

УДК 577.114.083

ФИЗИКО - ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА *LACTOCOCCUS LACTIS*

© 2017 Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, Л.В. Карпунина

Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова

Статья поступила в редакцию 28.04.2017

Были определены физико-химические свойства экзополисахарида *Lactococcus lactis* В-1662: молекулярная масса, химическая природа, моносахаридный состав, относительная вязкость.

Ключевые слова: бактерии, молочнокислые бактерии, лактококки, экзополисахариды, молекулярная масса, химическая природа, моносахаридный состав, вязкость.

ВВЕДЕНИЕ

Среди микробных биополимеров особое место занимают экзополисахариды (ЭПС). Источником получения экзополисахаридов на сегодняшний день являются многие бактерии, в том числе молочнокислые [1-5]. Известно, что они обладают реологическими, иммуностимулирующими, ранозаживляющими, пленкообразующими свойствами [3-5]. Однако функции этих биополимеров являются не до конца изученными. Для формирования представления о влиянии ЭПС молочнокислых бактерий на физиологические реакции в организме животных, необходимо накопление данных об их структуре, физико-химических и биологических свойствах ЭПС разных видов и штаммов.

В связи с этим, целью работы явилось изучение физико-химических свойств экзополисахарида *Lactococcus lactis* В-1662.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования явился экзополисахарид *Lactococcus lactis* В-1662. Выделение и очистку ЭПС проводили по методу J. Cerning et.al. [6] в нашей модификации.

Культура *Lactococcus lactis* В-1662 была получена из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пушкино-на-Оке).

Молекулярную массу экзополисахарида определяли методом аналитической гель-хроматографии [7], используя гелевый носитель TSKgel G 6000 PWXL (Япония). ЭПС идентифицировали на автоматическом анализаторе 2690 Alliance Waters. Наличие фракций ЭПС *L.*

lactis В-1662 определяли методом ионообменной хроматографии, используя носитель DEAE-Toyopearl 650 M [8].

Моносахаридный состав определяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках с целлюлозным носителем [9].

Относительную вязкость определяли с помощью стеклянного вискозиметра ВПЖ-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучали физико-химические свойства ЭПС *L. lactis* В-1662, который был получен нами ранее из культуры *L. lactis* В-1662 [10]. Данный ЭПС представлял собой порошок светло-коричневого цвета, без запаха, не имеющий в своем составе белка. Для его получения культуру *L. lactis* В-1662 выращивали на среде A. Welman [11] с сахарозой при температуре 27 °С, pH 5,5 в течение 48 ч на шуттель-аппарате при 180 об/мин. Очистку ЭПС проводили методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sephadex G-10.

Молекулярную массу экзополисахарида определяли методом аналитической гель-хроматографии на колонке TSKgel G6000 PWXL. Колонку калибровали стандартными образцами сахаров с известными молекулярными массами, такими как: глюкоза 6 тыс Да, Dextran 10 тыс Да, Dextran 110 тыс Да, Dextran 2 млн Да («Fluca», Швейцария, «Merck» Германия). Экзополисахарид *L. lactis* В-1662 детектировали на автоматическом анализаторе 2690 Alliance Waters (рис. 1). Как видно из табл. 1, молекулярная масса *L. lactis* В-1662 была равна 10000 Да (табл. 1).

Дальнейшую очистку ЭПС *L. lactis* В-1662 проводили, используя метод ионообменной хроматографии на колонке с анионообменником DEAE-Toyopearl 650M (20x200 мм). Элюцию проводили в два этапа: первоначально буфером 0,04 % NaN_3 , 0,05M KH_2PO_4 . После отделения нейтральных фракций, элюцию осуществляли раствором NaCl в том же буфере с градиентом концентрации 1M. Фракции с колонки собирали

Фокина Надежда Александровна, микробиолог.

E-mail: fockina.nadejda@yandex.ru

Урядова Галина Тимофеевна, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия»

E-mail:eni_galina@mail.ru

Карпунина Лидия Владимировна, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры «Микробиология, биотехнология и химия». E-mail: karpuninal@mail.ru

Таблица 1. Определение молекулярной массы ЭПС *L. lactis* B-1662 на колонке TSKgel тип G6000 PWWL

| Образец | Время выхода максимального пика, мин | Молекулярная масса, Да |
|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Декстран | 21,73 | 2 000 000 |
| Декстран | 23,20 | 110 000 |
| Декстран | 24,60 | 10 000 |
| Глюкоза | 25,76 | 6 000 |
| ЭПС на сахарозе пики слева направо | | |
| 1 | 25,51 | 10 000 |

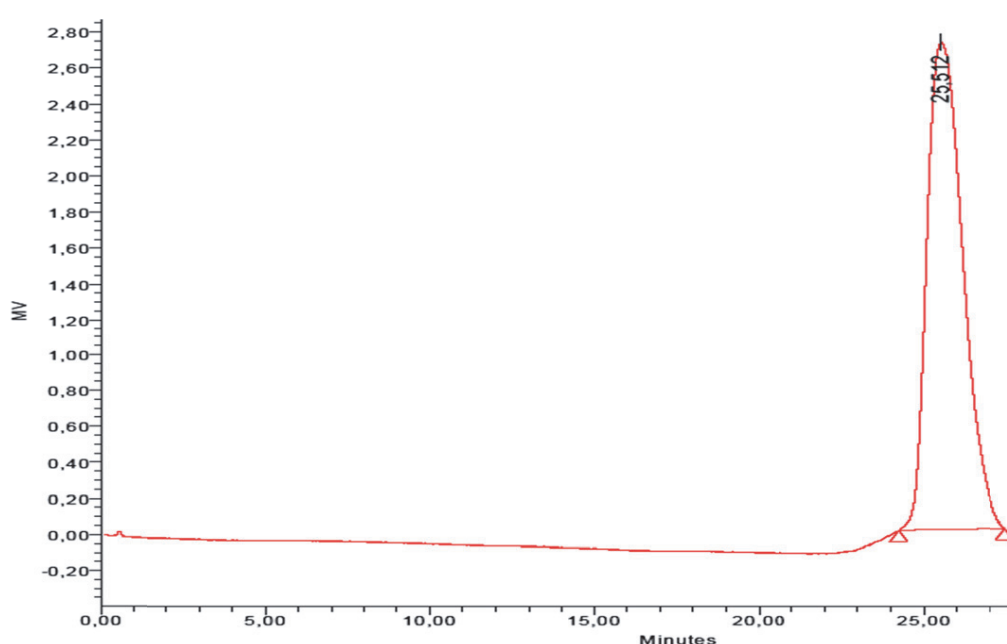


Рис. 1. Хроматограмма определения молекулярной массы ЭПС, полученного из *L. lactis* B-1662 на сахарозе на колонке с TSKgel G6000 PWWL

с помощью коллектора и затем исследовали на содержание углеводов фенол-серным методом [12]. Как видно из хроматограммы на рис. 2, образцы выходили одной фракцией соответствующей нейтральным веществам. Наличие одной нейтральной фракции было характерно и для некоторых ЭПС таких молочнокислых бактерий как *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* B-1596, *L. delbrueckii* B-1936 и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [13]. Хотя в литературе имеются данные о гетерогенности ЭПС некоторых штаммов лактококка [14].

Используя метод тонкослойной хроматографии, которую проводили на пластинке с целлюлозным носителем POLIGRAM® GEL 300 с толщиной слоя 0,1мм, определяли моносахаридный состав ЭПС *L. lactis* B-1662. В качестве «свидетелей» использовали спиртовые растворы моносахаров (Fluca) таких как: D- глюкоза, D -галактоза, L - манноза, D - рамноза, D- глюкоуроновая кислота, D - ксилоза. Гидролиз ЭПС

проводили 2 н. раствором трифторуксусной кислоты при 110° С в течение 3 часов. Элюентом являлся раствор, состоящий из этилацетата, пиридина, уксусной кислоты, воды в соотношении 5:5:1:3. В качестве проявителя использовали анилин фталат. Было определено, что в состав ЭПС входят ксилоза и глюкоза (рис. 3). Полученные результаты согласуется с литературными данными о том, что глюкоза и ксилоза, наряду с маннозой, рамнозой, галактозой могут являться структурными моносахаридами ЭПС [15,16].

В процессе исследований было установлено, что ЭПС изучаемой культуры обладал низкой вязкостью и это не позволяло определить динамическую вязкость. Относительная вязкость была определена с помощью капиллярного вискозиметра и составила 1,3 мм²/с. Значение относительной вязкости было сопоставимо с показателем вязкости ЭПС других молочнокислых бактерий – лактобацилл [14].

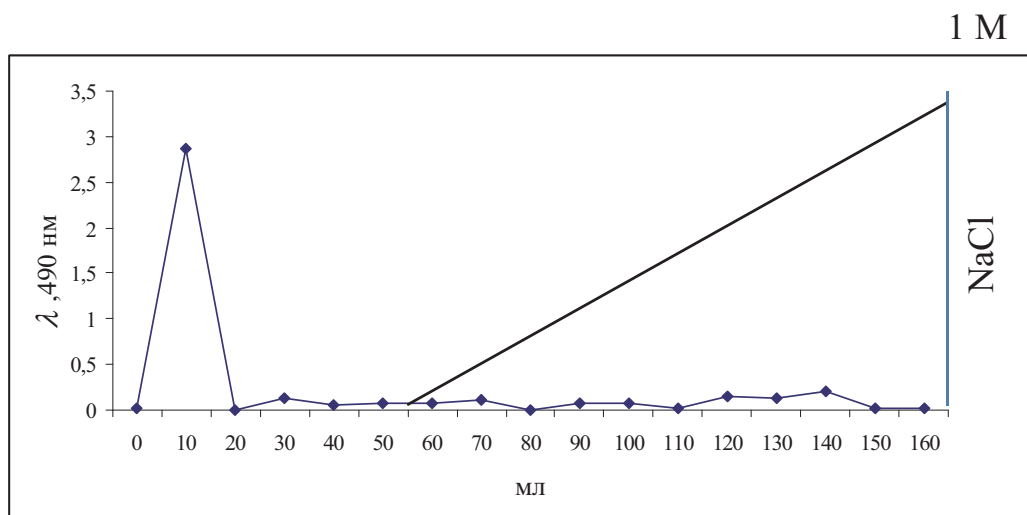


Рис. 2. Ионообменная хроматография ЭПС *L. lactis* B-1662 на DEAE - Toyopearl 650M

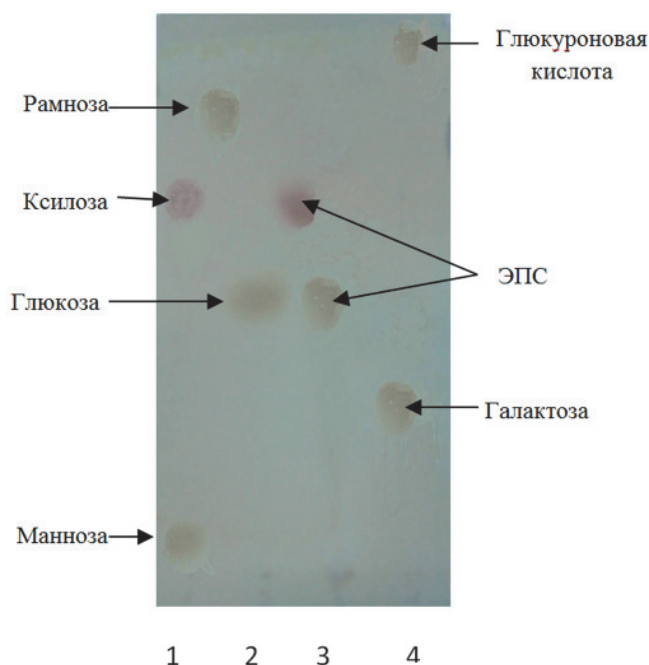


Рис. 3. Определение моносахаридного состава ЭПС *L. lactis* B-1662 методом тонкослойной хроматографии

Примечание: 1,2,4 – углеводы-свидетели, 3-ЭПС

Таким образом, из культуральной жидкости *L. lactis* B-1662 впервые выделен ЭПС, представленный одной нейтральной фракцией с молекулярной массой 10000 Да, обладающей небольшой относительной вязкостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганина В.И., Рожкова Т.В. Анализ зарубежных исследований в области молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды // Изв. вузов. Пищ. технол. 2005. № 5-6. С. 65-66.
2. Лахтин М. В., Лахтин В.М., Алешкин А.В. Экзополимеры пробиотических лактобацилл и бифидобактерий (новые подходы и свойства) // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра

Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 87. № 5. С. 257-261.

3. Ботина С.Г., Рожкова И.В., Семенихина В.Ф. Использование штаммов молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды, в производстве кисломолочных продуктов питания // Хранение и переработка сельхозсырья. 2010. № 1. С. 38-40.
4. Влияние экзополисахаридов *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* на цитокиновый статус лабораторных мышей / Е.В. Полукаров, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина, Е.И. Тихомирова // Медицинская иммунология. 2009. №4-5. С. 309-310.
5. Правдивцева М.И., Карпунина Л.В., Бухарова Е.Н. Влияние лаксаранов на процесс заживления ран у животных // Аграрная наука в XXI веке; проблемы и перспективы: сборник науч. статей VI Всерос-

- сийской науч. - практ. конф. Саратов, 2012. Ч.П. С. 82-84.
6. *Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J.* Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* // *Biotechnol. Lett.* 1988. Vol. 10. P. 255–260.
 7. *Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А.* Методы исследования эндотоксинов. Киев: Наукова думка, 2006. 234 с.
 8. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
 9. *Шталь Э.* Хроматография в тонких слоях. М.: Мир, 1965. 508 с.
 10. *Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В.* Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования // *Аграрный научный журнал.* 2016. № 12. С. 40-42.
 11. *Welman A.D., Maddox I.S., Archer R.H.* Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* // *J. Appl. Microbiol.* 2003. Vol. 95. P. 1200–1206.
 12. *Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J.K., Rebera P.A., Smith T.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* 1956. Vol. 28. No. 3. P. 350–356.
 13. *Полукаров Е.В.* Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их функциональная значимость в организме животных: дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2009. 106 с.
 14. *Рожкова Т.В.* Биотехнология стартовых культур на основе молочнокислых бактерий, синтезирующих полисахариды. Дис. ... канд. тех. наук. М., 2006. 159 с.
 15. *De Vuyst L., Degeest B.* Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol Rev.* 1999. Vol. 23. P. 153 - 177.
 16. Характеристика полисахаридов, секретируемых *Bifidobacterium adolescentis* 94 БИМ / *Г.И. Новик, Н.И. Астапович, Й. Кюблер, А. Гамъян* // *Микробиология.* 2002. Т. 71. № 2. С. 205-210.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF EXOPOLYSACCHARIDE *LACTOCOCCUS LACTIS*

© 2017 N. A Fokina, G.T. Uryadova, L.V. Karpunina

Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov

Physic-chemical properties of the exopolysaccharide (EPS) of *Lactococcus lactis* B-1662 were determined: molecular weight, chemical nature, monosaccharide composition, relative viscosity.

Keywords: bacteria, Lactic acid bacteria, Lactococci, exopolysaccharide (EPS), molecular weight; chemical nature; monosaccharide composition; relative viscosity.

Nadezhda Fokina, Microbiologist, Educational, Research and Testing Laboratory to Determine the Quality of Food and Agricultural Products.

E-mail: fockina.nadejda@yandex.ru

Galina Uryadova, Post-Graduate Student at the Microbiology, Biotechnology and Chemistry Department.

E.mail:eni_galina@mail.ru

Lidia Karpunina, Doctor of Biology Science, Professor at the Microbiology, Biotechnology and Chemistry Department.

E-mail: karpuninal@mail.ru