

一株高产胞外多糖的乳酸芽孢杆菌的筛选及功能鉴定

丁涛, 靳宝林, 杨晓宇, 白林含

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为丰富可用于功能食品的微生物资源,本研究从四川怀远发酵米糕作坊环境中分离出1株高产胞外多糖和乳酸的芽孢杆菌(XQ),经分子鉴定为短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*. HPLC检测XQ产乳酸含量为8 mg/mL;苯酚-硫酸法检测粗胞外多糖浓度达到7.16 mg/mL. 并经滤纸片法测定出XQ产生的粗胞外多糖对常见的食源性病原菌沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌均有抑菌作用. DEAE分离粗胞外多糖为中性多糖E1和酸性多糖E2. 当浓度为10 mg/mL时, E1对羟自由基清除活性为3.24%,而E2羟自由基清除活性高达84.58%; E1和E2对DPPH自由基的清除活性分别为26.07%和47.03%. E2还具有明显的抗肿瘤活性:当浓度为4 mg/mL时, E2对A549细胞的生长抑制率可达到81.30%,在浓度为6 mg/mL时, E2对HepG2细胞的生长抑制率为53.40%. 在模拟胃肠道耐受性实验中发现XQ对胰蛋白酶、胃蛋白酶和胆盐均具有良好的耐受性. 在安全性方面,没有发现XQ有溶血现象,对革兰氏阳性菌抗生素没有抗药性,具有良好的药物安全性. 表明XQ可作为一种潜在的益生菌.

关键词: 短小芽孢杆菌; 乳酸; 胞外多糖; 自由基清除活性; 抑制肿瘤活性; 益生菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.066002

Screening and functional identification of a *Lactobacillus* strain with high exopolysaccharide production

DING Tao, JIN Bao-Lin, YANG Xiao-Yu, BAI Lin-Han

(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to enrich the microbial resources that can be used in functional foods, a *Bacillus* (XQ) strain with high production of extracellular polysaccharide and lactic acid was isolated from the fermented rice cake workshop in Huaiyuan, Sichuan, and it was identified as *Bacillus pumilus*. The lactic acid content detected by HPLC was 8 mg/mL and the concentration of crude exopolysaccharide detected by the phenol-sulfuric acid method was 7.16 mg/mL. It was determined by the filter paper method that the extracellular polysaccharides and fermentation broth had inhibitory effects on common food-borne pathogens *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. The extracellular polysaccharide was further separated to obtain neutral polysaccharides E1 and acidic polysaccharides E2. When the concentration was 10 mg/mL, the scavenging activity of E1 on hydroxyl radicals was 3.24%, while the scavenging activity of hydroxyl radicals of E2 was as high as 84.58%; the scavenging activities of E1

收稿日期: 2021-03-29

基金项目: 国际科技合作专项(2015DFR31060)

作者简介: 丁涛(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为资源微生物. E-mail: 1025629494@qq.com

通讯作者: 白林含. E-mail: bailinhan@scu.edu.cn

and E2 on DPPH free radicals were 26.07% and 47.03%, respectively. E2 also had obvious anti-tumor activity. When the concentration was 4 mg/mL, the growth inhibition rate of E2 on A549 cells could reach 81.30%, and when the concentration was 6 mg/mL, the growth inhibition rate of E2 on HepG2 cells was 53.40%. In the simulated gastrointestinal tolerance experiments, it was found that XQ has a high tolerance to trypsin, pepsin and bile salts. In terms of safety, XQ has not been found to have hemolysis, is not resistant to Gram-positive antibiotics, and has good drug safety. In summary, this study indicated that XQ can be used as a potential probiotic.

Keywords: *Bacillus pumilus*; Lactic acid; Exopolysaccharide; Free radical scavenging activity; Antitumor activity; Probiotics

1 引言

芽孢杆菌作为益生菌用于生产发酵食品和保存食品已有很多年的历史. 因其具有分泌蛋白酶、抗菌物质的能力以及在胃肠道环境下较强的生存能力, 得到越来越多的关注^[1]. 芽孢杆菌是一种外源性的芽孢形成细菌, 通常不能定植于胃肠道中, 但可保持胃肠道微生物的良好平衡以及改善动物的生产性能^[2]. 已有研究表明益生芽孢杆菌可以在胃肠道的生理损伤条件下起预防作用^[3], 同时因产生胞外多糖而具有体外清除自由基、抗脂质过氧化的能力和体内提高抗氧化酶的活性、抗脂质过氧化的能力, 还可调节内源性抗氧化剂的活性^[4]. 大量从天然发酵食物中分离出具有益生菌特性的芽孢杆菌, 正以多种形式商业化^[5].

微生物胞外多糖是具有糖苷键的高分子量聚合物的大分子. 多种微生物包括细菌、真菌、藻类均能在其生长过程中分泌胞外多糖, 相比而言细菌产生能力较强. 胞外多糖不仅具有抗氧化活性, 还具有特殊的生理活性, 如降低胆固醇、抗肿瘤和调节机体免疫能力等, 是功能性保健产品和医药产品的重要成分^[6]. 微生物胞外多糖还可能在调节肠道菌群中起重要作用, 如双歧杆菌的应用^[7].

本实验室从四川怀远发酵米糕作坊环境中分离纯化了多株芽孢杆菌, 对其中高产胞外多糖和乳酸的 XQ 进行分子鉴定、功能鉴定及模拟胃肠道的耐受性试验以及菌株安全性方面探究, 为开发益生菌提供新的资源菌株.

2 材料与方法

2.1 材料

菌株(XQ), 由本实验室分离保存; L-乳酸, 购自成都市科隆化学品有限公司; 血琼脂平板, 购自郑州安图生物工程股份有限公司; 大肠杆菌、金黄

色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌由四川大学王红宁教授实验室提供; OXOID 药敏纸片购自 Thermo Scientific 公司. 货号分别为 CT0024B、CT0041B、CT0425B、CT0020B、CT0058B、CT0013B、CT0264B、CT0052B、CT1754B.

2.2 实验方法

2.2.1 16S rDNA 鉴定 采用 M13 的通用引物: M13F: 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3'; M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'. 进行菌液 PCR 验证, 由成都擎科公司进行测序. 将测序序列在 NCBI 数据库 Blast 上进行序列比对分析, 在 MEGA 6.06 软件中采用 Likelihood 方法构建系统发育进化树.

2.2.2 产乳酸检测 将 XQ 接种至 50 mL MRS 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养 48 h. 发酵液中乳酸含量的测定参照付卫明等人的反相高效液相色谱法^[8]. 色谱条件: 柱子为 C-18 反相柱子; 流动相为 pH2.5 磷酸缓冲液; 柱温为室温; 流速为 1 mL/min; 波长为 210 nm; 进样量为 20 μL; L-乳酸为内标.

2.2.3 胞外多糖的粗提取 将 XQ 接种至 100 mL 产胞外多糖液体培养基中, 接种量为 3%, 37 °C 200 r/min 发酵 3 d. 参照王辑^[9]的方法对发酵液中的胞外多糖进行粗提取, 并采用苯酚-硫酸法^[10]测定粗胞外多糖的含量.

2.2.4 胞外多糖的纯化 取粗胞外多糖溶液在纯水中透析(透析袋 MWCO 为 3 000~7 000), 上样 DEAE(GE XK16)中, 离子水、0.1 mol/mL、0.3 mol/mL、0.5 mol/mL NaCl 溶液分阶段洗脱, 每阶段洗脱 3 个柱体积, 流速为 1 mL/min, 分体积收集洗脱液(3 mL/管), 用苯酚-硫酸法检测多糖洗脱液含量, 以各管在 490 nm 的吸光光度测定对应管数作图, 绘制其洗脱曲线. 合并各个洗脱峰的洗脱液, 利用超滤管(MWCO3000)浓缩, 在纯水中

透析。

2.2.5 体外抑菌实验^[11] 将 XQ 接种至 50 mL LB 液体培养基中, 接种量为 2%, 30 °C 200 r/min 培养 3 d。将发酵液上清液冷冻干燥后, 稀释 20 倍后过滤, 得到浓缩的无菌发酵滤液, 吸取 50 μL 浸润空白滤纸片; 粗胞外多糖吸取 50 μL 浸润空白滤纸片。

将大肠杆菌、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌活化 12 h 均匀涂布于 LB 固体培养基上; 后将上述滤纸片放置于 LB 平板上。其中, 无菌 LB 培养液的滤纸片为空白对照, 氯霉素 (30 μg) 药敏纸片为阳性对照。每个实验重复 3 次, 37 °C 恒温培养 12 h, 观察滤纸片周围的抑菌圈。

2.2.6 羟自由基清除活性 羟自由基清除活性的测定参照金鸣等人^[12]的方法。

$$\text{羟自由基清除活性} = (A_1 - A_0) / (A - A_0) \times 100\%$$

式中, A_0 是对照试验的吸光光度值 (即以水代替样品); A_1 是样品试验的吸光光度值; A 是以水替代反应体系中的 H_2O_2 和样品的吸光度值。

2.2.7 DPPH 自由基清除活性 DPPH 自由基清除活性的测定参照 Shimada 等人^[13]的方法测定。

$$\text{羟自由基清除活性} = [1 - (A_1 - A)] / A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 是对照试验的吸光光度值 (即以水代替样品); A_1 是样品试验的吸光光度值; A 是以水替代反应体系中的 DPPH 溶液的吸光度值。

2.2.8 抗肿瘤活性测定 采用 Ramamoorthy 等人^[14]的方法测定胞外多糖的抗肿瘤活性。选择 A549 和 HepG2 细胞作实验对象, 细胞在 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱中培育 24 h 后, 在 A549、HepG2 中分别加入终浓度为 4 和 6 mg/mL 的胞外多糖, 在空白对照中加入等体积的培养基, 继续培养 24 h 后; 采用 CCK-8 法^[15]体外检测细胞活性。

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_1/A_0) \times 100\%$$

式中, A_0 是对照试验的吸光光度值 (即以培养基代替样品); A_1 是样品试验的吸光光度值。

2.2.9 耐受性实验 采用 Maragkoudakis 等人^[16]的方法进行人工模拟胃肠道耐受性和胆盐耐受性实验。

$$\text{相对存活率} = A_1/A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 是未处理 (0 h) 的活菌数的对数值; A_1 是处理后的活菌数的对数值。

2.2.10 药敏实验 将 XQ 用棉签均匀涂布于 MH 琼脂表面, 将涂布后的平板在室温下干燥 3~5 min, 用无菌镊子将药敏纸片贴于 MH 琼脂表面, 使纸片与琼脂完全接触。每种药敏纸片设置 3 个重复。将平板置于 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 16 h。实验结果根据 CLSL 分析^[17]。

2.2.11 溶血实验 将 XQ 均匀涂布到血琼脂平板上, 37 °C 孵育 24 h, 检测溶血情况^[18]。

2.2.12 数据分析 使用 EXCEL 统计数据并利用 Prism 6 进行作图。试验数据 SPSS 进行数据处理, 采用 Duncan 法进行单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 分子鉴定

将 XQ 的 16S rDNA 序列分别与 NCBI 中的 GenBank 中收录的序列进行 BLAST 分析, 利用 MEGA 6 软件的 Likelihood 方法构建系统发育树, 见图 1。XQ 与短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* strain BDH8 (序列登录号: KF933629.1) 相似性为 99.62%。

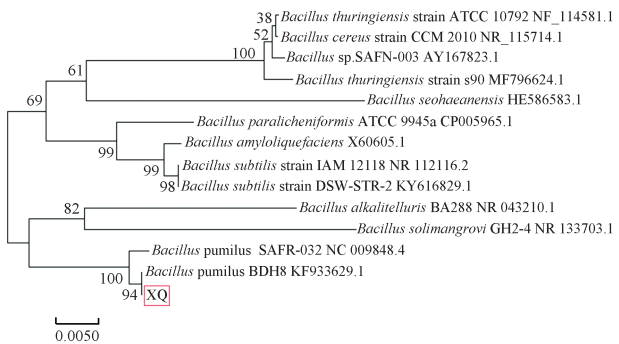


图 1 XQ 16 S rDNA 聚类分析
Fig. 1 16 S rDNA cluster analysis of XQ

3.2 HPLC 检测乳酸含量

根据乳酸 HPLC 检测标准曲线, 乳酸的保留时间为 10.6 min, 以乳酸浓度为横坐标 (X 轴), 峰面积为纵坐标 (Y 轴), 绘制标准曲线, 得到方程为 $y = 350.038.7007x + 1.056828.8011$, $R^2 = 0.99$, 在 0~35 g/L 范围内具有良好的线性关系 (见图 2)。

图 3(a), 乳酸溶液出峰时间为 10.632 min, 图 3(b) 发酵液中的乳酸出峰时间 10.616 min, 图 3(c) 6 mg/mL 乳酸溶液与发酵液混合液中的出峰时间为 10.119 min, 在发酵液中添加乳酸发现其峰升高 (相较于发酵液), 说明 XQ 产乳酸。检测其发酵液中乳酸, 计算得到其峰面积为 3 859 147, 带

入公式,其发酵液中乳酸含量为 8 mg/mL.

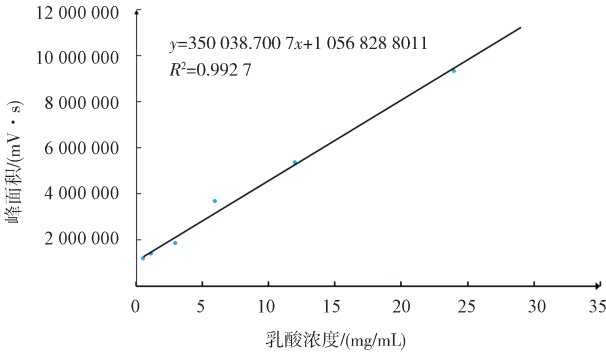


图 2 乳酸标准曲线
Fig. 2 Standard curve of lactic acid

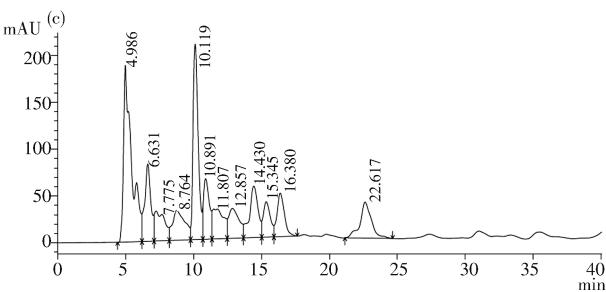
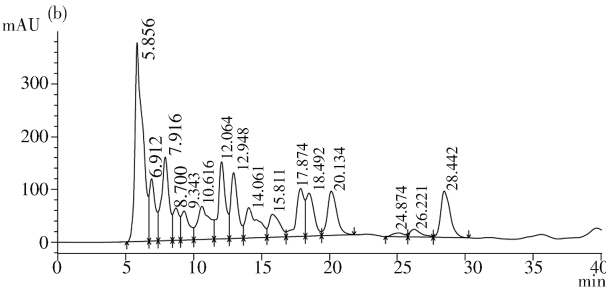
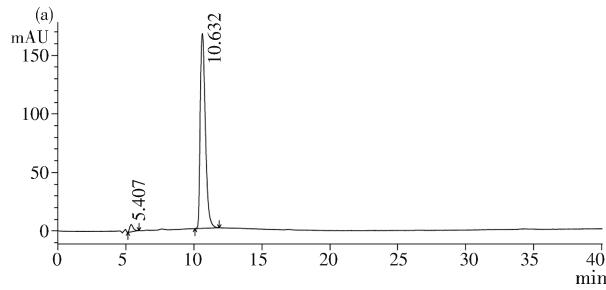


图 3 HPLC 检测乳酸

(a) 6 mg/mL 乳酸溶液;(b) 发酵液;(c) 6 mg/mL 乳酸与发酵液混合液

Fig. 3 Lactic acid detected by HPLC

(a) 6 mg/mL lactic acid solution; (b) fermentation broth; (c) mixture of 6 mg/mL lactic acid and fermentation broth

3.3 胞外多糖含量测定

以葡萄糖浓度做横坐标(X轴),吸光度 $A_{490\text{ nm}}$ 做纵坐标(Y轴)绘制标准曲线,标准曲线为 $y=1.913x+0.0136, R^2=0.99$,在 0~1.4 mg/mL 范围内具有较好的线性关系(见图 4)。利用苯酚-硫酸法测定发酵液中粗胞外多糖,将其稀释 40 倍,重

复 3 次测定平均吸光度值为 0.356,则带入公式 XQ 产粗胞外多糖的浓度为 7.16 mg/mL.

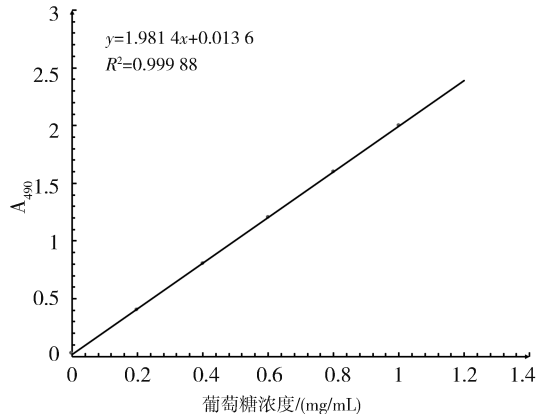


图 4 葡萄糖标准曲线
Fig. 4 Standard curve of glucose

3.4 胞外多糖的纯化

流速为 1 mL/min 时,仅有去离子水、0.1 mol/L NaCl 水溶液中有多糖存在.其洗脱峰为图 5,DEAE 将粗胞外多糖分为 E1 和 E2 两个峰.由于 DEAE 是通过多糖组分中自带的电荷来筛分多糖,因酸性多糖比中性多糖所带电荷多,所以采用 NaCl 浓度梯度增大的方式进行洗脱进而分离酸性多糖^[10].E1 组分不与 DEAE 结合,推测为中性多糖;E2 与 DEAE 结合,可通过 NaCl 洗脱,带有电荷,推测为酸性多糖.

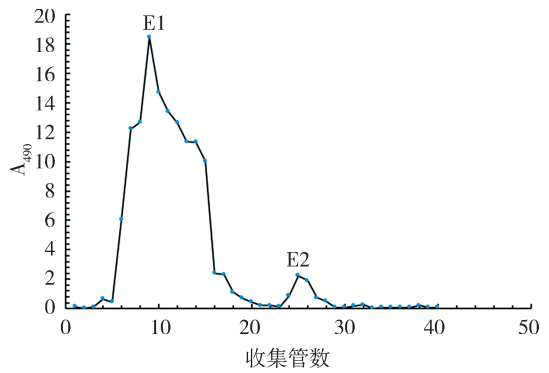


图 5 胞外多糖 DEAE 层析洗脱曲线
Fig. 5 The elution curve of extracellular polysaccharide by DEAE chromatography

3.5 体外抑菌实验

图 6 可以看出,XQ 发酵液仅对肠炎沙门氏菌有抑制效果,粗胞外多糖对肠炎沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有抑制效果,且对大肠杆菌抑制效果最强,对肠炎沙门氏菌抑制作用最弱.

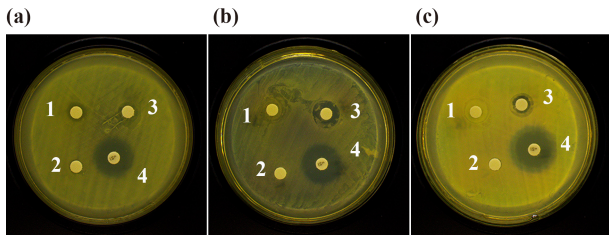


图 6 抑菌实验

(a) 肠炎沙门氏菌; (b) 大肠杆菌; (c) 金黄色葡萄球菌
 1 无菌发酵液; 2 空白培养液; 3 粗胞外多糖(350 μg); 4 氯霉素(30 μg)
 Fig. 6 Antibacterial experiment

(a) *Salmonella enteritidis*; (b) *Escherichia coli*; (c) *Staphylococcus aureus* RN4220
 1 Sterile fermentation broth; 2 blank culture broth; 3 extracellular polysaccharide (350 μg); 4 chloramphenicol (30 μg)

3.6 胞外多糖的抗氧化活性

3.6.1 羟自由基清除活性 胞外多糖 E1、E2 的羟自由基清除活性结果见图 7(a)。羟自由基清除活性随着浓度升高而增加,且 E2 显著高于 E1;在浓度为 10 mg/mL 时, E1 和 E2 其羟自由基清除率为 3.24% 和 84.58%。

3.6.2 DPPH 自由基清除活性 胞外多糖 E1、E2 的 DPPH 自由基的清除活性的结果见图 7(b)。清除活性随着浓度的增加而增加。在浓度为 10 mg/mL 时, E1 和 E2 的 DPPH 自由基的清除率为 26.07% 和 47.03%, 具有中等的 DPPH 自由基清除活性。

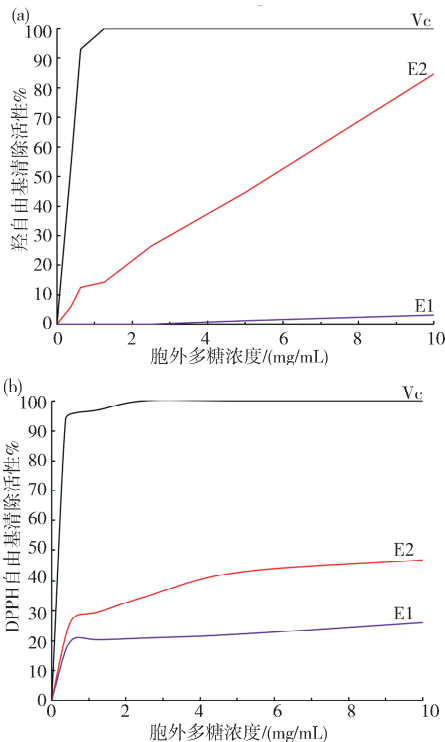


图 7 胞外多糖的抗氧化性

(a) 羟自由基清除活性; (b) DPPH 自由基清除活性
 Fig. 7 Antioxidant properties of extracellular polysaccharide
 (a) Hydroxyl radical scavenging activity; (b) DPPH free radical scavenging activity

3.7 抗肿瘤活性

在本试验中,通过 CCK-8 的方法测定了胞外多糖对 A549 和 HepG2 细胞系的体外细胞毒性试验。加入胞外多糖浓度为 4 mg/mL 时, E2 对 A549 细胞的生长抑制率为 81.30%, 培养 HepG2 细胞时加入胞外多糖浓度为 6 mg/mL, E2 对 HepG2 细胞的生长抑制率为 53.40%。胞外多糖 E2 对癌细胞系 A549 和 HepG2 细胞具有潜在的细胞毒性试验。E1 未显示抑制肿瘤细胞生长的作用。

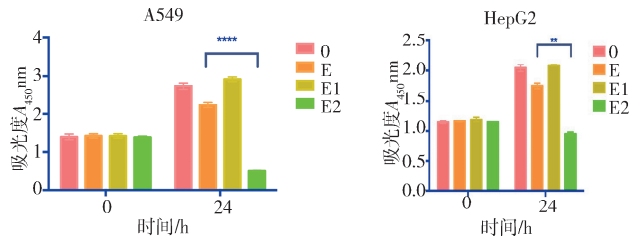


图 8 胞外多糖的抗肿瘤活性

Fig. 8 Antitumor activity of extracellular polysaccharide

3.8 耐受性实验

XQ 具有良好的耐受性,在酸性、胃蛋白酶、胰蛋白酶和胆盐特定条件下 3 h 相对存活率分别为 82.51%、82.6%、89.15% 和 72.09%。

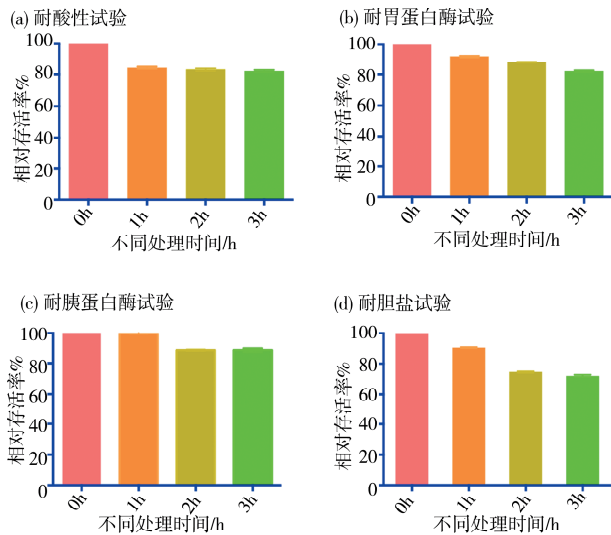


图 9 XQ 耐受性实验

Fig. 9 Tolerance experiment of XQ

3.9 药敏实验

根据抑菌圈直径的大小判断敏感性高低。由表 1 可知 XQ 作为格兰氏阳性菌对常见的革兰氏阳性菌抗生素(庆大霉素、四环素、万古霉素、环丙沙星、红霉素、氯霉素)均敏感;对革兰氏阴性菌抗生素氨基糖苷类不敏感。说明 XQ 几乎没有潜在的耐药性基因,在应用于生产中具有安全性。

表 1 XQ 药敏实验

Tab. 1 Drug susceptibility test of XQ

抗生素类型	抗生素	纸片含量 / μg	抑菌环直 径/mm	结果
氨基糖苷类	庆大霉素	10	22.33	S
四环素类	四环素	30	24.67	S
喹诺酮类	环丙沙星	5	31.33	S
大环内酯类	红霉素	15	21	S
粘肽类	万古霉素	30	15.5	S
其他	氯霉素	30	17.67	S
单环 β -内酰胺类	安曲南	30	0	—
—	甲氧苄苄嘧啶	25	37.67	S
—	氟苯尼考	30	28	S

注:直径 20 mm 以上是极敏,15~20 mm 为高敏,10~15 mm 为中敏,10 mm 以下为低敏,0 mm 无敏感性;—为无法判断,S 为 Sensitive 的缩写。

3.10 溶血实验

溶血性是其致病性的一个外在表现形式,是衡量毒力的重要指标。见图 10,XQ 不溶血,对照组为粘质沙雷氏菌溶血,说明 XQ 在溶血性方面具有安全性。

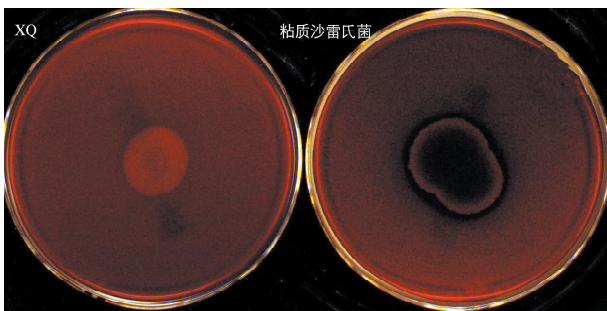


图 10 溶血实验
Fig. 10 Hemolysis test

4 讨论

在食品相关领域,益生菌用于食品是全球趋势,其主要应用于提供一些除传统营养元素外的其它可促进健康的成分。但如何筛选和评估益生菌的价值是业内学者一直在探索的问题^[19]。而益生菌在体内共生环境下,通过分泌相关的代谢产物改变人体局部的条件而产生利好有初步的研究和认识,如有机酸或多糖等物质。

由于大多数病原体不能在低 pH 值下生长^[20]。有机酸的分泌,如乳酸,可降低胃肠道的 pH 使其成为不利于病原体生长的环境,同时有机酸对病原菌的代谢和毒素的产生也有影响,进而起到预

防疾病的作用^[21]。

胞外多糖具有多种生理功能,但天然胞外多糖的产量并不高。与动植物胞外多糖相比微生物胞外多糖具有很多优点,其生产周期短,不受季节、地理和环境因素的影响,且原料丰富,成本相对较低,可在人工控制的条件下进行大规模工业生产,对环境无污染,其产量也相对较高,因此微生物胞外多糖具有很强的市场竞争力和广阔的前景发展^[22]。

现有研究中大部分乳酸菌胞外多糖的产量偏低(低于 1g/L)^[23-24],*Lactobacillus* sp. Ca₆ 产胞外多糖最大产量为 2.4 mg/mL^[25],而我们筛选的这株乳酸芽孢杆菌 XQ 胞外多糖产量为 7.16 mg/mL,可节省高昂纯化成本,因此 XQ 是具有开发优势的。有报道称来自不同微生物的胞外多糖混合物具有更好的 DPPH 清除能力^[26-27],这一点可为今后配制更好的 DPPH 清除能力胞外多糖混合物提供组分来源。

胞外多糖的抗肿瘤活性也备受关注。在本研究中,E2 对癌细胞系 A549 和 HepG2 细胞具有细胞毒性。浓度为 4 mg/mL 时,对 A549 细胞的生长抑制率为 81.30%,浓度为 6 mg/mL,对 HepG2 细胞的生长抑制率为 53.40%。

E1 未表现出肿瘤抑制作用,但作为中性多糖依然具有重要价值。Speciale 等人^[28]发现双歧杆菌双歧杆菌 PRI1 可产生四种不同化学结构的中性多糖混合物,同时发现不同化学结构的中性多糖在调节宿主与细菌相互作用中具有不同的作用,推测中性多糖混合物可根据结构差异调节宿主免疫力,从而增强免疫力或诱导免疫耐受。中性多糖可以促进某些乳酸菌的生长。Zeng 等人^[29]从 *Cistanche deserticola* YC Ma 获得了中性多糖 CDA-0.05,可以显著促进三种拟杆菌(*B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* 和 *B. fragilis*)的生长;此外,CDA-0.05 还可以促进某些益生菌的生长,例如干酪乳杆菌,植物乳杆菌和路透乳杆菌。中性多糖可能还具有抗病毒的作用。Li 等人^[30]从 *Dendrobium nobile* Lindl 分离出的中性多糖 DNPE6(4),具有抗 TMV 和抗 CMV 活性。

综上,从四川怀远发酵米糕作坊环境中分离出的短小芽孢杆菌(XQ),高产胞外多糖及乳酸。对常见食源性病原菌沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌具有抑制作用;产生的胞外多糖具备羟自由基清除活性和 DPPH 自由基的清除活性,并能抑制肿瘤生长。在模拟胃肠道耐受性实验中对胰蛋白

酶、胃蛋白酶和胆盐均具有良好耐受性.对常用抗生素无耐药性,溶血试验阴性,具有生物安全性.表明XQ可作为一种潜在的益生菌.

参考文献:

- [1] Elshaghabe F M F, Rokana N, Gulhane R D, *et al.* Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1490.
- [2] Guo X, Li D, Lu W, *et al.* Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 90: 139.
- [3] Zhang H L, Li W S, Xu D N, *et al.* Mucosa-repairing and microbiota-balancing therapeutic effect of *Bacillus subtilis* alleviates dextrate sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12: 2554.
- [4] Abinaya M, Vaseeharan B, Divya M, *et al.* Structural characterization of *Bacillus licheniformis* Dahb1 exopolysaccharide-antimicrobial potential and larvicidal activity on malaria and Zika virus mosquito vectors [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25: 18604.
- [5] Rao K P, Chennappa G, Suraj U, *et al.* Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorghum-based traditional fermented food [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2015, 7: 146.
- [6] Malick A, Khodaei N, Benkerroum N, *et al.* Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 102: 539.
- [7] Zhang J, Zhao X, Jiang Y, *et al.* Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibetan kefir [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100: 6025.
- [8] 付卫明, 白冬梅, 班睿, 等. 反相高效液相色谱法分离测定生孢乳杆菌发酵液中的乳酸 [J]. *化工进展*, 2002, 21: 259.
- [9] 王辑. 产胞外多糖植物乳杆菌的分离筛选, 分子表征及其应用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [10] 刘俊. 多粘类芽孢杆菌胞外多糖的发酵条件, 结构, 化学修饰及其抗氧化活性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [11] Aslim B, Yuksekdog Z N, Sarikaya E, *et al.* Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products [J]. *LWT: Food Sci Technol*, 2005, 38: 691.
- [12] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe²⁺ 氧化法检测 H₂O₂/Fe²⁺ 产生的羟自由基 [J]. *化学与生物物理进展*, 1996, 23: 553.
- [13] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, *et al.* Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 945.
- [14] Ramamoorthy S, Gnanakan A, Lakshmana S S, *et al.* Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 190: 113.
- [15] Rajoka M S R, Mehwish H M, Hayat H F, *et al.* Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin *Lactobacilli* [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2019, 11: 1132.
- [16] Maragkoudakis P A, Zoumpopoulou G, Miaris C, *et al.* Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16: 189.
- [17] Kaewklom S, Lumlert S, Kraikul W, *et al.* Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi) [J]. *Food Control*, 2013, 32: 552.
- [18] Manhar A K, Bashir Y, Saikia D, *et al.* Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): an in-vitro study with regards to application as an animal feed additive [J]. *Microbiol Res*, 2016, 186: 62.
- [19] Lebeer S, Bron P A, Marco M L, *et al.* Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 49: 217.
- [20] Chichlowski M, Croom J, McBride B W, *et al.* Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge [J]. *Int J Poult Sci*, 2007, 6: 694.
- [21] Mathipa M G, Thantsha M S. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted

- control of enteric pathogens [J]. Gut Pathog, 2017, 9: 1.
- [22] Chen L, Huang G. Antitumor activity of polysaccharides: an overview [J]. Curr Drug Targets, 2018, 19: 89.
- [23] 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 Sci Technol, 2015, 63: 129.
- [24] Oleksy M, Klewicka E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: biosynthesis and applications [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58: 450.
- [25] Trabelsi I, Slima S B, Chaabane H, et al. Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6 [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 74: 541.
- [26] Ye S, Zhang J, Liu Z, et al. Biosynthesis of selenium rich exopolysaccharide (Se-EPS) by *Pseudo-*monas PT-8 and characterization of its antioxidant activities [J]. Carbohydr Polym, 2016, 142: 230.
- [27] Chen Z, Shi J, Yang X, et al. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by *Tibetan kefir* grains during milk fermentation [J]. Int Dairy J, 2015, 43: 15.
- [28] Speciale I, Verma R, Di Lorenzo F, et al. *Bifidobacterium bifidum* presents on the cell surface a complex mixture of glucans and galactans with different immunological properties [J]. Carbohydr Polym, 2019, 218: 269.
- [29] Zeng H, Huang L, Zhou L, et al. A galactoglucan isolated from *Cistanche deserticola* YC Ma. and its bioactivity on intestinal bacteria strains [J]. Carbohydr Polym, 2019, 223: 115038.
- [30] Li Z, Shi J, Hu D, et al. A polysaccharide found in *Dendrobium nobile* Lindl stimulates calcium signaling pathway and enhances tobacco defense against TMV [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 137: 1286.

引用本文格式:

中文: 丁涛, 靳宝林, 杨晓宇, 等. 一株高产胞外多糖的乳酸芽孢杆菌的筛选及功能鉴定 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 066002.

英文: Ding T, Jin B L, Yang X Y, et al. Screening and functional identification of a *Lactobacillus* strain with high exopolysaccharide production [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2021, 58: 066002.