

嗜酸乳杆菌肽聚糖的 六种提取方法比较研究

杨 旭,朱静静,潘道东*,吴 振,曾小群,孙杨赢,曹锦轩
(宁波大学食品科学与工程系,浙江宁波 315211)

摘 要:比较嗜酸乳杆菌肽聚糖的六种提取方法,得到提取肽聚糖的最适方法并对此方法下提取的肽聚糖进行初步评价。最适提取方法步骤如下:三氯乙酸脱磷壁酸,乙醚脱脂,十二烷基磺酸钠结合胰蛋白酶去除蛋白质,此方法下肽聚糖的平均得率为 16.48%。溶菌酶实验及肽聚糖结构测定结果显示提取的肽聚糖为高纯度肽聚糖且电镜下成片状,并保持完整的菌体形态。氨基酸分析结果表明肽聚糖的主要氨基酸组成为丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和亮氨酸,为肽聚糖免疫效应的研究提供了理论基础。

关键词:肽聚糖,嗜酸乳杆菌,提取方法,结构测定

Comparison of six extraction methods of peptidoglycan in *Lactobacillus acidophilus*

YANG Xu,ZHU Jing-jing,PAN Dao-dong*,WU Zhen,ZENG Xiao-qun,SUN Yang-ying,CAO Jin-xuan

(Department of Food Science and Engineering,Ningbo University,Ningbo 315211,China)

Abstract:Six extraction methods of peptidoglycan of *Lactobacillus acidophilus* were compared and analyzed to get the optimal method, and its product was primarily evaluated. The steps of the optimal extraction way of peptidoglycan were as follows:the phosphate wall acid was removed with trichloroacetic acid (TCA), then the fat was skimmed with ether, finally, protein was removed with sodium dodecylsulphate (SDS) and trypsin. Under the method, the average extraction output was 16.48%. The results of structure determination and the experiment of lysozyme solution showed that the extracted peptidoglycan was pure. Under scanning electron microscopy (SEM), the peptidoglycan was schistose and maintained complete cell morphology of *Lactobacillus acidophilus*. Amino acid analysis suggested that alanine (Ala) and glutamic acid (Glu), lysine (Lys), aspartic acid (Asp) and leucine (Leu) were the principal amino acid components of peptidoglycan and the result would provide a theoretical basis for the study on the immune effect of peptidoglycan.

Key words:peptidoglycan;*Lactobacillus acidophilus*;extraction methods;structure determination

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)15-0066-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.15.004

肽聚糖 (Peptidoglycan, PG) 又称粘肽,是细菌细胞壁的特有组成部分,是由肽聚糖单体重复排列的复杂的大分子聚合物。每个肽聚糖单体由聚糖和肽组成,其中肽包括四肽链和肽间桥两部分;聚糖由 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸通过 $\beta-(1,4)$ 糖苷键连接而成^[1]。大量研究表明,肽聚糖具有抗癌活性,可以提高机体非特异性免疫,是一种无毒性的非特异性免疫增强剂^[2-6]。高纯度的肽聚糖有利于其免疫特性的研究及免疫效应的发挥,因此,要提取高纯度的肽聚糖,就需要去除乳酸菌细胞壁中蛋白质,脂类和磷壁酸等成分^[7]。

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 是第三代发酵剂,可以在肠道中定植抑菌,改善肠道微生物群的平衡,提高机体免疫及抑制肿瘤形成^[8-9]。本实验室的前期研究也表明,嗜酸乳杆菌肽聚糖可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞的炎症反应^[10-11]。但现有的关于肽聚糖提取的研究主要集中于双歧杆菌,并未对提取效果及肽聚糖的产量和纯度进行评价和分析。目前,关于嗜酸乳杆菌肽聚糖提取的报道较少,更缺乏有效提取高纯度肽聚糖的方法。本研究以嗜酸乳杆菌 ATCC4356 为模式菌株,比较了六种提取肽聚糖的方法,以获得有效的提取高纯度肽

收稿日期:2016-01-12

作者简介:杨旭(1989-),男,硕士,研究方向:乳品微生物,E-mail:yangxu12598@163.com。

* 通讯作者:潘道东(1964-),男,博士,教授,研究方向:乳品科学及禽肉加工技术研究,E-mail:daodongpan@163.com。

基金项目:国家自然科学基金(41276121、31471598);宁波市重大攻关项目(2011C11017)。

聚糖的方法,为肽聚糖提取的产业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

嗜酸乳杆菌 ATCC4356 本实验室保存;MRS 肉汤培养基 杭州生物试剂公司;十二烷基磺酸钠(SDS)(化学纯)、三氯乙酸(TCA)(分析纯)国药集团化学试剂有限公司;胰蛋白酶(Trypsin >250N·F·U·mg⁻¹) Solarbio;乙醚(分析纯) 杭州高晶精细化工有限公司。

LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;H2500R-2 高速冷冻离心机、H-2050R 高速冷冻离心机 长沙湘仪;Infinite200pro 酶标仪 瑞士 TECAN 公司; Nicolet6700 傅里叶变换红外 FT-IR 光谱仪 美国 Thermo 公司;A200 氨基酸自动分析仪 德国安米诺西斯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体的收集 将-20℃保存的嗜酸乳杆菌菌液按2%接种量于MRS肉汤培养基中活化,将活化后的菌种按2%接种量,加入新鲜MRS肉汤培养基中培养16h,水浴煮沸10min,以防止肽聚糖自溶,4000 r·min⁻¹离心15min,收集菌体沉淀,用灭菌生理盐水洗涤3次,置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 肽聚糖的提取方法 根据国内外已报道的肽聚糖的几种提取方法^[12-15]加以总结与调整,得出六种提取方法,具体如下:A:SDS→Trypsin→TCA→乙醚,B:TCA→乙醚→SDS→Trypsin,C:TCA→SDS→乙醚→Trypsin,D:SDS→TCA→Trypsin→乙醚,E:SDS→TCA→乙醚→Trypsin,F:TCA→SDS→Trypsin→乙醚。

上述提取方法中各试剂的作用分别为:SDS:常用的离子型表面活性剂,不仅可以使细胞膜破裂,与膜蛋白的疏水部分结合使其分离,而且还能破坏膜蛋白内部的非共价键,使蛋白变性,采用浓度为5%,沸水浴30min,室温下10000 r·min⁻¹离心15min,热蒸馏水洗至无SDS,取沉淀;TCA:蛋白质沉淀剂及磷壁酸提取剂,采用浓度10%,沸水浴25min,快速冷却后4℃10000 r·min⁻¹离心15min,取沉淀;Trypsin:采用浓度为2 mg·mL⁻¹的Trypsin在Tris-HCl缓冲体系(pH7.8)中水解16h,4℃10000 r·min⁻¹离心15min,取沉淀;乙醚:相似相溶的原理进行脱脂,采用浓度50%,作用时间20h,4℃10000 r·min⁻¹离心15min,并依次用75%乙醇、50%乙醇、蒸馏水洗涤,离心取沉淀。

1.2.3 提取的肽聚糖各指标的测定方法

1.2.3.1 蛋白质含量的测定 参照孟凡伦等^[14]的方法并加以修改,分别称取1mg上述六种方法提取的肽聚糖样品溶于1mL 0.15 mol·L⁻¹的NaOH中,37℃水解1h,4℃8000 r·min⁻¹离心15min取上清,用Bradford法^[16]测蛋白质含量。

1.2.3.2 总糖含量的测定 参照国标 GB/T 15672-2009 食用菌中总糖含量的测定,用苯酚-硫酸法测定肽聚糖总糖含量。

1.2.3.3 氨基己糖含量的测定 肽聚糖是由N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞酸两种氨基糖经β-1,4糖

苷键连接间隔排列形成的多糖支架^[1]。参照张世民等^[17]的方法并加以调整。分别取0.1 mg·mL⁻¹的氨基葡萄糖标准溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL以及提取的肽聚糖1 mL置于带塞试管中,加蒸馏水补至1 mL,以蒸馏水为空白对照,各加入乙酰丙酮0.5 mL,混匀后依次于沸水中水浴25 min,冰浴5 min,再加入无水乙醇1 mL,对二甲氨基苯甲醛0.5 mL,充分混匀后25℃水浴1 h,于530 nm测定吸光度,计算氨基己糖的含量。

1.2.3.4 肽聚糖得率的测定 分别测定上述六种方法提取的肽聚糖的质量和提取前菌体的质量,根据以下公式计算肽聚糖得率。

肽聚糖得率(%)=(提取的肽聚糖的质量/提取前菌体质量)×100

1.2.3.5 溶菌酶酶解实验 参考马西艺等^[15]在肽聚糖研究中使用的方法。溶菌酶可以定向的水解β-1,4糖苷键,降低肽聚糖的分子量,从而降低吸光度。将上述六种方法提取的肽聚糖配制成相同的浓度,经溶菌酶酶解后,通过吸光度的测定可知提取肽聚糖纯度。用pH6.2的磷酸缓冲液将肽聚糖配制1 mg·mL⁻¹的溶液,加溶菌酶使其终浓度为200 μg·mL⁻¹,摇床于37℃,120 r·min⁻¹振摇13 h,在不同时间点测定450 nm处吸光值的变化。

1.3 最适提取方法获得的肽聚糖的结构测定

1.3.1 红外光谱分析 取1 mg肽聚糖,用100 mg KBr压片,用傅立叶变换红外光谱分析仪进行光谱扫描,波长扫描范围为400~4000 cm⁻¹,分析图谱。

1.3.2 紫外光谱分析 取肽聚糖1 mg于100 mL纯水中,混匀后用酶标仪在波长190~400 nm下进行光谱扫描,扫描间距2 nm,观察图谱。

1.3.3 肽聚糖经溶菌酶溶解后分子量测定 用pH6.5的磷酸盐缓冲液将肽聚糖配制成1 mg·mL⁻¹的溶液,加溶菌酶使其终浓度为200 μg·mL⁻¹,摇床于37℃,120 r·min⁻¹处理10 h,离心机于4℃8000 r·min⁻¹离心15 min后取上清,在垂直板电泳槽中进行不连续电泳。分离胶质量分数12%,浓缩胶质量分数5%,1×Tris-tricine-SDS缓冲液。上样缓冲液与样品按1:4混合,煮沸5 min后上样。80V电泳至浓缩胶与分离胶交界处后,增大电压至150 V至距凝胶底部0.5~1 cm左右停止。

1.3.4 肽聚糖扫描电镜观察 采用2.5%的戊二醛将肽聚糖固定后梯度脱水,表面镀金后用扫描电镜进行观察。

1.3.5 氨基酸组成及含量分析 在110℃真空下,使用6 mol·L⁻¹的HCl对肽聚糖样品进行水解,24 h后,用氨基酸自动分析仪测定。

2 结果与分析

2.1 肽聚糖各提取方法相关指标的测定结果

2.1.1 蛋白质含量的测定结果 蛋白质含量的标准曲线的回归方程为: $y = 0.00364x + 0.2722$,其决定系数 $R^2 = 0.9966$ 。如图1(I)所示,根据不同提取方法下肽聚糖蛋白质含量的测定结果可以看出:在六种提取方法中,B、C两种方法下所得的肽聚糖中蛋白

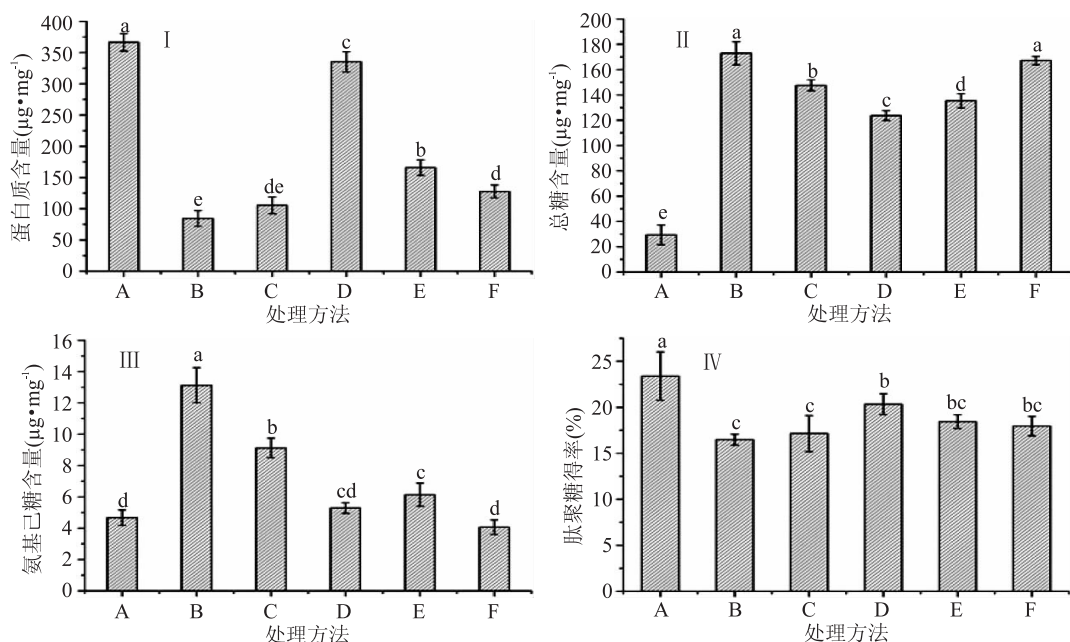


图1 六种方法提取的肽聚糖各指标测定结果

Fig.1 The results of different detection indexes for six extraction methods of peptidoglycan

注: I: 蛋白质含量测定; II: 总糖含量测定; III: 氨基己糖含量测定; IV: 肽聚糖得率; A: SDS→Trypsin→TCA→乙醚; B: TCA→乙醚→SDS→Trypsin; C: TCA→SDS→乙醚→Trypsin; D: SDS→TCA→Trypsin→乙醚; E: SDS→TCA→乙醚→Trypsin; F: TCA→SDS→Trypsin→乙醚; 不同字母代表差异显著, $p < 0.05$ 。

质含量低, 提取方法较好, 但 B 方法先用 TCA 去除磷壁酸的方法较先用 SDS 沉淀蛋白, 所提取物中蛋白质含量更低, 表明其可以更好的除去菌体蛋白。

磷壁酸按其其在细胞表面固定的方式可以分为脂磷壁酸和壁磷壁酸两种。其中壁磷壁酸不深入质膜, 其末端以磷酸二酯键与肽聚糖的 N-乙酰胞壁酸残基连结; 而脂磷壁酸可跨越肽聚糖层, 其末端以磷酸共价连接于质膜中糖脂的寡糖基部分^[18]。TCA 去除磷壁酸后, 增加了菌体细胞的通透性, 使得内容物流出, 可以更好的去除肽聚糖之外的其他杂质。

2.1.2 总糖含量的测定结果 总糖含量的标准曲线的回归方程为: $y = 0.0101x + 0.1155$, 其决定系数 $R^2 = 0.9982$ 。根据苯酚-硫酸法测定六种提取方法得到的肽聚糖中总糖含量如图 1 (II) 所示, B、F 两种提取方法得到的总糖含量较其他方法高, 且差异显著, 表明 B、F 两种提取方法得到的肽聚糖纯度较高。

2.1.3 氨基己糖含量的测定结果 氨基己糖含量的标准曲线的回归方程为: $y = 0.0092x + 0.0859$, 其决定系数 $R^2 = 0.9971$ 。六种提取方法得到的肽聚糖中氨基己糖含量如图 1 (III) 所示, 提取方法 B 得到的氨基己糖含量最高, 且和其他五种提取方法得到的氨基己糖含量之间存在显著差异, 表明采用提取方法 B 可以获得较好的提取效果。作为由双糖单位, 四肽尾, 还有肽桥聚合而成的大分子的肽聚糖, 氨基己糖的测定可以作为评价肽聚糖的有效指标。

2.1.4 肽聚糖含量的测定结果 本实验采用相同质量的菌体去磷壁酸, 去脂, 去蛋白得到产物肽聚糖, 因此去除杂质效果最好的方法即为最适提取肽聚糖的方法。如图 1 (IV) 所示, 提取方法 B 的肽聚糖得率虽然低于提取方法 C 的得率, 但是两种提取方法

得到的肽聚糖得率无显著差异。这表明 B、C 两种提取方法均可以达到较好的去杂效果。此外, 在脱磷壁酸后, 脱脂和脱蛋白的先后对产量的影响不存在显著的差异, 表明先采用脱磷壁酸方法对提取肽聚糖起着关键性的作用。

2.1.5 溶菌酶溶解实验结果 如图 2 所示, 经溶菌酶的作用后, 六种提取方法所得肽聚糖的吸光值均下降, 表明提取的肽聚糖均可以被溶菌酶降解, 从而验证六种提取方法下获得的产物均为肽聚糖。提取方法 B 得到的肽聚糖达到的酶解终点, 其 OD 值稳定, 吸光值最小, 表明提取方法 B 获得的肽聚糖纯度最高, 效果最好。

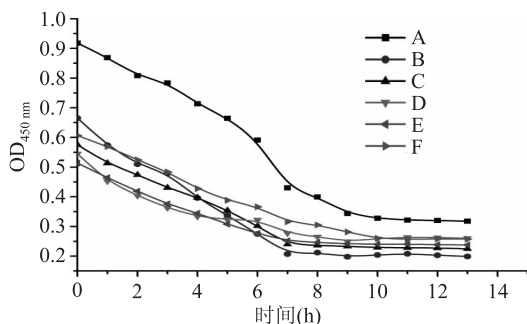


图2 六种提取方法所得肽聚糖的溶菌酶溶解曲线

Fig.2 The digestion curves of PG degraded by Lysozyme of six extraction methods

综上所述, 最好的提取方法为 B: TCA→乙醚→SDS→Trypsin, 即先用 TCA 脱磷壁酸, 再用乙醚脱脂, 最后 SDS 结合胰蛋白酶去蛋白的方法提取的肽聚糖纯度最高。因为磷壁酸可穿透厚的肽聚糖层, 跨越质膜, 脱除磷壁酸等于在细胞壁上开孔, 在保证菌体

形态的同时,可以使内容物流出,乙醚脱脂更增大了细胞壁的通透性,加速上述行为的发生,利于后续菌体蛋白的去除,得到高纯度的肽聚糖。此方法下肽聚糖得率为 16.48%,冻干后肽聚糖为白色絮状物。

2.2 最适提取方法所得肽聚糖结构测定结果

2.2.1 肽聚糖红外光谱分析结果 肽聚糖的红外光谱图如图 3 所示,所提取的肽聚糖在 3406 cm⁻¹有峰,表明此处有-OH 的伸缩振动,3300 cm⁻¹有峰表明此处有-CH 基团的伸缩振动,2930 cm⁻¹处有峰,表明此处有亚甲基-CH₂ 反对称伸缩。三处的峰均为糖类物质的特征吸收峰。此外,1650 cm⁻¹有峰,为酰胺特征吸收峰,1540 cm⁻¹处的峰为 N-H 弯曲以及 C=N 伸缩振动峰,1392 cm⁻¹处的峰来自对称甲基的变形振动。1234 cm⁻¹的峰值为 C-O 单键的伸缩振动,也为糖类的特征吸收峰。1063 cm⁻¹处的吸收峰为 C-O-C 的伸缩振动峰,可能说明 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸通过 β-(1,4) 糖苷键连接^[19-20]。红外光谱显示上述峰均为肽聚糖的吸收峰,无其他明显的杂峰出现,表明提取的物质为高纯度肽聚糖。

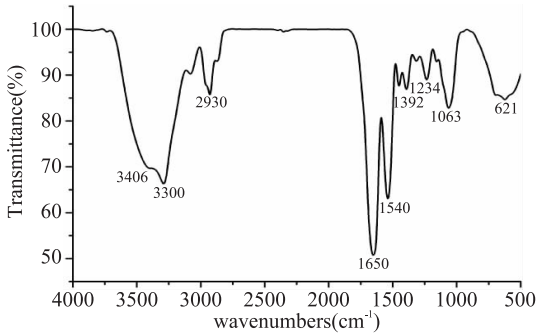


图 3 肽聚糖红外光谱分析

Fig.3 The FTIR spectral analysis of PG

2.2.2 肽聚糖紫外光谱分析结果 肽聚糖的紫外光谱分析见图 4,肽聚糖在 258 nm 和 280 nm 处均无明显的吸收峰,表明采用此方法提取肽聚糖,除蛋白和核酸的效果较好,同时也表明,采用 TCA 结合 SDS 的方法可以达到好的除杂的效果。

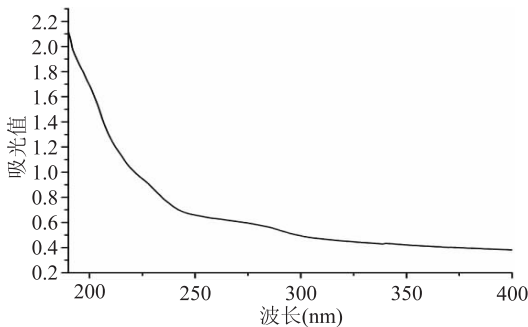


图 4 肽聚糖紫外光谱分析

Fig.4 The UV spectral analysis of PG

2.2.3 肽聚糖经溶菌酶酶解产物分子量测定结果 肽聚糖经溶菌酶酶解后分子量测定如图 5 所示,提取的肽聚糖经 SDS-PAGE 在 10 ku 处有明显的单一条带,表明提取的嗜酸乳杆菌肽聚糖纯度高,其经溶

菌酶酶解后产物分子量约为 10 ku。

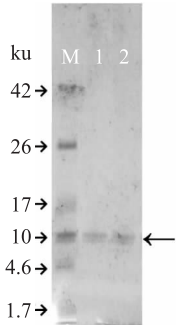


图 5 肽聚糖经溶菌酶酶解产物的 SDS-PAGE 图

Fig.5 The SDS-PAGE of PG dissolved by lysozyme

注:M 通道为 marker,1,2 通道为样品。

2.2.4 肽聚糖扫描电镜结果 肽聚糖扫描电镜如图 6 所示,提取后的肽聚糖扫描电镜下观察成片状,而且基本呈现了完整的细胞形态,说明通过此方法可以提取完整形态的肽聚糖。肽聚糖结构的完整可使其保持全菌的一些重要的生物学特征,并且和细胞功能有密切的关系,完整肽聚糖功能的研究可为菌体在机体的免疫作用的研究奠定基础。

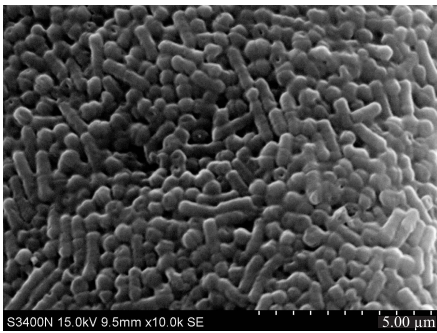


图 6 肽聚糖扫描电镜图(10000 ×)

Fig.6 SEM analysis of PG(10000 ×)

2.2.5 氨基酸组成及含量分析结果 氨基酸自动分析仪分析结果见表 1,从表中可以看出,嗜酸乳杆菌肽聚糖共含有 17 种氨基酸,其中含量较高的五种分别是丙氨酸,谷氨酸,赖氨酸,天冬氨酸和亮氨酸。其含量(μmol·g⁻¹)比为丙氨酸:谷氨酸:赖氨酸:天冬氨酸:亮氨酸=5.2:3.08:2.66:2.32:1。这五种氨基酸可能组成了连接在 N-乙酰胞壁酸 3 号碳原子上的短肽及肽桥。研究发现,肽聚糖免疫效应的产生(如 NOD1 通道的激活)可能与肽聚糖肽链上第三个氨基酸以及肽桥的交联结构有关^[21]。肽聚糖氨基酸成分及含量的测定可以为嗜酸乳杆菌肽聚糖免疫活性的研究提供理论基础。

3 讨论与结论

肽聚糖能增强机体的非特异性免疫作用,被应用于水产、畜禽养殖,提高动物的免疫力^[22-23],其产品可以代替抗生素,为解决抗生素滥用问题找到了新的突破口,具有广阔的应用前景,故有效提取高纯度肽聚糖方法具有重要意义。目前提取肽聚糖的方法大多从 Sekine 等人^[12]建立的方法衍生而来,提取方法各异,未对提取的效果和肽聚糖的纯度进行检测,

表1 嗜酸乳杆菌肽聚糖氨基酸组成及含量

Table 1 The compositions and contents of amino acids of PG

氨基酸名称	简称	分子量	含量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)
丙氨酸	Ala	89.09	108.83
谷氨酸	Glu	147.13	64.53
赖氨酸	Lys	146.19	55.63
天冬氨酸	Asp	133.10	48.56
亮氨酸	Leu	131.18	20.93
甘氨酸	Gly	75.07	18.89
组氨酸	His	155.00	12.13
苯丙氨酸	Phe	165.19	11.19
异亮氨酸	Ile	131.17	13.15
缬氨酸	Val	117.15	11.03
丝氨酸	Ser	105.09	10.43
苏氨酸	Thr	119.12	7.75
精氨酸	Arg	174.20	4.67
脯氨酸	Prg	115.13	6.16
酪氨酸	Tyr	181.20	3.49
半胱氨酸	Cys	121.15	0.89
甲硫氨酸	Met	149.21	0.70

尚缺乏有效的提取高纯度肽聚糖的方法,使得肽聚糖仍停留于实验室的研究,未能进行产业化的应用。本研究根据现报道的肽聚糖的提取方法加以总结及调整,得出六种提取方法并进行了比较研究,得到了有效提取高纯度肽聚糖的方法。即先用 TCA 去除磷壁酸,再用乙醚脱脂,最后用 SDS 结合胰蛋白酶去蛋白。其肽聚糖得率为 16.48%,高于前期研究^[24-25],并且肽聚糖的纯度高,紫外扫描也显示无核酸吸收,红外光谱显示提取物为高纯度肽聚糖。其主氨基酸组成有五种,分别为丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、亮氨酸,它们组成了连接在 N-乙酰胞壁酸 3 号碳原子上的短肽及肽桥。所得的肽聚糖成品为白色絮状物质,扫描电镜观察微观结构为片状,并保持细胞原有的形态。本实验获得了有效提取高纯度肽聚糖的方法,为解决肽聚糖研究和应用的瓶颈问题提供研究基础和技术支持。

参考文献

- [1] Meroueh S O, Bencze K Z, Heseck D, et al. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(12): 4404-4409.
- [2] Christensen H R, Larsen C N, Kaestel P, et al. Immuno-modulating potential of supplementation with probiotics: a dose-response study in healthy young adults[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 47(3): 380-390.
- [3] Sekine K, Onishi M, Tatsuki T, et al. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of Bifidobacterium infantis [J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 1995, 18(1): 148-153.
- [4] Kitamura M, Takahashi K, Tominaga T, et al. Preventive effect of whole peptidoglycan(WPG) on the occurrence of rat mammary

- tumors induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(dmab)[J]. Oncol Rep, 1994, 1(2): 309-312.
- [5] Franchi L, Warner N, Viani K, et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense[J]. Immunol Rev, 2009, 227(1): 106-128.
- [6] Shimada T, Park B G, Wolf A J, et al. Staphylococcus aureus evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1 beta secretion[J]. Cell Host Microbe, 2010, 7(1): 38-49.
- [7] Parvaneh J, Maryam T E. Lactobacillus acidophilus cell structure and application[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(24): 4033-4042.
- [8] 吕兵, 张国农, 杨瑞欢. 嗜酸乳杆菌生物学特性及其发酵乳的研究[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 37-39.
- [9] 田芬, 陈俊亮, 粘靖祺, 等. 嗜酸乳杆菌和双歧杆菌益生特性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 139-142.
- [10] Zhen Wu, Dao-dong Pan, Yuxing Guo, et al. Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from Lactobacillus acidophilus in RAW-264.7 cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2): 466-473.
- [11] Zhen Wu, Dao-dong Pan, Yuxing Guo, et al. N-acetylmuramic acid triggers anti-inflammatory capacity in LPS-induced RAW 264.7 cells and mice[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 13: 108-116.
- [12] Sekine K, Toida T, Saito M, et al. A new morphologically characterized cell wall preparation (Whole peptidoglycan) from Bifidobacterium infantis is with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice[J]. Cancer Research, 1985, 45: 1300-1307.
- [13] Jin Sun, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, et al. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from Lactobacillus sp [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(40): 6330-6337.
- [14] 孟凡伦, 马贵荣, 孔健. 乳链球菌 SB900 胞壁肽聚糖的部分生物学活性[J]. 微生物学报, 1998, 38(5): 376-380.
- [15] 马西艺, 乐国伟, 施用晖, 等. 乳酸杆菌肽聚糖的分离鉴定及其免疫活性[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6): 50-54.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1): 248-254.
- [17] 张民, 吴孟超. 多种中性糖、氨基己糖及乙酰氨基己糖的微量测定[J]. 第二军医大学学报, 1990, 11(5): 450-453.
- [18] Lovering A L, Lin L Y, Sewell E W, et al. Structure of the bacterial teichoic acid polymerase TagF provides insights into membrane association and catalysis[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2010, 17(5): 582-589.
- [19] 张悦, 宋晓玲, 黄健. 双歧杆菌肽聚糖结构及分子量的分析[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 676-681.
- [20] 杨媛, 潘道东, 曾小群, 等. 嗜酸乳杆菌胞壁肽聚糖的提取及结构分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(5): 202-208.
- [21] Travassos L H, Girardin S E, Philpott D J, et al. Toll-like

(下转第 75 页)

株内生菌具有清除 DPPH 自由基能力,其中,XZJ-11、XZY-15、XZG-3、XZG-6、XZG-9 和 XZG-19 等 6 株菌还对羟自由基或超氧自由基具有清除作用;XZY-20、XZG-8 和 XZG-11 则表现出对 3 种自由基都具有较好的清除能力。结果暗示了这些内生菌的抗氧化机制不同。目前报道从杜仲^[6]、虎皮檀^[7]、德国鸢尾^[8]等植物内生菌中分离的抗氧化活性物质多为黄酮类化合物,Teles HL 等^[26]从 *Ocotea corymbosa* 植物类弯孢属内生真菌中分离到的苯并吡喃以及从九里香正青霉属内生真菌分离的生物碱类物质 Spiroquinazoline alkaloid 等也具有抗氧化作用。香樟内生菌代谢产物中的抗氧化活性物质是否含为黄酮类或其类似物,以及内生菌的抗氧化机理是否与其宿主香樟相一致,对它们的体内体外抗氧化活性进一步比较,也将为今后天然抗氧化剂应用和机制研究提供基础。

参考文献

- [1] 张江巍,曹郁生.乳酸菌抗氧化活性的研究进展[J].中国乳品工业,2005,33(1):34-37.
- [2] Kloepper J B, eauchamp C J.A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J].Canadian Journal of Microbiology,1992,38:1219-1232.
- [3] Hallmann J, Quadt - Hallmann A, Mahaffee W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crop[J].Canadian Journal of Microbiology,1997,43(10):895-914.
- [4] 王志伟,纪燕玲,陈永敢.植物内生菌研究及其科学意义[J].微生物学通报,2015,42(2):349-363.
- [5] Strobel G, Daisy B.Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J].Microbiology and Molecular Biology Reviews,2003,67(4):491-502.
- [6] 沈书庆,殷红,刘芸,等.产杜仲黄酮内生真菌的初步研究[J].菌物研究,2008,6(1):46-48.
- [7] Zhao J T, Ma D H, Luo M, et al.*In vitro* antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.)) [J].Food Research International,2014,56:43.
- [8] Strobel G A, Ford E J, Worapong JK, et al.Isposetacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities[J].Phytochemistry,2002,69:179-183.
- [9] 陈良立,苏香萍,邓张双,等.交让木内生真菌 JR0203 代谢产物抗氧化及抑菌活性研究[J].食品工业科技,2014,35(3):101-104.
- [10] 王先.芳樟叶黄酮和多糖的提取分离、结构鉴定及抗氧化活性研究[D].厦门:厦门大学,2008.

- [11] 曾娟,李会娜.香樟叶多酚对油脂的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2012,28(8):949-952.
- [12] Hye J L, Eun A H, Weon J Y, et al.*In vitro* anti-inflammatory and anti-oxidative effect of Cinnammomum camphora extracts[J].Journal of Ethnopharmacology,2006,103:208-216.
- [13] 苏远波,李清彪,姚传义,等.芳樟树叶乙醇提取物的抗癌作用[J].化工进展,2006,25(2):200-204.
- [14] 褚衍亮,王娜.香樟果红色素的稳定性及抗氧化活性研究[J].北方园艺,2010,12:44-47.
- [15] 文才艺,尹志刚,陈建光.香樟内生细菌 EBS05 的鉴定及其抗菌活性物质性质的研究[J].微生物学通报,2009,6(7):88-93.
- [16] 李欣龙,王涛,游玲.香樟内生细菌抑制植物病原真菌及对纤维素利用初步研究[J].西南大学学报,2009,31(2):127-130.
- [17] Oyaizu M.Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from Glucosamine [J].Japanese Journal of Nutrition and Dietetics,1986,44:307-315.
- [18] Concepcion S M, Jose A L, Fulgencio S C.A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols [J].Science of Food and Agriculture,1998,76:270-276.
- [19] Smironff N, Cumbes Q J.Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J].Phytochemistry,1989,28(4):1051-1560.
- [20] 桂兴芬,阎家麒,朱建梅.几种改进的邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的比较[J].中国兽医科技,1993,23(1):23-24.
- [21] 王玉倩,潘舟强,翁庆北,等.云台山白云岩表层土可培养细菌多样性[J].云南大学学报:自然科学版,2015,37(4):616-622.
- [22] 文静,黄琴,吴红照,等.12 株芽孢杆菌体外抗氧化特性比较研究[J].中国畜牧杂志,2012,48(17):70-73.
- [23] Ryan R P, Germaine K, Franks A, et al.Bacterial endophytes: recent developments and applications [J].FEMS Microbiology Letters,2009,278(1):1-9.
- [24] Wang Y B, Gu Q.Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response [J].Marine Biology Research,2010,6(3):327-332.
- [25] 余东游,毛翔飞,秦艳,等.枯草芽孢杆菌对肉鸡生长性能及其抗氧化和免疫功能的影响[J].营养饲料,2010,46(3):22-25.
- [26] Teles H L, Silva G H, Castro G I.Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae) [J].Phytochemistry,2005,66(19):2363-2367.

(上接第 70 页)

- receptor 2 - dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition [J]. EMBO Reports, 2004, 5, 1000-1006.
- [22] 张春晓,麦康森,艾庆辉,等.饲料中添加肽聚糖对大黄鱼生长和非特异性免疫力的影响[J].水产学报,2008,32(3):411-416.
 - [23] 张璐,艾庆辉,麦康森,等.肽聚糖对鲈鱼生长和非特异

- 性免疫力的影响[J].中国海洋大学学报,2008,38(4):551-556.
- [24] 刘景圣,蔡丹,孙涛,等.嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取[J].吉林农业大学学报,2008,30(4):605-609.
 - [25] 朱丽,韩德权,张家玲,等.植物乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离及鉴定[J].黑龙江大学:自然科学学报,2011,28(1):113-120.