

嗜热链球菌 MGB80-7 所产胞外多糖的表型结构及其抗氧化活性

乔少婷, 解敏, 代安娜尔, 胡海敏, 何彬彬, 丹彤*

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, 内蒙古呼和浩特 010018

乔少婷, 解敏, 代安娜尔, 胡海敏, 何彬彬, 丹彤. 嗜热链球菌 MGB80-7 所产胞外多糖的表型结构及其抗氧化活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2686-2699

Qiao Shaoting, Xie Min, Daiannaer, Hu Haimin, He Binbin, Dan Tong. Phenotypic structure and antioxidant activity of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* MGB80-7[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2686-2699

摘要:【背景】胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是乳酸菌生长代谢过程中所产生的一种次级代谢产物,除了可以改善产品质构和品质外,其生理功能也是近年来研究人员追捧的热点。【目的】探究乳酸菌 EPS 的表征特性和分子结构,揭示其与 EPS 益生特性之间的联系。【方法】以产 EPS 的嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, *S. thermophilus*) MGB80-7 为研究对象,利用苯酚-硫酸法测定菌株 EPS 产量。采用离子交换柱层析和凝胶分子筛层析对该菌株所产 EPS 进行分离纯化,结合凝胶色谱、红外光谱及高效液相色谱对 EPS 表型结构进行剖析。此外,为确定 EPS 表型特征对其抗氧化活性的影响,测定了 EPS 对超氧阴离子、羟自由基及 DPPH 自由基等的清除能力。【结果】*S. thermophilus* MGB80-7 在 M17 培养基中 EPS 产量较高,为(268.25±5.36) mg/mL,分离纯化后共得到 2 种多糖组分,其中中性多糖(WPS-807)分子量为 1.028×10^5 Da,主要由葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成,并含有少量的鼠李糖和阿拉伯糖,酸性多糖(SPS-807)分子量为 8.601×10^4 Da,单糖组分相较于 WPS-807 更为复杂,主要由甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖组成。抗氧化活性的结果表明, EPS-807 具有一定的抗氧化活性,尤其对羟自由基的清除能力较好。【结论】*S. thermophilus* MGB80-7 所产 EPS 的分子量、结构特征对其抗氧化活性具有一定影响,此结果为进一步分析乳酸菌 EPS 的构效关系和抗氧化机制提供基础。

关键词: 嗜热链球菌; 胞外多糖; 表型特征; 抗氧化活性

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(31860448)

Supported by: National Natural Science Foundation of China-Regional Project (31860448)

*Corresponding author: E-mail: dantong813218@aliyun.com

Received: 2021-11-04; Accepted: 2021-12-29; Published online: 2022-03-25

Phenotypic structure and antioxidant activity of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* MGB80-7

QIAO Shaoting, XIE Min, Daiannaer, HU Haimin, HE Binbin, DAN Tong*

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

Abstract: [Background] Exopolysaccharide (EPS) is a secondary metabolite produced during the growth and metabolism of lactic acid bacteria. In addition to improving the texture and quality of products, its physiological function has also attracted the interest of scholars in recent years. [Objective] This study intends to explore the characterization and molecular structure of EPS of lactic acid bacteria, and to reveal the relationship between it and the probiotic properties of EPS. [Methods] The EPS produced by *Streptococcus thermophilus* MGB80-7 was studied. To be specific, the yield of EPS was determined with the phenol-sulfuric acid method. Then the EPS was separated and purified by ion exchange column chromatography and gel molecular sieve chromatography, and the phenotypic structure of EPS was analyzed based on gel chromatography, infrared spectroscopy, and high performance liquid chromatography. As for the antioxidant activity, the ability to scavenge superoxide anion, hydroxyl radical, and DPPH radical was detected. [Results] The EPS yield of MGB80-7 in M17 medium was high, which was (268.25 ± 5.36) mg/mL. After separation and purification, two components were obtained. Among them, the neutral polysaccharide (WPS-807, 1.028×10^5 Da) was composed of glucose, galactose, and mannose, and a small amount of rhamnose and arabinose, and the acidic polysaccharide (SPS-807, 8.601×10^4 Da) was made up of complex monosaccharides, which was dominated by mannose, galactose, and arabinose. EPS-807 can scavenge some free radicals, especially the hydroxyl radicals. [Conclusion] The molecular weight and structure of EPS produced by MGB80-7 influence its antioxidant activity. This result lays a basis for further analysis of the structure-activity relationship and antioxidant mechanism of EPS from lactic acid bacteria.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*; exopolysaccharide; phenotypic structure; antioxidant properties

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是发酵乳制品工业中的重要菌株,广泛应用于酸奶等发酵乳制品的生产。嗜热链球菌在牛乳发酵过程中具有优良的产酸特性,能迅速降低产品的pH值,是发酵剂中仅次于乳酸乳球菌的优势菌株之一^[1-3]。胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)作为乳酸菌在发酵过程中的次级代谢物之一,具有增加产品黏度、改善发酵乳口感^[4-6],

以及一定的抗氧化活性等益生作用^[7-10],其研究价值日益增长。

作为一种安全无毒、产出效率高、培养条件限制小的生物制剂,乳酸菌EPS已经成为国内外研究学者关注的热点^[11-12]。You等^[13]通过对分离自西藏地区开菲尔中的戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*) LZ-R-17所产的EPS进行结构分析发现,R-17-EPS分子量为 1.20×10^6 Da,

由半乳糖和葡萄糖残基组成, 为线性异半乳糖聚糖; 颜准等^[14]对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) M8 EPS 进行分离纯化, 得到一种酸性杂多糖和蛋白聚糖, 2 种多糖在分子量、单糖组成及水溶液中结构方面都有一定差异; Zhou 等^[15]通过研究大量乳酸菌 EPS, 发现乳酸菌 EPS 在糖苷键类型上有很大的相似性, 即重复单元通常由 4–10 个单糖组成, 其中常见的单糖组分有葡萄糖和半乳糖。

本实验以产 EPS 的 *S. thermophilus* MGB80-7 为研究对象, 利用苯酚-硫酸法测定 M17 培养基中 EPS 的产量, 并对 EPS 的抗氧化能力进行分析。在此基础上, 进一步对该菌株在 M17 培养基中所产 EPS 进行分离纯化, 对其表型结构进行剖析, 探究 EPS 的抗氧化活性与其表型结构之间的关系, 为乳酸菌 EPS 的应用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

本次研究所用菌株为分离自蒙古国扎布汗省奥特跟苏木地区传统牛乳制品中的 *S. thermophilus*, 编号 MGB80-7, 由“内蒙古农业大学乳品生物技术与工程”教育部重点实验室提供。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

M17 培养基, 海博生物技术(青岛)有限公司; 95%无水乙醇, 天津市风船化学试剂科技有限公司; DEAE-Cellulose 52, 北京酷来搏科技有限公司; Sepharose CL-6B, Sigma 公司; 氯化钠, 天津市汇航化工科技有限公司; 浓硫酸、苯酚, 天津市风船化学试剂科技有限公司; DPPH 自由基检测试剂盒、超氧阴离子检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 羟自由基检测试剂盒, 南京建成科技有限公司; 所有

分离用有机溶剂均为国产分析纯。

超净工作台, 上海智城分析仪器制造有限公司; 紫外分光光度计、傅里叶变换红外光谱仪, SHIMADZU 公司; 程控多功能全自动部分收集器、电脑恒流泵、梯度混合器, 上海青浦沪西仪器厂; 真空冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 凝胶色谱仪, Wyatt 公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化

根据陈海燕等^[16]的实验方法并稍做改动, 将贮藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 *S. thermophilus* MGB80-7 接种于灭菌后的 M17 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 100 r/min 培养 24 h, 并连续培养 3 代使菌株活力达到最大(活菌数 $>1\times 10^9\text{ CFU/mL}$)。

1.3.2 葡萄糖标准曲线的制作

参照张青等^[17]使用的苯酚-硫酸法并进行适当修改, 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 1 mL, 此时各管含糖量分别为 20、40、60、80、100 mg/L。每管先加入质量浓度为 60 g/L 的苯酚溶液 1 mL, 再迅速加入浓硫酸 5 mL 振荡混匀, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 于 490 nm 波长处对样品进行测定得到吸光值。

以葡萄糖含量为横坐标, 以其对应的吸光值为纵坐标, 绘制葡萄糖含量的标准曲线, 得到计算糖含量的线性回归方程。

1.3.3 菌株 EPS 产量的测定

将活化后的菌株以 2 mg/mL 的接种量接种于 100 mL M17 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 100 r/min 振荡培养 24 h。将培养结束后的发酵液离心 ($5\ 000\times g$, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)以去除菌体, 在上清液中加入质量浓度为 800 g/L 的三氯乙酸至终质量浓度为 60 g/L, 低温下静置 12 h 以上。静置后的样品以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\times g$ 离心 20 min, 去除底部

蛋白沉淀,取上清液体加入3倍体积的95%(体积分数)的乙醇,同时大力搅拌,低温静置24 h后4 °C、12 000×g离心20 min得到多糖沉淀。加入适当的去离子水使沉淀复溶,倒入透析袋中透析3 d以上,每8 h换水一次,透析结束后取出备用。

依据1.3.2中测定还原糖含量的方法对透析液中EPS的含量进行测定。

1.3.4 粗多糖的富集

将活化后的 *S. thermophilus* MGB80-7 以2 mg/mL的接种量接种于20 L M17培养基中,37 °C、100 r/min培养24 h,根据1.3.3中的方法提取粗多糖,将透析结束后的透析液冷冻干燥得到粗制EPS。

1.3.5 粗多糖分级纯化

(1) DEAE-Cellulose 52 离子交换色谱分级纯化

根据刘鑫^[18]的方法对DEAE-Cellulose 52进行预处理和装柱。取100 mg粗制EPS溶于5 mL去离子水中,利用孔径为0.45 μm的滤膜将部分杂质过滤,加入纤维素离子交换柱中进行层析纯化。使用去离子水与浓度为0–1 mol/L NaCl缓冲溶液对其进行洗脱(流速为0.8 mL/min)(NaCl缓冲溶液为线性洗脱),以6 min/管分步收集,对各试管中液体利用紫外分光光度计在 A_{490} 处测定吸光度,以试管标号为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线,收集合并同一峰型下的样品组分进行冷冻干燥,得到EPS初步纯化组分。

(2) Sepharose CL-6B 凝胶柱层析纯化

采用刘海韵等^[19]报道的方法预处理Sepharose CL-6B并装柱。取30 mg初步纯化的多糖溶于3 mL去离子水中,利用孔径为0.22 μm的滤膜进行过滤,加入凝胶层析柱中进行洗脱纯化(流速为0.6 mL/min),分步收集(8 min/管),绘制Sepharose CL-6B洗脱曲线的方法同1.3.5 (1),

将同一峰形下的样品合并收集,进行冷冻干燥,得到纯化后的EPS。

1.3.6 胞外多糖纯度及分子量测定

利用凝胶色谱法对纯化后的EPS的纯度及分子量大小进行测定。将EPS溶解后利用孔径为0.22 μm的滤膜进行过滤,上机检测。

凝胶色谱仪检测条件及参数如下:

检测器:激光检测器和示差检测器;流动相:0.2/1000的叠氮化钠;色谱柱:ShodexOHpak系列SB-806与SB-803串联;柱温:40 °C;流速:1 mL/min;进样量:500 μL。

1.3.7 EPS表型结构测定

(1) 红外光谱分析

利用压片法对EPS表型结构进行红外光谱分析。取2 mg EPS纯化组分加入200 mg干燥的KBr粉末进行研磨并压成薄片,置于红外光谱扫描仪进行扫描(扫描范围:400–4 000 cm^{-1} ,分辨率:4 cm^{-1}),使用干燥KBr粉末作为基准,再分别对含有样品的KBr薄片进行红外光谱测定。

(2) 单糖组成分析

称取适量纯化后的EPS溶于30 mL去离子水中,加入5 mL亚铁氰化钾溶液再缓慢加入相同体积的乙酸锌溶液,加水至终体积为80 mL,室温摇动1 h后4 °C、5 000×g离心20 min,用干燥滤纸过滤,过滤后的体系加水定容至100 mL备用。

取适量定容后的体系溶液加入0.5 mL浓度为4 mol/L的3氟乙酸,120 °C水解2 h,利用氮气吹干,再加入0.5 mL浓度为0.3 mol/L的NaOH溶液和相同体积的PMP溶液(溶于甲醇),70 °C水浴60 min,冷却至室温,然后加入0.3 mol/L的HCl和氯仿各0.5 mL,振荡混匀,静置20 min,弃去下部氯仿层。连续萃取3次后利用孔径为0.45 μm的滤膜进行过滤得到滤

液, 通过 HPLC 进行检测分析。

取单糖标准品(甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖及岩藻糖)经相同处理后作为对照。

HPLC 分析条件及参数如下:

仪器: Agilent 1200 高效液相色谱仪; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 245 nm; 色谱柱: SHISEDOC18 (4.6 mm×250 mm×5 μm); 流动相: 0.1 mol/L KH₂PO₄ (pH 6.8):乙腈=82:18; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min。

1.3.8 EPS 抗氧化活性的测定

取 8 mg 经过 1.3.4 处理得到的粗制 EPS, 溶于 1 mL 去离子水中, 梯度稀释样品使其质量浓度为 4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL, 备用。以相同质量浓度的抗坏血酸(Vc)作为阳性对照。

(1) DPPH 自由基清除率的测定

参考刘逸凡等^[20]的检测方法并加以改良。分别吸取质量浓度为 4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的 EPS 样品溶液各 0.50 mL, 加入 0.20 mL DPPH 溶液(体积浓度为 0.03 μL/mL), 充分混匀后将体系置于避光处, 室温下静置反应 30 min 后于 A₅₁₅ 处测定样品吸光度, 记为 A_样; 以体积分数为 95% 的乙醇作为空白对照, 测定其吸光值并记为 A_空; 测定 0.10 mL DPPH 溶液与 1.00 mL 乙醇溶液的混合物在 A₅₁₅ 处的吸光值, 记为 A₀; 以抗坏血酸(Vc)为阳性对照组。计算 DPPH 自由基清除率公式如下:

$$\text{DPPH清除率(\%)} = \frac{A_0 - A_{\text{样}} - A_{\text{空}}}{A_0} \times 100。$$

(2) 超氧阴离子清除率的测定

参考叶明等^[21]研究中的检测方法并加以改良。分别取质量浓度为 4.000、2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的胞外多糖样品溶

液各 1.00 mL 于 1.5 mL EP 管中, 室温下反应并显色 20 min, 于 530 nm 波长处测定样品吸光度, 记为 A_样; A₀ 为用去离子水代替粗多糖溶液的吸光度。取同质量浓度抗坏血酸(Vc)作为阳性对照, 以去离子水作为空白对照组。计算超氧阴离子清除率公式如下:

$$\text{超氧阴离子清除率(\%)} = \frac{A_0 - A_{\text{样}}}{A_0} \times 100。$$

(3) 羟自由基抑制能力的测定

根据 H₂O₂-FeSO₄ (Fenton 反应)体系检测 EPS 对·OH 自由基的清除效果。利用南京建成科技有限公司提供的羟自由基检测试剂盒说明书对样品进行处理, 处理方法以试剂盒说明书为准。以相同质量浓度的抗坏血酸(Vc)作为阳性对照。计算羟自由基抑制能力公式如下:

$$\text{抑制羟自由基能力(U/mL)} = \frac{A_{\text{对}} - A_{\text{样}}}{A_{\text{标}} - A_{\text{空}}} \times C_{\text{标}} \times \frac{1 \text{ mL}}{V_{\text{样}}}。$$

1.4 数据分析

利用 Origin 5、Excel、OMNIC 等软件对实验数据进行处理, 所有实验均重复 3 次以减少误差。

2 结果与分析

2.1 EPS 产量

绘制葡萄糖标准曲线, 如图 1 所示。线性回归方程为: $y=0.0253x-0.0143$ ($R^2=0.9987$),

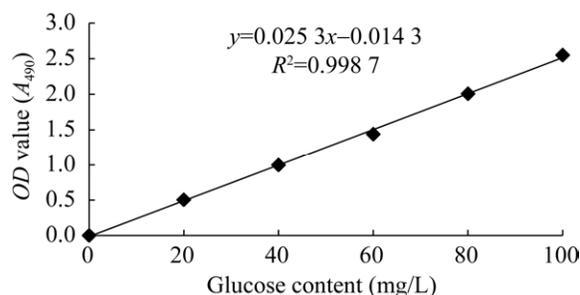


图 1 葡萄糖标准曲线

Figure 1 Glucose standard curve.

曲线回归性良好,可以用于后续样品糖含量的测定。将测得的样品 OD 值($A_{490}=6.772$)带入葡萄糖标准曲线后计算得出 M17 培养基中 MGB80-7 的 EPS 产量为 (268.25 ± 5.36) mg/mL。

2.2 *S. thermophilus* EPS 分离纯化

对 *S. thermophilus* MGB80-7 在 M17 培养基中获得的粗制 EPS 进行分离纯化,去除蛋白质等杂质分子,为后续对其表征结构进行分析提供基础。

2.2.1 离子交换柱纯化结果

离子交换树脂可以与 EPS 结合,通过利用去离子水和不同离子强度的洗脱液可有效分离不同极性的组分^[14]。将粗制 EPS 经离子交换柱层析分离后得到一个明显双峰,将 2 个峰下的物质分别命名为 EPS1 和 EPS2 (图 2)。其中, EPS1 由去离子水洗脱得出,为不带电荷的中性多糖组分; EPS2 由不同浓度(0–1 mol/L)的 NaCl 溶液洗脱得出,为带负电荷的酸性多糖或带酸性基团的糖复合物。乳酸菌 EPS 大多由中性多糖和酸性多糖共同组成^[14]。陈海燕等通过离子交换柱洗脱 *S. thermophilus* IMAU20756 所产的 EPS 后收集到 4 种不同极性的多糖组分^[16]。分

别收集 2 个组分并进行冷冻干燥用以进一步纯化。

2.2.2 凝胶分子筛纯化结果

将经过 1.3.5 处理后得到的 EPS1、EPS2 分别进行凝胶柱层析纯化,其洗脱曲线如图 3 所示。EPS1 洗脱曲线(图 3A)为单一峰形,且峰形较窄,表明 EPS 1 为纯的多糖组分,收集该峰形下的物质将其命名为 WPS-807。EPS2 洗脱曲线(图 3B)杂峰较多,但在试管 5 至试管 18 之间仍有一个明显大峰,收集该区域下的样品并将其命名为 SPS-807。将经过分子筛纯化的 2 种多糖组分别富集后冷冻干燥做后续分析。

2.3 *S. thermophilus* EPS 结构鉴定

2.3.1 分子量测定

表 1 为 2 种纯化后组分 WPS-807 和 SPS-807 的分子量测定结果,从表 1 中可以看出 WPS-807 的平均分子量为 1.028×10^5 Da,高于 SPS-807 的平均分子量(8.601×10^4 Da)。图 4 为 WPS-807 和 SPS-807 的分子量凝胶色谱(gel permeation chromatography, GPC)谱图,可以看出 2 种多糖均呈现单一峰形,说明 2 种 EPS 均为单一多糖,无其他杂质组分。

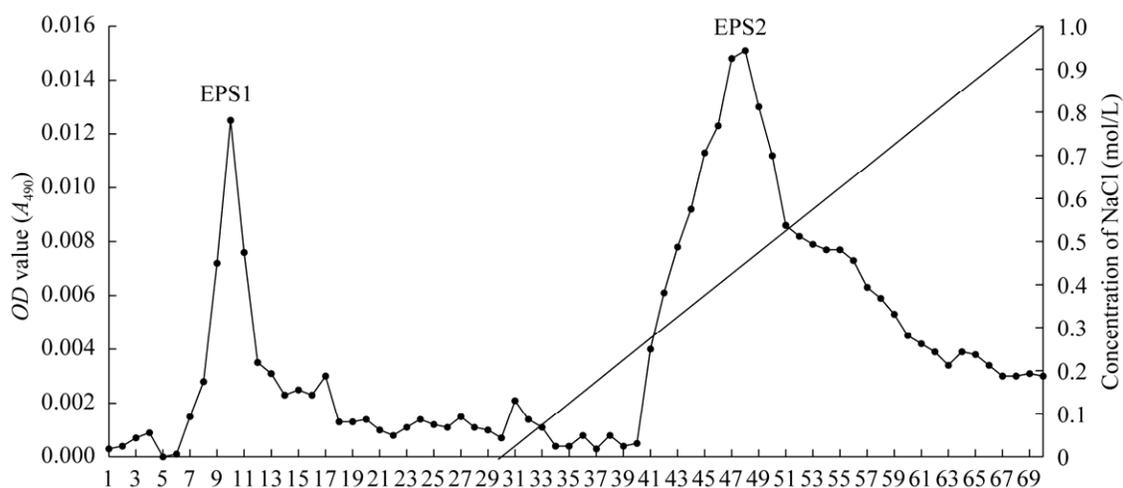


图 2 离子交换柱洗脱曲线

Figure 2 Ion exchange column elution curve.

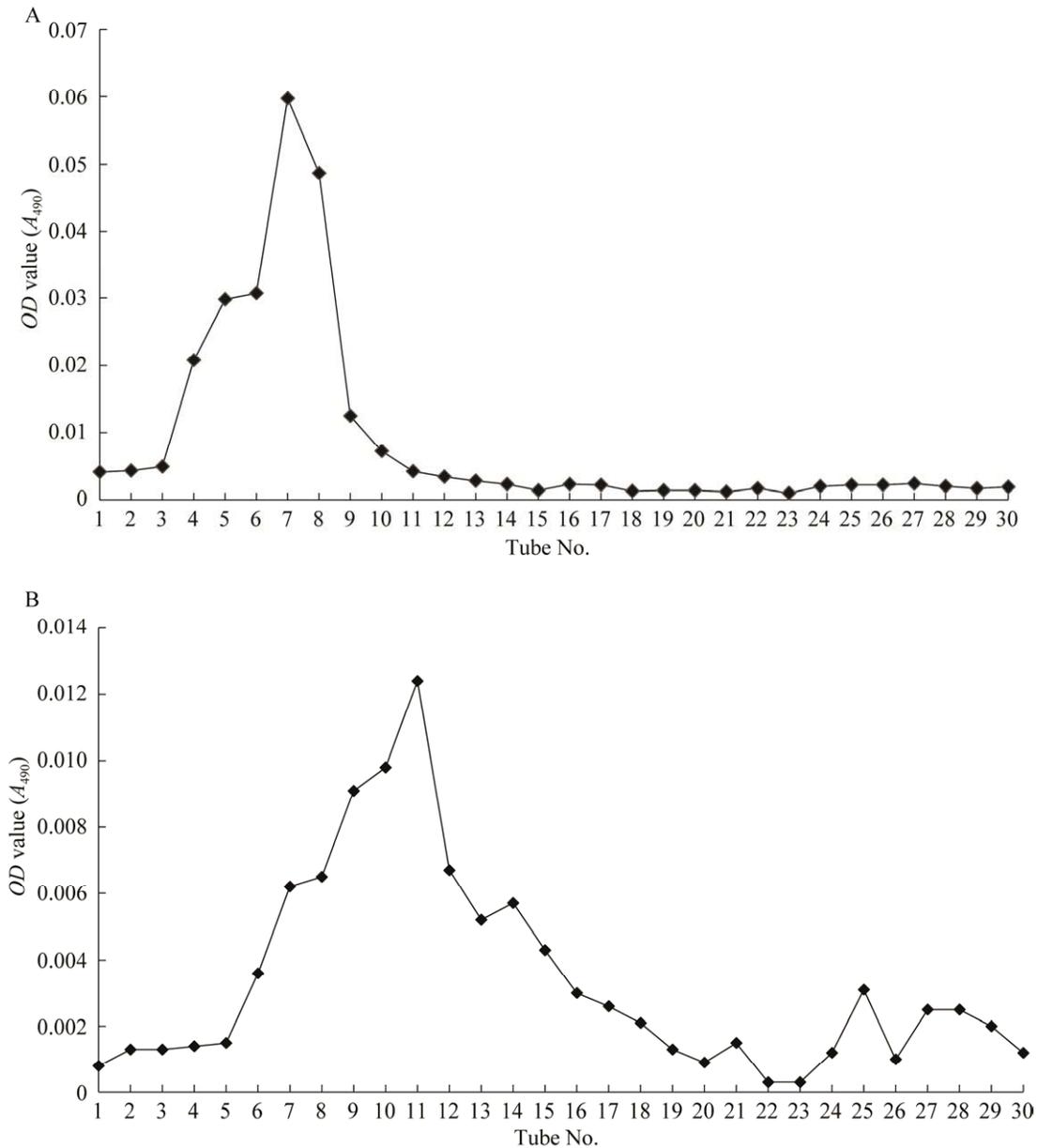


图3 EPS凝胶分子筛洗脱曲线 A: EPS1洗脱曲线; B: EPS2洗脱曲线

Figure 3 The elution curve of EPS through gel molecular sieve. A: The elution curve of EPS1; B: The elution curve of EPS2.

表1 EPS平均分子量

Table 1 Average molecular weight of EPS

Type	Distribution of main molecular weight (g/mol)	Mw (Da)	Mn (Da)	Mw/Mn
WPS-807	$(5.4-6.6) \times 10^4$ (51.6%)	1.028×10^5	7.433×10^4	1.383
SPS-807	$(3.4-8.1) \times 10^4$ (71.8%)	8.601×10^4	5.664×10^4	1.519

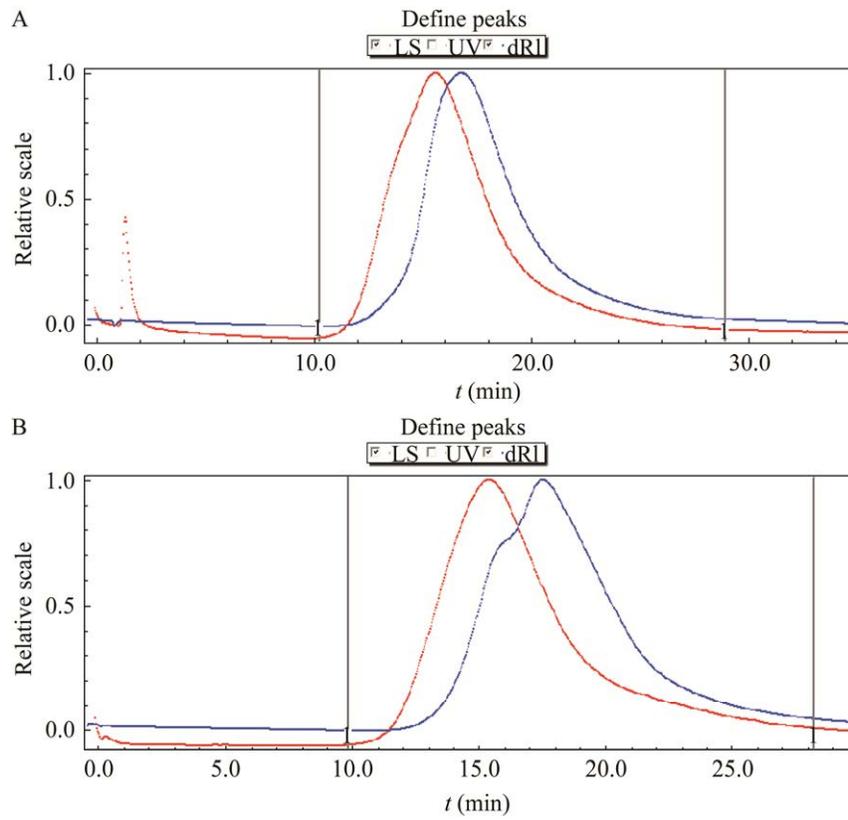


图 4 GPC 谱图 A: WPS-807 GPC 谱图; B: SPS-807 GPC 谱图

Figure 4 GPC spectrum of EPS. A: GPC spectrum of WPS-807; B: GPC spectrum of SPS-807.

2.3.2 EPS 官能团分析

图 5A、5B 表示 WPS-807 及 SPS-807 的红外光谱图结果, 多糖在红外光谱中具有典型的特征吸收峰, 在测定光波频率内 2 种多糖的红外光谱结果相似, 与王昭润的研究结果类似^[22]。

通过图 5A 可以看出, WPS-807 组分在 $3\ 413.88\ \text{cm}^{-1}$ 处有宽而强的吸收峰, 为 O-H 的收缩振动峰, 在 $2\ 928.93\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰为 C-H 键的收缩振动, 表明 WPS-807 确为多糖物质, 在 $1\ 642.92\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰表示为 C=O 的非对称伸缩振动, 在 $1\ 300\text{--}1\ 450\ \text{cm}^{-1}$ 处的弱吸收峰为 C=O 的对称伸缩振动, 表明 WPS-807 含有羧基。 $1\ 250.91\ \text{cm}^{-1}$ 处为 C-O 伸缩振动所呈现出的峰形, 另外在 $1\ 152.73\text{--}1\ 027.78\ \text{cm}^{-1}$ 之间的 3 个强吸收峰表示为吡喃糖环的特征

峰, 对应 C-O-H 和 C-O-C 的伸缩振动, 说明存在 $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$ 糖苷键, 在 $855.21\ \text{cm}^{-1}$ 处出现吡喃糖环的 α -型端基的 C-H 变角振动, 说明该多糖组分存在吡喃糖环残基和 α -型糖苷键。

SPS-807 的红外光谱结果检测如图 5B 所示, 在 $3\ 422.66\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现因 O-H 伸缩振动引起的强而宽的吸收峰, C-H 的伸缩振动所产生的吸收峰在 $2\ 928.93\ \text{cm}^{-1}$ 处出现, 是多糖的特征吸收峰, 在 $1\ 661.49\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 622.81\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的 2 个吸收峰为羧基中 C=O 键的非对称伸缩振动; 在 $1\ 453.22\ \text{cm}^{-1}\text{--}1\ 378.84\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰为 C=O 上下对称振动伸缩, 推测官能团为羧基或酯基, 在 $1\ 084.60\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现的 3 个吸收峰为吡喃糖环的特征峰, 对应 C-O-H 和 C-O-C, 可能存在 $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$ 糖苷键, $895.50\ \text{cm}^{-1}$

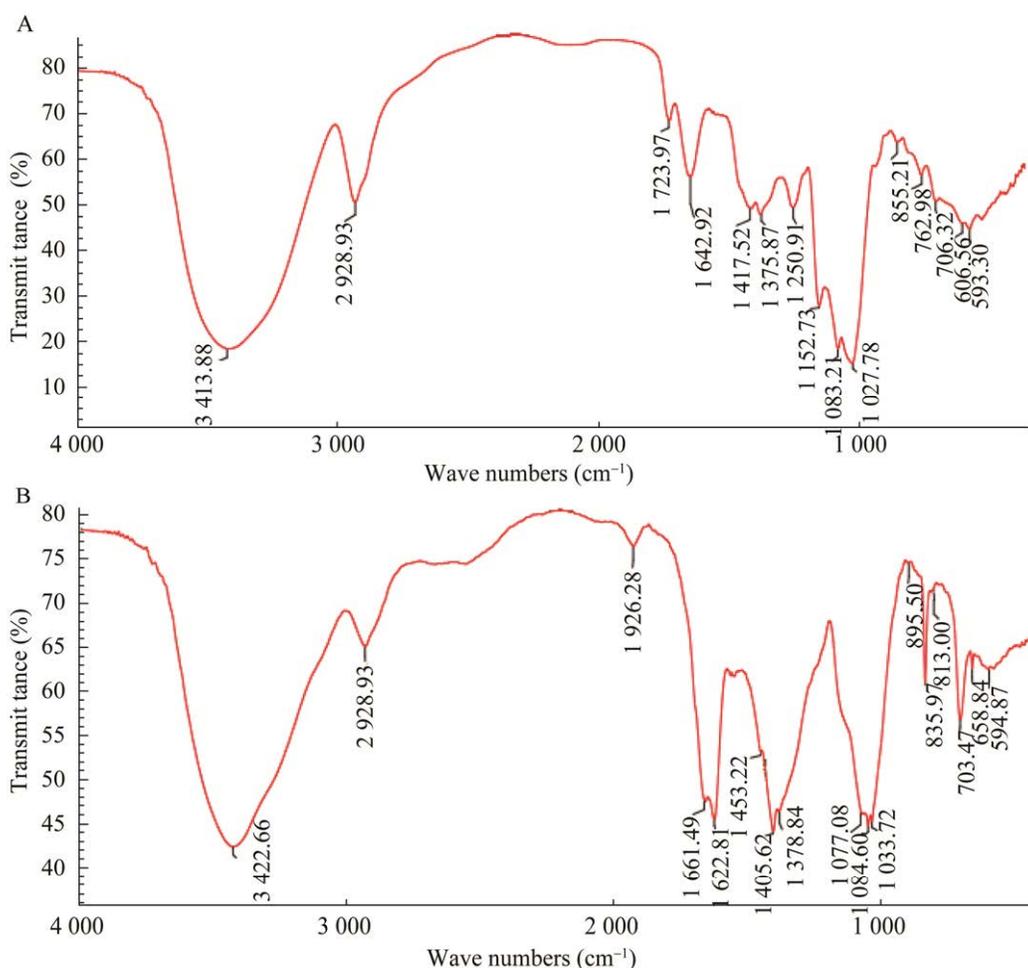


图5 EPS 红外光谱图 A: WPS-807 红外光谱结果; B: SPS-807 红外光谱结果

Figure 5 Infrared spectrum of EPS. A: Infrared spectrum of WPS-807; B: Infrared spectrum of SPS-807.

处出现吡喃环的不对称伸缩振动, 为 β -吡喃糖结构的特征峰, 813.00 cm^{-1} 处出现的吸收峰推测为甘露糖特征峰或 α -D-半乳吡喃糖特征峰, 594.87 cm^{-1} 处出现 β -型 C-H 变角振动吸收峰。

2.3.3 EPS 单糖组分分析

图 6A 为单糖标品液相色谱标准曲线。各单糖组分的出峰顺序及保留时间(retention time, RT)由小到大依次为: 甘露糖(RT=12.863 min), 核糖(RT=16.393 min)、鼠李糖(RT=17.194 min)、葡萄糖醛酸(RT=19.831 min)、半乳糖醛酸(RT=22.956 min)、葡萄糖(RT=26.305 min)、半乳糖(RT=30.005 min)、木糖(RT=31.139 min)、阿拉伯糖(RT=32.726 min)和岩藻糖(RT=37.078 min)。

利用高效液相色谱对 WPS-807 和 SPS-807 进行单糖组成测定的结果如图 6B、6C 所示。中性多糖 WPS-807 由甘露糖(RT=12.926 min)、鼠李糖(RT=17.335 min)、葡萄糖(RT=26.247 min)、半乳糖(RT=30.155 min)和阿拉伯糖(RT=32.992 min)这 5 种单糖组分构成, 其中甘露糖、葡萄糖和半乳糖为 WPS-807 的主要单糖成分, 占多糖含量的 99.28%, 三者摩尔比为 1.00:6.26:1.99。与 WPS-807 相比, 酸性多糖 SPS-807 的单糖组成更加复杂, 共有 8 种单糖组分, 分别为甘露糖(RT=12.953 min)、鼠李糖(RT=17.347 min)、葡萄糖醛酸(RT=20.188 min)、半乳糖醛酸(RT=23.359 min)、葡萄糖(RT=26.512 min)、半乳

糖(RT=30.288 min)、阿拉伯糖(RT=33.044 min)和岩藻糖(RT=37.295 min),其摩尔比为 20.50:1.02:3.71:2.16:2.66:14.17:3.96:1.00,其中甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖为主要的单糖组分,占酸性多糖总糖含量的 78.97%。

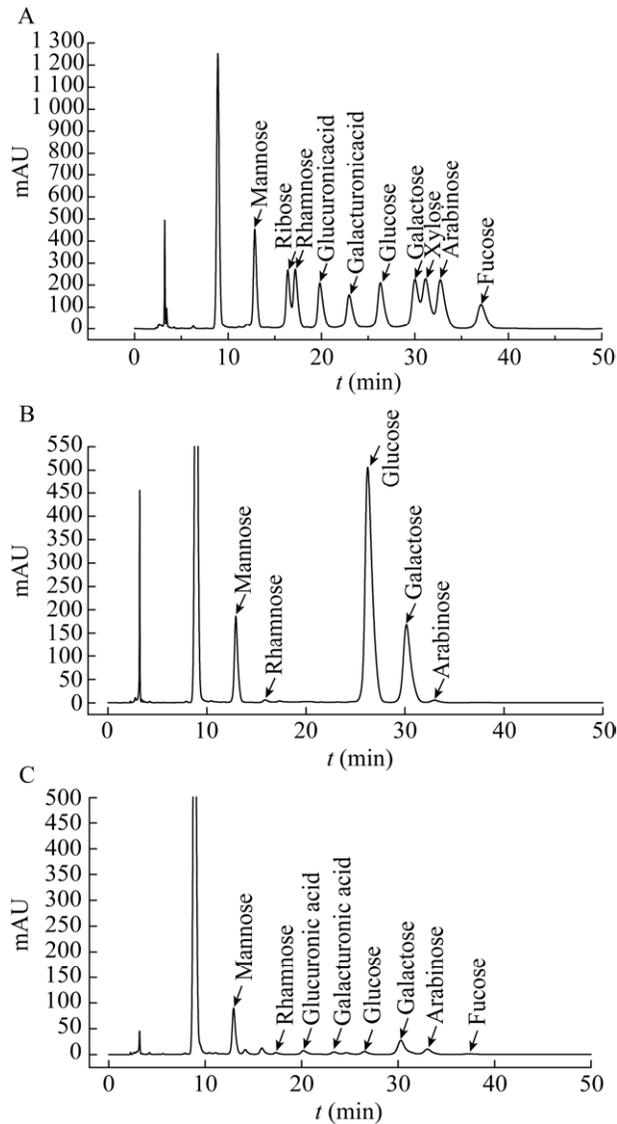


图 6 单糖组分分析 A: 单糖标品液相色谱标准曲线; B: WPS-807 单糖组成结果; C: SPS-807 单糖组成结果

Figure 6 Analysis results of monosaccharide components. A: Curve of monosaccharide standard; B: Monosaccharide composition results of WPS-807; C: Monosaccharide composition results of SPS-807.

2.4 EPS 抗氧化活性的检测

利用粗制 MGB80-7 EPS 测定其清除超氧阴离子、羟自由基、DPPH 自由基的能力,结果如图 7 所示。

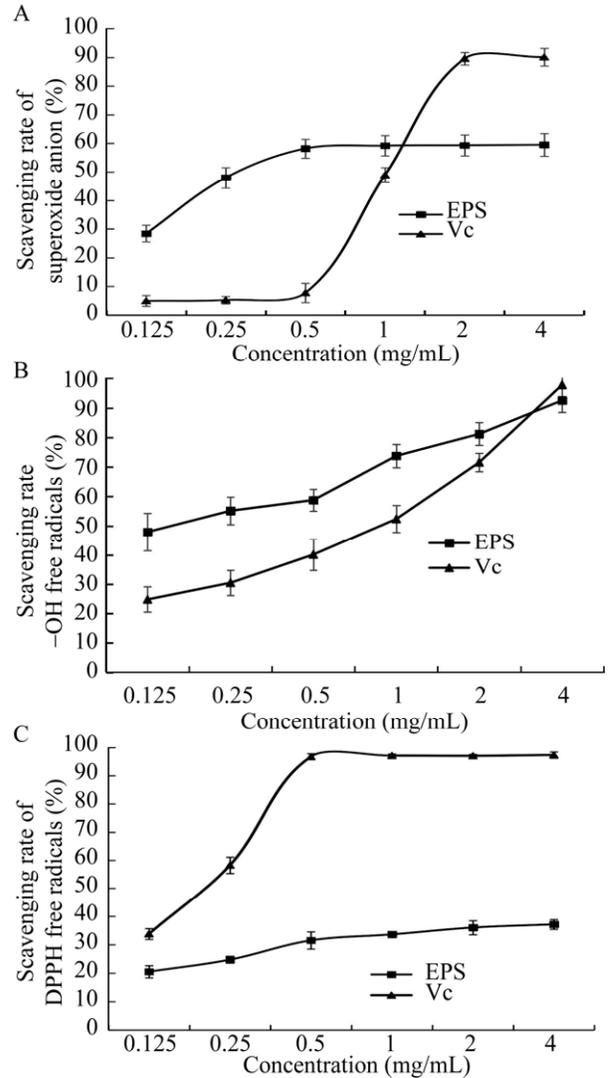


图 7 MGB80-7 所产 EPS 的抗氧化能力 A: EPS 对超氧阴离子的清除能力; B: EPS 对羟自由基的抑制能力; C: EPS 对 DPPH 自由基的清除能力

Figure 7 Antioxidant ability of EPS produced by MGB80-7. A: The scavenging ability of EPS to superoxide anion; B: The scavenging ability of EPS to $\cdot\text{OH}$ free radicals; C: The scavenging ability of EPS to DPPH free radicals.

图 7A 显示 EPS 对超氧阴离子的清除能力随质量浓度增大而上升, 当样品质量浓度增加到 4.000 mg/mL 时, EPS 对超氧阴离子的清除率接近于 60%, 为实验范围内的最高值; 当实验浓度为 0-1 mg/mL 时, EPS 对超氧阴离子的清除能力优于阳性对照, 质量浓度为 1-4 mg/mL 时, EPS 对超氧阴离子的清除效果增幅缓慢, 低于阳性对照。图 7B、7C 分别表示 EPS 对羟自由基、DPPH 自由基的清除能力。图 7B、7C 中 EPS 对羟自由基、DPPH 自由基清除率的变化趋势类似于图 7A, 随着 EPS 质量浓度的增加, EPS 对羟自由基、DPPH 自由基清除能力呈上升趋势, 当 EPS 的质量浓度为 4 mg/mL 时, EPS 对羟自由基的清除率可达到 $92.59\% \pm 4.01\%$, 接近于阳性对照 $97.87\% \pm 5.77\%$, 而对 DPPH 自由基的清除率偏低, 最高仅为 30% 左右。

上述结果表明, EPS 的抗氧化效果与其质量浓度呈正相关, 说明 EPS 有一定的抗氧化能力, 且具有明显的剂量效应。类似的研究成果在国内外已有报道, 如 Bomfim 等^[23]报道 *L. plantarum* 所产的 2 种 EPS 的抗氧化能力会随质量浓度增大而增强, 卢承蓉等^[24]报道了分离自甜橙、柚子发酵液中的乳酸菌 L15 及其诱变株所产的 EPS 的抗氧化活性均与 EPS 的浓度呈正相关, 呈现一定的浓度依赖性。

3 讨论

随着居民生活水平的提高, 人们对于食品的需求已不再局限于简单的营养补充, 开始向益生功能的方向靠拢。很久以来, 乳酸菌作为一类公认安全的细菌(General Regard as Safety, GRAS)已被广泛应用于食品发酵工业中。EPS 作为乳酸菌的次级代谢产物, 因其可以作为稳定剂、增稠剂和抗氧化剂等提高产品的感官特性、营养价值及货架期, 在食品行业中受到广

泛的关注^[25-26]。

乳酸菌 EPS 结构复杂, 其中一些单糖组分, 如甘露糖、鼠李糖、葡萄糖等和 EPS 的抗氧化能力密切相关^[27]。商佳琦等^[28]研究发现, 甘露糖的含量可影响 EPS 对羟自由基的抑制效果, Meng 等^[29]的研究结果也证实了这一观点。本实验获得的 2 种纯多糖组分(WPS-807、SPS-807)中均含有甘露糖且含量较高, 因此, 我们认为 MGB80-7 所产 EPS 可能对羟自由基有较好的清除效果。为验证这一想法, 我们采用羟自由基测试试剂盒测定 MGB80-7 EPS 对羟自由基的清除率, 结果发现一定质量浓度的 EPS (4.000 mg/mL) 对羟自由基的清除率较高, 达到 $92.59\% \pm 4.01\%$, 接近于阳性对照, 说明 EPS 中的甘露糖可能是影响 EPS 对羟自由基清除率的原因之一。有研究发现, 葡萄糖对 DPPH 自由基的清除效果不明显, 甚至会抑制 EPS 对 DPPH 的清除能力^[27,29]。在抗氧化实验中, MGB80-7 EPS 对 DPPH 自由基的清除率偏低, 最高仅为 30% 左右, 而在中性多糖 WPS-807 中葡萄糖为优势组分, 且含量较高, 这也许可以为 MGB80-7 所产 EPS 清除 DPPH 自由基的能力做出合理解释。李小蓉等^[30]发现鼠李糖的含量越高, 海带中岩藻多糖的抗衰老效果越强。然而在 WPS-807 和 SPS-807 中均含有鼠李糖, 推测 MGB80-7 EPS 中的鼠李糖可能影响 EPS 的抗氧化能力。

有研究指出, 乳酸菌 EPS 的分子量是影响多糖抗氧化能力的重要因素之一^[31]。艾于杰^[32]研究发现具有抗氧化活性的 TPS 最佳分子量在 $500-1.358 \times 10^5$ Da 之间, 而黄承敏等^[33]认为具有抗氧化活性的乳酸菌 EPS 最佳分子量范围在 $1 \times 10^4-1 \times 10^6$ Da 之间, 本实验中 WPS-807 和 SPS-807 的分子量分别为 1.028×10^5 Da 和 8.601×10^4 Da, 均在 $1 \times 10^4-1 \times 10^6$ Da 之间, 说明 *S. thermophilus* MGB80-7 EPS 的分子量对其抗

氧化能力可能也具有一定的影响。

乳酸菌 EPS 的中性和酸性纯化组分的抗氧化能力有一定差异。杨晨璐等^[34]通过对分离自鲜辣椒中的 *L. plantarum* 所产的 EPS 进行研究,发现酸性多糖 EPS-2 的抗氧化能力明显强于中性多糖 EPS-1 和粗多糖;商飞飞等^[35]分析山楂中提取的多糖后发现相较于中性多糖,酸性多糖的抗氧化能力明显较高,此外,Zhao 等^[36]的研究中也发现糖醛酸的含量可以显著影响多糖的抗氧化能力。本实验中仅初步探讨了 *S. thermophilus* MGB80-7 胞外多糖的表型结构及其抗氧化活性之间可能存在的关系,后续将继续对纯化后的 WPS-807 和 SPS-807 的抗氧化能力进行检测,探讨 EPS 不同纯化组分抗氧化能力的差异,为乳酸菌 EPS 的应用研究提供理论依据。

4 结论

(1) *S. thermophilus* MGB80-7 在 M17 培养基中所产 EPS 含量较高,为(268.25±5.36) mg/mL。

(2) MGB80-7 所产 EPS 主要由中性多糖(WPS-807)和酸性多糖(SPS-807)构成,2 种多糖组分中存在 O-H、C-H、糖吡喃环等 EPS 常见结构,其中中性多糖(WPS-807)分子量为 1.028×10^5 Da,主要由葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成,并含有少量的鼠李糖和阿拉伯糖,酸性多糖(SPS-807)分子量为 8.601×10^4 Da,单糖组分相较于 WPS-807 更为复杂,主要由甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖组成。

(3) MGB80-7 所产 EPS 对 DPPH、羟自由基、超氧阴离子等的清除效果较好,尤其是对羟自由基的清除效果作用明显,实验范围内可达到 92.59%,接近于同浓度下 Vc 的抗氧化能力。

REFERENCES

[1] 王月娇,郭帅,韩之皓,黄天,孙浩天,刘凯龙,王记

成,孙天松,张和平. 基于微流变技术研究不同嗜热链球菌对发酵乳凝胶化的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 203-208

Wang YJ, Guo S, Han ZH, Huang T, Sun HT, Liu KL, Wang JC, Sun TS, Zhang HP. Effect of different *Streptococcus thermophilus* strains on gelation process during milk fermentation based on rheological technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 203-208 (in Chinese)

[2] 田辉,梁宏彰,霍贵成,Evivie Smith Etareri. 嗜热链球菌的特性与应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 38-48

Tian H, Liang HZ, Huo GC, Etareri ES. Research progress on the property and application of *Streptococcus thermophilus*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 38-48 (in Chinese)

[3] Zhang L, Mi S, Liu RB, Sang YX, Wang XH. Evaluation of volatile compounds in milks fermented using traditional starter cultures and probiotics based on odor activity value and chemometric techniques[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2020, 25(5): 1129

[4] 白梅,黄天,郭帅,王月娇,韩之皓,李敏,王记成,孟和毕力格. 益生菌干酪乳杆菌 Zhang 和乳双歧杆菌 V9 发酵乳胞外多糖含量对流变学特性、质构和稳定性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 193-202

Bai M, Huang T, Guo S, Wang YJ, Han ZH, Li M, Wang JC, Menghebilige. Effects of extracellular polysaccharide in yogurt produced by the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* Zhang and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 on rheological properties, texture and stability[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 193-202 (in Chinese)

[5] Madhubasani GBL, Prasanna PHP, Chandrasekara A, Gunasekara DCS, Senadeera P, Chandramali DVP, Vidanarachchi JK. Exopolysaccharide producing starter cultures positively influence on microbiological, physicochemical, and sensory properties of probiotic goats' milk set-yoghurt[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(3): 1-8

[6] Che HQ, Zhang H, Tian YJ, Lai PFH, Xia YJ, Wang SJ, Ai LZ. Exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* as stabilizer in fermented dairy: binding kinetics and interactions with casein of milk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 1018-1025

[7] Shingel KI. Current knowledge on biosynthesis,

- biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(3): 447-460
- [8] 于建兴, 韦小雯, 顾青. 乳酸菌胞外多糖及其抗氧化活性研究[A]//中国食品科学技术学会. 第十六届益生菌与健康国际研讨会摘要集[C]. 中国食品科学技术学会: 中国食品科学技术学会, 2021: 2
Yu JX, Wei XW, Gu Q. Study on the exopolysaccharide of lactic acid bacteria and its antioxidant activity [A]//Chinese Society of Food Science and Technology. Abstracts of the 16th International Symposium on Probiotics and Health[C]. Chinese Society for Food Science and Technology: Chinese Society for Food Science and Technology, 2021: 2 (in Chinese)
- [9] Chen Y, Zhang M, Ren FZ. A role of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* in the intestinal inflammation and mucosal barrier in caco-2 monolayer and dextran sulphate sodium-induced experimental murine colitis[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2019, 24(3): 513
- [10] Sun NX, Liu HP, Liu SJ, Zhang XY, Chen P, Li WH, Xu XX, Tian WT. Purification, preliminary structure and antitumor activity of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CH₉[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2018, 23(11): 2898
- [11] 张钊瑞, 张晨, 李大鹏. 微生物多糖的结构与应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(1): 182-192
Zhang ZR, Zhang C, Li DP. Advances in structure and application of microbial polysaccharides[J]. Food Research and Development, 2021, 42(1): 182-192 (in Chinese)
- [12] Ng IS, Xue CF. Enhanced exopolysaccharide production and biological activity of *Lactobacillus rhamnosus* ZY with calcium and hydrogen peroxide[J]. Process Biochemistry, 2017, 52: 295-304
- [13] You X, Yang L, Zhao XJ, Ma K, Chen XH, Zhang CL, Wang GX, Dong MS, Rui X, Zhang QQ, et al. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 408-419
- [14] 颜准, 吴朝君, 张小兰, 李婉麒, 梁娟, 陈紫颖, 艾连中, 张江. 动物双歧杆菌乳亚种 M8 胞外多糖的分离纯化和分子特征[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 33-39
Yan Z, Wu CJ, Zhang XL, Li WQ, Liang J, Chen ZY, Ai LZ, Zhang H. Isolation, purification and molecular characteristics of exopolysaccharide of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* M8[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(2): 33-39 (in Chinese)
- [15] Zhou Y, Cui YH, Qu XJ. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: a review[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 207: 317-332
- [16] 陈海燕, 李嘉雯, 李婷, 刘洋, 田佳乐, 丹彤. 高产胞外多糖嗜热链球菌的筛选及胞外多糖的结构分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 286-294
Chen HY, Li JW, Li T, Liu Y, Tian JL, Dan T. Selection of *Streptococcus thermophilus* for high extracellular polysaccharide production and structural analysis of extracellular polysaccharide[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 286-294 (in Chinese)
- [17] 张青, 张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技, 2004, 6(7): 17-18
Zhang Q, Zhang TM. Phenol-sulfuric acid colorimetric method for determination of polysaccharide content[J]. Food and Drug, 2004, 6(7): 17-18 (in Chinese)
- [18] 刘鑫. 粗毛纤孔菌胞外多糖对酒精肝损伤保护作用及其液体发酵条件优化[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2019
Liu X. Protective effect of exo-polysaccharides from *Inonotus hispidus* on alcoholic liver injury and its liquid fermentation optimization[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2019 (in Chinese)
- [19] 刘海韵, 王维民, 谌素华, 吕佳桐, 陈华英, 廖森泰. 马尾藻岩藻聚糖分离纯化及其对小鼠黑尾血栓的效果[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 91-97
Liu HY, Wang WM, Chen SH, Lü JT, Chen HY, Liao ST. Isolation and purification of fucoidans from *Sargassum* and their effect on tail thrombosis in mice[J]. Food Science, 2020, 41(9): 91-97 (in Chinese)
- [20] 刘逸凡, 蔡国林, 李晓敏, 陆健. 丁酸梭菌的筛选及其胞外多糖抗氧化性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 25-30
Liu YF, Cai GL, Li XM, Lu J. Screening and identification of *Clostridium butyricum* and antioxidant activities of its exopolysaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(5): 25-30 (in Chinese)
- [21] 叶明, 李世艳, 张利兵, 蒋艳, 庄文颖. 盘针孢菌发酵及其胞外多糖抗氧化活性[J]. 微生物学报, 2008, 48(10): 1398-1402
Ye M, Li SY, Zhang LB, Jiang Y, Zhuang WY. Fermentation and polysaccharide antioxidative activity of a *Libertella* strain[J]. Acta Microbiologica Sinica,

- 2008, 48(10): 1398-1402 (in Chinese)
- [22] 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: 内蒙古大学硕士学位论文, 2018
- Wang ZR. Optimization and structure identification of extracellular polysaccharide from *Inonotus obliquus* based on α -glucosidase inhibitory rate[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2018 (in Chinese)
- [23] Bomfim VB, Pereira Lopes Neto JH, Leite KS, De Andrade Vieira É, Iacomini M, Silva CM, Olbrich Dos Santos KM, Cardarelli HR. Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003[J]. LWT, 2020, 127: 109349
- [24] 卢承蓉, 叶美芝, 上官文丹, 陈松, 钟青萍. 高产胞外多糖乳酸菌的诱变育种及其益生特性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(12): 14-20
- Lu CR, Ye MZ, Shangguan WD, Chen S, Zhong QP. Mutation breeding for high-yield exopolysaccharide lactic acid bacteria and evaluation of its probiotic properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(12): 14-20 (in Chinese)
- [25] Min WH, Fang XB, Wu T, Fang L, Liu CL, Wang J. Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 127(6): 758-766
- [26] Wang X, Shao CG, Liu L, Guo X, Xu YM, Lü X. Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 103: 1173-1184
- [27] 倪力军, 王媛媛, 何婉瑛, 张立国. 8 种多糖的单糖组成、活性及其相关性分析[J]. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2014, 47(4): 326-330
- Ni LJ, Wang YY, He WY, Zhang LG. Monosaccharide composition, activity and their correlation analysis in eight polysaccharides[J]. Journal of Tianjin University: Science and Technology, 2014, 47(4): 326-330 (in Chinese)
- [28] 商佳琦, 邹丹阳, 滕翔宇, 范荣, 付玲, 李雪晴, 刘宁, 邵美丽. 5 种食用菌多糖的结构特征及抗氧化活性对比[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 77-83, 89
- Shang JQ, Zou DY, Teng XY, Fan R, Fu L, Li XQ, Liu N, Shao ML. Structural characterization and antioxidant activity of five kinds of edible fungus polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 77-83, 89 (in Chinese)
- [29] Meng L, Sun SS, Li R, Shen ZP, Wang P, Jiang XL. Antioxidant activity of polysaccharides produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 452-457
- [30] 李小蓉, 张拴. 海带中岩藻多糖的抗衰老活性及构效关系研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 117-121
- Li XR, Zhang S. Study on the effect of anti-aging and structure-function relationship of fucoidan from kelp[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(15): 117-121 (in Chinese)
- [31] Guo YX, Pan DD, Sun YY, Xin LY, Li H, Zeng XQ. Antioxidant activity of phosphorylated exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(2): 849-854
- [32] 艾于杰. 抗氧化活性茶多糖构效关系研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019
- Ai YJ. Study on the structure-activity relationship of antioxidant tea polysaccharides[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [33] 黄承敏, 陈绮, 游善兵, 姚慧, 肖茜, 刘成国, 周辉. 乳酸菌胞外多糖的分类及生物活性研究进展[J]. 中国乳业, 2019(9): 59-62
- Huang CM, Chen Q, You SB, Yao H, Xiao Q, Liu CG, Zhou H. Research progress on classification and biological activity of exopolysaccharides of lactic acid bacteria[J]. China Dairy, 2019(9): 59-62 (in Chinese)
- [34] 杨晨璐, 马林, 周蕊, 饶晴, 邱朝坤, 凌洁玉. 植物乳杆菌胞外多糖的分离纯化及其抗氧化性研究[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(5): 9-13
- Yang CL, Ma L, Zhou R, Rao Q, Qiu CK, Ling JY. Purification and antioxidant activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum*[J]. China Dairy Industry, 2018, 46(5): 9-13 (in Chinese)
- [35] 商飞飞, 祝儒刚, 张鑫雨, 王宇, 王超. 山楂多糖的分离纯化及抗氧化和抗糖化活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 96-101, 303
- Shang FF, Zhu RG, Zhang XY, Wang Y, Wang C. Extraction, isolation and purification of haw polysaccharide and its antioxidant and antiglycation activities *in vitro*[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(9): 96-101, 303 (in Chinese)
- [36] Zhao CC, Li X, Miao J, Jing SS, Li XJ, Huang LQ, Gao WY. The effect of different extraction techniques on property and bioactivity of polysaccharides from *Dioscorea hemsleyi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102: 847-856