	$3.6 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ (79.2%)
EPS 2-3	1.811	2.159×10^4	1.192×10^4	$4.2 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ (32.2%)
EPS 3-1	1.927	1.149×10^5	5.964×10^5	$4.5 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^5$ (45.2%)
EPS 4-1	1.124	1.416×10^5	1.260×10^5	$1.1 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ (44.2%)

2.4 IMAU20561 各组分多糖的单糖检测结果

2.4.1 各组分多糖的红外光谱检测结果 用红外光谱可以识别吡喃糖、呋喃糖,确定糖苷键的类型、糖的构型及 EPS 链上羟基取代的信息,是鉴别多糖结构的重要方法。由图 6 可知,在 $3\ 600 \sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 范围内, EPS 1-3、EPS 2-3、EPS 3-1 和 EPS 4-1 都有一个宽而强的吸收峰,是由 -OH

键伸缩振动引起的;在 $2\ 930\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为 C-H 伸缩振动峰,是典型的多糖特征峰^[22];在 $1\ 700 \sim 1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 范围内,吸收峰为 $1\ 632.65, 1\ 646.97\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 643.39\ \text{cm}^{-1}$,是羧基的对称或非对称伸缩振动^[23];在 $1\ 500 \sim 950\ \text{cm}^{-1}$ 范围为碳水化合物的指纹区域,在 $1\ 410 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 范围的吸收峰为 C-H 的变角振动^[2]; $1\ 026 \sim 1\ 049\ \text{cm}^{-1}$ 和 $920 \sim 927$

cm^{-1} 范围为吡喃糖环的对称或非对称伸缩振动吸收峰^[24];在 $840\sim 920\text{ cm}^{-1}$ 范围有多个吸收峰表示样品同时存在 α 和 β 构型^[23]。可见,不同氮源培养基中获得的胞外多糖在构型上相似度较高,官能团差异较小。酸性多糖 EPS 1-3 与 EPS 2-3 都含

有羟基、亚甲基等官能团。水洗纯化的多糖组分 EPS 3-1 与 EPS 4-1 主要官能团组成相似, EPS 1-3 在 $1\ 640\text{ cm}^{-1}$ 附近没有明显峰值,不能判断是否含有羧基,在多糖指纹区没有明显差异,差异性较小。

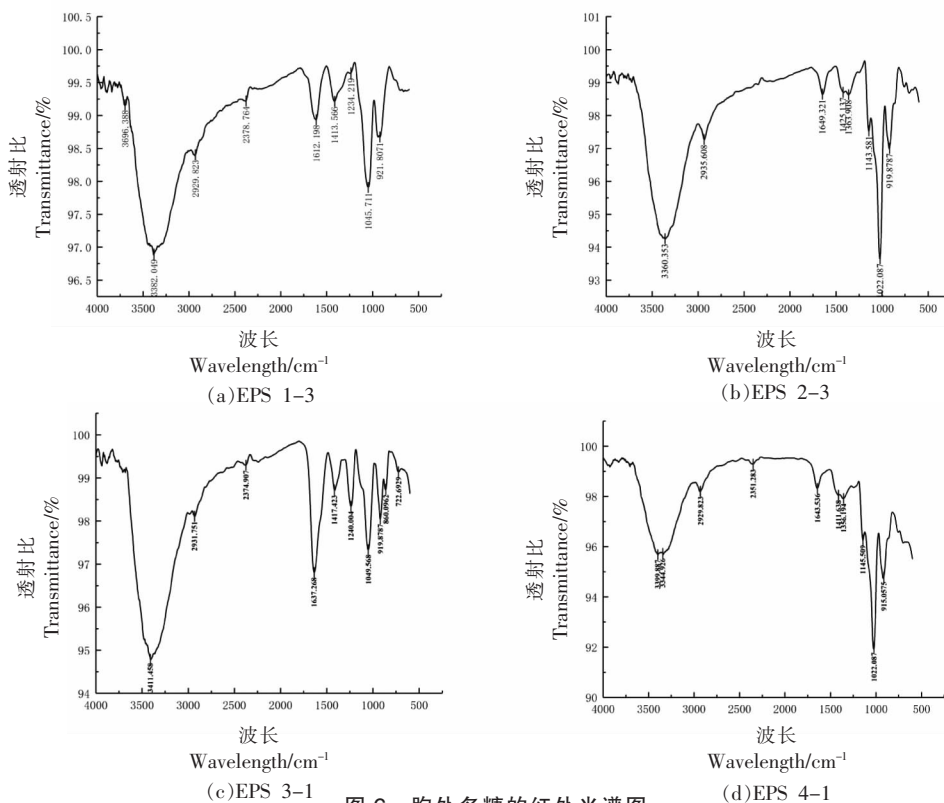


图 6 胞外多糖的红外光谱图

Fig.6 FT-IR spectrum of EPS

2.4.2 各组分的单糖组成 不同氮源的 M17 培养基中嗜热链球菌 IMAU20561 胞外多糖各组分的 HPLC 分析结果见图 8。图 7 为标准品单糖的出峰时间:①甘露糖(Man)(RT=13.375 min);②核糖(Rib)(RT=17.121 min);③鼠李糖(Rha)(RT=17.872 min);④葡萄糖醛酸(GlcA)(RT=20.974 min);⑤半乳糖醛酸(GalA)(RT=24.226 min);⑥葡萄糖(Glc)(RT=27.432 min);⑦半乳糖(Gal)(RT=31.296 min);⑧木糖(Xyl)(RT=32.538 min);⑨阿拉伯糖(Ara)(RT=34.144 min);⑩岩藻糖(Fuc)(RT=38.673 min)。

比对纯化的各组分胞外多糖的单糖组成与单糖标准品色谱图,根据出峰顺序及保留时间得出各组分之间的单糖种类及含量有一定的差异。

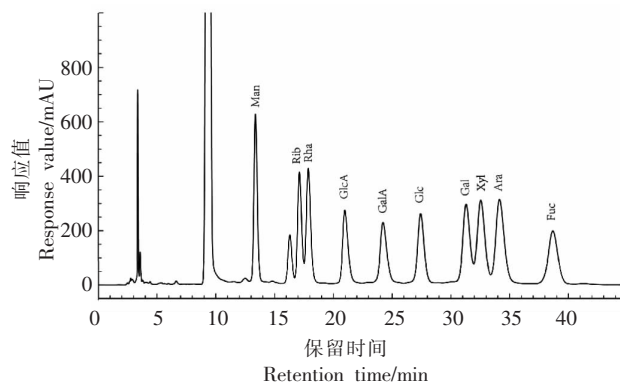


图 7 单糖标准品的液相色谱图

Fig.7 Liquid chromatogram of monosaccharide reference

EPS 1-3 和 EPS 2-3 为酸性多糖, EPS 1-3 主要由半乳糖醛酸、半乳糖和阿拉伯糖组成, 物质的量的比为 1:1.24:0.68。EPS 2-3 主要由葡萄糖醛酸、葡萄糖和半乳糖 3 种单糖组成, 占总物质的量的 85.58%, 物质的量的比为 1.84:0.15:1, 这与 DEAE-Cellulose 52 离子柱纯化结果较一致。EPS

3-1 和 EPS 4-1 主要由甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 物质的量的比分别为 1:8.36:0.15 和 1:3.68:0.14。这两种中性多糖组分的物质的量的比和单糖的种类差异较小, 还需进一步确定是否为同类型多糖。

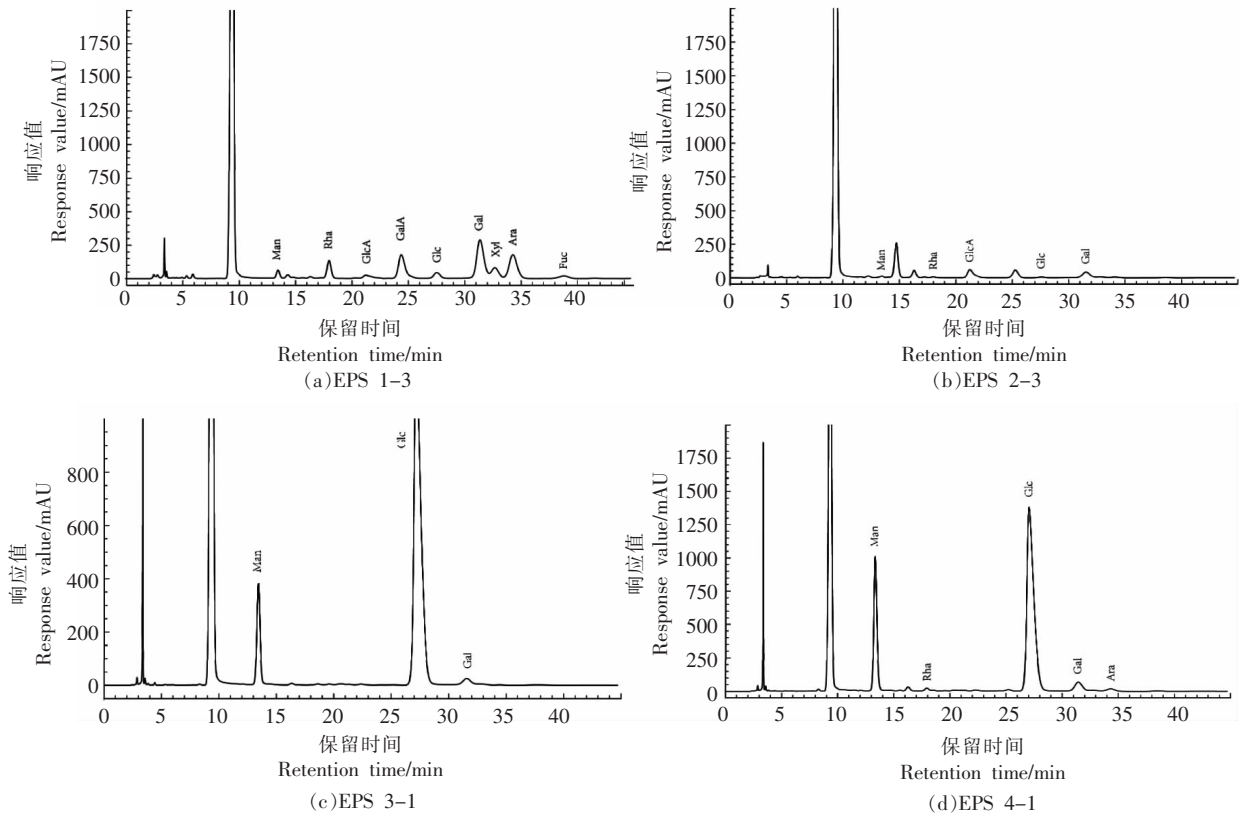


图 8 各组分的单糖组成分析图

Fig.8 Analysis of monosaccharide composition of EPS

3 结论

乳酸菌是公认的食品级安全微生物, 其在乳制品发酵过程中会产生次级代谢产物胞外多糖, 而胞外多糖具有独特的流变学特性和分子结构, 可作为增稠剂、乳化剂和稳定剂等, 在乳制品生产中发挥重要作用。本试验以分离自传统发酵乳制品中的嗜热链球菌 IMAU20561 为对象, 研究不同氮源对胞外多糖表型特征的影响, 得到如下结论:

1) 由不同氮源的 M17 培养基获得的胞外多糖的产量不同, 当大豆蛋白胨为唯一氮源时, 胞外多糖产量最高, 达 480.7 mg/L。

2) 由不同氮源的 M17 培养基所得胞外多糖

分子质量也有显著差异, 以酪蛋白胨为唯一氮源的 M17 培养基所得 EPS 分子质量最大, 其次为基础培养基 M17、大豆蛋白胨培养基和胰蛋白胨培养基。

3) 有不同氮源的 M17 培养基生产的胞外多糖结构有显著差异, 各单糖组成的百分比有所不同。

参 考 文 献

- [1] PSRK S B, MYUNG I M, LEE Y, et al. Effect of emollients containing vegetable-derived *Lactobacillus* in the treatment of atopic dermatitis symptoms:

- split-body clinical trial[J]. *Annals of dermatology*, 2014, 26(2): 6.
- [2] WEI D, ZHANG Y C, YI H X, et al. Research methods for structural analysis of lactic acid bacteria induced exopolysaccharides [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 46(6): 875-822.
- [3] AI L Z, GUO Q B, DING H H, et al. Structure characterization of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W from skim milk[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56: 134-143.
- [4] LI J Y, JIN M M, MENG J, et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LP6: antioxidation and the effect on oxidative stress[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(1): 1147-1152.
- [5] KORCZ E, KERÉNYI Z, VARGA L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects[J]. *Food & Function*, 2018, 9(1): 3057-3068.
- [6] GORSKA-FRACZEK S, SANDSTROM C, KENNEL L, et al. The structure and immunoreactivity of exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus johnsonii* strain 151[J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 378: 148-153.
- [7] CAGGIANIELLO G, KLEEREBEZEM M, SPANO G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(9): 3877-3886.
- [8] 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.
- [9] MAEDA H, ZHU X, OMURA K, et al. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation[J]. *BioFactors*, 2004, 22(1/2/3/4): 197-200.
- [10] LI S, SHAH N P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 [J]. *Food Chemistry*, 2014, 165(3): 262-270.
- [11] 陈营, 孙莉萍, 曾勇, 等. 一株乳酸菌胞外多糖产生的影响因素及其提取[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(4): 85-90.
- CHEN Y, SUN L P, ZENG Y, et al. The production influencing factors of extracellular polysaccharide (EPS) from a strain of lactic acid bacteria and EPS extraction[J]. *Microbiology*, 2005, 32(4): 85-90.
- [12] APARNA P, YING T, WU Q L, et al. Transcriptional insights into the growth phase- and sugar-associated changes in the exopolysaccharide production of a high EPS-producing *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1919.
- [13] 刘晶, 杨森, 陈杨扬, 等. 副干酪乳杆菌 VL8 产胞外多糖条件优化及其抗氧化性质[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(5): 82-89.
- LIU J, YANG S, CHEN Y Y, et al. Optimized condition and antioxidant properties of exopolysaccharides by *Lactobacillus paracasei* VL8[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(5): 82-89.
- [14] WEI D, ZHANG L W, WANG S M, et al. Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171: 307-315.
- [15] ESCALANTE A, VILLEGAS J, WACHER C, et al. Activity of the enzymes involved in the synthesis of exopolysaccharide precursors in an overproducing mutant copy strain of *Streptococcus thermophilus* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 209(2): 289-293.
- [16] KHANH T B T D, THAO D T T. Optimal conditions for exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* T10[J]. *J Sci Technol*, 2016, 54(4A): 40-47.
- [17] ALMALKI M A. Exopolysaccharide production by a new *Lactobacillus lactis* isolated from the fermented milk and its antioxidant properties [J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2020, 32(2): 1271-1277.
- [18] FAZILET M, TOKATLI M, BAĞDER E S, et al. Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(4): 875-885.
- [19] BREMER P J, GEESEY G G. An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenu-

- ated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Biofouling*, 1991, 3(2): 89–100.
- [20] GENTÈS M C, ST-GELAIS D, TURGEON S L. Turgeon. Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria[J]. *Dairy Science & Technology*, 2011, 91(5): 645–661.
- [21] XU Y M, CUI Y L, YUE F F, et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria: Structures, physicochemical functions and applications in the food industry[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 475–499.
- [22] WU W, ZHU Y, ZHANG L, et al. Extraction, preliminary structural characterization, and antioxidant activities of polysaccharides from *Salvia miltiorrhiza* Bunge.[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(2): 1348–1353.
- [23] CHEN Z, SHI J, YANG X, et al. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation[J]. *International Dairy Journal*, 2015, 43: 15–21.
- [24] 王昭润. 基于 α -葡萄糖苷酶抑制率的桦褐孔菌胞外多糖培养基优化及结构鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2018.
- WANG Z R. Optimization and structure identification of extracellular polysaccharide from *Inonotus obliquus* based on α -glucosidase inhibitory rate[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2018.

Effects of Nitrogen Sources on the Phenotypic Characteristics of Exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus*

Liu Yang, Qiao Shaoting, Li Jiawen, Tian Jiale, Dan Tong, Sun Tiansong*

(Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Hohhot 010018)

Abstract Lactic acid bacteria exopolysaccharides have the characteristics of increasing the viscosity of fermented milk, preventing the precipitation of whey, and enhancing the strength of curd. It is currently one of the research hotspots in the field of food science. In this study, the basic medium M17 was used as a control, and the compound nitrogen source of M17 liquid medium was replaced with soy peptone, tryptone and casein peptone to explore the effect of different nitrogen sources on the yield, molecular weight and structure of the extracellular polysaccharide of *Streptococcus thermophilus* IMAU20561. The results showed that the yield of extracellular polysaccharide in M17 medium with soy peptone as the sole nitrogen source for *Streptococcus thermophilus* IMAU20539 reached 480.7 mg/L, which was much higher than the yield of polysaccharides obtained from the other three media. Among them, the M17 medium with soy peptone as the sole nitrogen source had the highest production of extracellular polysaccharides, reaching 480.7 mg/L. Much higher than the yield of polysaccharides from the other three media. The EPS fractions of the crude EPS obtained from different nitrogen sources were different after purification, and the molecular weight of each EPS fraction was also significantly different. The M17 medium with casein peptone as the sole nitrogen source had the highest EPS (5.964×10^5 u), followed by basic medium M17 (1.260×10^5 u), soybean peptone medium (6.635×10^4 u) and tryptone medium (1.192×10^4 u). There were significant differences in the structure of polysaccharides obtained from different nitrogen sources. The EPS obtained from soy peptone medium is mainly composed of galacturonic acid, galactose and arabinose; the EPS obtained from the tryptone medium mainly consists of glucuronic acid, glucose and galactose. The EPS obtained from casein peptone medium and basic medium M17 had similar monosaccharide composition, mainly composed of mannose, glucose and galactose, and the percentages were 10.46:1.62:87.37 and 20.37:2.77:74.91, respectively.

Keywords *Lactobacillus*; *Streptococcus thermophilus*; exopolysaccharide; nitrogen source; polysaccharide structure