

doi:10.12301/spxb202200687

文章编号:2095-6002(2023)03-0107-09

引用格式:陈秉彦,林晓姿,李维新,等. 乳酸菌联合酿酒酵母发酵对龙须菜多糖结构特征及抗氧化性的影响[J]. 食品科学技术学报,2023,41(3):107-115.



CHEN Bingyan, LIN Xiaozhi, LI Weixin, et al. Effects of *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on structure characteristics and antioxidant properties of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(3):107-115.

乳酸菌联合酿酒酵母发酵对龙须菜多糖结构特征及抗氧化性的影响

陈秉彦, 林晓姿, 李维新, 杨超, 何志刚*

(福建省农业科学院农业工程技术研究所/福建省农产品(食品)加工重点实验室, 福建福州 350002)

摘要:为明确微生物发酵对龙须菜浆液多糖体外抗氧化活性的改善效果,以期为龙须菜的高值化利用提供理论参考。采用乳酸菌副干酪乳杆菌亚种 RP38 与酿酒酵母 JJ4 复合发酵龙须菜浆液,利用色谱及光谱分析技术解析了龙须菜多糖的结构变化,考察了发酵前后浆液多糖的自由基清除能力。研究表明,龙须菜经发酵后浆液多糖质量分数由 0.30% 提高至 0.79%,其中硫酸酯多糖质量分数由 0.03% 提高至 0.12%。多糖的凝胶渗透色谱及红外光谱研究结果表明,微生物发酵不改变龙须菜多糖的官能基团,但可降解龙须菜多糖分子质量,进而使其结构暴露出更多的硫酸酯基团。核磁共振扫描发现,硫酸酯多糖的硫酸酯主要分布在半乳糖的 C-6 位,微生物发酵并不改变硫酸酯在糖链上的分布位置,但可以提高硫酸酯的含量。进一步研究发现,发酵后的龙须菜浆液多糖的羟自由基清除能力提高了 5.33%,超氧阴离子自由基清除能力提高了 32.12%。龙须菜浆液发酵后多糖抗氧化活性提高可能与生成更强给氢能力的小分子多糖以及硫酸酯基团暴露量增多有关。

关键词: 乳酸菌; 酵母菌; 龙须菜; 发酵; 抗氧化; 多糖

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*), 又名海发菜、江蓠,系红藻门(Rhodophyta)、杉藻目(Gigartinales)、江蓠科(Gracilariaceae)、江蓠属(*Gracilaria*)的一种温带红藻,近年来在广东、福建等地成功实现规模化养殖,是我国继紫菜、海带、裙带菜之后第四大栽培性海藻。龙须菜作为我国传统药食两用的大宗经济型海藻,具有高膳食纤维、高蛋白,

并富含微量矿物质元素等营养物质的特点^[1-2]。随着龙须菜产量的逐年提升,在取得巨大经济利益的同时,龙须菜营养成分的功能活性研究越来越受到研究人员的关注。有研究表明,龙须菜藻红蛋白是一种制备优质生物活性肽的天然蛋白源,通过离子交换层析提纯的高纯度藻红蛋白,对人体直肠癌 SW-480 细胞生长具有一定抑制作

收稿日期:2022-06-30

基金项目:福建省公益类科研项目(2020R1032009);中央引导地方项目(2021L3023);福建省农业科学院科技创新团队建设项目(CXTD2021016-1)。

Foundation: Project for Agro-Scientific Research in Public Interest of Fujian Province(2020R1032009); Central Guidance on Local Science and Technology Development Fund(2021L3023); Technology Innovation Team Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences(CXTD2021016-1)。

第一作者:陈秉彦,男,助理研究员,博士,主要从事食品加工、纤维素改性及益生菌肠道递送方面的研究。

* 通信作者:何志刚,男,研究员,主要从事食品生物技术与农产品加工方面的研究。

用^[3]。沈嘉森等^[4]采用龙须菜蛋白为原料,通过胃肠道模拟消化制备出高血管紧张素转换酶抑制活性的寡肽,初步评估龙须菜可作为分离纯化制备降压肽的优质资源。费亚芬等^[5]评价了7种经济型海藻的膳食纤维促益生作用,筛选出龙须菜为促进有益菌生长的最优海藻,短期动物实验进一步证明龙须菜膳食纤维可改善造模鼠肠道菌群丰度,利于有益菌生长和肠道菌群环境恢复。

龙须菜多糖是龙须菜生理活性的重要功能成分,属于琼胶类与硫酸酯类混合多糖^[6],其中硫酸酯多糖是发挥多糖功能活性的主要物质。龙须菜多糖,特别是硫酸酯多糖已被证实具有抗氧化^[7]、抗肿瘤^[8]、提高免疫应答^[9]等多种生理功能,发酵后的龙须菜多糖也显示出良好的生理活性。万玮等^[10]研究发现,深海细菌太平洋火色杆菌 WPAGA1 可利用龙须菜为唯一碳源发酵产生高活性琼胶寡糖。高波良^[11]进一步研究了太平洋火色杆菌 WPA-GA1 降解龙须菜多糖的作用机制,重组硫酸酯酶能降解龙须菜中的粗琼胶产生游离的硫酸酯,与重组琼胶酶联合作用时,可提高琼胶酶产生还原性寡糖的活性。刘燕^[12]的研究发现,经优化工艺发酵的龙须菜多糖可显著提高黑鲷鱼的生长成活率和蛋白质效率,增强黑鲷的免疫和抗氧化能力,提示发酵龙须菜可作为优质的水产饲料。目前,现有研究多集中报道海洋细菌发酵对龙须菜多糖活性功能的影响,缺少发酵龙须菜多糖结构特征与功能活性变化的相关性研究,更未见乳酸菌及酿酒酵母等食品微生物发酵改性龙须菜多糖结构特征,影响龙须菜多糖抗氧化活性的报道。乳酸菌与酿酒酵母菌均为食品常用微生物,安全性高。乳酸菌在发酵过程中可产生有益香气及风味物质,而酿酒酵母在发酵过程中则为乳酸菌提供了促生长因子例如氨基酸、维生素和丙酮酸盐等,因此乳酸菌与酿酒酵母协同发酵对改善基料品质具有显著优势。课题组前期采用自筛乳酸菌与酿酒酵母联合发酵技术消除了龙须菜浆液的腥味成分,赋予其发酵果香,改善了龙须糕产品的食味品质^[13]。本文拟进一步对乳酸菌联合酿酒酵母发酵后的龙须菜多糖体外抗氧化活性进行研究,从硫酸酯多糖含量、分子质量以及化学结构等角度评价发酵前后龙须菜多糖的结构变化,以期为微生物发酵改善龙须菜浆液的营养品质,实现其高值化利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙须菜(鲁龙一号,连江县),购自福建省红太阳精品有限公司,-20℃保存;副干酪乳杆菌亚种(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) RP38 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisia*) JJ4,由福建省农产品(食品)加工重点实验室分离、鉴定并保存;溴化钾(光谱纯),德国默克生物科技有限公司;氧化氙,纯度99.9%,上海麦克林生化科技有限公司;普鲁兰/聚麦芽糖标准品(产品编号:34037075, $M_w = 342 \sim 736\ 000$ Da),上海甄准生物科技有限公司;无水乙醇、氯化钠、葡萄糖、氢氧化钠、硝酸钾、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢、三氯乙酸、三氟乙酸、DEAE-52 纤维素、浓盐酸、苯酚、浓硫酸、 KNO_3 、聚乙二醇、邻苯三酚、Tris-HCl 等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV1750 型分光光度计,日本岛津仪器株式会社;LRH-160 型生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;FD5-3 型冷冻干燥机,美国 SIM 公司;ICAN9 型傅里叶变换红外光谱仪,天津市能普科技有限公司;100 型高效凝胶渗透色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;AVANCE 600 型核磁共振波谱仪,德国布鲁克仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵培养基与种子液的制备

糖蜜培养基制备:将甘蔗糖蜜稀释至可溶性固形物质量分数为5%,用柠檬酸调节 pH 值至 5.0 ± 0.2 ,115℃高压灭菌30 min,用于酵母菌培养。MRS 液体培养基用于乳酸菌培养。

菌种经过活化后分别接种于相应的培养基,扩培至乳酸菌菌量达 10^9 CFU/mL,酵母菌菌量达 10^8 CFU/mL,经离心处理(5 500 r/min,4℃,10 min)获得菌泥,加等体积无菌水重悬后备用。

1.3.2 龙须菜浆液发酵

龙须菜解冻、洗净后沥干,按质量比1:1加入净水,置于料理机中研磨成浆液。称取500 g 浆液分装于1 L 三角瓶中,加入质量分数2%的白砂糖,搅拌溶解置于沸水浴中加热15~20 min。样液冷却后分别接种质量分数5%的活化种子液,30℃发酵5 d,100℃杀菌10 min,冷却备用。

1.3.3 龙须菜浆液的多糖提取

发酵的龙须菜浆液置于 85 ℃ 水浴下搅拌浸提 3 h, 离心 (5 000 r/min, 15 min) 获取上清液, 加入质量分数 2% 的活性炭, 置于 60 ℃ 摇床振荡 6 h, 之后抽滤得到脱色龙须菜发酵液。取发酵清液置于旋转蒸发仪中浓缩 3 倍体积后按体积比 1:3 加入 60 ℃ 无水乙醇醇沉, 静置 12 h 后, 离心 (6 000 r/min, 10 min) 获得粗多糖沉淀。粗多糖沉淀复溶于蒸馏水中, 按多糖溶液体积比 1:1 加入质量分数 15% 的三氯乙酸溶液, 搅拌静置, 离心除蛋白, 上清液经浓缩后, 装盘进行冷冻干燥, 获得发酵龙须菜多糖。

1.3.4 龙须菜多糖的初步纯化

采用 DEAE-52 纤维素凝胶对龙须菜多糖进行初步纯化^[14]。配制质量浓度为 50 g/L 的 DEAE-52 纤维素凝胶, 浸泡过夜后于 85 ℃ 水浴中预热; 称取 5.0 g 的龙须菜多糖粉末溶于 200 mL 蒸馏水中, 按 1:1 体积比与 DEAE-52 纤维素热溶液混合, 置于 85 ℃ 恒温水浴中搅拌 2 h, 抽滤收集滤饼。采用等体积 2.0 mol/L NaCl 溶液洗脱滤饼后抽滤收集滤液, 将滤液浓缩 3 倍后置于透析袋 (<500 Da) 中透析 48 h 除去盐分, 透析袋溶液经冷冻干燥后得到纯化多糖。

1.3.5 多糖含量及硫酸酯多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法测定发酵后龙须菜多糖的含量变化, 采用硫酸钡比浊法测定发酵后硫酸酯多糖含量。硫酸酯多糖的测定原理是通过酸水解将硫酸酯基团从糖链上脱离, 在氯化钡明胶溶液中硫酸根与钡离子结合形成硫酸钡悬浊液, 悬浊液在 360 nm 处吸光值与硫酸酯基团含量在一定范围内呈现线性相关, 由此测出多糖硫酸酯基团含量。

BaCl₂-明胶溶液与硫酸钾标准曲线的绘制参考薛峰等^[15]的方法。称取 50 mg 多糖粉置于凯氏消化管, 加入 15 mL HCl 以及 5 mL HNO₃ 后, 消化 1 h 至溶液微黄为止。将消化液定容到 100 mL 容量瓶中, 过滤。取 2 mL 消化液加入 3 mL BaCl₂-明胶溶液, 摇匀, 测定 360 nm 处吸光值。根据样品的吸光度, 由回归方程计算相应的 SO₄²⁻ 浓度。

1.3.6 多糖分子质量分布测定

采用凝胶渗透色谱法测定龙须菜多糖的分子质量分布。称取 10 mg 多糖粉溶于 0.1 mol/L KNO₃ 溶液配制成多糖质量浓度为 1.0 mg/mL 的工作溶液,

经 0.45 μm 滤膜过滤后上机测试。色谱条件: 柱温 40 ℃, 流动相为 0.1 mol/L KNO₃, 流速 1 mL/min, 进样量 40 μL。色谱柱采用 Waters Ultrahydrogel 1500 column, 250 column 与 120 column 三级凝胶柱联用。采用 OPEN LAB CDS 数据处理软件对数据进行积分处理, 得到多糖的分子质量分布。以不同分子质量的普鲁兰多糖为标准品 (M_w 分别为 736 000、343 000、202 000、110 000、50 600、23 000、9 900、6 600、1 260、342 Da), 标准曲线方程见式(1)。

$$y = 14.459144 - 0.653443x + 0.007528x^2 + 0.000026x^3 \quad (1)$$

式(1)中, y 为 $\lg M_w$, x 为出峰时间。

1.3.7 多糖功能基团的测定

采用红外光谱仪对多糖功能基团进行分析。扫描波数为 400 ~ 4 000 cm⁻¹, 分辨率为 2 cm⁻¹。

1.3.8 多糖单糖组成的测定

1.3.8.1 多糖衍生前处理

以葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖、氨基葡萄糖等 12 种单糖为标品, 采用 PMP 柱前衍生前处理, 参考戴军等^[16]的研究方法进行单糖组成测定。具体方法: 吸取 100 μL 质量浓度为 4 ~ 5 g/L 的多糖溶液于 5 mL 的具塞刻度试管中, 加入 100 μL 的 4 mol/L 三氟乙酸溶液, 充 N₂ 封管, 110 ℃ 烘箱中水解 2 h, 冷却后加入 200 μL 甲醇溶液, 随后用 N₂ 吹干; 重复加甲醇并用 N₂ 吹 2 ~ 3 次, 去除三氟乙酸, 加入 0.3 mol/L NaOH 溶液 50 μL 充分溶解残渣; 加入 0.5 mol/L 的 PMP-甲醇溶液, 漩涡混匀, 置于 70 ℃ 烘箱反应 100 min, 冷却后加盐酸中和, 再加等体积氯仿, 振荡萃取, 静置分液, 去除氯仿相后采用 0.45 μm 微孔膜过滤; HPLC 进样分析。

1.3.8.2 色谱条件

采用高效液相色谱仪测试龙须菜单糖组成, 色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm), 流动相为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 值为 6.7) - 乙腈 (两者体积比为 83:17), 柱温为 30 ℃, 检测波长为 250 nm, 流速为 1 mL/min, 进样体积为 20 μL。

1.3.9 多糖化学结构的测定

采用高频核磁共振波谱仪对多糖的功能基团进行分析。称取 30 mg 纯化多糖与 1 mL D₂O 混合, 置于 80 ℃ 水浴中加热 8 h, 之后冷却静置 12 h 至完全水合。取多糖溶液置于核磁管中进行碳谱测试, 测试扫描时间为 10 h, 每小时扫描次数为 512 次。

1.3.10 龙须菜浆液及其多糖体外抗氧化能力的测定

1.3.10.1 羟自由基清除能力的测定

羟自由基清除能力测定参照唐萍萍^[17]的方法。在试管中依次加入 FeSO_4 溶液 (2 mmol/L)、 H_2O_2 溶液 (6 mmol/L), 龙须菜多糖配成 0.5 mg/mL 的多糖溶液。取 2 mL 样品溶液静置 10 min, 之后再加入 2 mL 水杨酸溶液 (6 mmol/L), 静放 30 min 后在 510 nm 处测定吸光度 A_0 。用蒸馏水代替样品溶液同样处理, 测定吸光值 A_x 。羟自由基清除率计算方法见式(2)。

$$\text{羟自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_0}{A_x}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, A_0 为实验样品的吸光度, A_x 为空白样品的吸光度。

1.3.10.2 超氧阴离子自由基清除能力的测定

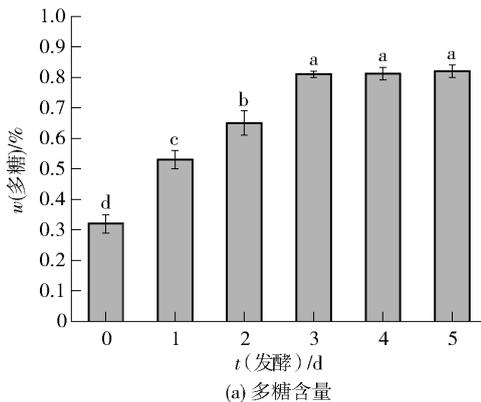
于 10 mL 试管中加入 5.7 mL Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 值 8.2), 加入 0.2 mL 质量浓度为 0.5 g/L 多糖溶液混匀后置于 25 °C 恒温箱中保温 10 min, 之后加入已预热的 10 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.1 mL, 快速混匀后采用多功能酶标仪测定 320 nm 波长处 1 min 内的吸光值的增加量 (A_j); 另取如上试剂, 采用等体积蒸馏水替代样品, 测定在 320 nm 波长处 1 min 内吸光度的增加量 (A_i)。超氧阴离子自由基清除率计算方法见式(3)。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} = \frac{A_i - A_j}{A_i} \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, A_i 为空白样品吸光度增加量, A_j 为实验样品吸光度增加量。

1.4 数据分析

各组实验数据均重复 3 次, $P < 0.05$ 表示数据



之间具有显著差异; 实验数据采用 DPS 9.05 软件进行统计, 采用 Origin Pro 8.5 软件绘图。

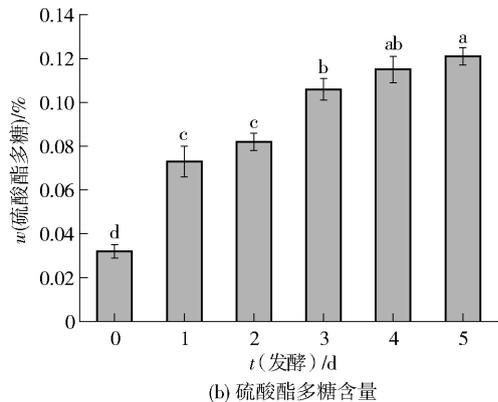
2 结果与分析

2.1 龙须菜浆液发酵后多糖含量变化

龙须菜发酵前后浆液中多糖含量变化的实验结果见图 1。由图 1 可知, 龙须菜浆液随着发酵时间的增加多糖含量呈现递增趋势。当发酵时间为 3 d, 龙须菜多糖质量分数达到最大值, 由 0.30% 上升至 0.79%; 进一步延长发酵时间, 多糖含量不发生明显变化。龙须菜浆液中硫酸酯多糖含量随着发酵时间的增加而增大, 硫酸酯多糖经发酵 5 d 后质量分数由 0.03% 上升至 0.12% (硫酸酯多糖约占总多糖含量的 15%)。这说明采用副干酪乳杆菌与酿酒酵母组合发酵可以提高浆液多糖, 特别是硫酸酯多糖含量。本研究结果发现, 龙须菜中硫酸酯多糖低于已报道的马尾藻、鼠尾藻的硫酸酯多糖含量 (质量分数为 18% ~ 22%)^[18-19], 高于坛紫菜的硫酸酯多糖含量 (质量分数为 10%)^[20]。有研究显示, 龙须菜多糖经热水浸提、低压浓缩、乙醇沉淀、柱层析获得的硫酸酯多糖质量约占总多糖的 11.26%^[21], 与本研究测定结果略有差异, 这可能与龙须菜生长的地域及采收时期有关。多糖中的硫酸酯是其抗氧化活性的重要来源, 海藻多糖中的硫酸酯具有很强的还原性, 易被自由基氧化起到抗氧化效果。乳酸菌与酿酒酵母发酵如何提高龙须菜硫酸酯多糖含量的问题尚待进一步研究。

2.2 龙须菜浆液发酵后多糖分子质量变化

龙须菜发酵前后浆液中多糖的分子质量分布见



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 龙须菜发酵过程中多糖及硫酸酯多糖含量变化

Fig. 1 Changes of polysaccharide and sulfated polysaccharide content of *Gracilaria lemaneiformis* during fermentation

图2。由图2可见,龙须菜多糖分子质量主要为 3.23×10^3 Da,龙须菜经发酵后多糖分子质量向低分子质量分布迁移,发酵5 d后的龙须菜多糖分子质量下降为 1.64×10^3 Da,这说明微生物发酵可降解龙须菜多糖的分子质量,形成小分子多糖。此外,分子质量谱图在低分子质量分布区域出现了一个弱吸收峰,分子质量为 4.89×10^2 Da,该吸收峰经发酵后分子质量未出现迁移,推测可能为多糖伴随的其他寡糖类物质。Sun等^[22]的研究发现,低分子质量的硫酸酯多糖相比高分子质量的硫酸酯多糖具有更优异的抗氧化能力,这可能归咎于小分子多糖具有更多的异端H结构,显示出更强的补给氢质子能力。张军等^[23]的研究结果也表明,刺麒麟菜经过益生菌发酵形成的小分子硫酸酯多糖更有利于穿透细胞膜,显示出更高的生物利用度及抗氧化性。

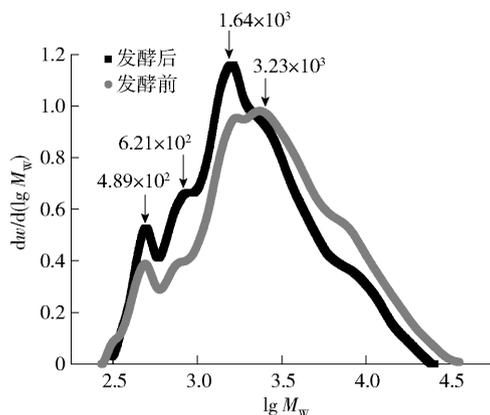


图2 龙须菜发酵前后的多糖分子质量变化

Fig.2 Molecular weight changes of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* before and after fermentation

2.3 龙须菜浆液发酵后多糖官能团的变化

采用红外光谱技术分别对未发酵和发酵后的龙须菜多糖的官能团结构进行表征,结果见图3。由图3可见,龙须菜多糖在波数为 3416 、 2920 、 1743 、 1656 、 $1400 \sim 1200$ 、 1074 、 931 、 892 cm^{-1} 处存在明显的吸收峰,其中 3416 cm^{-1} 处的吸收峰是分子内O—H的伸缩振动的吸收峰, 2920 cm^{-1} 处的吸收峰是亚甲基反对称伸缩振动, $1400 \sim 1200$ cm^{-1} 表示C—H弯曲振动吸收, 1074 cm^{-1} 处的吸收峰表示O—H的变角弯曲振动,这些峰均为多糖的典型吸收峰^[24]。进一步研究发现,多糖在 1250 cm^{-1} 附近处显示出明显的硫酸酯基团吸收峰,该吸收峰表示

O=S=O的不对称伸缩振动,表明了硫酸酯基团的存在^[25]。龙须菜多糖在 931 cm^{-1} 与 892 cm^{-1} 处的吸收峰表示3,6-内醚-L-半乳糖以及吡喃环结构^[26]。当龙须菜浆液经过发酵后,多糖的吸收峰未出现明显偏移,然而吸收峰强度出现了差异,说明微生物发酵后多糖并未产生出新的结构,但功能基团数量出现了变化。经发酵后,龙须菜多糖在 1250 cm^{-1} 处吸收峰强度增加, 1743 cm^{-1} 处吸收峰强度减小,表明发酵后龙须菜多糖的硫酸酯含量增加,糖醛酸含量减少。

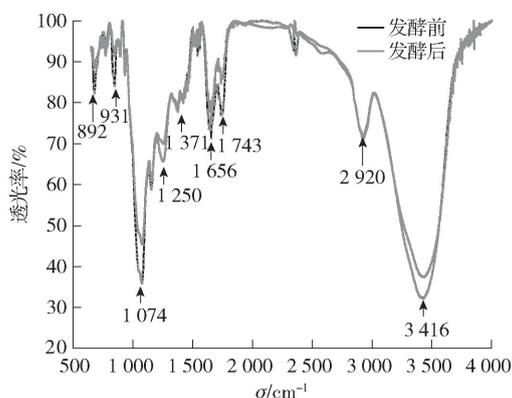


图3 龙须菜发酵前后的多糖官能团变化

Fig.3 Functional group changes of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* before and after fermentation

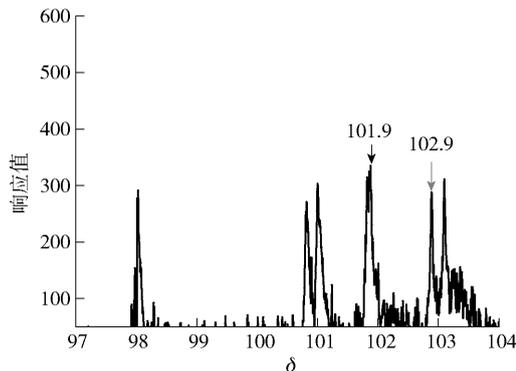
2.4 龙须菜浆液发酵后多糖的单糖组成及化学结构变化

龙须菜发酵前后多糖的单糖组成的测定结果见表1。由表1可见,龙须菜多糖中占比较高的3种单糖组分为半乳糖、葡萄糖、岩藻糖,其中半乳糖是最主要的单糖,物质的量比为79.97%,其次是岩藻糖(8.21%)与葡萄糖(7.97%)。半乳糖比例与张云林^[27]报道的水提龙须菜多糖的半乳糖比例相近。经微生物发酵后,龙须菜多糖的葡萄糖组分及岩藻糖组分物质的量比明显下降,半乳糖比例由79.97%上升至94.17%,这说明采用乳酸菌及酵母菌协同发酵可以修饰龙须菜多糖的单糖组成。这与刘艳芳等^[28]报道的研究结果相似,酿酒酵母发酵可以降低灵芝胞外多糖分子质量,改变多糖的单糖组成(甘露糖),进而影响其活性。冯书珍等^[29]研究了石莼、海带、裙带菜、紫菜4种海藻多糖的单糖组成与体外抗氧化活性的关系,发现海藻多糖的DPPH半抑制浓度与单糖组成中的鼠李糖、半乳糖呈现显著的负相关性。因此,推测采用乳酸菌与酿酒酵母

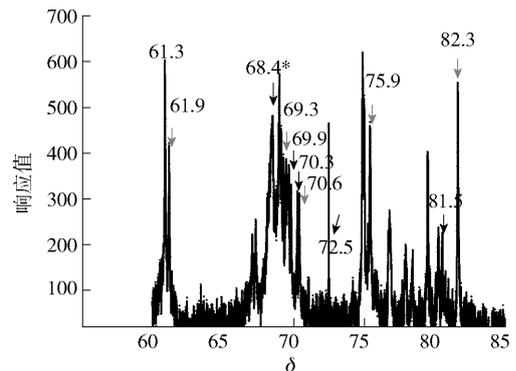
表1 龙须菜发酵前后多糖的单糖组成变化
Tab. 1 Changes in monosaccharide composition of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* before and after fermentation %

单糖组分	物质的量比	
	发酵前	发酵后
甘露糖	0.85	0.04
核糖	0.08	0.26
鼠李糖	0.73	0.26
葡萄糖醛酸	0.70	1.17
半乳糖醛酸	0.86	0.13
<i>N</i> -乙酰-氨基葡萄糖	ND	ND
葡萄糖	7.97	1.97
<i>N</i> -乙酰-氨基半乳糖	ND	ND
半乳糖	79.97	94.17
木糖	0.29	1.09
阿拉伯糖	0.34	0.37
岩藻糖	8.21	0.53

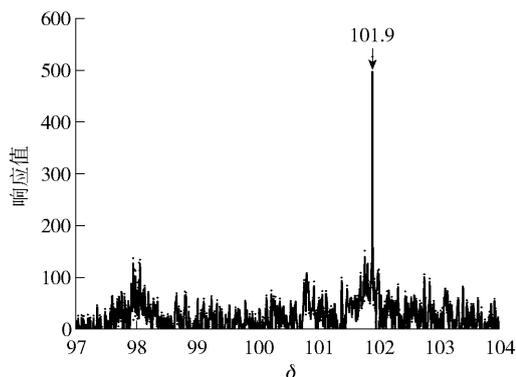
ND 表示未检出。



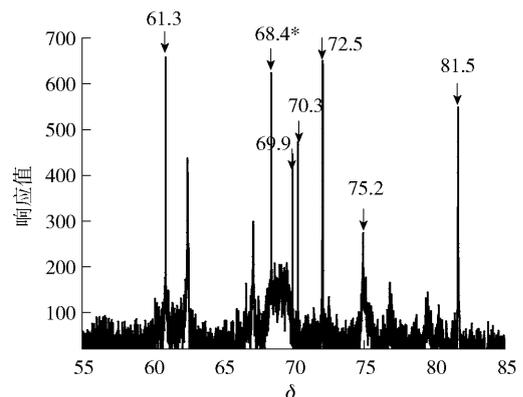
(a) 发酵前多糖的化学位移(97~104)



(b) 发酵前多糖的化学位移(55~85)



(c) 发酵后多糖的化学位移(97~104)



(d) 发酵后多糖的化学位移(55~85)

(b) (d)中“*”表示L-半乳糖硫酸酯特征峰。

图4 龙须菜发酵前后多糖的¹³C NMR变化

Fig. 4 ¹³C NMR changes of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* before and after fermentation

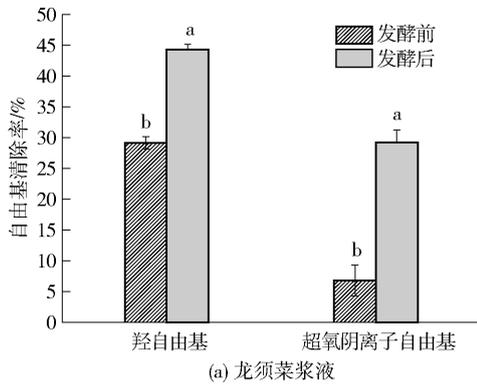
组合发酵可提高龙须菜多糖的半乳糖组分,这会进一步影响其抗氧化能力。

龙须菜发酵前后多糖的分子结构变化如图4。由图4可知,龙须菜多糖的碳谱化学位移在101.9、70.3、69.9、81.5、72.5、61.3处出现明显的吸收峰,表示多糖存在典型的L-半乳糖结构单元^[30];另外,多糖碳谱在68.4处呈现吸收峰,表明L-半乳糖单元的C-6位置上存在SO₄²⁻^[31]。龙须菜多糖在102.9、70.6、82.3、69.3、75.9、61.9处出现明显的吸收峰,表明多糖中含有葡萄糖单元结构^[25]。经微生物发酵后,龙须菜中半乳糖的碳谱化学位移未发生明显变化,仍在101.9、70.3、69.9、81.5、72.5、61.3处显示出吸收峰,且L-半乳糖硫酸酯(68.4)吸收峰出现了明显增强,说明经微生物发酵后龙须菜硫酸酯多糖含量增多,这可能是微生物发酵利用了原先结合在多糖上的蛋白质,从而使得糖蛋白分离,暴露出更多的硫酸酯基团;发酵龙须菜多糖的碳谱化学位移在102.9处的吸收峰完全消失,表明龙须菜多糖中葡萄糖单元被降解。已有研究表明,半乳糖

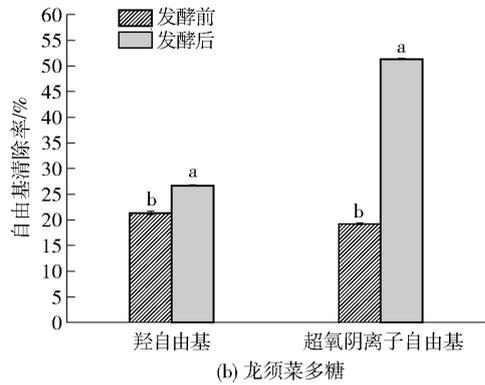
C-2及C-4位取代的硫酸酯基团抗氧化活性通常高于C-6位的活性^[32]。本研究发现,乳酸菌与酵母菌发酵后的龙须菜多糖的硫酸酯分布位置并未发生变化,其抗氧化活性增加可能与微生物发酵过程破坏了多糖蛋白质体系结构,使得多糖暴露出更多的活性半乳糖硫酸酯基团有关。

2.5 龙须菜浆液发酵后抗氧化活性的变化

龙须菜发酵前后浆液及其多糖的羟自由基清除率与超氧阴离子自由基清除率的测定结果见图5。由图5可知,龙须菜浆液经发酵后羟自由基清除率与超氧阴离子自由基清除率均出现了明显升高,分别为44.30%与29.24%,是未发酵组的1.52倍与4.29倍。进一步研究发现,发酵后龙须菜多糖的羟



自由基清除率为26.67%,与发酵前相比清除率提高了5.33%。发酵后龙须菜多糖的超氧阴离子自由基清除率为51.34%,与发酵前相比清除率提高了32.12%。研究结果说明采用乳酸菌与酵母菌组合发酵可以显著提高龙须菜浆液的体外抗氧化能力,改善其营养价值。此结果与番石榴叶固态发酵的研究报道^[33]相似,红曲霉固态发酵番石榴叶不仅有利于提高多糖得率,同时还可提高多糖的自由基清除能力,这可能与微生物发酵修饰多糖乙酰基,提高糖醛酸含量有关。值得注意的是,与龙须菜多糖相比,龙须菜浆液具有更高的羟自由基清除能力,推测龙须菜浆液还存在酚类等其他活性成分,有助于改善羟自由基清除能力。



不同小写字母表示发酵前后差异显著($P < 0.05$)。

图5 龙须菜发酵前后浆液及其多糖的自由基清除能力变化

Fig. 5 Free radical scavenging capacity changes of *Gracilaria lemaneiforms* slurry and polysaccharides before and after fermentation

3 结论

分析了乳酸菌 RP38 与酿酒酵母 JJ4 联合发酵对龙须菜多糖结构特征及抗氧化活性的影响。研究表明,乳酸菌与酿酒酵母发酵不改变龙须菜多糖的官能团结构,但会提高硫酸酯多糖的含量,并将大分子多糖降解为具有更强给氢能力的小分子多糖;此外,乳酸菌与酿酒酵母发酵并不影响多糖硫酸酯的碳位分布,但可能会破坏龙须菜的多糖蛋白质体系,使得多糖暴露出更多的硫酸酯基团。龙须菜浆液经发酵后硫酸酯多糖的质量分数由0.03%提高至0.12%。进一步研究发现,龙须菜浆液及其多糖经乳酸菌与酿酒酵母组合发酵后多糖的羟自由基清除能力以及超氧阴离子自由基清除能力均显著增加,其中龙须菜多糖的羟自由基清除能力提高5.33%,超氧阴离子自由基清除率提高32.12%。

可以推测,乳酸菌与酿酒酵母发酵形成的更强给氢能力的小分子多糖以及发酵后暴露出更多的硫酸酯结构,是造成浆液多糖抗氧化能力提高的主要原因。

参考文献:

- [1] 周峙苗,何清,马晓宇. 东海红藻龙须菜的营养成分分析及评价[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 284-287. ZHOU S M, HE Q, MA X Y. Evaluation of nutritional components in *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Food Science, 2010, 31(9): 284-287.
- [2] 林建云,林涛,林雨萍,等. 福建近海几种海藻的营养成分与饲用安全评价分析[J]. 福建农业学报, 2011, 26(6): 997-1002. LIN J Y, LIN T, LIN L P, et al. Nutrition and feed safety of seaweeds from Fujian coastal waters [J]. Fujian Journal of Agricultural Science, 2011, 26(6): 997-1002.

- [3] LI P Z, YING J, CHANG Q L, et al. Effects of phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* in proliferation and apoptosis of SW480 cells [J]. *Oncology Reports*, 2016, 36: 3536 – 3544.
- [4] 沈嘉森, 苏永昌, 陈晓婷, 等. 龙须菜蛋白的提取工艺优化及降血压组分制备[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1232 – 1239.
- SHEN J S, SU Y C, CHEN X T, et al. Optimization of extraction technology of *Gracilaria lemaneiformis* protein and preparation of blood pressure lowering components [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(4): 1232 – 1239.
- [5] 费亚芬, 王玉婷, 陆夏逸, 等. 海藻膳食纤维提取工艺优化及其对小鼠肠道菌益生作用[J]. *海南师范大学学报*, 2019, 32(1): 54 – 63.
- FEI Y F, WANG Y T, LU X Y, et al. Extraction and optimization of marine algae dietary fiber and its effects on mice intestinal microflora [J]. *Journal of Hainan Normal University*, 2019, 32(1): 54 – 63.
- [6] 王晓梅, 张忠山, 周俊波, 等. 龙须菜多糖的提取纯化及生物活性研究进展[J]. *海洋渔业*, 2020, 42(1): 120 – 128.
- WANG X M, ZHANG Z S, ZHOU J B, et al. Research progress on extraction, purification and physiological activity of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Marine Fisheries*, 2020, 42(1): 120 – 128.
- [7] LONG X S, HU X, LIU S C, et al. Insights on preparation, structure and activities of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide [J]. *Food Chemistry: X*, 2021, 12: 100153.
- [8] LIU S Y, LIU Y, TANG S J, et al. *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharides alleviate colitis by modulating the gut microbiota and intestinal barrier in mice [J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 13: 100197.
- [9] LIU Q M, ZHOU Y, MA L, et al. Sulfate oligosaccharide of *Gracilaria lemaneiformis* modulates type 1 immunity by restraining T cell activation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 288: 119377.
- [10] 万玮, 高超, 产竹华, 等. 深海细菌 *Flammeovirga pacifica* 降解龙须菜产寡糖反应条件的优化[J]. *应用海洋学学报*, 2013, 32(4): 584 – 590.
- WANG W, GAO C, CHAN Z H, et al. Fermentation condition optimization for oligosaccharide production of *Gracilaria lemaneiformis* by deep-sea bacteria *Flammeovirga pacifica* [J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2013, 32(4): 584 – 590.
- [11] 高波良. 深海太平洋火色杆菌粗琼胶降解代谢途径及寡糖的新型制备方法研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2018.
- GAO B L. Metabolic pathway of crude agar-degrading in *Flammeovirga pacifica* WPAGA1 and a novel way for producing agaro-oligosaccharides [D]. Xiamen: Xiamen University, 2018.
- [12] 刘燕. 龙须菜的发酵及发酵龙须菜对黑鲷生长、免疫和抗氧化能力的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- LIU Y. Fermentation of asparagus and effects of fermented asparagus on growth and immunity of black seabream [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [13] 杨超, 梁璋成, 林晓姿, 等. 龙须菜生物脱腥工艺优化及其挥发性风味物质分析[J]. *福建农业学报*, 2021, 36(4): 490 – 500.
- YANG C, LIANG Z C, LIN X Z, et al. Optimization of biological deodorization process and analysis of volatile flavor in *Gracilaria lemaneiformis* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2021, 36(4): 490 – 500.
- [14] 董文霞, 刘萍, 张京声, 等. DEAE-52 纤维素静态法分离纯化桦褐孔菌多糖的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 154 – 158.
- DONG W X, LIU P, ZHANG J S, et al. Optimization of purification of polysaccharides from the *Inonotus obliquus* using DEAE-52 cellulose static method [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(4): 154 – 158.
- [15] 薛峰, 张立新, 苔海绵, 等. *Tedania sp.* 多糖及其中硫酸根含量测定[J]. *青岛大学学报*, 2006, 21(4): 25 – 28.
- XUE F, ZHANG L X, TAI H M, et al. The determination of the polysaccharides and sulfate radical of marine sponge *Tedania sp.* [J]. *Journal of Qingdao University*, 2006, 21(4): 25 – 28.
- [16] 戴军, 朱松, 汤坚, 等. PMP 柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(2): 206 – 210.
- DAI J, ZHU S, TANG J, et al. Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides from *D. salina* by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2007, 26(2): 206 – 210.
- [17] 唐萍萍. 灵芝、蓝莓液体发酵工艺条件优化和发酵产物活性分析[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2020.
- TANG P P. Optimization of liquid fermentation conditions for *Ganoderma lucidum* and *Vaccinium spp* and

- analysis of the fermentation product activity [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2020.
- [18] 海霞, 汪秋宽, 何云海, 等. 马尾藻褐藻多糖硫酸酯的分离纯化及结构研究[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(5): 559–562.
HAI X, WANG Q K, HE Y H, et al. Purification and structure of fucoidan from sargasso weed *Sargassum* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(5): 559–562.
- [19] 史永富, 汪秋宽, 张甜翠. 鼠尾藻中岩藻聚糖硫酸酯提取工艺及纯化研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 511–514.
SHI Y F, WANG Q K, ZHANG T C. Extraction and purification of fucoidan from *Sargassum thunbergii* [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(5): 511–514.
- [20] 张忠山. 坛紫菜多糖的化学结构修饰及其构效关系研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2010.
ZHANG Z S. Chemical modification of porphyran from *Porphyra haitanensis* and study of structure-activity relationship [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010.
- [21] 刘庆梅. 龙须菜硫酸多糖抗食物过敏活性的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2016.
LIU Q M. Anti-food allergic activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* [D]. Xiamen: Jimei University, 2016.
- [22] SUN L, WANG C, SHI Q, et al. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium-cruentum* and their antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 45: 42–47.
- [23] 张军, 谷福蝶, 刘艳, 等. 益生菌发酵刺麒麟菜制备硫酸多糖工艺优化及性质分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 175–184.
ZHANG J, GU F D, LIU Y, et al. Optimization preparation and property analysis of sulfate polysaccharide from *Eucheuma spinosum* by probiotic fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 175–184.
- [24] 王欣. 龙须菜多糖的提取、分析及其生理活性的研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2006.
WANG X. Studies on extraction, analysis and physiological activity of polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* [D]. Shantou: Shantou University, 2006.
- [25] ALENCAR P C, LIMA G C, BARROS F C, et al. A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilariacaudata*: *in vitro* and *in vivo* activities [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 28–34.
- [26] CHOPIN T, WHALEN E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT-IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material [J]. Carbohydrate Research, 1993, 246: 51–59.
- [27] 张云林. 龙须菜多糖的制备及降血糖活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
ZHANG Y L. Preparation of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharides and its hyperglycemic activities in STZ-induced diabetes mice [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [28] 刘艳芳, 高坤, 冯杰, 等. 酿酒酵母发酵降解灵芝胞外多糖组分分析及活性研究[J]. 菌物学报, 2020, 39(2): 372–380.
LIU Y F, GAO K, FENG J, et al. Characteristics and immune enhancing activities of *Ganoderma lingzhi* extracellular polysaccharide fermented with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mycosystema, 2020, 39(2): 372–380.
- [29] 冯书珍, 卢宇凤, 刘南英, 等. 海藻多糖的单糖组成对体外抗氧化活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 116–121.
FENG S Z, LU Y F, LIU N Y, et al. Effect of monosaccharide composition on antioxidant activity of algal polysaccharides [J]. Natural Product Research Development, 2019, 31(1): 116–121.
- [30] SÁNCHEZ R A, MATULEWICZ M C, CIANCIA M. NMR spectroscopy for structural elucidation of sulfated polysaccharides from red seaweeds [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 199: 386–400.
- [31] SÁNCHEZ R A, CANELÓN D J, COSENZA V A, et al. *Gracilariopsis hommersandi*, a red seaweed, source of agar and sulfated polysaccharides with unusual structures [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 213: 138–146.
- [32] MOURAO P. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives [J]. Current Pharmaceutical Design, 2004, 10(9): 967–981.
- [33] 罗游. 番石榴叶多糖活性分析及分离鉴定与发酵提升[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
LUO Y. Bioactivity evaluation, isolation, identification and fermentation promotion of polysaccharides from guava leaves [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.

compounds. Therefore, metabolic engineering was used to modify *Corynebacterium glutamicum* for pyruvate production. Five key genes (pyruvate quinone oxidoreductase gene *pqo*, pyruvate carboxykinase gene *pyc*, aminotransferase gene *alaT*, valine-pyruvate aminotransferase gene *avtA*, pyruvate dehydrogenase gene *aceE*), related to pyruvate metabolic tributaries in *Corynebacterium glutamicum*, were successfully knocked out by homologous recombination. The concentration of pyruvate reached 14.64 g/L after 72 h of fermentation in shaking flasks. Then, transketolase gene *tkt*, transaldolase gene *tal*, and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* were overexpressed to increase the supply of precursors for pyruvate synthesis. After 72 h of fermentation in shake flasks, pyruvate production reached 15.39 g/L, which was 28 times higher than that of the wild-type strain. This study aimed to provide theoretical reference for application of pyruvic acid production by microbial fermentation.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; pyruvate; metabolic engineering; homologous recombination; overexpression

(责任编辑:张逸群)

(上接第115页)

Effects of *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation on Structure Characteristics and Antioxidant Properties of *Gracilaria lemaneiformis* Polysaccharide

CHEN Bingyan, LIN Xiaozi, LI Weixin, YANG Chao, HE Zhigang*

(Institute of Agricultural Engineering and Technology, Fujian Academy of Agricultural Science/Fujian Province Key Laboratory of Agricultural Products (Food) Processing Technology, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The improvement effect of microbial fermentation on *in vitro* antioxidant properties of *Gracilaria lemaneiformis* slurry polysaccharide was studied to provide theoretical support for high value utilization of *Gracilaria lemaneiformis*. The structure changes of polysaccharide before and after fermentation by *Lactobacillus* RP38 and *Saccharomyces cerevisiae* JJ4 were analyzed by modern chromatography and spectral analysis techniques. The free radical scavenging ability of slurry polysaccharides before and after fermentation was investigated. The result showed that the mass fraction of polysaccharide increased from 0.30% to 0.79%, and sulfated polysaccharide mass fraction increased from 0.03% to 0.12%. Results of gel permeation chromatography and infrared spectroscopy revealed that functional groups of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharides remained unchanged after biological fermentation, the molecular weight of the polysaccharide was reduced, and then more sulfate groups exposed. In addition, it was found by nuclear magnetic resonance scanning that sulfate group of sulfated polysaccharide was mainly distributed in the C-6 position of galactose. The distribution position of sulfate was not changed by biological fermentation, but the content of sulfate was improved. The hydroxyl radical scavenging ability of *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide was increased by 5.33% and the superoxide radical scavenging ability was increased by 32.12% after fermentation. In conclusion, the antioxidant properties of *Gracilaria lemaneiformis* slurry could be improved by *Lactobacillus* RP38 and *Saccharomyces cerevisiae* JJ4, which may be related to the fact that the formation of small molecular polysaccharide with hydrogen supply capacity and more sulfate groups exposure during fermentation.

Keywords: *Lactobacillus*; yeast; *Gracilaria lemaneiformis*; fermentation; antioxidant; polysaccharide

(责任编辑:叶红波)