

细菌胞外多糖构效关系及特性的研究

王 鹏, 江晓路*, 江艳华, 管华诗
(中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003)

摘 要: 近年来随着糖生物学的发展, 细菌胞外多糖所表现出独特的理化特性、生物学活性越来越被人们所关注。本文对目前已研究发现的细菌胞外多糖, 从结构出发对构效关系、理化性质及生物学活性进行了详细阐述。并对今后细菌胞外多糖在工业应用的前景进行了展望, 以期对新型细菌胞外多糖的研究与开发提供一定的理论基础。
关键词: 细菌胞外多糖; 构效关系; 特性; 应用

Review on Research and Development on Structure-function Relationship and Characteristics of Bacterial Exopolysaccharides

WANG Peng, JIANG Xiao-Lu*, JIANG Yan-Hua, GUAN Hua-Shi
(Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: With the development of glycobiology, the unique physical and chemical characteristics and bioactivities of bacterial exopolysaccharides were paid great attentions by the concerned people. The classification and structure, physical and chemical characteristics, biological activities and relationship of structure and function of polysaccharides produced by bacterium were introduced in detail in this paper. And the prospect of bacteria polysaccharides was envisaged. These information could be used as a theoretical foundation for the study and development of novel polysaccharides.

Key words: bacterial exopolysaccharides; structure-function relation; characteristics; application

中图分类号 Q539

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0257-04

随着糖生物学的飞速发展, 多糖结构与其本身理化性质及生物学活性间的关系不断被阐明。多糖在食品、医药、石油及化工等领域的应用越来越被人们所关注。作为多糖中的一类——细菌胞外多糖, 它广泛存在于自然界中。它相比其它四类多糖——真菌多糖、动物多糖、植物多糖、藻类多糖, 具有许多优良性质: 如细菌胞外多糖产糖量较高、质量稳定, 且受环境因素影响较小。同时近年来利用生物技术开发的新型产品, 以安全、无毒且独特的理化性质占据了较强的市场竞争力, 具有广阔的发展前景。但从国内范围来看, 细菌胞外多糖的研究不多且较为局限。本文对目前就已研究发现的细菌胞外多糖, 从结构本身出发, 对构效关系、理化性质及生物学活性进行了详细阐述。并对今后细菌胞外多糖在工业应用的前景进行展望, 以期对新型细菌胞外多糖的研究与开发提供一定的理论基础。

1 细菌胞外多糖的分类及其结构

近年来在结构分析方面, 随着分析手段的不断提高以及生物合成与化学分析的综合运用, 大大提高了人们对细菌胞外多糖结构的认识。从细菌胞外多糖的构成上可分为两部分, 即具有不同聚合度的寡糖重复单位和各种不同的非糖取代基。目前发现的细菌产生的典型胞外多糖有: 右旋糖酐、果聚糖、纤维素以及很多含有不同官能团的异质聚糖。与真菌多糖、植物多糖相比, 大多细菌产生的胞外多糖的结构相对简单, 通常有以某一单糖构成重复单位的匀多糖, 也有以2~4个单糖组成的二糖至八糖构成重复单位的杂多糖。这些多糖链上多含有酰基取代基, 主要为丙酮酸、乙酸及丁二酸取代基。以土壤杆菌属(*Agrobacterium* sp.)、根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)、产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)为代表产生的是琥珀酰葡聚糖(succinoglycans), 该多糖是由D-葡萄糖和D-半乳糖组成的八糖重复单位, 其中含有丙酮酸、乙酸及丁二酸取代基^[1]。某些根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)产生的多糖其八糖重复单位含有D-葡萄

收稿日期 2004-11-15

*通讯作者

基金项目: 国家基础研究重大项目前期研究专项(2001CCA01600); 山东省科技攻关项目(003110112)

作者简介: 王鹏(1980-), 男, 博士研究生, 研究方向为微生物资源与应用。

糖醛酸、D-核糖、D-肠菌酸^[2,3]。

从细菌胞外多糖的表观形态上可将其分为两类：一种类粘蛋白(Mucoid)，通常是多糖通过分子间氢键及其它非共价键的形式与细胞壁间形成坚韧的外膜粘附于细胞表面，通常称为荚膜多糖(capsular polysaccharide)；另外细菌能够产生一些结构疏松较易渗透于培养基中，这部分多糖通常称为粘液多糖(slime polysaccharide)。目前已清楚的菌株能产荚膜多糖的包括肠杆菌科(Enterobacteriaceae)粘液样菌种中的M-抗原，沙门氏菌属(*Salmonella* sp.)、亚利桑那菌属(*Arizona* sp.)、埃希氏菌属(*Escherichia* sp.)、若干种中的Vi-抗原以及大肠杆菌(*E. coli*)的K-抗原和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)等的特异性荚膜抗原。能够产生胞外粘液多糖的有以下几类：铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)产生的D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-鼠李糖和D-葡萄糖醛酸组成的酸性多糖，结合杆菌(*M. tuberculosis*)产生的由D-甘露糖、阿拉伯糖组成的中性多糖。链球菌*S. equi*和*S. zooepidemicus*能够产生由葡萄糖醛酸和氨基葡萄糖组成的透明质酸。也有不少菌株能够产生同质聚糖：例如明串珠菌属(*Leuconostoc* sp.)和足球菌属(*Pediococcus* sp.)产生的胞外葡聚糖；醋酸杆菌(*A. xylinum*)产生的胞外细菌纤维素等^[4,5]。

胞外多糖的化学结构多种多样，在其形成过程中受到多种条件影响和制约，如营养物的调节、培养条件的改变以及菌种代龄等。例如，唾液链球菌(*S. Salivarius*)的粘液多糖，由右旋糖酐组成，但该糖的分泌必须在含有蔗糖的培养基中才能产生。此外本身产荚膜多糖的某些大肠杆菌、沙门氏菌及阴沟气杆菌在适宜的条件下还能产生胞外粘液多糖，常称之为肠菌酸(colanic acid)，该类糖上多含有丙酮酸和乙酸取代基。

2 细菌胞外多糖的构效关系

细菌多糖的物理性质一般取决于糖链的一、二、三和四级结构。以黄原胶为例，黄原胶的侧链产生的聚合物是一种不溶于水的类纤维素物质，但实际上形成的多聚物是一种水溶性物质。侧链的存在能够调节多糖糖链的空间结构，一般线性糖链上具有侧链的多糖能够调节构效的不平衡并且能够通过抑制糖链固有的结构而提高多糖的水溶性。从小核菌葡聚糖(Scleroglucan)与热凝胶的比较中可看出，小核菌葡聚糖易溶于水并能产生较高的粘度，而热凝胶缺少侧链其水溶性较差，但却能形成两种不同形状的凝胶^[6]。就像糖醛酸基团的存在能够改变多糖的电荷数，酰基化和其它的糖取代基能够显著的改变糖链的物理结构。多糖糖链上缺少电荷数，可能导致多糖较差的水溶性。此外还取决于主链的连接键型。例如， β -1,4-连接的聚合物具有较强的刚性，

而 α -1,2-连接的聚合物如黄原胶具有很强的伸展性。

对多糖的产生菌进行诱变得到的变异型与野生型菌株产生多糖的比较，能够揭示一些碳水化合物、酰基化与物性之间的联系。例如野生型菌株产生的黄原胶分子是一种双螺旋结构，该双螺旋结构的变性温度为50~90℃，这主要取决于多糖链的酰基化及溶液离子强度的影响。丙酮酸、乙酰取代基能够影响该糖链的稳定性从而导致多糖的变性温度降低。向溶液中添加盐类能提高糖链的稳定性从而提高其变性温度。酰基化的程度尤其是O-乙酰化能够影响葡萄糖基和半乳糖基与甘露糖间的相互作用^[7]。一般酰基化能够阻碍多糖链间的协同作用，经去乙酰化的多糖在很少的浓度即可形成凝胶。有选择性的去除乙酰基或丁二酸取代基能够相应的提高或降低糖链的变性温度，对多糖进行去除丁二酸能够显著提高多糖的假塑性^[8]。而其它的胞外多糖在经相应的处理改变其化学结构后，也有类似的影响。同样，将*Rhizobium* TA1产生的 α -D-半乳聚糖的侧链去除，该多糖形成的凝胶的刚性将大大降低。

此外*Enterobacter* sp.-XM86产生的胞外多糖，经研究发现乙酰化处理对糖结构及物性有较大的影响。该糖是一个具有四糖重复单位，且不具有任何酰基化修饰的糖链。而*K. aerogenes*-54产生的多糖结构与其相似，但在该糖重复单位的岩藻糖基上均含有乙酰化基团。*Enterobacter* sp.-XM86产生的胞外多糖能够同许多一价、二价阳离子结合形成凝胶，相反，经乙酰化后的多糖虽然具有较高的粘度但却丧失形成凝胶的能力^[9]。而对这两种多糖进行X射线衍射发现，其结构均为简单的双螺旋结构。

活性多糖的化学结构是其生物活性的基础，也是当前糖化学和糖生物学共同关注的焦点问题。研究表明，寡糖的活性与其初级和高级结构特别是三维构象密切相关，多糖亦是如此，而且还和分子量、溶解度、粘度等物理化学性质有关。而且通过对多糖官能团的改造，如氧化、降解、羧甲基化、硫酸酯化、乙酰化等也可提高或降低多糖的生物活性。就多糖的一级结构与其生物活性的关系而言，一方面多糖的糖组成和糖苷键类型对其生物活性有一定的影响，如从菌体中获得的活性多糖一般有葡萄糖构成，而葡萄糖主链上的 β -1,6-糖苷键是抗肿瘤所必须的。对具有抗病毒活性的硫酸酯化多糖而言，硫酸酯化均多糖的活性大于硫酸酯化杂多糖，且以 β -1,3-D-葡聚糖为主的多糖活性明显高于 β -1,6-D-葡聚糖。

3 细菌胞外多糖的理化特性及生物学活性

近年来陆续开发细菌胞外多糖新产品，因其具有独特的物化性质，已通过不同方式应用于石油、化工、

食品和制药等多个领域。同时,某些胞外多糖具有的生物学活性如:抗感染、抗肿瘤及抗辐射等,在临床免疫学等方面引起人们的关注。因此对细菌胞外多糖理化性质、生物活性及其应用的研究不断受到人们的关注。这里将对一些具有代表性的细菌胞外多糖的性质进行介绍:

3.1 增稠性

细菌胞外多糖的分子结构上含有大量的羟基、羧基等阴离子亲水性基团,具有较好的亲水性。因此一些较高分子量的胞外多糖水溶液在相对较低浓度,即能使溶液粘度增加并逐渐丧失流动性。在相同浓度的水溶液,与植物多糖相比细菌胞外多糖的粘度较高,其中节杆菌属和隐球菌属的多糖粘度高于植物多糖中粘度最大的半乳甘露聚糖——瓜耳胶(guar gum),黄原胶粘度也与其相当。

细菌胞外多糖的粘度受无机盐、温度及pH的影响较小,具有耐酸耐碱、抗盐、抗温、及优良的兼容性等。例如,在2%的磷酸甘露聚糖中添加硼砂,其粘度降低;当硼砂浓度达到0.15%后则粘度急剧增大。当加入KCl时,不论其盐浓度如何,粘度均降低。而黄原胶在高浓度时添加KCl时,粘度略有增加;在低浓度时添加,粘度稍有降低。节杆菌属和隐球菌属的胞外多糖添加NaCl、CaCl₂后,粘度均相应提高。许多植物多糖在加热时粘度下降,但多数细菌胞外多糖对热具有稳定性。如黄原胶在一定温度范围内反复受热、冷冻而不影响粘度。黄原胶、琥珀酸葡聚糖和节杆菌属多糖粘度对pH变化分别在pH6~9, 3~10和4~10的范围内稳定。

3.2 假塑流变性

有些酸性阴离子杂多糖,以黄原胶为例,其水溶液中的粘度受剪切力的影响较大,呈非牛顿性流体,是具有假塑性流变特性的物质。该水溶液在静止或低剪切力下,糖分子以超会合聚合体形式存在,此时粘度较高。当受高剪切力时,其聚合体结构解离成自由卷曲状态,溶液粘度降低。而当去掉剪切力后,糖分子再次回复至超会合聚合体形式,粘度恢复。因此该类胞外多糖被广泛地应用于石油开采、食品添加剂等方面。

3.3 凝胶性

在细菌胞外多糖中,有一类多糖在一定条件下可形成坚硬而具有弹性的热不可逆或热可逆凝胶,其成胶机理、凝胶特性及应用都各不相同。但与植物多糖相比,它们不仅具有产糖量高、质量稳定,受环境因素影响较小,且产品安全、无毒,同时形成的凝胶在相同条件下优于植物多糖(如琼胶、卡拉胶)等特点。

如结冷胶(Gellan Gum)由伊乐藻假单胞菌(*Pseudomonas elodea*)产生的由一分子鼠李糖、葡萄糖

醛酸和两分子葡萄糖构成的四糖重复单位的聚阴离子线形多糖,具有双螺旋结构。该糖在金属离子存在时可在0.05%的浓度下形成凝胶,用量是琼胶、卡拉胶的1/2~1/3。同时该凝胶具有很好的持水性,耐酸碱、耐高温、热可逆等特点。现多作为凝胶剂、增稠剂、悬浮剂和成膜剂使用,也可以作为琼脂的替代品制备生物培养基,同时在食品工业、园艺和农业中有广泛的应用前景^[10]。

热凝胶(Curdlan)是由土壤杆菌属的某些菌产生的一种由D-葡萄糖残基经 β -1,3连接而成的线性葡聚糖。与常见的其它凝固剂(如琼脂)在加热后经冷却才凝固成胶有所不同,热凝胶可以在加热时便形成凝胶,即使在温度高于100℃时都不会融化,因此被称为热凝胶。它可作为天然植物胶的替代物用于食品中,同时改善产品的风味品质,如开发的新型食品:豆腐面条、煮鱼糊、可食用膜等。除了食品领域的应用外,热凝胶还被广泛用于化工、农业、烟草、医药等领域。

3.4 改善质地及流变特性

在乳酸菌胞外多糖研究方面人们发现,用于发酵牛奶中的某些革兰氏阳性菌也可产生胞外多糖。这些多糖和黄原胶不同,不是添加到食品中去的,而是通过菌体在生长过程中发酵牛奶而产生并进而分泌到介质中。这些阳性菌主要为乳酸菌,如乳杆菌、链球菌、四联球菌和明串珠菌^[11]。由德氏乳杆菌、乳酸乳球菌和瑞士乳杆菌等生产的胞外多糖的结构已得到确认,这种生物聚合物是由D-半乳糖通过 β -1,3和 β -1,4糖苷键连接而成的。此类聚合物没有离子特性,这是它能在复杂蛋白质原料(牛奶)中存在的重要原因。嗜热链球菌(*S. Thermophilus*)产生胞外多糖能够赋予并改善产品结构和流变特性,即抗机械强度提高和凝固敏感性降低^[12]。因而这类生物聚合物在牛奶发酵食品中尤其是酸奶的生产,经常作为稳定剂、粘稠剂、乳化剂、胶化剂和水化剂等使用。

3.5 生物学活性

细菌胞外多糖是菌体在生命活动过程中合成的多糖,具有独特的生物学活性。通常认为细菌胞外多糖的生理功能主要是:防护作用、保持水分,促进金属离子的吸收以及抑制溶菌酶和噬菌体的侵袭。当菌体在极端条件时,如干燥、高温或冷冻条件,菌体可以利用具有高亲水性的胞外多糖间质存留的水以起到保护菌体的作用。有研究发现,具有糖醛酸或有机羧基的多糖类物质具有吸收或供给营养物质和无机盐的作用。当遭遇外源病原物的侵袭时,外膜包被着具有粘液状的胞外多糖能够保护菌体免受原生动物的噬菌体的识别或吞噬。

此外细菌胞外多糖具有抗病毒、抗感染、抗辐射及抗肿瘤等活性。一些细菌胞外多糖本身具有抗原特异

性、保湿和噬菌作用^[13,14]。来源于几种细菌的D-葡聚糖被证明具有抗血栓、抗肿瘤和免疫调节的作用^[15]。Kitazawa等报道,保加利亚乳杆菌 OLL1073R-1 产生的酸性胞外多糖具有促进幼鼠 B 淋巴细胞有丝分裂的作用, Forsen 等认为乳酸菌胞外多糖可以促进 T 淋巴细胞的增殖。此外,乳酸菌胞外多糖在肝素类物质、血浆代用品、眼及关节外科等方面具有潜在的开发价值。右旋糖酐已被用作代用血浆及血流改善剂。充分的试验证明,右旋糖酐可恢复循环的血容量,维持血压等作用。此外,右旋糖酐的衍生物——右旋糖酐铁可配制注射剂,治疗缺铁性贫血。某些蓝细菌(Cyanobacteria sp.)胞外多糖具有抑制 H I V 反转录酶的作用,而 Cyanobacteria polykrikoides 产生的硫酸胞外多糖具有抵抗流感病毒的作用。高分子量的透明质酸分子因其本身带有大量负电荷,在水溶液中无规则卷曲形成一种无序纤维网络结构,具有流体阻抗、立体排阻及分子筛效应。而高浓度透明质酸能够抑制粒性白细胞的迁徙和吞噬作用,表现出抗炎特性。此外低分子量透明质酸对血小板沉积具有抑制作用。

4 展 望

在实践应用方面,细菌胞外多糖在工业上能够广泛应用有以下几个原因:首先此类多糖本身具有独特的理化特性:如黄原胶较高的粘度及其较好的稳定性;结冷胶的高透明度和凝胶强度。其次,某些细菌胞外多糖在临床、医药等方面已被证实具有独特的生物学活性,如透明质酸、右旋糖酐及 β -D-葡聚糖等。因此未来的细菌胞外多糖新产品开发及其市场的扩大取决于该类多糖独特的生物学性质或新的应用领域的开拓。对于新型的细菌胞外多糖的开发还应注意:该多糖独特的应用价值、生产成本以及提取工艺的可行性。目前尽管人们还发现了许多其它的细菌胞外多糖,但实际它们在食品、日化、医药、石化工业中的开发和应用很少。在今后的研究中,可能会发现更新更好的细菌胞外多糖,进而弥补现有多糖在工业应用中的不足。

理论研究方面,结构与功能的关系问题,仍然是今后研究的热点。由于多糖结构复杂,多糖结构与功能关系中的机理还不完全清楚,有关这方面的研究与探索还不完善,急待深入研究。只有将结构与功能的关系搞清楚,才能有目的地降解或合成我们所期望的生物大分子,更好地满足我们的不同需要。

参考文献:

- [1] Sutherland I W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 1996, 38: 249-261.
- [2] Hisamatsu M, Nomura S, Shutsrirung A, et al. Structural characterization of a new acidic exopolysaccharide and cyclic (1-2) glucan produced by Rhizobium huakuii forming nodules on Astragalus sinicus [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83: 315-320.
- [3] Illain-Simonnet A, Milas M, Rinaudo M. A new bacterial polysaccharide. I. Characterization of the conformations and conformational transition [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2000, 27: 65-75.
- [4] Sutherland I W. Novel and established applications of microbial polysaccharides [J]. Trends Biotechnol, 1998, 16: 41.
- [5] Vuyst L D, Zamfir M, Mozzi F, et al. Exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus strains as functional starter culture in the production of fermented milks [J]. International Dairy Journal, 2003, 13: 707-717.
- [6] Kanzawa Y, Harada A, Koreeda A, et al. Difference of molecular association in two types of curd langle [J]. Carbohydrate Polymers, 1989, 10: 299-313.
- [7] Shatwell K P, Sutherland I W, Dea I C M, et al. The influence of acetyl and pyruvate substituents on the solution properties of xanthan polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1990, 12: 71-78.
- [8] Ridout M J, Brownsey G J, York G M. Effect of O-acetyl substituents on the functional behaviour of Rhizobium meliloti succinoglycan [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1997, 20: 1-7.
- [9] Atkins E D T, Attwood P T, Miles M J, et al. Effect of acetylation of the molecular interactions and gelling properties of a bacterial polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1987, 9: 115-117.
- [10] Shigeta J I, Sato K, Tanaka S, et al. Efficient plant regeneration of asparagus from in vitro multiplied shoot explants using gellan gum and glucose [J]. Plant Science, 1996, 58: 1224-1230.
- [11] De Vuyst L. Technology aspects related to the application of functional starter cultures [J]. Food Technology and Biotechnology, 2000, 38: 105-112.
- [12] Ruas-Madiedo P, Hugenholz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 163-171.
- [13] Zubillaga M, Weill R, Postaire E. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases [J]. Nutrition Research, 2001, 21: 569-579.
- [14] Pasquier C, Marty N, Dournes J L, et al. Implication of neutral polysaccharides associated to alginate in inhibition of murine macrophage response to Pseudomonas aeruginosa [J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 195-202.
- [15] Sutherland I W. Novel and established applications of microbial polysaccharides [J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16: 41-46.