

# 产胞外多糖乳杆菌的筛选及多糖功能的研究

董阳勤<sup>1</sup>, 妥彦峰<sup>1</sup>, 牟光庆<sup>1,2</sup>, 姜淑娟<sup>1</sup>, 钱方<sup>1</sup>, 宋莹龙<sup>1</sup>

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

(2. 东北农业大学食品安全与营养协同创新中心, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 本论文从大连地区海产品消化腺中筛选产胞外多糖(EPS)的乳杆菌属菌株, 并研究其所产 EPS 的功能特性, 选出一株目标菌, 对其EPS分离纯化, 测定纯化后各多糖组分的相对分子量。获得EPS产量相对较高的菌株经16S rRNA序列测定鉴定为 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*-4, *Lactobacillus plantarum*-12, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*-49; 对3株植物乳杆菌及其EPS进行清除DPPH自由基的测定, *Lactobacillus plantarum*-12的EPS浓度为0.5 mg/mL时, 清除率为48.82±3.88%, 显著高于另外2株菌 ( $p<0.05$ ); 测定植物乳杆菌的EPS抑制 *E. coli* ATCC25922 在HT-29细胞上的粘附效果, *Lactobacillus plantarum*-12的EPS浓度为0.2 mg/mL时, 抑制率为78.23%±2.46%, 显著高于另外两株菌 ( $p<0.05$ ); *Lactobacillus plantarum*-12的EPS可显著抑制 *E. coli* ATCC25922 刺激HT-29细胞产生IL-8 ( $p<0.05$ )。 *Lactobacillus plantarum*-12的EPS经DEAE-Sepharose Fast Flow离子交换柱、Sepharose CL-6B凝胶柱和Sephacryl HR S200凝胶柱层析分离得到两组分, 测定两组分的相对分子质量分别为  $8.5 \times 10^4$  u 和  $7.4 \times 10^4$  u。

**关键词:** 胞外多糖; 抗氧化性; 粘附性; IL-8; 纯化

文章编号: 1673-9078(2017)2-61-68

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.010

## Screening of Exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* Strains and Study of Exopolysaccharide Properties

DONG Yang-qin<sup>1</sup>, TUO Yan-feng<sup>1</sup>, MU Guang-qing<sup>1,2</sup>, JIANG Shu-juan<sup>1</sup>, QIAN Fang<sup>1</sup>, SONG Ying-long<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

(2. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus* strains were screened from the digestive glands of seafood from the Dalian area, and the functional properties of the produced EPSs were studied. One target strain was selected, the corresponding EPS was isolated and purified, and the relative molecular weights of all purified polysaccharide components were measured. Strains with relatively high EPS-producing ability were identified as *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*-4, *Lactobacillus plantarum*-12, and *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*-49. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging abilities of the three *Lactobacillus plantarum* strains and their EPSs were measured. When the EPS produced by *Lactobacillus plantarum*-12 was at a concentration of 0.5 mg/mL, the DPPH free radical scavenging rate was 48.82±3.88%, significantly higher than those of other two strains ( $p<0.05$ ). The effect of EPS produced by *Lactobacillus plantarum* strains on the inhibition of the adhesion of *Escherichia coli* ATCC 25922 to HT-29 cells was measured. When the EPS produced by *Lactobacillus plantarum*-12 was at a concentration of 0.2 mg/ml, the inhibitory rate was 78.23%±2.46%, significantly higher than those of other two strains ( $p<0.05$ ). The EPS produced by *Lactobacillus plantarum*-12 could significantly inhibit IL-8 production by HT-29 cells stimulated by *E. coli* ATCC 25922 ( $p<0.05$ ). The crude EPS produced by *Lactobacillus plantarum*-12 was purified by DEAE-Sepharose anion-exchange, Sepharose CL-6B, and Sephacryl HR S200 chromatography columns; two fractions were obtained, and their relative molecular weights were  $8.5 \times 10^4$  u and  $7.4 \times 10^4$  u.

**Key words:** exopolysaccharides; antioxidant activities; adhesion; interleukin 8; purification

收稿日期: 2016-02-18

基金项目: 本课题由国家十二科技支撑计划项目(2013BAD18B09); 国家自然科学基金项目(31571813); 国家海洋食品工程技术研究中心项目(2012FU125X03); 辽宁省自然科学基金项目(2014026018)资助

作者简介: 董阳勤(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳品工程

通讯作者: 牟光庆(1967-), 男, 博士生导师, 研究方向: 乳品科学与乳品微生物

胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是细菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外的粘液或荚膜多糖<sup>[1]</sup>。乳酸菌胞外多糖是一种天然的高分子聚合物,具有诸多功能特性,如改善发酵乳的质构特性及对人体健康的益生作用等。从乳制品中筛选出的菌株,在乳品中所产多糖赋予了产品良好的稳定性等、使产品细腻均匀、口感顺滑、乳清析出少。许多学者对乳酸菌胞外多糖的结构和功能特性及其构效关系进行了广泛而深入的研究。产粘多糖的菌株提高发酵乳的粘度和质构与多糖的产量并非有直接的相关,而与多糖的分子量、链的长度、分支度以及多糖和酪蛋白之间的作用等有关<sup>[2]</sup>。LAB EPS的免疫调节活性与多糖的物化性质有关,比如分子量<sup>[3]</sup>。李伟等通过体外细胞模型研究了*L. helveticus* MB2-1的胞外多糖LHEPS对人胃癌细胞BGC-823的增殖情况,其粗多糖及其纯化组分均能抑制肿瘤细胞增殖<sup>[4]</sup>。

自然界中大量分布着产胞外多糖的乳酸菌,从发酵乳、酸奶和奶酪中都可筛选得到乳酸菌菌株。目前国内产EPS的乳酸菌集中在乳杆菌属、球菌属、链球菌属、明串珠菌属及双歧杆菌属等<sup>[5]</sup>。已被研究过EPS的LAB有嗜热链球菌(*S. thermophilus*)、嗜酸乳杆菌(*Lb. acidophilus*)、乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lc. Lactis ssp. Cremoris*)、乳酸乳球菌(*Lc. lactis subsp. lactis*)、嗜热链球菌(*S. thermophilus*)和植物乳杆菌(*Lb. plantarum*)等<sup>[6]</sup>。产胞外多糖的乳酸菌有很多,可从婴幼儿粪便或哺乳动物肠道中分离获得。近年研究发现,鱼类肠道中也存在嗜酸乳杆菌和短乳杆菌等多种乳酸菌类群<sup>[7]</sup>。利用鱼肠或扇贝的消化腺分离出乳酸菌,将对产胞外多糖的乳酸菌菌种资源提供有力的支撑。

多糖有分子量较大,内部结构和构象较复杂等特点,多糖的纯化是其结构解析的基础。一般利用乙醇沉淀法得到粗多糖,再经色谱柱如离子交换柱或凝胶层析柱的层析进一步纯化。多糖的带电性质和分子量的差异性可作为根据来选择合适的分离介质,如DEAE-Sephadex、DEAE-Sepharose、Sepharose系列和Superdex系列等<sup>[8]</sup>。

本论文以海洋生物的消化道为原料,筛选出胞外多糖产量相对较高的目标菌株,同时对胞外多糖的功能特性进行初步研究,并对其进行提取纯化和分子量的测定。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与主要试剂

海产品:大连市甘井子区水产市场购买的活的夏

威夷扇贝、鸦片鱼和多宝鱼,作为分离乳杆菌的样品。

MRS培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司,产品编号HB0384)用于培养乳酸菌;LB培养基:酵母膏0.5%,蛋白胨1%,氯化钠1%,pH为7.0。

HT-29细胞:来自中国科学院上海典藏细胞库,用含10%胎牛血清(gibco)的RPMA1640细胞培养液(Therom Fisher Scientific Inc)培养;DPPH试剂,购于美国sigma公司;浓硫酸;三氯乙酸;Triton×100,上海生工生物公司;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>试剂;苯酚。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌落初筛

取新鲜鱼肠和夏威夷扇贝的消化腺用剪刀剪碎,放在研钵里进行研磨。加入生理盐水,进行适当稀释后,涂布于pH 6.0的MRS培养基上,置厌氧培养箱中37℃恒温培养48h,获得单菌落培养物。

#### 1.2.2 菌株复筛

将从平板上得到的单菌落,取其部分用5%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进行接触酶试验;用接种环挑取接触酶阴性单菌落,于MRS固体培养基上进行三区划线,37℃培养48h,获得单菌落;观察菌株在平板上的菌落形态特征。挑取少量菌体于载玻片上进行涂片、革兰氏染色,然后在显微镜下观察菌体形态;保留接触酶阴性、革兰氏染色阳性的杆菌和球菌,进行后续试验。

#### 1.2.3 产胞外多糖乳杆菌的筛选

选择从海产品中分离获得的杆菌,依据高产胞外多糖乳酸菌的筛选方法<sup>[9]</sup>,筛选出胞外多糖产量相对较高的杆菌。将分离获得的杆菌,按2%(V/V)的接种量接种到10 mL的MRS液体培养基中37℃培养18h。在10000 r/min、4℃条件下离心15 min得上清液,沸水浴10 min使分解多糖的酶类失活,冷却到室温。加入80%(m/V)的三氯乙酸至终浓度7%(m/V),恒温摇床(160 r/min, 20℃)震荡2h,在10000 r/min, 4℃条件下离心15 min除去蛋白沉淀,得上清液。加入20 mL无水乙醇4℃静置12h。在10000 r/min、4℃条件下离心15 min,收集多糖沉淀,加入10 mL超纯水溶解粗多糖,并装于透析袋(截留分子量8 ku~14 ku)中,超纯水透析3 d;透析结束后,采用苯酚-硫酸法测定透析后多糖溶液的浓度,筛选出胞外多糖产量相对较高的菌株,委托宝生物工程(大连)有限公司经16S rRNA基因序列测定,经BLAST比对进行菌株鉴定。

#### 1.2.4 粗多糖的提取

选择胞外多糖产量相对较高的菌株进行培养,依据粗多糖的制备方法提取粗多糖<sup>[10]</sup>。将活化好的菌株

按3~5% (V/V) 的接种量接种到MRS液体培养基1000 mL中培养18 h。在10000 r/min、4 °C条件下离心15 min除菌体沉淀得上清液，沸水浴10 min，使上清液中分解多糖的酶类失活，冷却到室温。60 °C旋蒸浓缩至原体积的1/5，加TCA至终浓度为7% (m/V)，置于层析柜中静置10 h，在10000 r/min、4 °C条件下离心20 min除去蛋白沉淀，在上清液中加入3倍体积的无水乙醇，置于4 °C层析冷柜中静置24 h，确保多糖能完全沉淀。在10000 r/min，4 °C条件下离心10 min收集多糖沉淀。加入部分超纯水溶解多糖沉淀后，倒入透析袋（截留分子量8~14 ku）中，超纯水透析2 d且经常换水以便小分子物质的去除，冷冻干燥得到粗多糖样品，用保鲜膜包住并存放于干燥器中。

### 1.2.5 粗多糖中多糖和蛋白质含量的测定

提取的粗多糖，以葡萄糖（分析纯）为标准，采用苯酚-硫酸法进行多糖含量的测定。以牛血清白蛋白为标准，采用考马氏亮蓝法进行蛋白质含量的测定。

### 1.2.6 乳酸杆菌及胞外多糖清除 DPPH 自由基的测定

#### 1.2.6.1 乳酸杆菌清除 DPPH 自由基的测定

产胞外多糖相对较高的3株菌进行清除DPPH自由基能力的测定<sup>[11]</sup>：1 mL菌液（10<sup>7</sup> CFU/mL）中加入1 mL的0.2 mmol/L DPPH试剂，强烈振荡后室温下避光反应30 min，3500 r/min离心10 min，在517 nm处测定上清液吸光度。平行测定3次。

$$\text{清除率}(\%) = \left[ 1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right] \times 100$$

其中，A<sub>i</sub>为1 mL DPPH+1 mL样品的吸光度；A<sub>j</sub>为1 mL PBS+1 mL样品的吸光度；A<sub>c</sub>为1 mL DPPH+1 mL PBS的吸光度。

#### 1.2.6.2 胞外多糖清除 DPPH 自由基的测定

胞外多糖清除 DPPH 自由基能力的测定：配制不同浓度的 EPS 溶液：0.10、0.30、0.50 mg/mL；向1 mL的0.2 mmol/L DPPH试剂中加入1 mL上述样品，强烈振荡后室温下避光反应30 min，3500 r/min离心10 min，在517 nm处测定上清液吸光度。平行测定3次，计算方法与菌体抗氧化测定相同。

### 1.2.7 胞外多糖对 *E.coli* 的抑制黏附作用

采用在改良型RPMI-1640培养液（HyClone）中培养HT-29细胞，并添加10% (V/V) 的胎牛血清（Gibco）。细胞置于37 °C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养，每24 h换一次液。将消化后的HT-29细胞接到12孔细胞培养板中，每孔加入2.5×10<sup>5</sup>个细胞，于CO<sub>2</sub>培养箱中培养，待细胞达到80%~90%融合时，进行黏附实验。

用HT-29细胞模型研究乳酸菌胞外多糖抑制大肠杆菌的黏附作用<sup>[12]</sup>。配制不同浓度EPS溶液：0.05、

0.10、0.20 mg/mL，然后每孔加入100 μL的多糖样品到HT-29单层细胞中，在CO<sub>2</sub>培养箱中37 °C培养1 h，然后用无菌PBS洗涤3次，移去未粘附的EPS，加入0.1 mL *E.coli* ATCC25922悬液（10<sup>8</sup> CFU/mL）反应1 h。然后用无菌PBS清洗细胞4次，加入0.5 mL、5% (V/V) Triton-100，吹打混匀后冰浴5 min，对照组只加入 *E.coli* ATCC25922处理，梯度稀释后平板计数实验组和对照组中 *E.coli* ATCC25922的菌落数。

$$\text{抑制率}(\%) = (C_e - C) / C_e \times 100\%$$

式中C<sub>e</sub>表示对照组 *E.coli* ATCC25922在HT-29细胞上的粘附数，C则表示实验组 *E.coli* ATCC25922在HT-29细胞上的粘附数。

### 1.2.8 胞外多糖对 *E.coli* 诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10 的影响

配制不同浓度 EPS 溶液：125、250、500 μg/mL。将0.1 mL 1×10<sup>8</sup> CFU/mL *E.coli* ATCC25922和0.1 mL不同浓度的多糖溶同时加入到细胞培养板中，在37 °C的5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养3 h。8000 r/min离心10 min收集上清液，存放于-80 °C超低温冰箱中待测。按 Human IL-8/IL-10 试剂盒（Quantitative analysis Human IL-8 ELISA Research Reagent, Wuhan）说明书用酶联免疫吸附检测测定 IL-8 和 IL-10<sup>[13]</sup>。

### 1.2.9 胞外多糖的纯化

#### 1.2.9.1 多糖的离子柱的纯化

用 Tris-HCl 缓冲液（0.05 mol/L，pH 7.60）平衡 DEAE-Sephacryl Fast Flow 离子柱（D2.6×28 cm，GEHealthcare），流速为2 mL/min。粗多糖用 Tris-HCl 缓冲液溶解后过0.45 μm滤膜上样，上样浓度为3 mg/mL，上样量100 mL。先用 Tris-HCl 缓冲液洗脱，再用 Tris-HCl 与1.0 mol/L NaCl进行梯度洗脱；每管收集5 mL。采用苯酚-硫酸法逐管检测糖含量，绘制洗脱曲线。收集不同组分经透析、浓缩、冷冻干燥得到不同多糖组分。

#### 1.2.9.2 多糖的凝胶柱纯化

（1）中性多糖的 Sephacryl HR S200 凝胶柱层析离子柱纯化后，第一个峰形多糖组分进一步在 Sephacryl HR S200 凝胶柱（D1.6×60 cm，GEHealthcare）上进行分离。用含0.15 mol/L NaCl的 Tris-HCl 洗脱液（0.05 mol/L，pH 7.60）进行洗脱，上样浓度：2 mg/mL，上样体积：2 mL，流速：0.10 mL/min，每管收集体积：2.0 mL。检测收集管中多糖含量<sup>[14]</sup>，合并收集峰组分，经透析、浓缩、冷冻干燥得到多糖组分。

（2）酸性多糖的 Sepharose CL-6B 凝胶柱层析离子柱纯化后，第二个峰形多糖组分进一步在 Sepharose CL-6B 凝胶柱（D1.6×90 cm，GEHealthcare）

上进行分离。用含 0.15 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.60) 进行平衡。上样浓度: 1 mg/mL, 上样量: 2 mL, 流速: 0.40 mL/min, 每管收集体积: 5.0 mL。检测收集管中多糖含量, 合并收集峰组分, 经透析、浓缩、冷冻干燥得到多糖固样。

### 1.2.10 多糖的分子量测定

采用不同分子量 (Gel Filtration Calibration Kit LMW/HMW) 的标准品, 高分子量标准品重均分子量  $M_w$  分别为 158 ku、440 ku、75 ku、43 ku 和 669 ku, 低分子量标准品重均分子量  $M_w$  分别为 6500 u、13700 u、29 ku、43 ku 和 75 ku, 使用蛋白纯化仪测定每个标准品在 Sepharose CL-6B 凝胶柱上的洗脱体积。用含 0.15 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 7.60) 进行平衡。上样浓度: 1 mg/mL, 上样量: 2 mg, 流速: 0.40 mL/min, 每管收集体积: 5.0 mL。以标准品相对分子量的对数 (LogWt) 为纵坐标, 以各标准品在峰值处的洗脱体积为横坐标, 绘出标准曲线, 得出二者的线性回归方程。

称取纯化后的两多糖组分各 1.0 mg 溶于 2 mL 的超纯水中, 与标准品相同的条件在 Sepharose CL-6B

凝胶柱上进行上样和洗脱, 收集洗脱液, 苯酚-硫酸法逐管检测多糖含量, 记录洗脱体积, 代入回归方程, 得到两组分的相对分子量。

### 1.2.11 数据分析

所有实验重复三次, 数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计, 差异显著性检验采用独立样本 t 检验和单因素方差分析 (ANOVA, LSD)。所有数据均表示为平均值±标准误差,  $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳酸杆菌的筛选

从海鱼及扇贝肠道中分离获得的菌落进行接触酶实验和革兰氏染色, 镜检后, 保留接触酶阴性, 革兰氏阳性的菌株, 共 52 株, 分别编号。多宝鱼肠道分离获得 40 株菌 (1 号~40 号), 鸦片鱼肠道分离菌 9 株菌 (41 号~49 号), 夏威夷扇贝消化腺分离菌 3 株菌 (50 号~52 号), 如表 1 所示, 将分离获得的接触酶阴性、革兰氏染色阳性的杆菌初步认为是乳杆菌属细菌。

表 1 海产品肠道分离获得的菌株

Table 1 Results of physiological and biochemical tests on the strains isolated from the intestinal tract of seafood

菌株	来源	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 酶实验	革兰氏染色	形态
1 号~40 号	多宝鱼	-	+	11 株 (杆) 29 株 (球)
41 号~49 号	鸦片鱼	-	+	9 株 (杆) 1 株 (球)
50 号~52 号	夏威夷扇贝	-	+	1 株 (杆) 2 株 (球)

### 2.2 产胞外多糖乳酸杆菌的筛选

从分离获得的 20 株疑似乳杆菌中筛选高产胞外多糖的菌株, 21 株菌株在 MRS 培养基中的 EPS 产量不尽相同。其中, 4 号菌、12 号菌、37 号菌、44 号菌、49 号菌和 50 号菌的 EPS 产量分别为 (589.21±3) mg/L、(631.10±5) mg/L、(561.23±12) mg/L、(561.61±4) mg/L、

(617.32±10) mg/L 和 (531.40±11) mg/L, 显著高于其它 14 株菌株 ( $p < 0.05$ ); 将产 EPS 量较高的这 6 株菌进行 16S rRNA 序列测定, 经 BLAST 序列比对, 鉴定为植物乳杆菌菌株, 见表 2; 4 号、12 号和 49 号植物乳杆菌在培养 18 h 后, EPS 产量显著高于其它菌株 ( $p < 0.05$ )。因此, 将 4 号、12 号和 49 号作为出发菌株, 用于后续研究。

表 2 植物乳杆菌胞外多糖的产量

Table 2 EPS production of *Lactobacillus plantarum* in MRS medium

菌株编号	菌株名称	菌株来源	EPS 产量/(mg/L)
4 号	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> -4	多宝鱼的肠道	589.21±3 <sup>c</sup>
12 号	<i>Lactobacillus plantarum</i> -12	多宝鱼的肠道	631.10±5 <sup>e</sup>
37 号	<i>Lactobacillus plantarum</i> -37	多宝鱼的肠道	561.23±12 <sup>b</sup>
44 号	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> -44	鸦片鱼的肠道	561.61±4 <sup>b</sup>
49 号	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> -49	鸦片鱼的肠道	617.32±10 <sup>d</sup>
50 号	<i>Lactobacillus plantarum</i> -50	夏威夷扇贝肠道	531.40±11 <sup>a</sup>

注: 同一列数据右上角标示不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 2.3 粗多糖中多糖和蛋白含量的测定

多糖含量的测定回归方程为： $y=0.0075x+9.2925$  ( $R^2=0.9991$ )，测定粗多糖制品中的总糖含量为62.11%。蛋白质含量的测定回归方程为： $y=8.4172x+0.0226$  ( $R^2=0.9973$ ) 未检测到蛋白质的存在。分析胞外粗多糖另外的成分，可能存在一些小分子杂质或含有部分未除尽的水分。因此需要将粗多糖经离子交换柱和凝胶柱层析进行纯化。

### 2.4 菌株及其胞外多糖的清除DPPH自由基作用

#### 2.4.1 菌体清除DPPH自由基测定

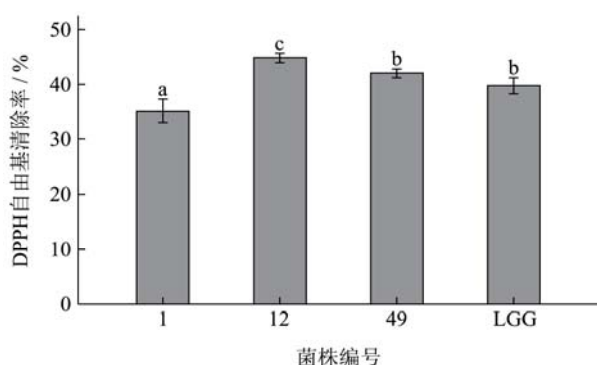


图1 受试植物乳杆菌清除DPPH自由基的能力

Fig.1 DPPH free radical scavenging abilities of the tested *Lactobacillus plantarum* strains using LGG as a control

注：LGG 作为对照组，字母表示  $p<0.05$ 。

以DPPH自由基清除率为指标，研究浓度为 $10^7$  CFU/mL的3株受试植物乳杆菌和标准菌株LGG的抗氧化能力。结果表明：受试的4株乳酸杆菌对DPPH均有一定的清除能力，清除率的范围为33%~45%，其中植物乳杆菌12号清除率较高，为44.78%左右，显著高

表3 植物乳杆菌胞外多糖的DPPH自由基清除能力

Table 3 DPPH free radical scavenging ability of EPS produced by *Lactobacillus plantarum* strains using LGG as a control ( $p<0.05$ )

质量浓度/(mg/mL)	DPPH 自由基清除率/%			
	12	4	49	LGG
0.10	24.24±2.33 <sup>Aa</sup>	23.31±4.22 <sup>Aa</sup>	22.08±5.82 <sup>Aa</sup>	25.95±2.64 <sup>Aa</sup>
0.30	32.61±3.41 <sup>Bc</sup>	28.33±5.71 <sup>Bb</sup>	24.21±3.40 <sup>Ba</sup>	30.95±2.78 <sup>Bb</sup>
0.50	49.11±4.11 <sup>Cb</sup>	48.82±3.88 <sup>Cb</sup>	31.11±3.24 <sup>Ca</sup>	47.19±2.66 <sup>Cb</sup>

注：LGG 作为对照组 ( $p<0.05$ )；同 1 行数据右上角标示不同小写字母表示差异显著 ( $p<0.05$ )；同 1 列数据右上角标示不同大写字母表示差异显著 ( $p<0.05$ )。

### 2.5 多糖抑制 *E.coli* 粘附作用

研究发现 12 号，49 号及 LGG 菌株所产 EPS 具有很好的抑制 *E. coli* ATCC25922 对 HT-29 细胞粘附的

于其他受试菌株( $p<0.05$ )，故选定其作为后续实验菌株。测定DPPH清除率虽然操作简单，但实验过程中发现其结果重现性较差，重复实验的结果往往有较大差异。不同来源的乳酸菌菌株对DPPH自由基的清除能力方面存在差异，且其发挥抗氧化作用的活性物质存在的部位也因菌株的不同而具有较大的差异性<sup>[15]</sup>。部分研究发现，乳酸菌具有抗氧化能力，但并没有明确其抗氧化作用机理。推测乳酸菌代谢产物EPS可能发挥一定的抗氧化能力，因此将乳酸菌的多糖，用于后续的清除DPPH自由基的研究。

#### 2.4.2 胞外多糖清除DPPH自由基测定结果

采用DPPH清除试验对产胞外多糖较高的3株乳杆菌胞外多糖进行抗氧化活性测定，并以LGG所产EPS为对照。如表3所示，当EPS为0.5 mg/mL时，*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum-4*，*Lactobacillus plantarum-12*，LGG的多糖对DPPH自由基的清除率47%以上，与*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum-49*之间有显著差别 ( $p<0.05$ )。在EPS浓度为0.30 mg/mL时，其DPPH自由基清除能力为24%以上，不同EPS之间无显著性的差别 ( $p>0.05$ )；当EPS浓度达到0.1 mg/mL时，其清除能力较小；Ye等<sup>[16]</sup>体外研究了*Pseudomonas* PF-6产的酸性多糖对DPPH自由基 (DPPH·)、羟自由基 (·OH) 和超氧自由基 ( $O_2\cdot^-$ ) 均有较强的清除作用，而且多糖对·OH的清除能力强于Vc，清除 $O_2\cdot^-$ 的能力与Vc相当，显示出较强的抗氧化能力。乳酸菌胞外多糖中很多都具有自由基清除能力的生物学活性，而其清除能力的大小与其一级结构如分子量大小或高级结构等有直接作用的关系<sup>[17]</sup>。根据DPPH清除能力，利用*Lactobacillus plantarum-12*和*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum-49*的多糖，用于后续的抑制大肠杆菌粘附性的研究。

效果，但是抑制效果各异。结果如表4所示，不同乳酸菌所产EPS对*E.coli*的抑制黏附作用具有浓度效应，随着多糖浓度的增加抑制粘附率升高，不同浓度的EPS之间，抑制黏附作用存在显著性的差别

( $p>0.05$ ); 当浓度为 0.2 mg/mL 时, LGG 菌株的 EPS 的抑制粘附率高于 49 号的 EPS, 小于 12 号的 EPS, 三者之间有显著差别 ( $p<0.05$ )。由此可见, 3 者之间 12 号菌株的 EPS 的抑制 *E. coli* ATCC25922 在 HT-29 细胞上粘附的效果相对更好。一些研究表明一些 *Lactobacillus* 为益生菌, 其代谢产物可以抑制 *E. coli* 的感染和粘附, 初步推测 EPS 起到空间排阻的作用, 通过屏蔽细胞表面黏附位点, 增强了肠上皮细胞的屏障功能, 减少了致病菌对细胞的粘附作用<sup>[18]</sup>。

表 4 不同浓度 EPS 排除 *E. coli* 对 HT-29 细胞的粘附作用

**Table 4 Inhibition of the adhesion of *E. coli* to HT-29 cells with different doses of EPS ( $p<0.05$ )**

质量浓度 (mg/mL)	抑制粘附率/%		
	LGG	49	12
0.05	4.63±0.60 <sup>bA</sup>	2.83±0.90 <sup>aA</sup>	12.97±2.36 <sup>cA</sup>
0.10	14.87±0.65 <sup>aB</sup>	30.33±0.60 <sup>bB</sup>	44.63±1.60 <sup>cB</sup>
0.20	57.93±6.45 <sup>aC</sup>	56.07±1.79 <sup>bC</sup>	78.23±2.46 <sup>cC</sup>

注: 同 1 行数据右上角标示不同小写字母表示差异显著 ( $p<0.05$ ); 同 1 列数据右上角标示不同大写字母表示差异显著

表 5 *Lactobacillus plantarum*-12 和 LGG 不同浓度 EPS 抑制 *E. coli* 刺激细胞产生 IL-8 和 IL-10

**Table 5 Inhibition of the *E. coli*-induced-production of IL-8 and IL-10 by various concentrations of EPS produced by *Lactobacillus plantarum*-12 and LGG**

12	IL-8 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)	LGG	IL-8 含量/(pg/mL)	IL-10 含量/(pg/mL)
Control	56.37±2.75 <sup>d</sup>	52.35±1.84 <sup>a</sup>	Control	54.26±2.24 <sup>d</sup>	51.50±0.77 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	1662.19±54.83 <sup>a</sup>	49.77±1.38 <sup>a</sup>	<i>E. coli</i>	1672.18±64.18 <sup>a</sup>	49.26±0.62 <sup>a</sup>
500 μg/mL	908.58±12.74 <sup>c</sup>	48.51±1.79 <sup>a</sup>	500 μg/mL	901.98±13.04 <sup>c</sup>	47.35±0.60 <sup>a</sup>
250 μg/mL	938.59±4.90 <sup>c</sup>	51.23±3.42 <sup>a</sup>	250 μg/mL	931.84±5.20 <sup>c</sup>	46.54±1.06 <sup>a</sup>
125 μg/mL	1094.59±19.60 <sup>b</sup>	53.26±5.28 <sup>a</sup>	125 μg/mL	1091.78±11.20 <sup>b</sup>	56.60±1.10 <sup>a</sup>

注: 同一列数据右上角标示不同字母表示差异显著 ( $p<0.05$ )。

## 2.7 多糖的分离纯化

粗多糖是由几种不同的多糖组分组成的, 需要进一步分离纯化。胞外多糖经离子交换柱纯化洗脱时先用 Tris-HCl 洗脱液洗 2 个柱体积, 把粗多糖中的中性多糖洗出, 再用 Tris-HCl 洗脱液与 NaCl 溶液梯度洗脱 5 个柱体积, 把粗多糖中酸性多糖洗出, 最后用 NaCl 溶液走 2 个柱体积。如图 2 所示, 粗多糖由于所带电荷的不同分离出两个组分 EPS1 和 EPS2, 梯度洗脱和 Tris-HCl 洗脱液洗出的多糖量接近, 说明该粗多糖中两种组分含量接近。测定两种组分的质量分数分别为粗多糖的 25.5% 和 37%。组分 EPS1 由 pH 7.6 的缓冲液洗脱出来, 推测多糖成分为不带电荷的中性多糖。组分 EPS2 在含 NaCl 缓冲液中梯度洗脱下来, 推测 EPS2 组分是带有负电荷, 为酸性或带酸性基团多糖。

根据分离组分的分子大小不同, 组分的洗脱体积

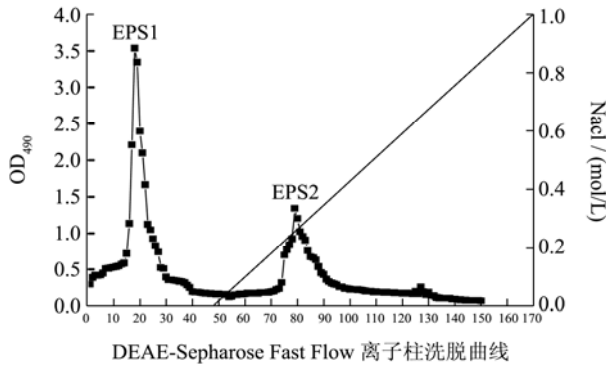
( $p<0.05$ )。

## 2.6 多糖抑制 *E. coli* 诱导 HT-29 细胞分泌 IL-8 和 IL-10

将 2 种菌株中抑制粘附性更强的 *Lactobacillus plantarum*-12 作为出发菌株, 研究其 EPS 抑制大肠杆菌刺激 HT-29 细胞产生 IL-8 和 IL-10 的作用。结果如表 5 所示, 与对照组相比, *Lactobacillus plantarum*-12 和 LGG 的不同浓度 EPS 显著抑制 IL-8 的产生 ( $p<0.05$ )。当 EPS 作用浓度降低时, *E. coli* 刺激 HT-29 细胞产生的 IL-8 逐渐增多。G. Moorthy 研究表明, *Lactobacillus* 的 EPS 与 *E. coli* ATCC43889 同时加入细胞时, EPS 也可以抑制 *E. coli* ATCC43889 对细胞的接触和刺激, 从而减少细胞 IL-8 的表达<sup>[19]</sup>。对照组 *E. coli* 单独刺激 HT-29 细胞产生的 IL-10 的量为 (49.77±1.38) pg/mL, *Lactobacillus plantarum*-12 和 LGG 的 EPS 对 *E. coli* 刺激 HT-29 细胞分泌 IL-10 量影响效果不明显 ( $p>0.05$ ), 既是 2 株乳酸杆菌的 EPS 没有刺激 HT-29 细胞产生 IL-10 的功能。

不同, 从而将不同分子量的组分分离。组分 EPS2 的洗脱曲线如图 3 所示。由此可以看出, 在洗脱的大峰后面还有扁平的小峰, 初步判断 EPS2 经离子柱分离纯化不够彻底, 含有两个分子量大小不同的组分。由于小峰所占含量很低, 透析冻干后称量, 无法称出。收集大峰组分, 透析和冻干后, 作为组分 EPS2 的一个组分, 并记录组分在峰值处的洗脱体积。

利用分子量大小不同, 多糖组分 EPS1 经 Sephacryl HR S200 凝胶柱层析纯化。洗脱曲线如图 4 所示。在一个大的主要吸收峰后面尾随一个较小的峰, 说明组分 EPS1 是由主要的一个分子量组成, 并夹带少量其它分子量的多糖。检测发现第二个小峰形的糖量较少, 所以只对第一个大峰的组分进行收集, 合并大峰处溶液, 然后再上 Sepharose CL-6B 凝胶柱, 检测其纯度, 若洗脱曲线只出现单一的峰, 即只有一种分子大小的组分, 测其洗脱体积, 确定其分子质量。



DEAE-Sephacryl Fast Flow 离子柱洗脱曲线

图2 EPS 在离子柱上的洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of EPS on anion-exchange chromatography column

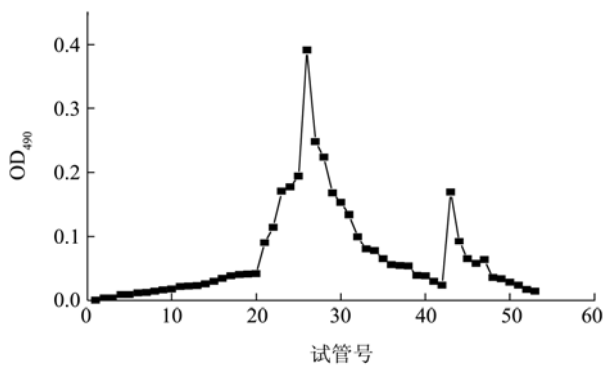


图3 EPS2 在 CL-6B 凝胶柱洗脱曲线

Fig.3 Elution profile of EPS2 on CL-6B column

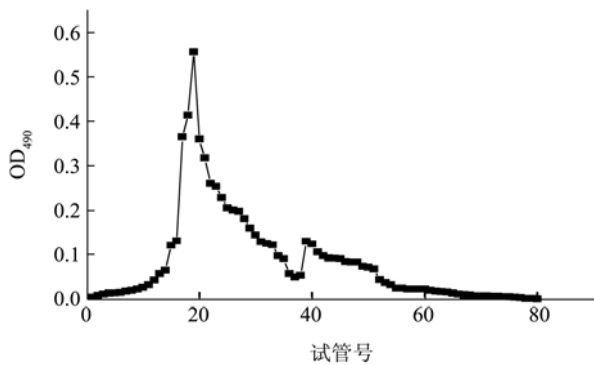


图4 EPS1 在 HR S200 凝胶柱洗脱曲线

Fig.4 Elution profile of EPS1 on HR S200 column

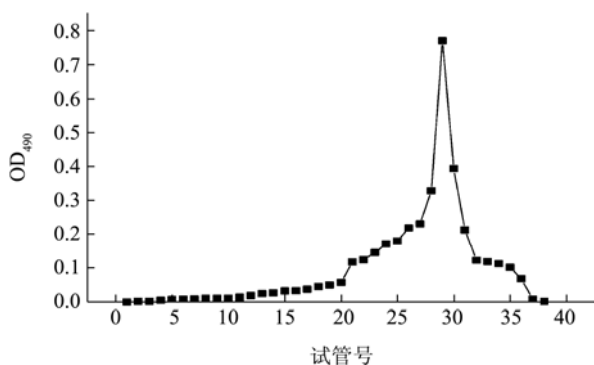


图5 EPS1 在 CL-6B 凝胶柱的洗脱曲线

Fig.5 Elution profile of EPS1 on CL-6B column

把组分 EPS1 上 Sephacryl HR S200 凝胶柱纯化后的主要吸收峰, 透析冻干后再经 Sepharose CL-6B 分子筛层析柱。洗脱曲线如图 5 所示, 样品经洗脱只出现一个峰, 则表明该多糖组分为分子量大小均一的组分。记录峰值处的洗脱体积 145 mL, 收集洗脱液透析、冻干后得到纯化多糖, 为白色纤维状疏松固体。

### 2.8 多糖的分子量测定

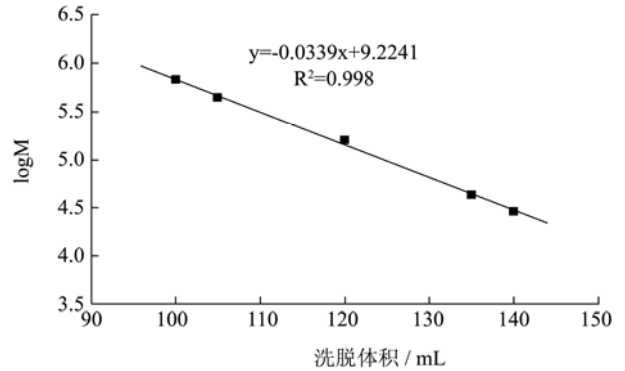


图6 多糖分子量与洗脱体积的标准曲线

Fig.6 Standard curve of polysaccharide Mw

高效凝胶渗透色谱 (GPC) 或高效体积排阻色谱 (SEC) 是常用的测定多糖分子量的方法。当多糖的结构与标准品的结构接近时, 测定的结果才与实际值比较接近。因此, 本实验采用在 Sepharose CL-6B 凝胶柱上测定标准品的洗脱体积与分子质量的标准曲线, 进一步测定组分 EPS2 和组分 EPS1 的相对分子质量。

依据相对分子质量不同的标准品在 Sepharose CL-6B 凝胶柱上的洗脱体积不同, 求得回归方程:  $\log M = -0.0339x + 9.2241$  ( $R^2 = 0.9981$ )。组分 EPS2 在 Sepharose CL-6B 凝胶柱上的洗脱体积 130 mL, 则分子质量为  $8.5 \times 10^4$  u。组分 EPS1 在 Sepharose CL-6B 凝胶柱上的洗脱体积为 145 mL, 则分子质量为  $7.4 \times 10^4$  u。组分 EPS2 的分子质量略大于组分 EPS1 的分子质量。此外, 文献中报道的 LAB EPS 的分子量范围在  $10^4 \sim 6 \times 10^6$  u<sup>[20]</sup>, 两多糖组分的分子量均在其之间。

### 3 结论

本论文从夏威夷扇贝、鸦片鱼和多宝鱼的肠道里分离获得 21 株疑似乳酸杆菌, 不同菌株的 EPS 产量存在一定差异, 初筛得到的 3 株乳杆菌胞外多糖产量显著 ( $p < 0.05$ ) 高于其它菌株, 鉴定为 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*-4、*Lactobacillus plantarum*-12、*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*-49; 根据菌株及胞外多糖对 DPPH 的清除率, 筛选到 2 株优良的菌株 *Lactobacillus plantarum*-12 和 *Lactobacillus*

*plantarum* subsp. *plantarum*-49 ; *Lactobacillus plantarum*-12 不同浓度的粗多糖能抑制大肠杆菌在 HT-29 细胞上的粘附, 当 EPS 浓度为 0.2 mg/mL 时, 抑制率为  $78.23\% \pm 2.46\%$ , 显著高于另外 2 株菌 ( $p < 0.05$ ); *Lactobacillus plantarum*-12 的粗多糖能显著抑制 *E.coli* 刺激 HT-29 细胞产生 IL-8 ( $p < 0.05$ )。 *Lactobacillus plantarum*-12 的胞外多糖经离子柱和凝胶柱纯化获得 2 组分, 测得 2 组分的相对分子量分别为  $8.5 \times 10^4$  u 和  $7.4 \times 10^4$  u。胞外多糖纯化后组分的功能特性仍需进一步研究, 与粗多糖的功能特性进行对比, 确定发挥生物学活性的主要成分。

### 参考文献

- [1] Sutherland I W. Bacterial exopolysaccharides [J]. Adv. Microb. Physiol., 1971, 8(8): 142-213
- [2] Ruas-Madiedo P, Tuinier R, Kanning M, et al. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks [J]. International Dairy Journal, 2002, 12(8): 689-695
- [3] Lopez P, Monteserin D C, Gueimonde M, et al. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different *in vitro* responses upon interaction with human cells [J]. Food Research International, 2012, 46(1): 99-107
- [4] Li W, Ji J, Tang W, et al. Characterization of an antiproliferative exopolysaccharide (LHEPS-2) from *Lactobacillus helveticus* MB2-1 [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105(1): 334-340
- [5] Bouzar F, Cerning J, Desmazeaud M. Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants [J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(2): 205-211
- [6] Feng Mei-Qin. The study of the fermentation, structural and characters of the plant *Lactobacillus* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [7] Wang Lin-Jun. The separation of the fish intestinal *Lactobacillus acidophilus* and its characters analysis [J]. Journal of Chinese Food, 2014, 5: 20-25
- [8] Shao Li. Screening of *Lactobacillus* producing exopolysaccharide and the study of its separation, structural and biological characters [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
- [9] Yu Jing, Zeng Xiao-qun, Wang Hong-fei, et al. Screening of *Lactobacillus* producing high yield exopolysaccharide and the optimize of its fermentation conditions [J]. Journal of Chinese Food, 2015, 15(2): 93-98
- [10] Hamet M F, Piermaria J A, Abraham A G. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 63(1): 129-135
- [11] Yin J Y, Nie S P, Zhou C, et al. Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of *Plantago asiatica* L [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(2): 210-217
- [12] Ren D, Li C, Qin Y, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by *Lactobacilli* and cell surface properties that influence attachment [J]. Anaerobe, 2012, 18(5): 508-515
- [13] Bleau C, Monges A, Rashidan K, et al. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 666-675
- [14] Wang Xi, Luo Xian, Xu Xiao-yang, et al. Comparative studies on antioxidant activities of different lactic acid bacterial strains [J]. Food Science, 2010, 31(1): 197-201
- [15] Ye S, Liu F, Wang J, et al. Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6 [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(1): 764-770
- [16] Mende S, Peter M, Bartels K, et al. Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 178-185
- [17] Melo M R S, Feitosa J P A, Freitas A L P, et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea* [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(4): 491-498
- [18] Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, et al. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(8): 2011-2015
- [19] Huang Yi, Huang Qi, Li Wei-feng, et al. The antioxidant function of the *Lactobacillus rhamnose* against Caco-2 and the influence of the secretion of cytokines [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary, 2012, 43(2): 250-254
- [20] Hassan A N. ADSA foundation scholar award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods [J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(4): 1282-1298



现代食品科技