

李静, 王翔宇, 张诗琦, 等. 牦牛酸乳源高产胞外多糖乳酸菌筛选及其多糖结构表征与体外功能活性分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 190–202. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050164

LI Jing, WANG Xiangyu, ZHANG Shiqi, et al. Screening of High-yield Exopolysaccharide-producing Lactic Acid Bacteria from Yak Fermented Milk and Structural Characterization and *in Vitro* Bioactivity Analysis of Polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 190–202. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050164

· 生物工程 ·

牦牛酸乳源高产胞外多糖乳酸菌筛选及其多糖结构表征与体外功能活性分析

李 静¹, 王翔宇², 张诗琦¹, 王樱洁¹, 宛祎豪¹, 双维明¹, 田 罗¹, 陈炼红^{1*}

(1. 西南民族大学药学与食品学院, 四川成都 610041;

2. 四川省食品检验研究院, 四川成都 611731)

摘要: 本研究旨在从川西传统牦牛酸乳中筛选高产胞外多糖 (Exopolysaccharides, EPS) 的乳酸菌, 并对其所产 EPS 进行结构表征与功能特性分析。从 185 株分离自酸乳的乳酸菌中筛选出一株高产 EPS 的菌株——发酵粘液乳杆菌 197 (*Limosilactobacillus fermentum* 197)。通过单因素实验优化其发酵培养基组成, 并采用 DEAE-52 和 CL-6B 柱层析对 EPS 进行分离纯化, 得到主要组分 EPS1, 利用傅里叶变换红外光谱、凝胶渗透色谱及核磁共振等技术对 EPS1 的结构进行解析, 并评估其体外抗氧化和血糖调节活性。结果表明, 该菌在优化后的培养基 (麦芽糖与大豆蛋白胨均为 40 g/L) 中 EPS 产量达到 1699.83±34.31 mg/L, 较原始产量提高 5 倍。纯化后组分 EPS1 得率为 15.07%, 分子量为 2.11×10⁵ Da, 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成, 含有 α 和 β 型糖苷键, 具备三股螺旋结构, 微观呈片状多孔形态。体外活性研究表明, EPS1 在 10 mg/mL 浓度下对 ABTS⁺ 自由基、DPPH 自由基和羟基自由基的清除率分别为 57.07%、46.54% 和 49.68%, 对 α -淀粉酶的抑制率为 51.46%。本研究揭示了 EPS1 的结构与其抗氧化和降血糖活性之间的关联, 为开发基于乳酸菌 EPS 的功能性乳制品提供了理论依据, 也为高原乳酸菌资源的综合利用提供了新方向。

关键词: 乳酸菌, 胞外多糖, 结构表征, 体外功能活性

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2026)09-0190-13

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050164

本文网刊:



Screening of High-yield Exopolysaccharide-producing Lactic Acid Bacteria from Yak Fermented Milk and Structural Characterization and *in Vitro* Bioactivity Analysis of Polysaccharides

LI Jing¹, WANG Xiangyu², ZHANG Shiqi¹, WANG Yingjie¹, WAN Yihao¹, SHUANG Weiming¹,
TIAN Luo¹, CHEN Lianhong^{1*}

(1. College of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Sichuan Institute of Food Inspection, Chengdu 611731, China)

Abstract: This study aimed to screen lactic acid bacteria (LAB) with high exopolysaccharide (EPS)-producing capacity from traditional yak yogurt in Western Sichuan, and to characterize the structure and functional properties of the EPS. Among 185 LAB strains isolated, *Limosilactobacillus fermentum* 197 was identified as a high EPS producer. The fermentation medium was optimized through single-factor experiments, and the EPS was purified using DEAE-52 and CL-6B column chromatography. The purified fraction EPS1 was structurally characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, gel permeation chromatography, and nuclear magnetic resonance, and its bioactivities were evaluated *in vitro*.

收稿日期: 2025-05-19

基金项目: 西南民族大学 2025 年研究生创新型科研项目; 四川省科普培训项目资助 (2024JDKP0200)。

作者简介: 李静 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 畜产品加工与安全, E-mail: 13624856019@163.com。

* 通信作者: 陈炼红 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 高原特色食品资源开发, E-mail: llianhong_chen@163.com。

The results showed that the optimal carbon and nitrogen sources for EPS production were maltose and soybean peptone, both at 40 g/L. After optimization, the EPS yield reached 1699.83 ± 34.31 mg/L, representing a 5-fold increase compared to the original yield. The purified EPS1, with a yield of 15.07%, had a molecular weight of 2.11×10^5 Da and was composed of rhamnose, arabinose, galactose, glucose, and mannose. It contained both α - and β -glycosidic bonds, exhibited a triple-helix structure, and displayed a flaky porous morphology under microscopy. *In vitro* assays demonstrated that EPS1 at 10 mg/mL exhibited scavenging rates against ABTS⁺, DPPH, and hydroxyl radicals of 57.07%, 46.54%, and 49.68%, respectively, and an α -amylase inhibition rate of 51.46%. This study reveals the relationship between the structure of EPS1 and its antioxidant and hypoglycemic activities, providing a theoretical basis for developing functional dairy products using LAB-derived EPS and offering new insights into the utilization of lactic acid bacteria resources from plateau pastoral areas.

Key words: lactic acid bacteria; exopolysaccharides; structural characterization; *in vitro* bioactivity

乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB), 凭借其公认的安全性和多样的功能优势, 已成为科学研究的热点。乳酸菌在发酵代谢过程中可产生有机酸、小分子肽、胞外多糖等有益的生物活性物质^[1], 已有研究发现乳酸菌的生理活性与其代谢产物胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)密切相关, 如抗氧化活性^[2-3]、免疫调节活性^[4]、降血脂活性^[5]和降血糖活性^[6-7]等, 不会对健康造成危害^[8]。

传统牦牛酸乳是在青藏高原独特的低温、低氧、强紫外线辐射环境下进行自然发酵的产物^[9]。这种极其严酷的发酵环境构成了强大的天然选择压力, 高效筛选并富集了大量具备特殊生理生化特性及卓越环境适应能力的微生物菌群^[10]。其中, LAB 作为牦牛酸乳中的优势菌群之一^[11], 在长期的适应性进化过程中, 发展出极强的抗逆性。为了应对高原极端环境对其生存和生长造成的多重胁迫并弥补因低温等因素导致的细胞壁组分合成相对缓慢的不足, 这些 LAB 会显著提高 EPS 的合成量。这些 EPS 在菌体表面形成保护性屏障或胶层, 对维持细胞完整性、抵御恶劣环境侵害至关重要^[12]。因此, 传统牦牛酸乳可视为一个蕴含丰富且独特乳酸菌资源的天然宝库, 尤其蕴藏着大量在极端胁迫下进化出的、具有高产 EPS 潜力的菌株。这类在高强度环境压力下诱导产生的高产 EPS 乳酸菌, 其 EPS 的分子结构、理化性质及相应的生理活性可能显著区别于常规环境来源的菌株^[13], 具有极高的研究和应用价值。目前, 尽管已从酸面团、发酵果蔬、酸奶、开菲尔、奶酪等多种发酵食品中分离出多种高产 EPS 的乳酸菌^[11, 14-16], 并对其多糖特性开展了广泛研究, 但由于不同来源的乳酸菌所产 EPS 在结构和功能上存在显著差异^[17], 因此, 对传统牦牛酸乳中高产 EPS 乳酸菌所产多糖进行精细结构解析与功能性生理活性评价, 仍具有重要的研究价值与应用意义。

本研究以实验室前期分离的传统牦牛酸乳源乳酸菌为对象, 开展高产胞外多糖(EPS)菌株的筛选工作。通过单因素实验对其发酵培养基组分进行优化, 以提升 EPS 产量。在此基础上, 针对分离纯化后的主要组分 EPS1, 系统开展结构特征及化学组成分析, 并基于结构解析结果测定其体外抗氧化与降血糖

活性。研究旨在为川西地区特色微生物资源的开发利用提供理论依据, 同时为川西高原微生物资源的深度开发提供创新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

185 株乳酸菌 从川西高原自然发酵酸奶中分离, 储存于西南民族大学实验室; 大豆蛋白胨、胰蛋白胨、蛋白胨、酪蛋白胨、 α -葡萄糖苷酶(75 U/mg)、 α -淀粉酶(60 U/mg)(以上为 BR)、CL-6B 琼脂糖凝胶、纤维素 DEAE-52 北京索莱宝生物科技有限公司; 葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖(以上为 BR)、考马斯亮蓝 G-250、吡啶、凝胶多糖(以上为 AR) 上海麦克林生化科技股份有限公司; 磷酸氢二钾、三氯乙酸、苯酚、氯化钡 AR, 成都市科隆化学品有限公司。

Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机 德国艾本德股份公司; ALPHA 1-4 LSC 冷冻干燥机 德国 Martin Christ 公司; Spectrum 3™傅里叶变换红外光谱仪 美国 PerkinElmer 公司; ICS5000 离子色谱系统、U3000 凝胶色谱 赛默飞世尔科技公司; Bruker AV II -600 MHz 核磁共振分析仪 德国 Bruker 公司; ZEISS sigma500 扫描电子显微镜 德国蔡司集团; DAWN HELEOS II 激光光散射检测器、Optilab T-rEX 示差检测器 美国怀雅特技术公司。

1.2 实验方法

1.2.1 高产胞外多糖菌株筛选 MRS 培养基配制: 称取蛋白胨 10 g、葡萄糖 20 g、牛肉浸粉 8 g、醋酸钠 5 g、酵母浸粉 4 g、磷酸氢二钾 2 g、柠檬酸氢二铵 2 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.04 g、吐温-80 1 g, 将其全部溶解于 1000 mL 去离子水中后调 pH 至 6.0, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.1.1 胞外粗多糖提取 参考李洋^[18]的方法, 将 185 株乳酸菌活化后, 在培养基中按 3%(质量体积比)接入稀释后的菌悬液, 于 37 °C 培养 48 h。将培养物转移至离心管, 在 4 °C 条件下以 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并弃除菌体沉淀。向上清液中添加 80% 三氯乙酸溶液, 混匀后于 4 °C 冷藏静置过夜。次日离心处理后, 向上清中加入 3 倍体积的 95% 乙醇溶液, 在 4 °C 环境下沉淀过夜。再次离心

收集沉淀,用去离子水复溶后,将溶液装入截留分子量为 8000~14000 Da 的透析袋,置于流水中透析 72 h。收集透析后的样品进行冷冻干燥处理,所得产物于干燥条件下储存备用。

1.2.1.2 粗多糖含量测定 参考王纯玮^[19]的方法,以葡萄糖为标准品,利用苯酚-硫酸法,建立总糖标准曲线。得到的标准曲线方程为 $y=9.2550x-0.0541$ ($R^2=0.9970$),其中 y 和 x 分别表示吸光值及质量浓度。该式用于计算各菌株发酵液中的总糖含量。

取 1 mL 稀释至合适倍数(25~50 倍)的发酵液,苯酚-硫酸法测定吸光值,并根据标准曲线计算各菌株 EPS 产量。

1.2.2 高产胞外多糖菌株培养条件优化 采用单因素实验优化发酵培养基,以 MRS 培养基作为基础配方,针对氮源和碳源成分开展实验:以 MRS 培养基原有碳源葡萄糖为基础碳源,氮源选取普通蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨、大豆蛋白胨,以 EPS 产量分析确定最佳氮源,再以筛选出的最佳氮源为基础氮源,碳源设置葡萄糖、乳糖、蔗糖、半乳糖、麦芽糖,以 EPS 产量确定最佳碳源;根据确定好的最佳碳源及氮源,设计 10、20、30、40、50 g/L 5 个浓度梯度,确定各自的最适浓度,开展优化研究。

1.2.3 乳酸菌胞外多糖的分离纯化 以纤维素 DEAE-52 和 CL-6B 琼脂糖凝胶为填充材料,对粗 EPS 进行分离。首先,粗多糖称重后制成 10 mg/mL 溶液并过 0.22 μm 水系滤膜,在 DEAE-52 阴离子交换柱中进行初步分离,依次以去离子水、0.1、0.3、0.5、0.7 mol/L 的 NaCl 溶液为流动相,以 2 mL/min 的流速 2 min 收集一管,每个梯度收集 60 管,采用苯酚-硫酸法跟踪检测并绘制洗脱曲线。冻干后,用琼脂糖凝胶 CL-6B 进一步纯化,以去离子水为流动相,每管收集 5 mL,纯化时的多糖含量利用 1.2.1.2 中的苯酚-硫酸法进行追踪测定,收集洗脱曲线中峰值位置的洗脱液,最终分离得到纯化多糖,命名为 EPS1 并称重。并根据式(1)计算纯化多糖得率。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{M_1}{M_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: M_0 : 纯化前粗多糖净重, mg; M_1 : 纯化冻干后多糖净重, mg。

1.2.4 乳酸菌胞外多糖化学成分研究

1.2.4.1 化学成分测定 总糖含量测定以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法进行;糖醛酸含量检测以半乳糖醛酸为标准物质,通过咪唑-硫酸比色法^[20]测定,得到糖醛酸标准曲线为 $y=11.965x-0.012$, $R^2=0.9926$;蛋白含量分析以牛血清蛋白为标准品,运用考马斯亮蓝法^[21]完成,得到蛋白标准曲线为 $y=4.938x+0.0189$, $R^2=0.9948$;硫酸根含量则以硫酸钾为标准对照,借助氯化钡-明胶法^[22]进行定量分析,得到硫酸根标准曲线为 $y=0.2466x+0.001$, $R^2=0.9982$ 。

1.2.4.2 紫外全波长扫描 用适量的去离子水将粗多糖及纯化多糖配制成 0.1 mg/mL 的溶液。以去离子水为调零空白对照,使用全波长紫外分光光度计在 190~400 nm 处对其进行全波长扫描。

1.2.5 乳酸菌胞外多糖结构分析

1.2.5.1 红外光谱分析 称取纯化多糖各 2 mg,放入傅里叶红外光谱分析仪 ATR 附件上进行红外扫描。扫描波数范围: 500~4000 cm^{-1} , 扫描间隔: 4 cm^{-1} 。

1.2.5.2 胞外多糖分子量的测定 将样品溶解在 0.1 mol/L NaNO_3 水溶液(含 0.02% NaN_3 , w/w)中,终浓度为 1 mg/mL,并通过孔径为 0.45 μm 的过滤器过滤后上机检测。采用凝胶排阻色谱柱(Ohpak SB-805 HQ(300×8 mm), Ohpak SB-804 HQ(300×8 mm)和 Ohpak SB-803 HQ(300×8 mm)串联;柱温 45 $^{\circ}\text{C}$,进样量 100 μL ,流动相 A 为 H_2O ,流动相 B 为 0.1 mol/L NaOH,流动相 C 为 0.1 mol/L NaOH 及 0.2 mol/L NaAc,流速 0.4 mL/min)。

1.2.5.3 EPS 的单糖组成 称取适量多糖样品,加入 1 mL 2 mol/L TFA 酸溶液,121 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h。通氮气,吹干。加入 99.99% 甲醇清洗,再吹干,重复甲醇清洗 2~3 次。加入无菌水溶解,转入色谱瓶中待测。采用 DionexTM CarboPacTM PA20(150×3.0 mm, 10 μm)液相色谱柱;进样量 5 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速: 0.5 mL/min;流动相: 流动相 A(H_2O),流动相 B(0.1 mol/L NaOH),流动相 C(0.1 mol/L NaOH, 0.2 mol/L NaAc),洗脱梯度如表 1 所示。

表 1 单糖组成洗脱梯度
Table 1 Monosaccharide composition elution gradients

洗脱时间(min)	V/V		
	流动相A	流动相B	流动相C
0	95	5	0
26	85	5	10
42	85	5	10
42.1	60	0	40
52	60	40	0
52.1	95	5	0
60	95	5	0

1.2.5.4 NMR 分析 分别称取 50.0 mg 的纯化多糖于离心管中,加入 0.6 mL 氘代 DMSO 充分溶解样品,取上清液置于核磁管中,在 Bruker 核磁共振分析仪中使用 600 MHz 的频率测定 EPS1 的 ^1H 、 ^{13}C 谱图。

1.2.5.5 三股螺旋结构的测定 参考 Chen 等^[23]的方法,稍作修改。取 1.5 mL 粗多糖及纯化多糖溶液(1 mg/mL)与 1.5 mL 刚果红溶液(100 $\mu\text{mol/L}$)按等体积比例混合,依次加入 0、0.16、0.33、0.75、1.28、2、3 mL 的 1 mol/L NaOH 溶液,将溶液浓度依次调节至 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L,在 400~700 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描,测定体系的最大吸收波长。实验设置以去离子水替代多糖溶液

的空白对照组,同时以具有三股螺旋结构的凝胶多糖作为阳性对照。

1.2.5.6 胞外多糖的扫描电子显微镜分析 利用扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)观察,取 5 mg EPS,将其置于已有导电胶的样品台上,真空环境下镀一层导电膜(金)后,采用 SEM 在 10 kV 的电压下观察表面结构。

1.2.6 乳酸菌胞外多糖体外抗氧化能力测定

1.2.6.1 ABTS⁺自由基清除能力的测定 根据 Hwang 等^[24]的方法并修改,取 20 μL EPS 溶液(0~10 mg/mL)与 180 μL ABTS 溶液在 96 孔板中混合,设为实验组;去离子水为空白对照组;pH7.4 的磷酸缓冲液为样品背景对照组;等浓度的 V_C 溶液与 ABTS 溶液混合,设为阳性对照组。将以上四组混合液配制完成后,放入酶标仪中,37 °C 振荡摇匀反应 6 min 后,测定 OD_{734 nm}。ABTS⁺自由基清除能力计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A₀: 空白对照组吸光值; A₁: 实验组吸光值; A₂: 样品背景组吸光值。

1.2.6.2 DPPH 自由基清除能力的测定 参考 Yong 等^[25]的方法并修改,在 96 孔板中加入等体积的不同浓度 EPS 溶液(0~10 mg/mL)以及 DPPH-乙醇溶液设为实验组,等体积去离子水为空白组,无水乙醇为样品背景对照组;将等浓度的 V_C 溶液与 DPPH-乙醇溶液混合,设为阳性对照组。将以上四组于暗处反应 0.5 h 后测定 OD_{517 nm}。DPPH 自由基清除能力依据以下公式计算:

$$\text{DPPH 自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A₀: 空白对照组吸光值; A₁: 实验组吸光值; A₂: 样品背景组吸光值。

1.2.6.3 羟自由基(·OH)清除能力的测定 参考 Wang 等^[26]的方法并修改,在 96 孔板中加入等体积(50 μL)的不同浓度的多糖溶液(0~10 mg/mL)、水杨酸乙醇溶液以及 FeSO₄ 溶液,将其充分混匀后加入等体积 H₂O₂ 溶液,在酶标仪中 37 °C 振荡 30 min 后测定吸光值。同时测定以 V_C 为阳性对照、不含多糖溶液的空白对照以及各浓度样品的背景对照(不含 H₂O₂)的吸光值,羟自由基清除能力按以下公式计算:

$$\text{羟自由基清除能力}(\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A₀: 空白对照组吸光值; A₂: 实验组吸光值; A₁: 样品背景组吸光值。

1.2.6.4 超氧阴离子(O₂^{-·})清除能力的测定 参考

Wang 等^[26]的方法并修改,取不同浓度的 EPS 溶液(0~10 mg/mL),按体积比 1:3 与 Tris-HCl 缓冲液在 96 孔板中混匀,于 30 °C 孵育 20 min。待体系恢复至室温后,加入 120 μL 邻苯三酚溶液,轻轻振荡使混合均匀,室温条件下反应 3 min,随后添加 10 mol/L HCl 溶液作为终止剂,终止反应进程。在 320 nm 波长处测定各孔吸光度(OD 值)。设置维生素 C(V_C)作为阳性对照,同时设立不含样品溶液的空白对照组以及不含邻苯三酚的样品背景组,用于背景校正和活性对比,超氧阴离子清除能力按照下列公式进行计算:

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{ 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: A₀: 空白对照组吸光值; A₁: 实验组吸光值; A₂: 样品背景组吸光值。

1.2.7 胞外多糖体外降血糖能力测定

1.2.7.1 抑制 α-葡萄糖苷酶能力的测定 参照文献[6]的方法并修改,将 α-葡萄糖苷酶溶液与样品溶液在 96 孔板中混匀后,于 37 °C 条件下预孵育处理,随后加入对硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)底物溶液,继续在 37 °C 环境中进行酶促反应。反应完成后,加入 Na₂CO₃ 溶液终止反应,以阿卡波糖为阳性对照,在 405 nm 波长处测定体系吸光值,α-葡萄糖苷酶抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(6)}$$

式中: A₂: 样品/阳性对照组 OD 值; A₁: 样品背景组 OD 值; A₀: 空白组 OD 值。

1.2.7.2 抑制 α-淀粉酶能力的测定 参照杨晓华等^[27]的方法并修改,在 2 mL 冻存管中将 PB、α-淀粉酶以及样品溶液混合后于 25 °C 水浴锅中孵育,再加入反应底物淀粉在 25 °C 反应,最后加入 DNS 进行显色反应,以阿卡波糖为阳性对照,测定 OD_{540 nm}。α-淀粉酶抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(7)}$$

式中: A₂: 样品/阳性对照组 OD 值; A₁: 样品背景组 OD 值; A₀: 空白组 OD 值。

1.3 数据处理

所有测定结果均重复三次,数据用平均值±标准差表示,单因素方差分析利用 SPSS26.0 软件进行, P<0.05 则表示具有显著差异,利用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 高产胞外多糖菌株筛选及培养基优化

2.1.1 高产胞外多糖菌株筛选 通过对实验室前期分离的 185 株乳酸菌的胞外多糖产量进行分析,由图 1 及表 2 综合分析可知,不同乳酸菌胞外多糖

的产量不同,胞外多糖产量在 104.97~310.41 mg/L 范围内,其中发酵乳杆菌 197(*Limosilactobacillus fermentum* 197, 菌株编号 125)胞外多糖产量可达 310.41±1.22 mg/L。Liu 等^[28]发现 5 株西藏开菲尔粒源、高产 EPS 植物乳杆菌产胞外多糖范围为 100~125 mg/L,其中植物乳杆菌 GSLP-7 产量最高,为 125.2 mg/L,略低于菌株 197 的产量;而在檀茜倩等^[29]从泡菜中筛选出一株高产胞外多糖乳酸菌 *L. plantarum* PC715,其 EPS 产量最高为 870 mg/L,高于菌株 197。因此确定发酵乳杆菌 197 EPS 产量在合理范围内,可作为后续研究的目标菌株。

2.1.2 高产胞外多糖菌株培养基优化 氮源作为微生物维持生命活动不可或缺的营养物质,通过影响

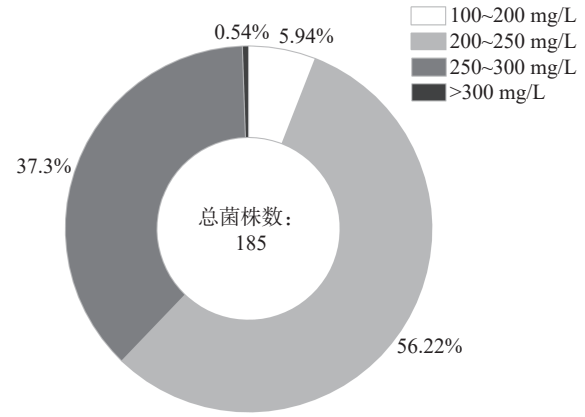


图1 185株乳酸菌胞外多糖产量分布

Fig.1 Distribution of the production of exopolysaccharides by 185 lactic acid bacteria strains

表2 各菌株胞外多糖产量

Table 2 Exopolysaccharide yields of different experimental strains

菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)	菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)	菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)	菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)
1	186.99±6.91	48	260.27±3.08	95	255.08±5.51	142	236.93±2.12
2	188.72±10.71	49	228.58±5.20	96	268.05±1.22	143	180.46±5.01
3	210.11±8.52	50	266.90±3.89	97	260.85±9.18	144	229.15±1.22
4	202.33±3.82	51	293.41±4.70	98	299.74±4.14	145	197.17±1.87
5	224.81±6.81	52	283.32±4.14	99	226.56±4.94	146	223.96±7.44
6	202.33±3.82	53	210.71±2.94	100	234.33±10.18	147	232.61±1.87
7	205.79±2.14	54	261.99±3.93	101	225.12±6.00	148	230.02±4.94
8	216.16±22.32	55	220.22±4.48	102	272.66±4.14	149	196.88±0.81
9	198.88±8.47	56	143.86±2.67	103	278.71±3.34	150	259.12±6.17
10	218.33±7.71	57	104.97±2.04	104	280.15±4.94	151	225.11±2.48
11	219.84±15.60	58	239.24±5.75	105	291.10±1.78	152	245.29±3.26
12	249.01±0.65	59	244.71±3.08	106	244.99±1.08	153	247.59±8.36
13	238.64±0.53	60	234.05±7.81	107	253.64±10.78	154	251.05±14.69
14	263.71±2.92	61	231.75±4.23	108	230.59±4.14	155	255.37±2.85
15	242.1±9.29	62	234.34±4.94	109	257.39±4.70	156	224.83±2.54
16	245.12±2.95	63	251.91±4.14	110	211.86±3.23	157	225.69±6.81
17	249.66±7.90	64	253.93±6.96	111	265.46±2.54	158	246.44±2.12
18	256.39±16.02	65	280.15±2.12	112	232.90±2.48	159	248.17±6.81
19	228.48±10.93	66	247.88±4.70	113	272.08±1.63	160	212.15±2.67
20	231.72±4.04	67	230.59±2.48	114	242.41±4.14	161	215.03±9.58
21	230.856±31.21	68	259.69±4.25	115	234.91±2.67	162	260.84±0.41
22	230.64±7.75	69	261.13±3.73	116	255.66±6.08	163	201.20±4.70
23	232.37±10.24	70	251.62±2.54	117	211.86±1.87	164	237.22±3.26
24	237.34±5.97	71	270.07±7.74	118	243.56±2.94	165	241.25±7.44
25	216.60±6.92	72	264.59±9.26	119	233.76±9.10	166	275.54±2.67
26	234.75±4.61	73	258.83±4.59	120	254.22±4.94	167	225.69±4.94
27	223.73±5.37	74	252.20±8.94	121	265.74±6.40	168	213.30±4.70
28	242.11±1.87	75	249.61±3.89	122	270.35±7.81	169	213.30±4.70
29	168.62±0.53	76	251.05±4.96	123	238.37±1.47	170	227.13±4.07
30	225.67±3.47	77	231.17±8.42	124	274.68±3.34	171	257.68±2.54
31	233.02±8.41	78	253.64±3.48	125	310.41±1.22	172	253.07±5.20
32	287.48±4.79	79	253.35±19.42	126	232.03±2.16	173	258.54±4.63
33	243.82±8.01	80	239.81±7.87	127	251.63±1.22	174	215.89±4.31
34	223.08±13.75	81	258.54±5.51	128	270.64±2.54	175	241.83±4.14
35	229.56±1.59	82	259.10±6.85	129	237.22±4.70	176	259.69±0.81
36	244.47±3.71	83	238.08±3.89	130	241.25±2.12	177	255.37±8.15
37	233.67±2.72	84	234.33±11.62	131	282.17±4.25	178	237.51±2.94
38	158.25±1.94	85	259.98±4.01	132	295.99±4.70	179	253.93±1.47
39	216.6±3.24	86	219.06±1.63	133	236.35±5.70	180	220.51±3.08
40	231.51±7.90	87	226.27±6.85	134	256.24±1.47	181	222.81±11.17
41	223.97±4.89	88	282.74±8.56	135	269.49±10.71	182	223.97±6.47
42	231.17±2.85	89	281.88±1.87	136	256.24±1.08	183	234.34±8.82

续表 2

菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)	菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)	菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)	菌株编号	胞外多糖产量(mg/L)
43	233.47±6.11	90	249.03±6.95	137	257.68±8.56	184	228.57±1.08
44	274.68±3.48	91	270.07±0.81	138	255.08±3.23	185	221.08±3.62
45	266.61±5.66	92	238.08±0.81	139	237.79±2.44		
46	205.81±0.71	93	283.03±13.34	140	255.37±10.94		
47	212.44±1.63	94	240.68±4.59	141	239.81±5.88		

EPS 相关酶的活性, 来影响 EPS 的产量^[30]。而碳源是乳酸菌生长所必需的营养和能量来源, 其种类和浓度对乳酸菌细胞外多糖的合成和单糖组成有重要影响^[31]。由图 2 可知, 大豆蛋白胨作为氮源时, EPS 产量显著高于其他氮源($P<0.05$), 且碳源为葡萄糖时, EPS 产量在大豆蛋白胨浓度为 40 g/L 时达到峰值, 为 1238.3 mg/L, 较未优化时增长约 2.43 倍。然而, 当浓度增至 50 g/L 时, EPS 产量未显著增加, 这可能是高浓度氮源可能抑制菌株生长和 EPS 合成。在碳源方面, 麦芽糖表现出最佳效果, 分析图 3 可知, EPS 产量达 542.49±1.43 mg/L, 且在最佳氮源及最适浓度时, EPS 产量在麦芽糖浓度 40 g/L 时达到最高, 为 1699.83 mg/L, 较未优化时增长至少 1.72 倍。浓度升至 50 g/L 时, EPS 产量显著下降($P<0.05$), 这可能是由于高浓度碳源产生的渗透压抑制了菌株的生长和 EPS 合成。

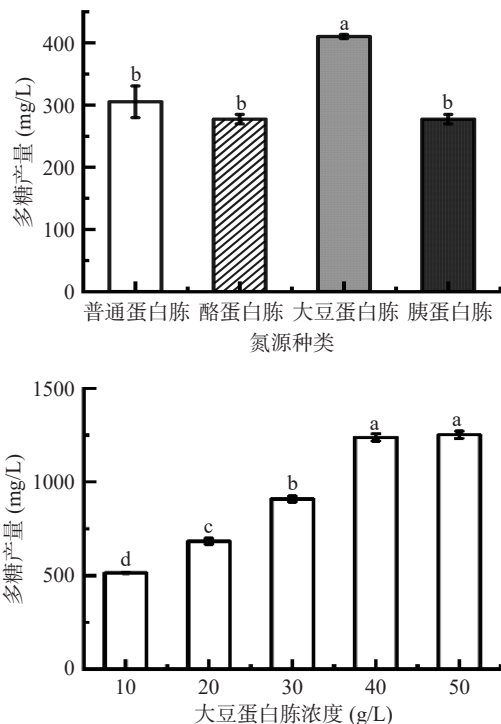


图 2 氮源最适种类及浓度筛选

Fig.2 Screening for optimal type and concentration of nitrogen source

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 图 3、图 13~图 18 同。

综上, 确定最佳氮源和碳源分别为大豆蛋白胨和麦芽糖, 两者最适浓度均为 40 g/L, 与优化前相比产量提高了 5 倍, 至 1699.83 mg/L。

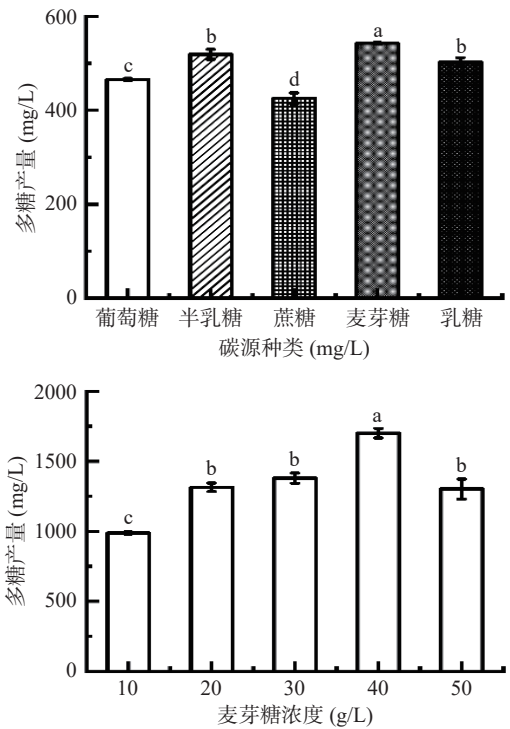


图 3 碳源最适种类及浓度筛选

Fig.3 Screening for optimal type and concentration of carbon source

2.2 乳酸菌胞外多糖的分离纯化及化学成分研究

2.2.1 乳酸菌胞外多糖的分离纯化 采用优化后的培养基培养发酵乳杆菌 197, 得到胞外多糖粗品 EPS。如图 4A 所示, 粗 EPS 经 DEAE-52 纤维素柱分离出四个组分, 分别命名为 EPS1(15.07%)、EPS2(3.46%)、EPS3(4.3%)和 EPS4(2.49%)。由于 EPS2、EPS3、EPS4 的得率较低难以富集, 因此选用 EPS1 组分进行后续研究。

将 EPS1 经过琼脂糖凝胶 CL-6B 洗脱并绘制其洗脱曲线, 结果如图 4B, 其洗脱曲线为单一峰且较为对称, 说明 EPS1 组分为单一组分, 其得率为 15.64%。将纯化后的组分进行冻干, 得到成品。由于 EPS1 是由去离子水洗下的组分, 因此该组分不带电荷为中性多糖。

2.2.2 乳酸菌胞外多糖化学成分的研究 对粗多糖 EPS 及其纯化组分 EPS1 的化学组成分析结果表明, 二者在多项指标上存在显著差异, 其原因主要源于纯化过程对多糖组分的选择性富集与杂质去除。

由表 3、图 5 可知, 粗多糖 EPS 为深褐色粉末, 其总糖含量为 49.44%±2.96%, 蛋白含量较多, 为 9.57%±1.38%, 而纯化后多糖 EPS1 为白色絮状物,

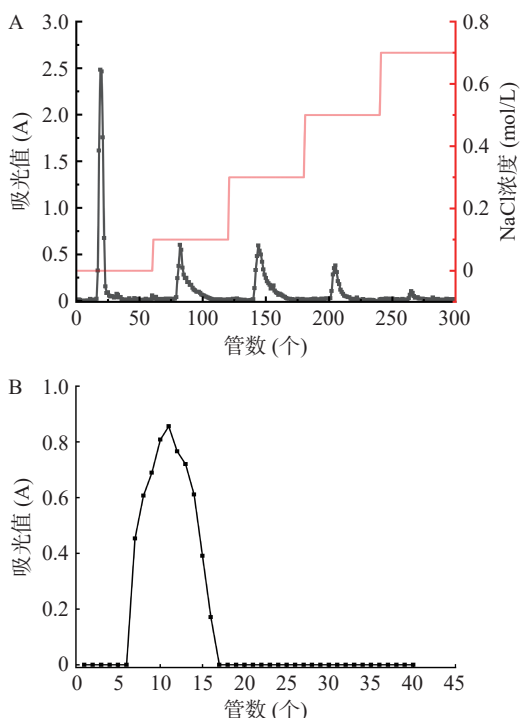


图4 纤维素 DEAE-52(A)及琼脂糖凝胶 CL-6B(B)洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of cellulose DEAE-52 (A) and agarose gel CL-6B (B)

注: A: 纤维素 DEAE-52 洗脱曲线, B: 琼脂糖凝胶 CL-6B 洗脱曲线。

表3 胞外多糖 EPS 和 EPS1 的理化性质

Table 3 Physicochemical properties of EPS and EPS1

项目	EPS	EPS1
物理形态	粉末	絮状
颜色	棕褐色	白色
总糖含量(%)	49.44±2.96	73.66±3.47
蛋白含量(%)	9.57±1.38	1.21±0.16
糖醛酸(%)	6.01±1.05	6.97±0.56
硫酸根(%)	7.57±1.52	4.81±1.63

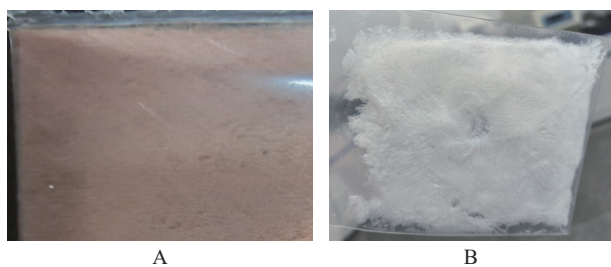


图5 粗 EPS 及经琼脂糖凝胶纯化后得到的 EPS1

Fig.5 Crude EPS product and fractions of EPS1 purified by agarose gel

注: A: 粗 EPS, B: 经琼脂糖凝胶纯化后得到的 EPS1。

其总糖含量上升至 73.66%±3.47%，蛋白含量降低至 1.21%±0.16%，张日馨^[32]研究四株植物乳杆菌胞外多糖的化学组成，其蛋白含量均在 1% 左右，与本文结果相似，说明经过纯化后胞外多糖蛋白质已基本脱除，总糖含量较高。此外，粗多糖 EPS 的糖醛酸和硫

酸根含量分别为 6.01%±1.05% 和 7.57%±1.52%，纯化后，糖醛酸含量上升至 6.97%±0.56%，硫酸根含量降低为 4.81%±1.63%，硫酸根水平的变化可能与纯化过程中部分硫酸化多糖组分的流失或分级效应有关。刘明超等^[33]测定一株植物乳杆菌 NM18 胞外多糖硫酸根含量时发现，大部分多糖组分硫酸根含量在 1% 以下时，有一个组分硫酸根含量可达 6.3%，可见不同多糖以及同一多糖的不同组分之间的硫酸根含量差异较大。因此，纯化后组分 EPS1 在颜色、总糖、蛋白及硫酸根含量方面的变化，主要是由于纯化步骤去除了蛋白质、色素及部分硫酸化多糖，从而提高了多糖的化学纯度和组成一致性。

2.2.3 紫外全波长扫描 利用紫外全波长扫描可以测定样品中是否存在蛋白以及核酸等杂质。粗多糖 EPS 和纯化组分 EPS1 的紫外扫描结果如图 6 所示，可以看出粗多糖在 280 nm 处出现明显的吸收峰，而纯化多糖 EPS1 在 280 nm 处无明显吸收峰，说明粗多糖蛋白质含量比纯化后多糖 EPS1 较高。同时粗多糖 EPS 与纯化多糖 EPS1 在 260 nm 处均未出现明显的吸收峰，说明两者均不含核酸，此结果与 2.2.2 的结果相互印证。综上可以看出，经纤维素 DEAE-52 和琼脂糖凝胶 CL-6B 纯化后的多糖纯度较高。

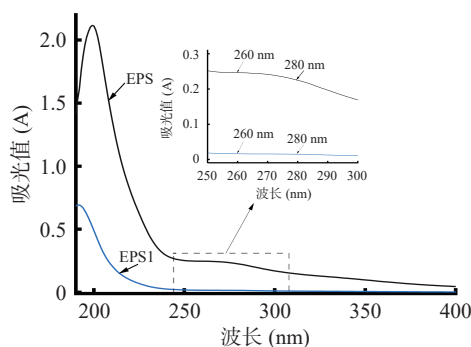


图6 紫外全波长扫描

Fig.6 UV full-wavelength scan

2.3 乳酸菌胞外多糖 EPS1 结构分析

2.3.1 EPS1 红外光谱结果分析 采用傅里叶变换红外光谱对 EPS1 中化学键和官能团进行初步分析，结果如图 7，EPS1 在 3300 cm⁻¹ 处出现的吸收峰代表

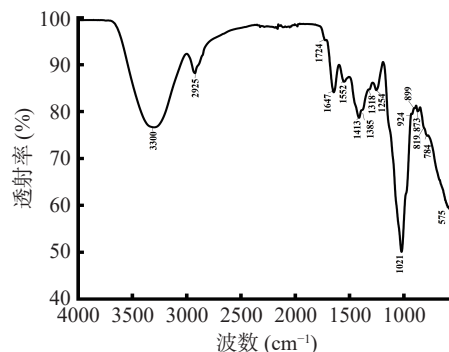


图7 EPS1 的红外光谱图

Fig.7 Fourier-transform infrared spectroscopy of EPS1

其分子内存在 O-H 键,即分子内存在大量羟基; 1021 cm^{-1} 处出现的强吸收峰是由于 C-O-H 和糖链中的 C-O-C 发生伸缩振动而引起的,且 1200~1000 cm^{-1} 为吡喃糖环的特征吸收带,说明 EPS1 分子内存在 C-O-C 键构型及大量的吡喃糖环^[34]; 2925 cm^{-1} 的吸收峰表示其分子内存在 C-H 的振动; 1318 cm^{-1} 和 1385 cm^{-1} 处的吸收峰是由于 O-H 发生变形振动和 C-O 发生伸缩变化而形成的,说明 EPS1 分子内可能存在这两种化学键。以上均为多糖类物质在红外光谱中的特征吸收峰。同时, EPS1 在 1254 cm^{-1} 处存在 O=S=O 的红外特征吸收峰,因此可以推断 EPS1 中存在硫酸基团; 在 1724 cm^{-1} 处出现的吸收谱带表明 EPS1 中含有未被酯化的糖醛酸结构,而 1413 cm^{-1} 处的吸收峰对应糖醛酸羧基的对称伸缩振动,二者形成相互佐证; 1552 cm^{-1} 位置的吸收特征归属于 N-H 基团(酰胺结构)的振动特性,说明 EPS1 中可能存在少量的蛋白质,以上结果与前期对 EPS1 化学成分测定结果相符; EPS1 在 1647 cm^{-1} 处存在吸收峰,其表示的是非对称的 C=O 伸缩峰(存在于乙酰氨基中),说明 EPS1 中存在乙酰氨基。此外 EPS1 在 924 cm^{-1} 和 819 cm^{-1} 处存在微弱的吸收峰,可以推断 EPS1 中同时存在 α 和 β 糖苷键^[35]。

2.3.2 EPS1 分子量分析 EPS1 的分子量测定如图 8 所示,LS 指的是多角度激光光散射检测信号,其散射光强度与物质的分子尺寸及分子量呈正相关关系; RI 作为示差信号,其响应信号强度受柱后流出液折射率变化的影响,与物质类型、溶液浓度及分子量等因素均相关。由图 8 可知, EPS1 为均一分布的单一多糖,与琼脂糖凝胶 CL-6B 结果相互印证,同时通过计算得出 EPS1 重均分子质量 (M_w) 为 2.11×10^5 Da, 其数均分子量 (M_n) 为 6.79×10^4 Da, 其分散系数 (PDI, M_w/M_n) 为 3.11。有研究表明,嗜热链球菌 IMAU20756 的 EPS1a 的 PDI 值为 2.902, 与本实验结果相似^[36], 但与之相比本实验 EPS1 分子量分布较宽。

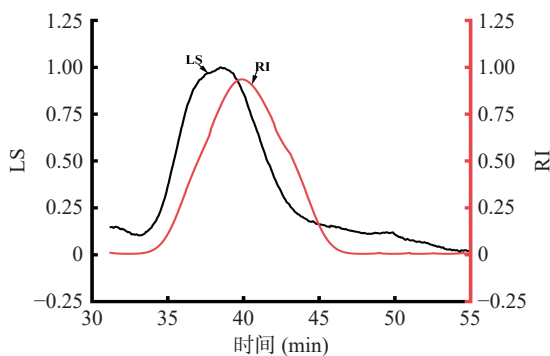


图 8 EPS1 的分子量测定图
Fig.8 Molecular sizing diagram of EPS1

2.3.3 EPS1 单糖组成分析 EPS1 的单糖组成如图 9 及表 4 所示, EPS1 共由 7 种单糖组成分别为岩

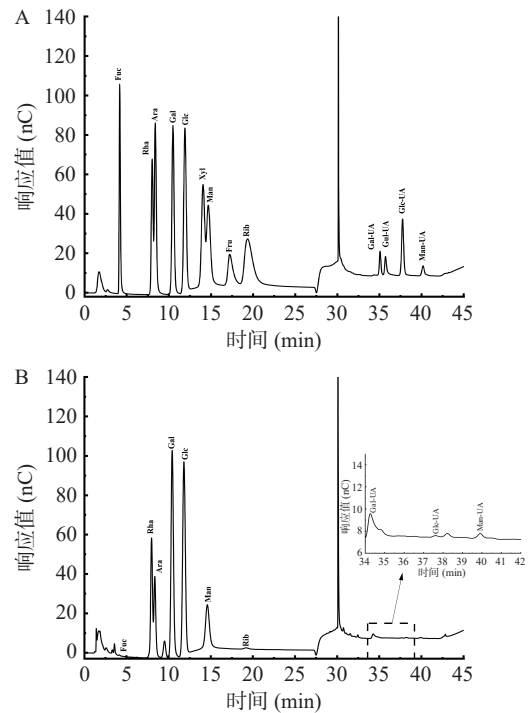


图 9 混标及 EPS1 离子色谱图
Fig.9 Mixed label and EPS1 ion chromatogram
注: A: 混标, B: EPS1。

表 4 EPS1 单糖组成(摩尔比)

单糖种类	摩尔比
岩藻糖(Fuc)	0.15
鼠李糖(Rha)	11.22
阿拉伯糖(Ara)	6.06
半乳糖(Gal)	14.65
葡萄糖(Glc)	13.73
甘露糖(Man)	8.39
核糖(Rib)	0.95
半乳糖醛酸(Gal-UA)	0.88
葡萄糖醛酸(Glc-UA)	0.37
甘露糖醛酸(Man-UA)	1.10

藻糖(Fuc)、鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、核糖(Rib), 其占比分别为 0.25%、18.42%、9.1%、26.39%、24.73%、15.12%、1.43%, 由此可以看出 EPS1 为一种杂多糖^[37], 主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成, 此五种多糖共占总糖的 95.46%, 与 Liu 等^[28] 提取出的 *L. plantarum* EPS 单糖组成类似, 可见 EPS1 的骨架结构可能是由上述五种糖组成, 岩藻糖和核糖含量较低可能分布在 EPS1 的侧链中。同时在测定单糖时, 测定出少量的半乳糖醛酸(Gal-UA)、葡萄糖醛酸(Glc-UA)以及甘露糖醛酸(Man-UA), 其比例分别为 1.70%、0.72% 和 2.13%, 这与 2.2.2 测定 EPS1 中含有糖醛酸相互印证。

2.3.4 NMR 结果分析 EPS1 的核磁共振氢谱如图 10A 所示, 其中 $\delta 2.55$ ppm 和 $\delta 3.3$ ppm 附近的 5 重峰和单峰分别为氘代 DMSO 峰和水峰, 根据氘

代 DMSO 的 5 重峰最高峰进行定标, 调整 EPS1 ¹H NMR 谱图后进行分析。EPS1 在低场区 4.3~5.9 ppm 化学位移范围内有明显的化学信号, 其中化学位移高于 5 ppm 的信号(δ4.86 和 4.82 ppm 等)归属于 α-糖苷构型糖环的异头氢, δ4.67 和 4.52 ppm 归属于 β-糖苷键构型糖环的异头氢。此外处于高场区中的核磁信号在 δ1.11、1.23、1.32 以及 1.35 ppm 处存在, 可以推断为甲基或亚甲基的信号峰, 根据文献判断^[38], 前两处分别归属于葡萄糖甲基及鼠李糖甲基上的 H。

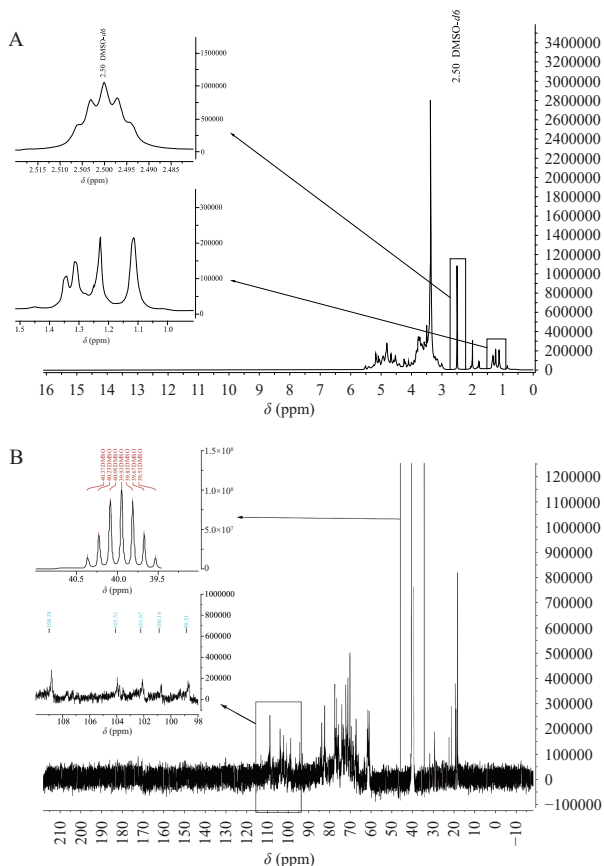


图 10 EPS1 核磁共振谱图

Fig.10 NMR spectrum of EPS1

注: A: EPS1 核磁共振¹H 谱图, B: EPS1 核磁共振¹³C 谱图。

EPS1 的 ¹³C NMR 图如图 10B 所示。EPS1 在 98.31、100.14、101.67、103.53 和 108.38 ppm 处具有信号, 说明 EPS1 结构中含有 5 种不同类型的糖苷键, 其中三个为 α 构型(98.31、100.14 和 101.67 ppm), 两个为 β 构型(103.53 和 108.38 ppm)。EPS1 在 82~84 ppm 和 60~80 ppm 之间有信号出现, 说明 EPS1 结构中同时具有呋喃糖和吡喃糖结构^[6], 这与单糖组成中存在阿拉伯糖的结果相符。在高场区 15~20 ppm 化学位移范围内的信号, 根据文献及书本记载推断为鼠李糖 C6 的信号。

综上, 从 1D NMR ¹H 谱和 ¹³C 谱高场区中可以看出五个明显的吸收峰, 通过化学位移可以判断出 EPS1 中同时存在 α 和 β 构型的组分, 且由七个不同糖苷键的单糖组分连接。

2.3.5 三股螺旋结构分析 研究表明, 许多具有三股螺旋结构的多糖具有不同的健康益处, 包括抗癌、免疫调节和抗氧化活性^[39], 因此对 EPS1 是否具有三股螺旋结构进行研究。图 11 为样品溶液与对照组溶液在不同浓度 NaOH 溶液中紫外最大吸收波长变化图。由图可知, 具有三股螺旋结构的凝胶多糖和 EPS1 溶液在不同浓度的 NaOH 溶液中最大吸收波长先出现红移, 随着 NaOH 浓度的继续增大, 其最大吸收波长逐渐下降最后趋于稳定, 但远高于空白组刚果红溶液的最大吸收波长。目前虽然还没有基于刚果红法确定多糖三股螺旋结构的具体标准, 但有研究表明, 当 NaOH 浓度为零时, 刚果红与多糖的简单混合不会改变刚果红的 λ_{max}。然而, 在低 NaOH 浓度下, λ_{max} 急剧增加, 这表明需要低浓度的 NaOH 来形成刚果红与三股螺旋多糖之间的复合物^[40]。Numata 等^[41]报道了 β-(1→3)-D-葡聚糖和刚果红多糖复合物的形成需要高 pH(NaOH), 因此 EPS1 中可能存在三股螺旋结构, 但还需经过其他手段进行验证。

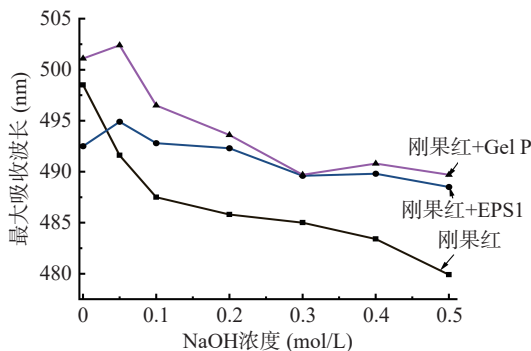


图 11 EPS1 三股螺旋结构

Fig.11 Three-dimensional spiral structure of EPS1

2.3.6 扫描电镜结果分析 图 12 为 EPS1 的 SEM 图片, 在低倍数(1000×)下可以看出 EPS1 呈现出致密的多孔片状结构, 高孔隙率可以让多糖分子中的羟基暴露出来, 使胞外多糖结合水的能力增强并使其具有良好的保水性^[42]; 当它被继续放大(5000×或 20000×)时, 可以发现片状结构表面具有大量紧密接触的褶皱, 这使得其具有作为可降解增塑膜原料的潜力^[43]。

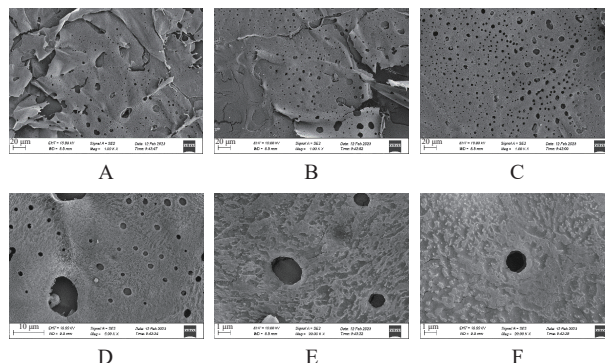


图 12 EPS1 的扫描电镜图

Fig.12 SEM of EPS1

注: A、B、C: 1000×; D、E、F: 20000×。

2.4 乳酸菌胞外多糖 EPS1 体外生理活性分析

2.4.1 体外抗氧化活性研究

2.4.1.1 ABTS⁺自由基清除能力 ABTS 测定法在生物活性化合物、食品和药物的研究中有着广泛的应用,其反映样品提供氢原子或电子以中和自由基、中断氧化链反应的能力。由图 13 可以看出在实验范围内,ABTS⁺自由基清除率与多糖浓度呈正相关,当浓度在 0~10 mg/mL 时,清除率均出现了出现较为显著的提升,当浓度达到 10 mg/mL 时,其清除率可以达到 57.07%,相同浓度下 V_C 的 ABTS⁺自由基清除能力为 99.53%。经过 IC₅₀ Calculator 的计算, EPS1 的清除 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 值为 7.91 mg/mL,与 Xu 等^[44] 研究结果一致。

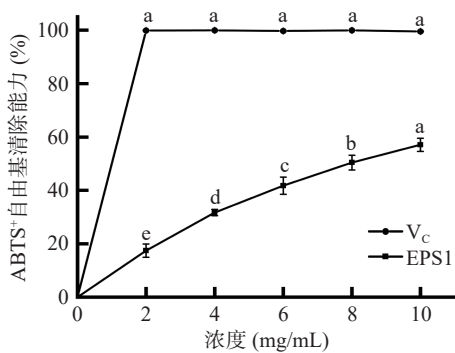


图 13 EPS1 的 ABTS⁺自由基清除能力
Fig.13 ABTS⁺ radical scavenging activity of EPS1

2.4.1.2 DPPH 自由基清除能力 DPPH 自由基清除能力是评价物质体外抗氧化活性的常用指标,其反映样品提供氢原子或电子以中和自由基的能力。多糖的 DPPH 自由基清除活性通常归因于其结构中的活性羟基及其他还原性基团,可通过氢转移机制终止自由基链反应^[45]。由图 14 可以看出, DPPH 自由基的清除率与 EPS1 的浓度呈剂量效应关系,当浓度达到 10 mg/mL 时,其清除率为 46.54%,小于相同浓度下 V_C 清除 DPPH 自由基的能力(99.66%),这与 Inanan 等^[3] 研究结果类似,经过 IC₅₀ Calculator 的计算, EPS1 的清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 10.6 mg/mL,该结果与 ABTS 测定结果呈正相关,与文献 [46] 报道结果一致。

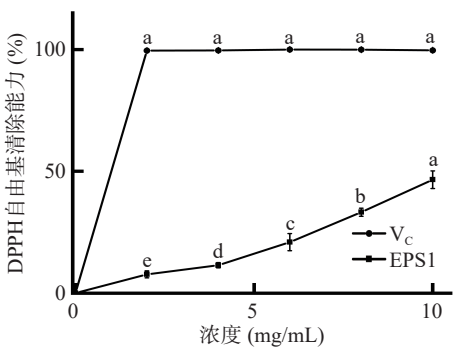


图 14 EPS1 的 DPPH 自由基清除能力
Fig.14 DPPH radical scavenging activity of EPS1

2.4.1.3 羟基自由基清除能力 ·OH 是活性极强的一种自由基,可引发脂质、蛋白质及 DNA 氧化损伤,其清除能力是评价样品抗氧化活性的重要指标。由图 15 可以看出在实验范围内,羟自由基的清除率与多糖浓度呈正相关,且当浓度达到 10 mg/mL 时,其清除率为 49.68%,但小于相同浓度下 V_C 羟自由基的清除能力(99.94%)。经过 IC₅₀ Calculator 的计算, EPS1 的清除羟自由基的 IC₅₀ 值为 10.19 mg/mL。尽管 EPS1 清除效果低于相同浓度下的阳性对照 V_C(清除率 99.94%),但与部分已报道的微生物胞外多糖相比仍具有一定的抗氧化潜力^[47]。结果表明, EPS1 具有一定的·OH 清除能力,可作为天然抗氧化剂进一步研究,但其效率较合成抗氧化剂仍有差距。

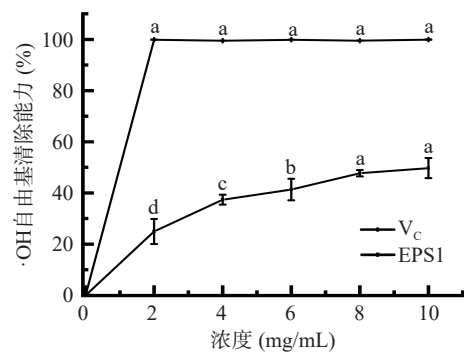


图 15 EPS1 的羟基自由基清除活性
Fig.15 Hydroxyl radical scavenging activity of EPS1

2.4.1.4 超氧阴离子(O₂^{-·})清除能力 超氧阴离子是生物体内一类重要的活性氧自由基,介导氧化应激及其相关损伤级联反应,其清除效能是评估样品抗氧化活性的常用指标^[48]。由图 16 可以看出在实验范围内,当 EPS1 浓度在 2~4 mg/mL 区间时, O₂^{-·} 的清除率出现较明显上升;随浓度继续增加,清除率增长趋缓。在最高实验浓度下,其对 O₂^{-·} 的清除率为 11.41%,与相同浓度下 V_C 的 O₂^{-·} 清除率(99.89%)相比,其对 O₂^{-·} 的清除能力较弱,这可能归因于 EPS1 是一种中性多糖,还原端有限且无带电基团。李尧等^[49] 研究发现乳酸片球菌 C6 的胞外多糖对 O₂^{-·} 的清除率均较低,清除率均不高于 20%,与本文研究结果相似。

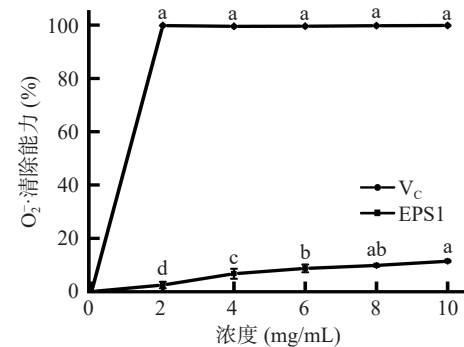


图 16 EPS1 的超氧阴离子自由基清除活性
Fig.16 Superoxide anion radical scavenging activity of EPS1

2.4.2 体外降血糖活性研究

2.4.2.1 EPS1 对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力 维持血糖在正常水平内的最新的方法之一是抑制 α -葡萄糖苷酶活性。 α -葡萄糖苷酶通过在人体小肠中将碳水化合物水解为葡萄糖和单体糖来帮助消化^[50]。由图 17 可以看出在本实验浓度范围(0~10 mg/mL)内,胞外多糖 EPS 对 α -葡萄糖苷酶均表现出抑制效果,且抑制率随多糖浓度增加而逐渐提高。在 0~2 mg/mL 范围内抑制率上升显著;随着浓度进一步增加,抑制效果虽仍保持上升趋势,但增幅逐渐趋缓。当浓度达到 10 mg/mL 时,抑制率为 26.25%。多糖类物质对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用可能与其通过空间位阻、氢键或疏水作用与酶活性中心结合,阻碍底物-酶相互作用有关^[51]。EPS1 抑制能力虽显著低于相同浓度下的阳性对照阿卡波糖,但略高于同等浓度的 *Lactobacillus sakei* Probio 65 所产胞外多糖的抑制效果^[52]。结果表明,EPS1 具备一定的 α -葡萄糖苷酶抑制潜力,在功能性食品应用中可能具有开发价值,但仍需进一步结构优化或组合使用以提高效能。

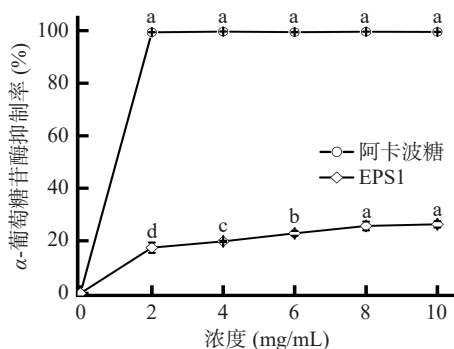


图 17 阳性对照以及各浓度梯度 EPS1 的 α -葡萄糖苷酶抑制率

Fig.17 α -Glucosidase inhibition rate of positive control and each concentration gradient of EPS1 at different concentration gradients

2.4.2.2 EPS1 对 α -淀粉酶的抑制能力 α -淀粉酶抑制率是评价降血糖活性的重要指标,其抑制能力越强,表明延缓碳水化合物消化吸收的潜力越大。如图 18 所示,在 0~10 mg/mL 内,阳性对照阿卡波糖对 α -淀粉酶的抑制率随浓度升高呈明显上升趋势;当浓度达到 10 mg/mL 时,其抑制率高达 99.71%,在相同浓度条件下,本研究所得胞外多糖 EPS 对 α -淀粉酶也表现出一定的抑制效果,抑制率最高可达 51.46%,说明其具备体外降血糖潜能。多糖类物质对 α -淀粉酶的抑制作用可能与其通过氢键、疏水作用等与酶活性中心结合,阻碍底物接触有关^[7]。与阿卡波糖相比,EPS 的抑制能力仍相对较弱。该结果与已有研究中多数天然多糖的抑制水平相一致^[53],表明其虽不具备药物级强抑制作用,但作为天然产物仍具有一定的功能食品开发价值。

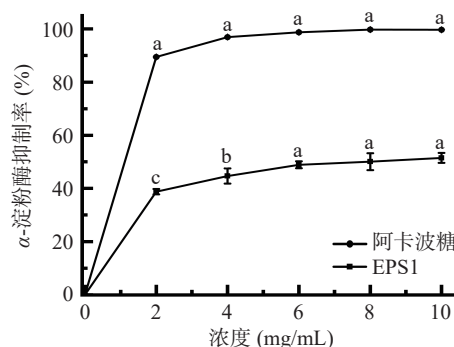


图 18 阳性对照以及各浓度梯度 EPS1 的 α -淀粉酶抑制率

Fig.18 α -Amylase inhibition rate of positive control and each concentration gradient of EPS1 at different concentration gradients

3 结论

本研究从传统牦牛酸乳源的 185 株乳酸菌中筛选出一株高产 EPS 的发酵乳杆菌 197(*Limosilactobacillus fermentum* 197),其 EPS 产量为 310.41 ± 1.22 mg/L。通过发酵培养基组分的优化,产量提高至 1699.83 mg/L;经提取与纯化后,得到一种平均分子量为 2.11×10^5 Da 的中性杂多糖 EPS1,得率为 15.07%,主要由鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖组成。结构初步分析表明,EPS1 同时含有 α 和 β 型糖苷键,并可能具备三股螺旋构型;其微观结构呈片状多孔形态,推测其在可生物降解膜材料中具备应用潜力。在体外活性方面,EPS1 表现出良好的抗氧化能力,在 10 mg/mL 浓度下对 ABTS⁺、DPPH·及·OH 的清除率分别为 57.07%、46.54% 和 49.68%,但对 O₂⁻ 的清除效果较弱(11.41%)。同时,EPS1 显示出一定的降血糖潜力,在同一浓度下对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率分别为 26.25% 和 51.46%。

本研究发现牦牛酸乳源发酵乳杆菌 197 所产多糖 EPS1 具有良好的抗氧化活性及降血糖能力,丰富了对传统发酵乳源乳酸菌多糖的功能性认知,为牦牛酸乳源乳酸菌 EPS 的工业化发酵与利用提供了理论依据,也为高附加值功能性食品材料的开发提供了新思路。然而,EPS1 的体内活性机制、构效关系及实际应用性能仍需进一步研究,后续工作应聚焦于其结构精细解析、体内实验验证及在食品体系中的应用效果评价。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] ABEDIN M M, CHOURASIA R, PHUKON L C, et al. Lactic acid bacteria in the functional food industry: Biotechnological properties and potential applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(29): 10730-10748.
- [2] 尹树磊,杜香,张小希,等. 乳酸菌抗氧化机制研究进展及在

- 食品领域的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(13): 345–355. [YIN S L, DU X, ZHANG X X, et al. Research progress in the antioxidant mechanism of lactic acid bacteria and its application in the food field[J]. Food Science, 2024, 45(13): 345–355.]
- [3] İNANAN T, ÖNAL D D, KARADUMAN Y T, et al. Structural characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* ACS5 exopolysaccharide in association with its antioxidant and antidiabetic activity *in vitro*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280: 136148.
- [4] ZHANG J, XIAO Y, WANG H, et al. Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure-function relationship[J]. Microbiological Research, 2023, 274: 127432.
- [5] QAYYUM N, HAN H Y, ISMAEL M, et al. *In vitro* assessment of antioxidant, antidiabetic, and cholesterol-modulating abilities of lactic acid bacteria: Implications for metabolic health and functional foods[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 103952.
- [6] WANG J B, YU L Y, ZENG X, et al. Screening of probiotics with efficient α -glucosidase inhibitory ability and study on the structure and function of its extracellular polysaccharide[J]. Food Bioscience, 2022, 45: 101452.
- [7] ZHANG L, LI Z, KONG H, et al. Advances in microbial exopolysaccharides as α -amylase inhibitors; Effects, structure-activity relationships, and anti-diabetic effects *in vivo*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 281: 136174.
- [8] TIWARI S, KAVITAKE D, SURYAVANSHI M V, et al. An expanding frontier in prebiotic research and synbiotic functional food development through exopolysaccharides from probiotic bacteria[J]. Food and Humanity, 2024, 3: 100436.
- [9] 陈孝勇. 传统发酵牦牛酸乳中改善肠道功能乳酸菌的筛选与评价[D]. 重庆: 西南大学, 2017. [CHEN X Y. Screening and evaluation of lactic acid bacteria improving intestinal function in traditional fermented yak yogurt[D]. Chongqing: Southwest University, 2017.]
- [10] SINGH T P, ARORA S, SARKAR M. Yak milk and milk products: Functional, bioactive constituents and therapeutic potential[J]. International Dairy Journal, 2023, 142: 105637.
- [11] 孙思雨, 陈炼红, 王琳琳. 应用 Illumina Miseq 测序分析川西高原传统牦牛发酵酸奶中细菌多样性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 98–103. [SUN S Y, CHEN L H, WANG L L. Analysis of bacterial diversity in traditional yak fermented yogurt on the western sichuan plateau by illumina miseq sequencing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(23): 98–103.]
- [12] PRASAD S, PUROHIT S R. Microbial exopolysaccharide: Sources, stress conditions, properties and application in food and environment: A comprehensive review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 124925.
- [13] CAO F, LIANG M, LIU J, et al. Characterization of an exopolysaccharide (EPS-3A) produced by *Streptococcus thermophilus* ZJUIDS-2-01 isolated from traditional yak yogurt[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 192: 1331–1343.
- [14] SEO K-H, GYU L H, YOUNG E J, et al. Effects of kefir lactic acid bacteria-derived postbiotic components on high fat diet-induced gut microbiota and obesity[J]. Food Research International, 2022, 157: 111445.
- [15] TANG X J, LIU N, HUANG W N, et al. Syneresis rate, water distribution, and microstructure of wheat starch gel during freeze-thaw process: Role of a high molecular weight dextran produced by *Weissella confusa* QS813 from traditional sourdough[J]. Cereal Chemistry, 2018, 95(1): 117–129.
- [16] YANG S, TAO Y, MAIMAITI X, et al. Investigation on the exopolysaccharide production from blueberry juice fermented with lactic acid bacteria: Optimization, fermentation characteristics and Vis-NIR spectral model[J]. Food Chemistry, 2024, 452: 139589.
- [17] 卢利平, 卢嘉怡, 崔润洁, 等. 4 株产胞外多糖植物乳杆菌的分离、鉴定及其体外益生特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(23): 115–122. [LU L P, LU J Y, CUI R J, et al. Isolation, Identification and *in vitro* probiotic characteristics analysis of 4 *Lactiplantibacillus plantarum* strains producing exopolysaccharides[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(23): 115–122.]
- [18] 李洋. 肠膜明串珠菌 SN-8 胞外多糖分离纯化, 结构鉴定及功能特性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020. [LI Y. Isolation, purification, structural identification and functional properties of exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* SN-8[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.]
- [19] 王纯玮. 开菲尔胞外多糖结构表征、理化特性及其与乳蛋白相互作用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022. [WANG C W. Research on structural characterization, physico-chemical properties of kefir and its interaction with milk proteins[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022.]
- [20] WU Y, LI Y, LIU C, et al. Structural characterization of an acidic epimedium polysaccharide and its immune-enhancement activity[J]. Carbohydr Polym, 2016, 138: 134–142.
- [21] BRAFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [22] ZOU Z, WEI M, FANG J, et al. Preparation of chondroitin sulfates with different molecular weights from bovine nasal cartilage and their antioxidant activities[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 152: 1047–1055.
- [23] CHEN X, ZHANG R, LI Y, et al. Degradation of polysaccharides from *Sargassum fusiforme* using UV/H₂O₂ and its effects on structural characteristics[J]. Carbohydr Polym, 2020, 230: 115647.
- [24] HWANG C E, KIM S C, KIM D H, et al. Enhancement of isoflavone aglycone, amino acid, and CLA contents in fermented soybean yogurts using different strains: Screening of antioxidant and digestive enzyme inhibition properties[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 128199.
- [25] YONG Y, AHMAD H N, ZHANG H, ZHANG H, et al. Topological structure, rheological characteristics and biological activities of exopolysaccharides produced by *Saccharomyces cerevisiae* ADT[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 286: 138297.
- [26] WANG J, CHEN J, YE S, et al. Characterization of structure and antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic *Lysinibacillus sphaericus* Ya6 under acid-base stress[J]. Journal of Molecular Structure, 2023, 1294: 136402.
- [27] 杨晓华, 洪嘉淇, 王临好, 等. 降糖活性乳酸菌的筛选及对 2 型糖尿病小鼠的改善作用[J]. 食品科学, 2025, 46(8): 151–161. [YANG X H, HONG J Q, WANG L H, et al. Screening of hypoglycemic active lactic acid bacteria and their improvement effects on type 2 diabetic mice[J]. Journal of Food Science, 2025, 46(8): 151–161.]
- [28] LIU J, CHEN N, ZHANG Z, et al. Screening and evaluation of prebiotic exopolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* on treating IBD in mice[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104098.
- [29] 檀葛倩, 麻冰玉, 程笑笑, 等. 一株泡菜中分离高产胞外多糖

- 植物乳杆菌的益生特性分析[C]//中国食品科学技术学会第二十二届年会论文集. 2023: 107-108. [TAN Q Q, MA B Y, CHENG X X, et al. Probiotic properties analysis of a high exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* strain isolated from pickles[C]// Proceedings of the 20th Annual Conference of Chinese Institute of Food Science and Technology. 2023: 107-108.]
- [30] RANA S, UPADHYAY L S B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 577-583.
- [31] NIE C, XIONG Z, ZHANG H, et al. Effect of carbon sources on characterization of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* S-3 [J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104676.
- [32] 张日馨. 不同植物乳杆菌菌株胞外多糖免疫调节活性与结构研究[D]. 大连: 大连工业大学 2019. [ZHANG R X. Study on immunomodulatory activity and structure of exopolysaccharides from different *Lactobacillus plantarum* strains[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2019.]
- [33] 刘明超, 王荣平, 何宇星, 等. 内蒙古酸马奶中植物乳植杆菌 NM18 胞外多糖的结构特征[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7): 133-142. [LIU M C, WANG R P, HE Y X, et al. Structural characterization of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NM18 in Inner Mongolian koumiss[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 133-142.]
- [34] MANAFU Z, DU R, KUDERETI T, et al. Structure characterization and intestinal immune promotion effect of polysaccharide purified from *Alhagi camelorum* Fisch [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269: 132077.
- [35] ZHANG H, ZOU P, ZHAO H, et al. Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharide from pinecones of *Pinus koraiensis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117078.
- [36] 陈海燕. 高产胞外多糖嗜热链球菌的筛选、培养条件的优化及多糖的结构分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学 2020. [CHEN H Y. Screening of high exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus*, optimization of culture conditions and structural analysis of exopolysaccharides[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.]
- [37] CAGGIANIELLO G, KLEEREBEZEM M, SPANO G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(9): 3877-86.
- [38] LI H, MAO W, CHEN Y, et al. Sequence analysis of the sulfated rhamno-oligosaccharides derived from a sulfated rhamnan [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(3): 1299-1304.
- [39] GUO X, KANG J, XU Z, et al. Triple-helix polysaccharides: Formation mechanisms and analytical methods [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117962.
- [40] FU Y L, SHI L. Methods of study on conformation of polysaccharides from natural products: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 263: 130275.
- [41] NUMATA M, TAMESUE S, FUJISAWA T, et al. β -1, 3-Glucan polysaccharide (schizophyllan) acting as a one-dimensional host for creating supramolecular dye assemblies [J]. Organic Letters, 2006, 8(24): 5533-5536.
- [42] HAN Y, LIU E, LIU L, et al. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061 [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 115: 230-237.
- [43] KOWSALYA M, VELMURUGAN T, MYTHILI R, et al. Extraction and characterization of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* strain PRK7 and PRK 11, and evaluation of their antioxidant, emulsion, and antibiofilm activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 242: 124842.
- [44] XU Q, WANG M M, LI X, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities and action mechanisms of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* Z-1 [J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105247.
- [45] 刘辉, 刘悦, 章检明. 产酸乳酸菌筛选、鉴定及其后生元抗氧化活性比较 [J]. 食品研究与开发, 2025, 46(1): 202-209. [LIU H, LIU Y, ZHANG J M. Screening and identification of acid-producing lactic acid bacteria and comparison of antioxidant activities of postbiotics [J]. Food Research and Development, 2025, 46(1): 202-209.]
- [46] YUAN Q, XIE Y, WANG W, et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 128: 52-62.
- [47] ZHANG W, YUAN S, CHEN R, et al. Exopolysaccharide from endophytic fungi of *Cinnamomum burmannii* leaves: Structural characterization and hepatoprotective effects [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 322: 146703.
- [48] SANZ C G, ALDEA A, BARSAN M M. Electrochemical detection of superoxide anion in living systems: Recent trends and clinical implications [J]. Bioelectrochemistry, 2025, 165: 108998.
- [49] 李尧, 卢承蓉, 刘丹, 等. 乳酸片球菌胞外多糖的分离纯化、结构分析及抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 35-42. [LI Y, LU C R, LIU D, et al. Structure and antioxidant activity of *Pediococcus lactis* extracellular polysaccharide [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 35-42.]
- [50] AGRAWAL N, SHARMA M, SINGH S, et al. Recent advances of α -glucosidase inhibitors: A comprehensive review [J]. Curr Top Med Chem, 2022, 22(25): 2069-2086.
- [51] DENG C, ZHANG N, LIN H, et al. Recent progress on natural α -glucosidase inhibitors derived from the plants and microorganisms [J]. Current Medicinal Chemistry, 2025, 32(11): 2115-2141.
- [52] BAJPAI V K, RATHER I A, PARK Y H. Partially purified exo-polysaccharide from *Lactobacillus sakei* Probio 65 with antioxidant, α -glucosidase and tyrosinase inhibitory potential [J]. Journal of Food Biochemistry, 2016, 40(3): 264-274.
- [53] JIANG B, CHEN P, GUO J, et al. Structural characteristics and biological activity of lactic acid bacteria exopolysaccharides separated by ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ATPS [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 244: 125451.