

空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 产胞外多糖 发酵条件优化及抗氧化活性研究

李 兵¹, 杨飞宇¹, 张红星¹, 谢远红¹, 刘 慧^{1*}, 郝红炜²

¹北京农学院食品科学与工程学院 微生态制剂关键技术开发北京市工程实验室; 食品质量与安全北京实验室;
农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室, 北京 102206;
²富乐顿生物工程科技(北京)有限公司, 北京 100022

摘要: 试验对空间诱变的植物乳杆菌 SS18-119 产胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)的发酵条件进行优化并研究该菌株所产 EPS 的抗氧化活性。通过单因素多水平试验及正交试验优化 SS18-119 菌株合成 EPS 最佳发酵条件为培养基起始 pH 7.0、发酵温度 37 °C、发酵时间 20 h、接种量 3%, 在此条件下 EPS 产量为 2.24 g/L, 比优化前提高了 1.19 倍。检测该发酵条件下不同质量浓度 EPS 对 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基清除率和 Fe²⁺ 螯合能力及总还原能力。结果表明: EPS 浓度为 2 mg/mL 时, DPPH 清除率为 85.6%; EPS 浓度为 10 mg/mL 时, 超氧阴离子自由基清除率为 79.0%、Fe²⁺ 螯合能力为 36.3%、总还原能力吸光度值为 0.5603。由此显示经过太空诱变的植物乳杆菌 SS18-119 在优化发酵条件下能够高产 EPS, 且其所产 EPS 具有较强的抗氧化活性, 为其开发抗氧化功能食品提供实践依据。

关键词: 空间诱变; 植物乳杆菌; 胞外多糖; 抗氧化活性

中图分类号: Q93-335

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)Suppl-0007-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.002

Optimization of fermentation conditions and antioxidant activity of exopolysaccharide produced by space-mutated *Lactobacillus plantarum* SS18-119

LI Bing¹, YANG Fei-yu¹, ZHANG Hong-xing¹, XIE Yuan-hong¹, LIU Hui^{1*}, HAO Hong-wei²

¹Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture; Beijing Engineering Laboratory of Probiotics Key Technology Development; Beijing Laboratory of Food Quality and Safety; Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control for Spoilage Organisms and Pesticides, Beijing 102206, China;

²Fullerton Bioengineering Technology Co., Ltd., Beijing 100022, China

Abstract: This study aimed to optimise the conditions for fermentation of exopolysaccharide (EPS) produced by a space-induced *Lactobacillus plantarum* SS18-119, and further aimed to investigate the antioxidant activity of EPS produced by this strain. Using a single-factor, multi-level trial and an orthogonal test, the conditions for fermentation of EPS produced by the strain SS18-119 were optimised as follows: initial pH of the medium 7.0; fermentation temperature 37 °C; fermentation time 20 h; inoculation amount 3%. Under these conditions, the yield of EPS was 2.24 g/L, which was 1.19 times higher than that before optimisation. The scavenging rates of DPPH and superoxide anion radicals, Fe²⁺ chelating capacity, and overall reducing power of EPS at different mass concentrations were analysed under these fermentation conditions. The results showed that when the concentration of EPS was 2 mg/mL, the scavenging rate of DPPH radicals was 85.6%. At 10 mg/mL EPS, the scavenging rate of superoxide anion radicals was 79.0%, Fe²⁺ chelating capacity was 36.3%, and absorbance value of overall reducing power was 0.5603. The results demonstrate that the space-induced *L. plantarum* SS18-119 can produce EPS at high levels under optimised fermentation conditions, and the produced EPS have strong antioxidant activity, providing a practical

收稿日期: 2020-07-20

接受日期: 2020-10-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31201310); 北京市属高等学校高层次人才引进与培养项目(CIT&TCD20140315)

* 通讯作者 Tel: 86-013683640697; E-mail: mxdlh1963@163.com

basis for the development of foods with antioxidant function.

Key words: space mutagenesis; *Lactobacillus plantarum*; exopolysaccharide; antioxidant activity

乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是乳酸菌在亚优化生长条件下,为抵抗不良环境因素分泌于细胞表面的黏液多糖或荚膜多糖,是一种重要的次级代谢产物,分子量在 $4.0 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^6$ Da之间^[1,2]。许多研究表明, EPS 具有免疫调节、抗脂质过氧化、抗肿瘤、降低血清胆固醇和甘油三酯水平,以及抑制脂肪肝形成等多种生理功能^[3,7]。此外, EPS 常被作为增稠剂、凝胶剂、稳定剂和乳化剂等应用于食品中^[8]。EPS 的合成除与微生物自身的遗传特性相关外,环境因素对其合成亦有重要影响,如培养基成分(碳源、氮源、刺激生长因子和无机盐等)、培养基初始 pH 值、发酵温度、发酵时间和接种量等^[9]。目前国内外学者对空间微生物的研究主要集中在空间病原菌、空间腐蚀菌和微生物制药方面,而空间食品微生物工程菌的研究处于空白状态。本文利用天宫 2 号和神舟 11 号宇宙飞船搭载返回地面经太空诱变后的植物乳杆菌,以地面原始的植物乳杆菌做对照,选育出发生正向突变的高产 EPS 的菌株,再利用遗传稳定且产 EPS 较高的空间诱变植物乳杆菌 SS18-119,研究提高合成胞外多糖产量的环境因素,优化其所产 EPS 的发酵条件,并检测在优化发酵条件下所产 EPS 的抗氧化活性,为 EPS 在提高生物抗氧化活性功能食品中的应用提供实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株

空间诱变植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) SS18-119 菌株,经太空环境诱变的植物乳杆菌中筛选与鉴定,确定为高产胞外多糖菌株,保藏于富乐顿生物工程科技(北京)有限公司航天微生物菌种库。

1.1.2 主要试剂

10% 三氯乙酸、95% 乙醇、6% 苯酚、浓硫酸、DPPH、Tris-盐酸、邻苯三酚、铁氰化钾、氯化铁、氯化亚铁和菲啰啉等。

1.1.3 培养基

MRS 培养基^[10]。

1.1.4 仪器与设备

CR3i 冷冻离心机(美国 Thermo 公司);真空冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司);SHT-II 型数显搅

拌恒温电热套(上海帅登仪器有限公司);UV-2600 型紫外分光光度计(美国 UNICO 公司);Biofuge stratos 型大容量台式冷冻离心机(美国热电公司);MLS-3750 型全自动高压蒸汽灭菌锅(日本 SANYO 公司);BCN-1360B 型无菌超净工作台(哈尔滨东联公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化

将保藏于-80 ℃甘油管中的空间诱变植物乳杆菌 SS18-119,以接种量为 2% (体积百分数)移种于 10 mL MRS 培养基试管中,37 ℃培养至菌液混浊,连续培养两代,冷藏备用。

1.2.2 培养基起始 pH 对 EPS 产量的影响

在发酵剂接种量为 2%、发酵温度为 37 ℃、发酵时间为 14 h 的前提下,设计 MRS 培养基的起始 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5,分别进行 SS18-119 菌株产 EPS 的发酵试验,提取并测定发酵液中 EPS 含量,以此确定合成 EPS 的适宜培养基起始 pH。

1.2.3 发酵温度对 EPS 产量的影响

在确定培养基起始 pH 试验结果基础上,于发酵剂接种量为 2%、发酵时间为 14 h 的前提下,设计发酵温度为 31、34、37、40、43 ℃,分别进行 SS18-119 菌株产 EPS 的发酵试验,提取并测定发酵液中 EPS 含量,以此确定合成 EPS 的适宜发酵温度。

1.2.4 发酵时间对 EPS 产量的影响

在确定培养基起始 pH、发酵温度试验结果基础上,于发酵剂接种量为 2%、设计发酵时间为 12、14、16、18、20 h,分别进行 SS18-119 菌株产 EPS 的发酵试验,提取并测定发酵液中 EPS 含量,以此确定合成 EPS 的适宜发酵时间。

1.2.5 发酵接种量对 EPS 产量的影响

在确定培养基起始 pH、发酵温度、发酵时间试验结果基础上,设计发酵接种量为 1%、2%、3%、4%、5%、分别进行 SS18-119 菌株产 EPS 的发酵试验,提取并测定发酵液中 EPS 含量,以此确定合成 EPS 的适宜发酵接种量。

1.2.6 菌株 SS18-119 产 EPS 发酵条件的优化

根据上述单因素多水平试验结果,设计培养基起始 pH、发酵温度、发酵时间、接种量四因素三水平

[$L_9(3^4)$] 正交试验(见表1), 每组3次重复, 以发酵液中 EPS 含量为试验指标, 通过对结果的极差分析

和 K 值分析确定菌株 SS18-119 较优的高产 EPS 的发酵条件。

表1 正交试验设计因素水平

Table 1 Factors and levels in orthogonal test design

水平 Level	A 培养基起始 pH Initial medium pH	B 发酵温度 Fermentation temperature(°C)	C 发酵时间 Fermentation time (h)	D 接种量 Inoculum size(%)
1	6.5	31	16	2
2	7.0	34	18	3
3	7.5	37	20	4

1.2.7 验证试验

以正交试验优化后的发酵条件为验证组, 以培养基起始 pH 6.5、发酵温度 37 °C、发酵时间 14 h、接种量 2% 的发酵条件作为对照组, 分别测定验证组和对照组发酵液中 EPS 的含量, 以此比较菌株 SS18-119 合成 EPS 最佳发酵条件的优越性。

1.2.8 发酵液中 EPS 含量的测定方法

发酵液中 EPS 的提取和测定方法(苯酚-硫酸法), 以及葡萄糖标准曲线的制作方法见参考文献^[11]。根据葡萄糖标准曲线得到回归方程: $y = 0.5985x + 0.0223 (R^2 = 0.9991)$, 采用苯酚-硫酸法测定发酵液中 EPS 的吸光度值($A_{490\text{nm}}$), 再根据上述回归方程换算成多糖含量 x (g/L)。

1.2.9 SS18-119 菌株 EPS 对 DPPH 清除能力

参考 Yang^[12] 的方法, 以无水乙醇配制 0.01 mmol/L 的 DPPH 溶液, 分别取 2 mL 不同浓度的 EPS 溶液(将 EPS 粗品以去离子水配制成浓度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL 的 EPS 溶液), 向每种浓度的 EPS 溶液中加入 DPPH 溶液 2 mL, 混匀后暗反应 30 min, 以无水乙醇作为参比液调零, 测定波长为 517 nm 处的吸光度值($A_{517\text{nm}}$), 试验中每个浓度平行做 3 次, 取其平均值, 按以下公式计算 DPPH 清除率。

$$\text{DPPH 清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_i 为 EPS 溶液 + DPPH 乙醇溶液吸光度; A_j 为 EPS 溶液 + 无水乙醇吸光度; A_0 为 DPPH 乙醇溶液 + 蒸馏水吸光度。

1.2.10 SS18-119 菌株 EPS 对超氧阴离子自由基清除能力

在试管中分别加入 1 mL 不同浓度的 EPS 溶液(将 EPS 粗品以去离子水配制成浓度为 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的溶液), 按照下述方法测定不同 EPS 浓

度下的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力: 向 1 mL EPS 溶液中加入 pH 8.2、0.05 mol/L 的 Tris-盐酸缓冲液, 于 25 °C 水浴保温 10 min, 然后再向反应体系中加入同样预温热处理的 30 mmol/L 的邻苯三酚水溶液 12 μ L, 混匀后精确反应 4 min, 以 0.5 mL 浓盐酸终止反应, 以 Tris-盐酸缓冲液作为空白对照调零, 测定波长在 320 nm 处的吸光度值($A_{320\text{nm}}$), 试验中每个浓度平行做 3 次, 取其平均值, 按以下公式计算超氧阴离子自由基清除率。

$$\text{超氧阴离子清除率} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_i 为反应体系(Tris-盐酸 + 邻苯三酚)加入 EPS 溶液后的吸光度; A_j 为 EPS 溶液的吸光度; A_0 为反应体系(Tris-盐酸 + 邻苯三酚)的吸光度。

1.2.11 SS18-119 菌株 EPS 对 Fe^{2+} 螯合能力

分别取 3 mL 不同浓度的 EPS 溶液(将 EPS 粗品以去离子水配制成浓度为 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的溶液), 按照下述方法测定不同 EPS 浓度下的 Fe^{2+} 螯合的能力: 向 3 mL EPS 溶液中加入 0.05 mL 的 2 mmol/L 氯化亚铁溶液和 0.2 mL 的 5 mmol/L 菲啰啉水溶液, 经振荡混匀后室温静置 10 min, 以蒸馏水作为空白对照调 0, 测定波长在 562 nm 处的吸光度值($A_{562\text{nm}}$), 试验中每个浓度平行做 3 次, 取其平均值, 按以下公式计算 Fe^{2+} 螯合能力。

$$Fe^{2+} \text{ 螯合能力} = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_0 为对照组的吸光度(使用蒸馏水替代样品); A_i 为样品的吸光度; A_j 为空白的吸光度(使用蒸馏水替代氯化亚铁溶液)。

1.2.12 SS18-119 菌株 EPS 的总还原能力

参考 Zhang^[13] 的方法, 分别取 1 mL 不同浓度的 EPS 溶液(将 EPS 粗品以去离子水配制成浓度为 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的溶液), 按照下述方法测定不

同 EPS 浓度下的总还原能力;向 1 mL EPS 溶液中加入 2.5 mL 0.2 mol/L pH 为 6.6 的磷酸缓冲液和 2.5 mL 质量分数为 1% 铁氰化钾溶液,混匀后 50 °C 水浴保温 20 min,经流水冷却后,再加入质量分数为 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL,得到混合液;将混合液以 3 000 rpm 离心 10 min 后取上清液 2.5 mL,向 2.5 mL 上清液中加入 2.5 mL 蒸馏水和 2.5 mL 质量分数为 0.1% 氯化铁溶液,混匀后室温下静置 10 min,以蒸馏水作为无还原能力的样品对照调零,测定波长在 700 nm 处吸光度值 ($A_{700\text{ nm}}$),试验中每个浓度平行做 3 次,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 SS18-119 菌株产 EPS 发酵条件的优化

2.1.1 培养基起始 pH 的确定

培养基的起始 pH 对菌体的生长繁殖及合成 EPS 的产量有较大影响。当培养基的 pH 较低时,一方面乳酸菌在生长繁殖过程中产生的酶类会降解已经合成的 EPS^[14],另一方面会降低参与合成 EPS 的异戊二烯脂质载体中间体活性而减缓 EPS 的合成速度^[15];当 pH 较高时,不仅会影响菌体生长繁殖,而且可降低 EPS 的积累。研究表明,培养基 pH 在接近中性及弱酸性时,有利于合成 EPS,缘于培养基的 pH 通过影响各种酶的活性,从而影响菌体的新陈代谢^[16]。由图 1 可知,培养基的 pH 为 7.0 时, EPS 产量最高,这是由于此时参与合成 EPS 的异戊二烯脂质载体活力最高,故确定 SS18-119 菌株高产 EPS 的发酵培养基起始 pH 为 7.0。

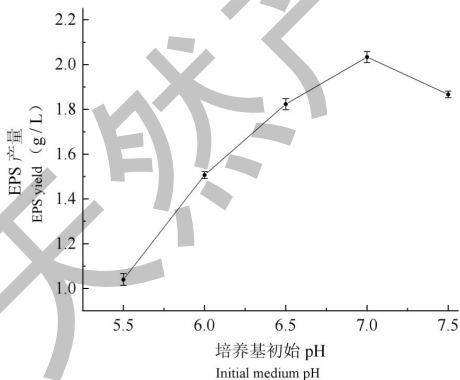


图 1 培养基不同 pH 对菌株 SS18-119 合成 EPS 的影响

Fig. 1 Effect of different pH of culture medium on the synthesis of EPS by strain SS18-119

2.1.2 发酵温度的确定

发酵温度是影响菌体生长繁殖与 EPS 合成的重要因素。当发酵温度较低时,菌体生长速度减缓,

细胞壁合成速度亦减慢,从而使更多的异戊二烯脂质载体中间体用于合成 EPS^[17];当发酵温度较高时,菌体生长速度较快,发酵后期更易衰老自溶,同时温度较高还会使异戊二烯脂质载体失活,降低 EPS 的产量。由图 2 可知,发酵温度为 34 °C 时, EPS 产量最高,故确定 SS18-119 菌株高产 EPS 的发酵温度为 34 °C。

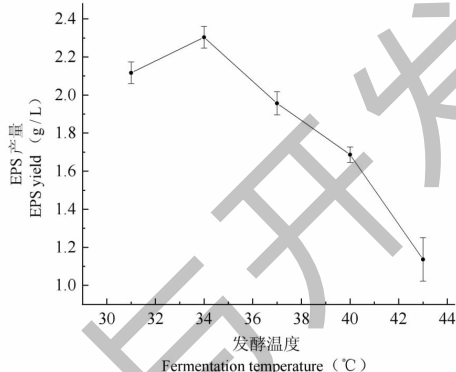


图 2 不同发酵温度对菌株 SS18-119 合成 EPS 的影响

Fig. 2 Effect of different fermentation temperatures on EPS synthesis by strain SS18-119

2.1.3 发酵时间的确定

发酵时间对 EPS 的产量影响亦较大。乳酸菌合成 EPS 主要在对数生长期的末期和稳定期,因而适当延长发酵时间有利于积累 EPS。当发酵时间较短时,菌体可以充分利用营养物质生长繁殖,但不利于 EPS 的合成;当发酵时间较长时,菌体会产生降解多糖的酶类,且容易衰老自溶。由图 3 可知,发酵时间为 18 h 时, EPS 产量最高,故确定 SS18-119 菌株高产 EPS 的发酵时间为 18 h。

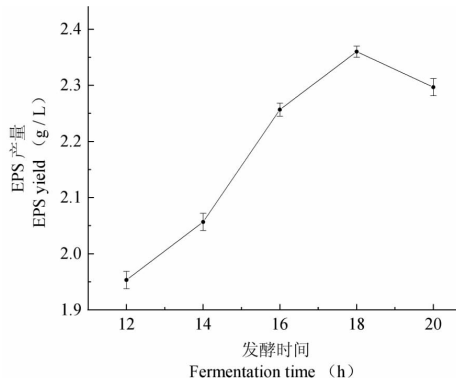


图 3 不同发酵时间对菌株 SS18-119 合成 EPS 的影响

Fig. 3 Effect of different fermentation time on the synthesis of EPS by strain SS18-119

2.1.4 发酵接种量的确定

接种量的多少会影响菌体生长速度和菌体浓

度。适宜的接种量有利于菌体在保证自身生长的同时增加 EPS 的产量。当接种量较少时,菌体浓度较低,大量营养物质被用于菌体生长繁殖,不利于 EPS

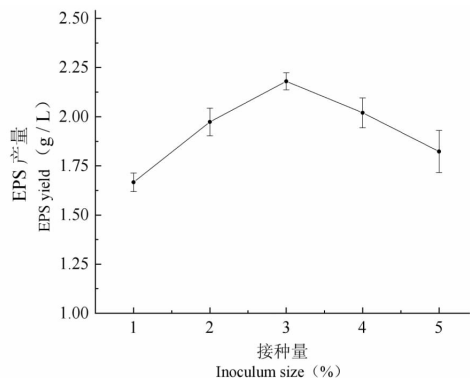


图4 不同接种量对菌株 SS18-119 合成 EPS 的影响

Fig. 4 Effect of different inoculation doses on the synthesis of EPS by strain SS18-119

的合成;接种量较高时,菌体快速利用营养物质大量繁殖,发酵后期会因营养物质不足导致菌体消亡,而减少 EPS 的产量。由图 4 可知,接种量为 3% 时, EPS 产量最高,故确定 SS18-119 菌株高产 EPS 的接种量为 3%。

2.1.5 正交试验优化 SS18-119 菌株产 EPS 发酵条件

由表 2 可见,根据正交试验极差分析 $R_B > R_A > R_D > R_C$ 可知,不同发酵条件对菌株 SS18-119 合成 EPS 的影响顺序为:发酵温度 > 发酵培养基起始 pH > 接种量 > 发酵时间;根据正交试验 K 值分析 $K_{A2} > K_{A3} > K_{A1}$ 、 $K_{B3} > K_{B2} > K_{B1}$ 、 $K_{C3} > K_{C2} > K_{C1}$ 、 $K_{D2} > K_{D3} > K_{D1}$ 可知,菌株 SS18-119 高产 EPS 发酵条件的最优组合为 $A_2B_3C_3D_2$,即发酵培养基起始 pH 为 7.0、发酵温度为 37 °C、发酵时间为 20 h、接种量为 3%。

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

组别 Group	A 培养基起始 pH Initial medium pH	B 发酵温度 Fermentation temperature (°C)	C 发酵时间 Fermentation time (h)	D 接种量 Inoculum size (%)	EPS 产量 EPS yield (g/L)
1	1	1	1	1	1.45 ± 0.03
2	1	2	2	2	1.85 ± 0.04
3	1	3	3	3	2.12 ± 0.02
4	2	1	2	3	1.77 ± 0.02
5	2	2	3	1	1.86 ± 0.03
6	2	3	1	2	2.23 ± 0.03
7	3	1	3	2	1.68 ± 0.02
8	3	2	1	3	1.75 ± 0.02
9	3	3	2	1	2.02 ± 0.06
K1	1.81	1.63	1.81	1.78	
K2	1.96	1.82	1.88	1.92	$A_2B_3C_3D_2$
K3	1.82	2.13	1.89	1.88	$RB > RA > RD > RC$
R	0.15	0.50	0.07	0.14	

注:表中数据为 $n=3$ 的平均值。

Note: The data in the table is the average value of $n=3$.

2.1.6 验证试验

由表 3 可知,在验证组优化后的发酵条件下菌株 SS18-119 合成 EPS 的产量明显提升,其多糖产量为 2.24 g/L,而在对照组发酵条件下菌株 SS18-119 合成 EPS 的产量为 1.88 g/L。因此,在优化发酵条件下菌株 SS18-119 合成 EPS 的产量是优化前的 1.19 倍。

2.2 SS18-11 菌株 EPS 抗氧化活性研究

2.2.1 SS18-119 菌株 EPS 对 DPPH 清除能力

DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基是一

种人工合成的,以氮为中心的稳定有机化合物,其乙醇溶液呈深紫色,且在 515 ~ 520 nm 范围有最大吸收峰^[18],将自由基加入其中,DPPH 溶液由深紫色变为浅黄色或无色,因此可通过吸光度的变化对自由基清除剂进行定量分析^[19]。由图 5 可知,菌株 SS18-119 所产 EPS 清除 DPPH 的能力与多糖浓度成正相关关系。当 EPS 浓度为 2 mg/mL 时,DPPH 清除率为 85.6%。Wang 等^[20]测定 *L. plantarum* NM18 所产 EPS 在浓度为 4 mg/mL 时的 DPPH 清除率为 42.31%;Wang 等^[21]测定 *L. plantarum* YW32 所产

表3 发酵条件优化结果与初始发酵条件结果对比

Table 3 Comparison of optimization results of fermentation conditions with results of initial fermentation conditions

组别 Group	培养基起始 pH Initial medium pH	发酵温度 Fermentation temperature(°C)	发酵时间 Fermentation time (h)	接种量 Inoculum size(%)	EPS 产量 EPS yield (g/L)
验证组 Verification group	7.0	37	20	3	2.24 ± 0.03
对照组 Control group	6.5	37	14	2	1.88 ± 0.04

注:表中数据为 $n=3$ 的平均值。

Note: The data in the table is the average value of $n=3$.

EPS 在 5 mg/mL 时的 DPPH 清除率为 30%。由此显示空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 对 DPPH 自由基的清除能力处于较高水平。

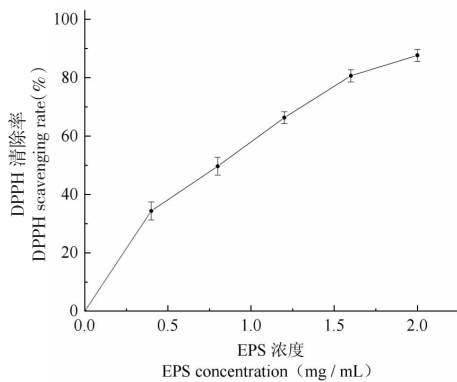


图5 菌株 SS18-119 所产 EPS 对 DPPH 的清除率

Fig. 5 DPPH scavenging removal rate of EPS produced by strain SS18-119

2.2.2 SS18-119 菌株 EPS 对超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 在有有机体内是所有活性氧自由基的前体,可转化为其它活性氧自由基并对生物体的机体损伤、衰老与疾病有重大影响^[22]。由图 6 可知,菌株 SS18-119 所产 EPS 清除超

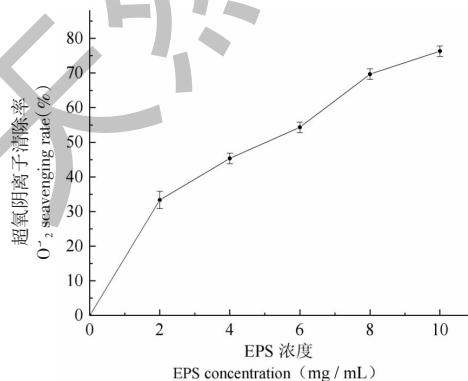


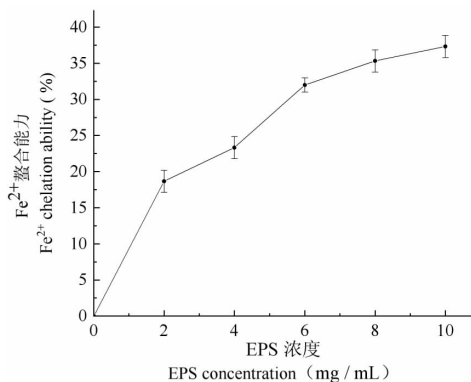
图6 菌株 SS18-119 所产 EPS 对超氧阴离子的清除率

Fig. 6 $O_2^{\cdot-}$ scavenging rate of EPS produced by strain SS18-119

氧阴离子的能力随着多糖浓度的升高而增加,当多糖浓度为 10 mg/mL 时,超氧阴离子自由基清除率为 79.0%。Meng 等^[23]测定副干酪乳杆菌 H9 所产 EPS 在浓度为 200 mg/L 时的超氧阴离子自由基清除率为 55.3%;Li 等^[24]测定乳酸菌所产 EPS 在浓度为 1.25 mg/mL 时的超氧阴离子自由基清除率为 50.0%。经比较显示,空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 对超氧阴离子具有较高清除能力。

2.2.3 SS18-119 菌株 EPS 对 Fe^{2+} 螯合能力

金属离子在机体内能诱导脂质过氧化而对机体生物膜和核酸造成损伤,因此螯合 Fe^{2+} 的能力也是一项重要的抗氧化指标。由图 7 可知,SS18-119 菌株所产 EPS 的 Fe^{2+} 螯合能力亦与多糖浓度成正相关关系,当多糖浓度为 10 mg/mL 时, Fe^{2+} 螯合能力为 36.3%。Li 等^[25]测定瑞士乳杆菌所产 EPS 在浓度为 40 mg/mL 时的 Fe^{2+} 螯合能力为 59.11%;Zhang 等^[13]测定乳酸菌所产 EPS 在浓度为 30 mg/mL 时 Fe^{2+} 螯合能力为 53.21%。经比较可见,空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 具有一定螯合 Fe^{2+} 能力。

图7 菌株 SS18-119 所产 EPS 对 Fe^{2+} 的螯合能力Fig. 7 Fe^{2+} chelation ability of EPS produced by strain SS18-119

2.2.4 SS18-119 菌株 EPS 的总还原能力

总还原能力是测定抗氧化能力的一项重要指标,具有还原能力的物质可通过提供氢原子阻断过

氧化物形成,从而使自由基链式反应无法进行。由图 8 可知,植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 的总还原能力亦与多糖浓度成正相关关系,当多糖浓度为 10 mg/mL 时,总还原能力吸光度值($A_{700\text{nm}}$)为 0.560 3。Wang 等^[26]测定植物乳杆菌 70810 所产 EPS 在多糖浓度为 4 mg/mL 时,其总还原能力 $A_{700\text{nm}}$ 最大为 0.350 0。可见,空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 具有良好总抗氧化能力。

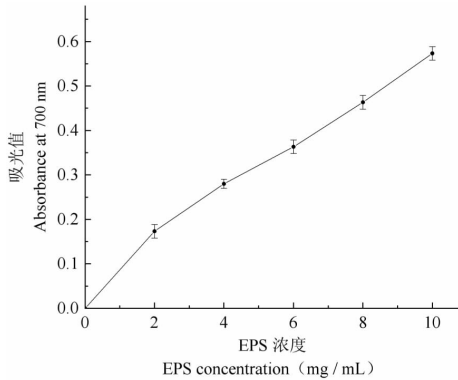


图 8 菌株 SS18-119 所产 EPS 总还原力测定

Fig. 8 Determination of total reducing power of EPS produced by strain SS18-119

3 结论

利用空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 经过单因素多水平试验和正交试验,确定高产 EPS 的优化发酵条件为:发酵培养基起始 pH 7.0、发酵温度 37 °C、发酵时间 20 h、接种量 3%。在此优化发酵条件下,菌株 SS18-119 发酵液中的 EPS 含量为 2.24 g/L,是优化前 EPS 含量的 1.19 倍。

体外抗氧化活性研究表明,空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 在浓度为 2 mg/mL 时,对 DPPH 清除率为 85.6%;在 EPS 浓度为 10 mg/mL 时,超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除率为 79.0%、 Fe^{2+} 螯合能力为 36.3%、总还原能力吸光度值为 0.560 3,显示空间诱变植物乳杆菌 SS18-119 所产 EPS 具有较强的抗氧化活性,将之用于开发抗氧化功能食品具有广阔应用前景。

参考文献

1 Margolles A, Ruas MP, Leivers S, et al. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative EPS cluster [J]. *Carbohydr Res*, 2011, 346: 2710-2717.

2 Ruas MP, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by *lactic acid bacteria* [J]. *Int Dairy J*, 2002, 12(2-3): 163-171.

3 Wang RQ, Zhang HX, Liu H, et al. Advance in methods of separation and purification of *Lactobacillus* exopolysaccharides [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2008, 29: 700-703.

4 Li L, Jiang YJ, Yang XY, et al. Immunoregulatory effects on Caco-2 cells and mice of exopolysaccharides isolated from *Lactobacillus acidophilus* NCFM [J]. *Food Funct*, 2014, 5: 3261-3268.

5 Ryan PM, Ross RP, Fitzgerald G F, et al. Sugar-coated; exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications [J]. *Food Funct*, 2015, 6: 679-693.

6 Ji W, Xiao Z, Zheng T, et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 125: 16-25.

7 Nwodo UU, Green E, Okoh AI. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 14002-14015.

8 Torino MI, Font DV, Mozzi F. Biopolymers from *lactic acid bacteria*. Novel applications in foods and beverages [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 253-259.

9 Liu H, Xiong LX, Han R, et al. Optimization of fermentation conditions for high-yield extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus casei* KL1 from Tibetan mushroom [J]. *Chin Agr Sci Bull (中国农学通报)*, 2008, 24(11): 117-121.

10 Liu H. *Modern Food Microbiology Experimental Technology (现代食品微生物学实验技术)* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2017: 296-297.

11 Liu H, Zhang HX, Dai J. Optimization of fermentation conditions for high-yield extracellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* in Tibetan mushroom [J]. *Chin Brew (中国酿造)*, 2007, 6: 41-45.

12 Yang XJ. Analysis of bacterial phase in fermented milk of Tibetan Ling mushroom and study on antioxidant properties of extracellular polysaccharide [J]. *Food Technol (食品科技)*, 2016, 41(2): 30-35.

13 Zhang YL, Hu P, Wang JL, et al. Isolation of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria and its antioxidant properties [J]. *Chin Brew (中国酿造)*, 2015, 34(10): 37-42.

14 Liang ZL, Li H, Zhang R, et al. Optimization of synthesis conditions of extracellular polysaccharide of *Lactobacillus plantarum* KF5 [J]. *Food Res Dev (食品研究与开发)*, 2019, 40(3): 14-18.

- 15 Liu LB, Liu N, Meng XC. Factors affecting the synthesis of extracellular polysaccharides of *Lactobacillus* [J]. Chin Dairy Ind(中国乳品工业), 2004, 2: 32-35.
- 16 Jolly L, Stingege F. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria [J]. Int Dairy J, 2001, 11: 733-746.
- 17 Yang ZN, Huttunen E. Biological basis and molecular structure modification of extracellular polysaccharide secreted by *Lactobacillus* [C]. Proceedings of the 3rd China Dairy Technology Conference(第三届中国乳业科技大会), 2006: 95-100.
- 18 Wei XY, Yin LQ, Zhong C, et al. Research progress of DPPH method for evaluating antioxidant activity [J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(9): 317-322.
- 19 Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant and free radical scavenging activity of anaqueous extraet of *Coleus aromaticus* [J]. Food Chem, 2006, 97(1): 109-114.
- 20 Wang RP. Preparation, structure analysis and antioxidant study of extracellular polysaccharides from *Lactobacillus plantarum* source [D]. Neimeng: Inner Mongolia Agricultural University(内蒙古农业大学), 2017: 23-29.
- 21 Wang J, Zhao X, Yang YW, et al. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32 [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 74: 119-126.
- 22 Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4: 278-286.
- 23 Meng XS, Li B. Antioxidant study of *Lactobacillus paracasei* and its extracellular polysaccharides [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2012, 37(9): 48-53.
- 24 Li JY. Antioxidant activity and structure of *Lactobacillus* extracellular polysaccharide [D]. Wuxi: Jiangnan University(江南大学), 2013: 11-14.
- 25 Li W, Ji J, Rui X, et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro* [J]. LWT-Food Sci Technol, 2014, 59: 732-739.
- 26 Wang K. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 67: 71-78.

(上接第 133 页)

- 26 Ho YS, Yu MS, Yik SY, et al. Polysaccharides from wolfberry antagonizes glutamate excitotoxicity in rat cortical neurons [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29: 1233-1244.
- 27 Zhang ZP, Guo R, Shi XW, et al. Study on the change of *Lycium barbarum* L. quality in different picking stages [J]. Acta Agr Bor-occid Sin(西北农业学报), 2007, 16(4): 126-130.
- 28 Ha R, Ma YP, Cao B, et al. Effects of simulated elevated CO₂ concentration on vegetative growth and fruit quality in *Lycium barbarum* [J]. Sci Silv Sin(林业科学), 2019, 55(6): 28-36.
- 29 Yao RY, Heinrich M, Weckerle CS. The genus *Lycium* as food and medicine: a botanical, ethnobotanical and historical review [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 212: 50-66.
- 30 Li WL, Yang ZG. Analysis on frequencies of keywords in Chinese information science journals papers [J]. Inf Sci(情报科学), 2005, 23(1): 68-70.
- 31 Chen CM. CiteSpace II: detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature [J]. J Am Soc Inf Sci Tec, 2006, 57: 359-377.