

外源信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 产胞外多糖的影响

王 艳, 顾 悦, 郑砚学, 张 悦, 贺银凤*
(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018)

摘要 研究群体感应信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 胞外多糖产量的影响,探讨信号分子 AI-2 对乳酸菌分泌胞外多糖的调控机制。采用苯酚-硫酸法和哈维氏弧菌 BB170 生物发光法测定菌株不同培养时间胞外多糖产量和 AI-2 活性,筛选添加最佳浓度的外源信号分子 AI-2,测定菌株的生长量、胞外多糖产量、AI-2 活性,扫描电镜观察菌体形态及冷冻干燥后多糖形态。结果表明:发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 均在 10 h 时 AI-2 活性最强,22 h 时胞外多糖产量最高,分别达到 (195.863 ± 1.643) mg/L 和 (125.179 ± 1.458) mg/L。100 μ mol/L 外源 AI-2 为菌株 TG4-1-1 和 11-3 的最佳添加浓度,而该浓度对两菌株各阶段生长量均无显著影响 ($P > 0.05$),对菌株 TG4-1-1 在 16~22 h 和菌株 11-3 在 13~22 h 的胞外多糖产量有显著促进作用 ($P < 0.05$)。同时,显著增强试验菌株在 10 h 时 AI-2 的活性 ($P < 0.05$)。添加 100 μ mol/L 外源 AI-2 培养 13 h 后菌体表面光滑,形状规则,形态饱满,其对胞外多糖形态无明显影响。以上结果说明一定浓度的外源 AI-2 可促进菌株 TG4-1-1 和 11-3 胞外多糖的产生,为 LuxS/AI-2 QS 系统调控胞外多糖研究提供参考。

关键词 外源信号分子 AI-2; 发酵乳杆菌; 乳酸片球菌; 胞外多糖

文章编号 1009-7848(2023)06-0018-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.003

群体感应(quorum sensing, QS)是细菌通过感知周围环境中菌群浓度的变化,释放信号分子,进而启动相关基因表达来实现调控菌体行为的一种生理活动^[1]。目前发现 QS 系统可以调控细菌多种生理行为,如毒力因子的表达、生物膜的形成、胞外多糖的产生、生物发光、细菌自溶以及细菌素的生物合成和对各种环境压力的抗性等^[2-6]。乳酸菌是一类兼性厌氧,能够将碳水化合物发酵产生乳酸的革兰氏阳性菌,其群体感应类型包括自身诱导和双组分信号系统^[7]。乳酸菌的信息交流分为种间交流信号分子 AI-2 和种内调节信号分子 AIP,其中,信号分子 AI-2 是呋喃酮酰硼酸二酯, LuxS/AI-2 群体感应系统在多种细菌信息交流中都起着重要的作用^[8-9]。

前期研究表明 LuxS/AI-2 群体感应系统可调控乳酸菌形成生物膜,且对生物膜的形成能力具有一定的影响^[10-11]。乳酸菌的生物膜主要是菌体外

的大量胞外聚合物与细菌粘连形成的菌落聚集体^[12]。胞外聚合物主要指细菌分泌的各种生物大分子物质,如胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)和蛋白质、核酸等。EPS 是指细菌在生长发育过程中通过自身代谢,将环境中含碳化合物通过一系列的反应合成并分泌到细胞外的高分子、长链糖类聚合物。EPS 在生物膜中的比例占总有机物的 50%~90%^[13]。EPS 在微生物抵抗不良环境时发挥作用,助其存活^[14],具有改善肠道微生物的菌群结构,促进肠道健康,调节免疫功能,抗肿瘤及抗氧化等益生功能^[15]。

目前研究主要集中在 QS 系统对乳酸菌生物膜的形成,在研究 QS 系统与生物膜的调控机制过程中发现 QS 系统与细菌分泌 EPS 在一定程度上存在某种联系。吴荣^[16]通过研究发现添加终浓度为 60 μ mol/L 的外源信号分子 AI-2 时,植物乳杆菌 5-4-1 各生长阶段 EPS 生成量均显著提高。Smritikana 等^[6]研究发现,霍乱弧菌 MO10 合成 EPS 过程涉及群体感应系统,该菌的群体感应自诱导剂缺失会引起 EPS 过度表达。杨维等^[17]研究发现在不同浓度溴化呋喃酮作用下,单增李斯特菌 EPS 含量均低于空白组,且随着浓度的增加,

收稿日期: 2022-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960467); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019BS03002)

第一作者: 王艳,女,硕士生

通信作者: 贺银凤 E-mail: heyinf6468@163.com

EPS 含量逐渐减小。以上结果表明 QS 系统对细菌 EPS 合成有一定的影响,然而是否存在调控关系还需验证。

本研究首先通过测定发酵乳杆菌(*L. fermentum*)TG4-1-1 和乳酸片球菌(*P. acidilactici*)11-3 不同培养时间 EPS 分泌量和 AI-2 活性,得出菌株分泌 EPS 和 AI-2 活性的变化规律;其次,采用添加外源 AI-2 的方法,以两菌株在外源 AI-2 作用下生长量、菌体形态、EPS 分泌量以及微观表面结构的变化为指标,研究信号分子 AI-2 是否可以调控乳酸菌分泌 EPS。最后,明确信号分子 AI-2 和乳酸菌产 EPS 之间是否存在相关性,为 LuxS/AI-2 群体感应系统调控 EPS 的研究提供一定的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)BB170、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)TG4-1-1、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)11-3 均由内蒙古农业大学食品科学与工程学院食品生物技术团队提供。

1.2 试剂与材料

氯化钠、七水合硫酸镁、三氯乙酸,国药化学集团;透析袋(MD34,截留分子质量为 8 000~14 000 d),北京索莱宝科技有限公司;L-精氨酸、酸水解酪蛋白,Coolaber 公司;MRS 肉汤,广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 仪器与设备

HF-SAFE 1500 型生物安全柜、SMART-N 纯水机,力康生物医疗科技控股有限公司;SX-500

全自动高压灭菌锅,日本 TOMY 公司;PB 10 型酸度计,德国 Satorius 公司;5810 型高速低温离心机,德国 Eppendorf 公司;Neofuge 18R 高速冷冻离心机,上海力申科学仪器有限公司;Free Zone 真空冷冻干燥机,美国 Laconco 公司;紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司。BioTek Epoch 全波长酶标仪,美国 BioTek 公司;Perkin Elmer victor X 酶标仪,美国 Perkin Elmer 公司;TM4000 形桌上显微镜,日本株式会社日立高新技术那珂事业所。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株不同生长阶段 EPS 产量的测定 将发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 以 2%(体积分数)接种比接种于 MRS 液体培养基中,在 37 °C 下活化培养二代,将二代菌液制备成供试菌液^[18]。将供试菌液以 2%(体积分数)接种比接种于新鲜的 MRS 液体培养基中培养 0,4,7,10,13,16,19,22,25 h 后测定不同时间点菌株的生长量、EPS 产量、AI-2 活性。

1.4.1.1 EPS 的粗提取 EPS 的粗提取参照纪亚楠^[19]的试验方法。

1.4.1.2 EPS 的测定 采用苯酚-硫酸法测定乳酸菌 EPS 含量,取稀释后的透析样品 200 μ L,依次加入 6%苯酚溶液 200 μ L,浓硫酸 1 mL,摇匀,室温放置 30 min 使用酶标仪测 OD_{490nm} 值。将不同培养时间粗多糖的 OD_{490nm} 代入标准曲线中即可算出 EPS 的含量。

葡萄糖标准曲线绘制:以无水葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法绘制标准曲线^[20]。配制 100 μ g/mL 的葡萄糖标准液,按表 1 加入各种试剂,混匀,静置 30 min,以 1 号管为空白对照,在 490 nm 处测定吸光度,绘制葡萄糖标准曲线。

表 1 苯酚-硫酸法标准曲线绘制

管数	1	2	3	4	5	6
葡萄糖标准/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
去离子水/mL	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
6%苯酚/mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
浓硫酸/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	0.1

以糖含量(mg/L)为横坐标,吸光度(A_{490nm})为纵坐标绘制标准曲线,建立回归方程,回归线性方

程为 $Y=0.0112X-0.0064$, $R^2=0.999$ 。 $R^2>0.99$,表示具有可行度和线性关系, R^2 值越接近 1,吻合程度

越高。

1.4.2 菌株不同生长阶段 AI-2 活性测定

1.4.2.1 无细胞发酵上清液的制备(cell-free fermentation supernatant, CFS) 将试验菌株以 1.4.1 节的方法进行培养,待测培养液 8 000 r/min 离心 5 min (4 ℃),使用 0.22 μm 水系滤膜对上清液过滤除菌,即得到试验菌株的 CFS。将哈维氏弧菌 BB170 以 2%(V/V)接种于 AB 培养基中培养 3 代至 OD_{600nm} 为 0.9~1.1,4 ℃ 4 000 r/min 离心 10 min,使用 0.22 μm 水系滤膜对上清液过滤除菌,即得到阳性对照。AB 培养基过滤除菌即得到阴性对照,MRS 培养基过滤除菌即得乳酸菌介质对照。所取上清液与对照样品于-80 ℃保存。

1.4.2.2 信号分子 AI-2 活性的测定 将哈维氏弧菌 BB170 接种到 AB 培养基中,30 ℃ 100 r/min 振荡培养活化二代,以 2%接种比培养 3 代至 OD_{600nm} 为 0.9~1.1,按 1:5 000(V/V)将菌液和 AB 培养基混合,得到稀释后约为 105 CFU/mL 的哈维氏弧菌 BB170 菌液。阳性对照为哈维氏弧菌 BB170 的 CFS,阴性对照为无菌的 AB 培养基,介质对照为无菌 MRS 培养基。将待测样品、阳性、阴性、介质对照与稀释后的哈维氏弧菌 BB170 菌液以 1:100(V/V)进行混合,30 ℃ 100 r/min 振荡培养。在 0~6 h 内,每隔 30 min 取 200 μL 混合液在化学发光模式测定其荧光强度值。在阴性对照荧光强度值达到最低点时对各个样品的荧光强度进行测定,计算其相对荧光强度用以代表信号分子 AI-2 的活性。计算公式如下:

待测样品相对荧光强度=待测样品的荧光强度值/介质对照的荧光强度值^[21]

1.4.3 外源信号分子 AI-2 最佳添加浓度的确定

根据顾悦^[22]的试验方法,完成了信号分子 AI-2 的体外合成。反应体系为:1 mmol/L 的 SAH 与 1 mg/mL 的 LuxS 和 Pfs 蛋白在 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)中,37 ℃水浴反应 1 h。使用 10 ku 超滤管以除去未反应的蛋白,使用 0.22 μm 水系滤膜过滤除菌,保藏于-80 ℃。利用埃尔曼试剂测定 AI-2 浓度可达 1.362 mmol/L,同时采用哈维氏弧菌 BB170 生物发光法测得合成 AI-2 的相对荧光强度可达 139.350±0.384。

将外源信号分子 AI-2 添加到 MRS 培养基中

至终浓度分别为 50,100,150 μmol/L,将活化培养至二代的发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 按 2%(V/V)接种比接入含有不同浓度外源 AI-2 的 MRS 培养基中作为试验组,将菌按 2%(V/V)接入含有等体积 pH 7.5 磷酸钠缓冲液的 MRS 培养基中作为对照组,测定 AI-2 活性最高点时处理组生长量和 AI-2 活性变化,测定 EPS 产量最高点时生长量和 EPS 产量变化,筛选出最佳外源 AI-2 添加浓度便于后续试验。

1.4.4 外源信号分子 AI-2 对菌株的影响 将 1.4.3 节中筛选得到的最佳浓度作为试验浓度,同时以未添加外源 AI-2(0 μmol/L)为对照,分别培养 0,4,7,10,13,16,19,22,25 h 后,测定外源 AI-2 对菌株 TG4-1-1 和 11-3 不同培养时间生长量、EPS 产量的影响。同时利用扫描电镜观察两株菌培养 13 h 的菌体形态以及培养 22 h 的多糖冷冻干燥后的表面结构。

1.5 数据处理及分析

每组试验重复 3 次,用 SPSS19.0 对试验数据进行统计分析,所有数值用平均值±标准差表示, $P<0.05$ 表示差异显著。

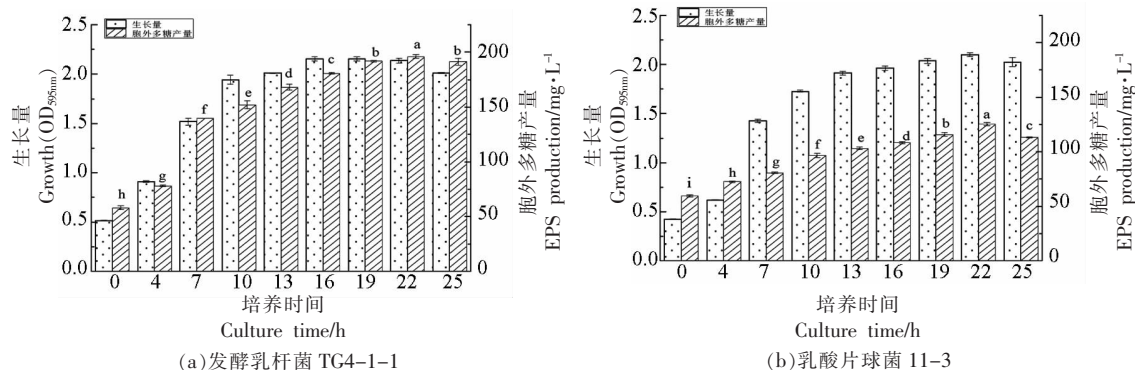
2 结果与分析

2.1 不同培养时间 EPS 产量和 AI-2 活性的变化规律

2.1.1 发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 不同培养时间 EPS 产量的变化规律 不同培养时间发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 EPS 产量和生长量的变化规律如图 1 所示。由图 1a 可知,发酵乳杆菌 TG4-1-1 的延滞期较短,培养 4 h 以后进入对数生长期;13 h 以后开始进入稳定期,且稳定期持续时间较长;培养 16 h 时生长量达到最大(OD_{595nm}=2.153±0.019),22 h 以后生长量逐渐降低进入衰亡期。发酵乳杆菌 TG4-1-1 不同时间点粗多糖产量差异较大,随着培养时间延长,菌株粗多糖的产量呈逐渐上升的趋势。0~4 h 为发酵乳杆菌 TG4-1-1 EPS 合成的起始阶段,4~13 h 内是 EPS 快速合成阶段,13~22 h 进入 EPS 合成的稳定期,培养 22 h 后 EPS 产量最高达到(195.863±1.643)mg/L,之后在 25 h 时 EPS 产量略有下降。由图 1b 可知菌株 11-3 与菌株 TG4-1-

1 随不同培养时间的生长量和 EPS 产量的变化规律具有相似性, 其在培养 16 h 时 OD_{595nm} 为 2.061 ± 0.022 达到最大, 培养 22 h 后 EPS 产量为 $(125.179 \pm 1.458) \text{ mg/L}$ 达到最大。说明菌株 TG4-1-1 和 11-3 从延滞期开始一直到稳定期前期的生长量和 EPS 产量都随着时间的延长呈现大幅上升的趋势, 是因为菌株在这段时期内生长旺

盛导致其代谢产物也增多; 当菌株的生长量稳定时, EPS 产量在小幅增加; 当菌株进入衰亡期时, EPS 产量也随之减少, 推测可能是由于培养后期培养基营养物质不充分, 菌体会分解一定量自身所产 EPS, 也可能是菌体发酵过程中产生的酶如糖苷水解酶将 EPS 降解, 导致后期出现 EPS 产量减少现象^[23]。



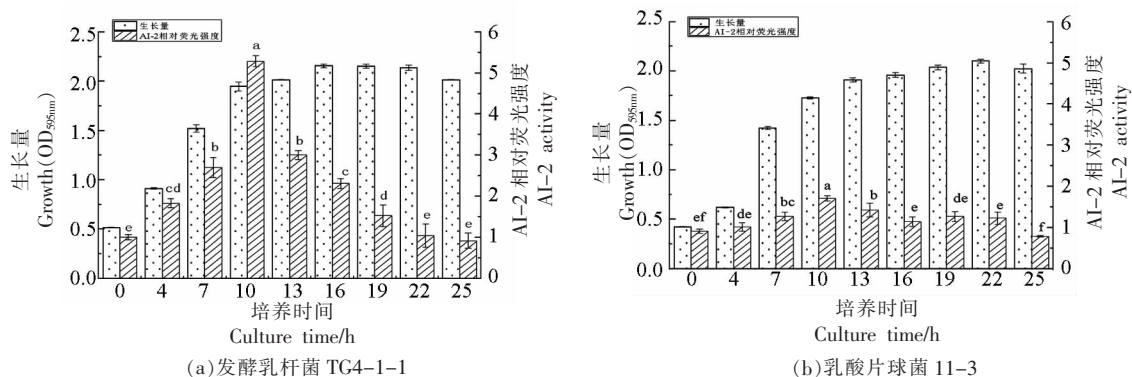
注:不同字母表示同一菌株不同培养时间的 EPS 产量差异显著。

图 1 菌株不同培养时间的生长量和 EPS 产量的关系

Fig.1 Growth and EPS yield of strains at different culture time

2.1.2 发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 不同培养时间 AI-2 活性的变化规律 利用哈维氏弧菌 BB170 生物发光法对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 培养不同时间下产 AI-2 活性进行检测。结果如图 2a, 发酵乳杆菌 TG4-1-1 随着培养时间的延长 AI-2 活性逐渐增强, 达到最强后又减弱。在 0~10 h 内随着时间的延长发酵乳

杆菌 TG4-1-1 的生长量(OD_{595nm})逐渐增大、AI-2 活性逐渐增强; 菌株在 10 h 时 AI-2 活性达到最大; 之后菌株的生长量还在逐渐上升直至稳定后又略有下降, 在此期间菌株 AI-2 活性则一直呈现下降趋势。从图 2b 可知乳酸片球菌 11-3 所产 AI-2 活性随着培养时间的延长在 10 h 时达到最强, 之后 AI-2 活性减弱。发酵乳杆菌 TG4-1-1 和



注:不同小写字母表示同一菌株不同培养时间 AI-2 活性差异显著。

图 2 菌株不同培养时间的生长量和 AI-2 活性的关系

Fig.2 Growth and AI-2 activity of strains at different culture time

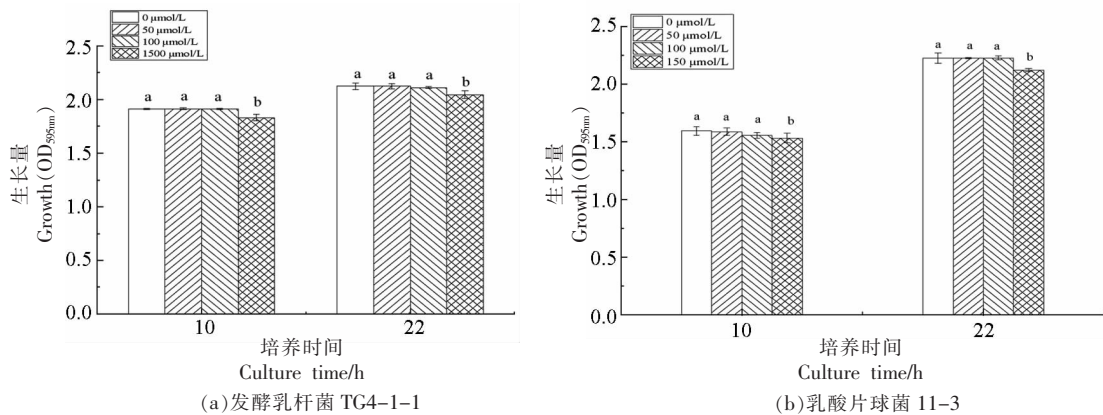
乳酸片球菌 11-3 均在 10 h 时所产 AI-2 活性最强,这与其它研究证实细菌信号分子 AI-2 产生的最强时期一般发生在对数末期和稳定初期^[24-25]的结果一致;后期 AI-2 活性减弱可能与 AI-2 不稳定易分解的性质有关^[26],也可能是因为 AI-2 附着在菌体细胞膜上导致其环境中减少^[27]。

2.1.3 发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 不同培养时间 EPS 和 AI-2 的关系 从图 1 和图 2 可以看出,在 0~10 h 试验菌株的 EPS 产量、AI-2 活性随时间的延长而呈现上升的趋势。10 h 之后试验菌株的 AI-2 活性开始逐渐下降,可能是被菌株内化吸收后参与调控某些生理活动^[28],如 EPS 的产生,与此同时 EPS 产量仍在不断积累,因此可证明这一猜测合理。

2.2 最佳外源信号分子 AI-2 添加量的确定

根据前期试验得出发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 均在培养 10 h 时 AI-2 活性最强以及 22 h 时 EPS 产量最高。为筛选出发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 最佳的外源信号分子 AI-2 添加浓度,选取试验菌株 10 和 22 h 测定菌株生长量、信号分子 AI-2 活性和 EPS 产量。

2.2.1 不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株生长量的影响 加入不同浓度外源信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 分别培养 10 h 和 22 h 的生长量的影响如图 3 所示。从图 3 中可以看出添加外源信号分子 AI-2 对菌株 TG4-1-1 和 11-3 的生长量有一定的影响。添加终浓度为 0, 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 在 10, 22 h 的 $\text{OD}_{595\text{nm}}$ 之间均无差异,表明 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 对该菌株的生长量均无显著影响($P>0.05$);而添加浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时,发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 在 10, 22 h 的 $\text{OD}_{595\text{nm}}$ 则显著降低($P<0.05$),表明两株菌的生长量受到明显抑制。随着外源信号分子 AI-2 的浓度增加,其对菌株 TG4-1-1 和 11-3 10 h 和 22 h 生长量的影响逐渐显著,说明信号分子的作用范围受其浓度抑制,当超过一定范围后其作用效果受到影响^[29]。出现这样的结果可能是因为浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时达到了菌体感受识别 AI-2 的阈值,使得菌株的生长受到了影响造成其生长量低于未添加组。



注:不同小写字母表示不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株同一时间点生长量影响的差异显著。

图 3 不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株 10, 22 h 生长量的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of exogenous AI-2 on the growth of strains at 10 and 22 h

2.2.2 不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株 22h EPS 产量的影响 不同浓度外源信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 培养 22 h 时 EPS 产量的影响如图 4 所示。由图可知,不同浓度添加外源信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌

TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 EPS 产量有一定的影响。添加终浓度分别为 0, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 后提取测定菌株 TG4-1-1 的 EPS 产量分别为 (194.077 \pm 1.174), (197.119 \pm 1.380), (202.012 \pm 1.172) 和 (176.964 \pm

2.030)mg/L, 菌株 11-3 的 EPS 产量分别为 (122.054±2.770), (127.262±1.034), (132.768±1.021)mg/L 和 (114.167±2.011)mg/L, 外源信号分子 AI-2 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 两株菌 EPS 产量均得到促进并显著高于未添加组 ($P<0.05$); 当外源信号分子 AI-2 终浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 两株菌 EPS 产量则受到抑制, 显著低于未添加组 ($P<0.05$)。

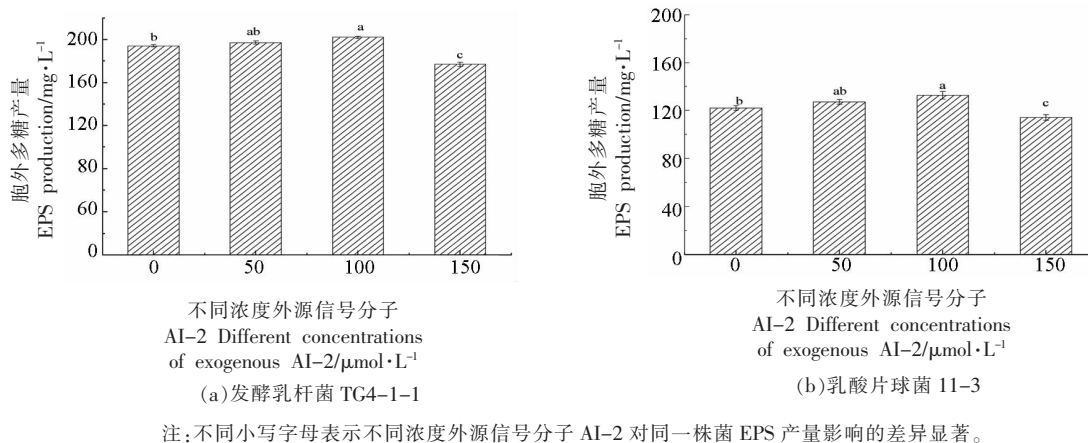


图 4 不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株 22 h EPS 产量的影响

Fig.4 Effects of exogenous AI-2 at different concentrations on EPS yield of strain cultured for 22 h

2.2.3 不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株 10 h AI-2 活性的影响 不同浓度外源信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 培养 10 h 时所产 AI-2 活性的影响见图 5。从图 5a 中可以看出不同浓度添加外源信号分子 AI-2 对菌株 TG4-1-1 AI-2 活性有一定的影响。与未添加外源 AI-2 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 当外源信号分子 AI-2 终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 发酵乳杆菌 TG4-1-1 所产 AI-2 活性都得到增强, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 时菌株所产 AI-2 活性显著高于其它浓度 ($P<0.05$); 但当外源信号分子 AI-2 终浓度增大到 150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 菌株所产 AI-2 的活性被减弱, 显著低于未添加时的 AI-2 活性 ($P<0.05$)。从图 5b 中可知添加 50, 100 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 均对乳酸片球菌 11-3 10 h 时 AI-2 活性有增强作用, 且增强作用显著 ($P<0.05$); 100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 对菌株 11-3 AI-2 活性的增强作用最好。出现这样的结果可能是 AI-2 对菌株的各种生理调控呈现浓度依赖, 当 AI-2 浓度超出

当外源 AI-2 终浓度在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着外源信号分子 AI-2 浓度增加, EPS 产量也略有增高, 由此推测信号分子 AI-2 的添加可能增强了乳酸菌的 EPS 合成相关的生理活动, 进而提高了菌株产 EPS 的能力。但外源信号分子 AI-2 浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时因其影响菌株 TG4-1-1 和 11-3 的生长量从而可能影响了 EPS 的产量。

菌株的识别阈值范围, 导致部分 AI-2 转入了菌体细胞内, 对菌株的生理活动起到了负调控。

综合上述结果得出外源信号分子 AI-2 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 在 10 h 的 AI-2 活性以及 22 h 的 EPS 产量均有一定的促进作用, 且促进作用显著 ($P<0.05$)。因此, 选择 100 $\mu\text{mol/L}$ 的信号分子 AI-2 为用于后续试验。

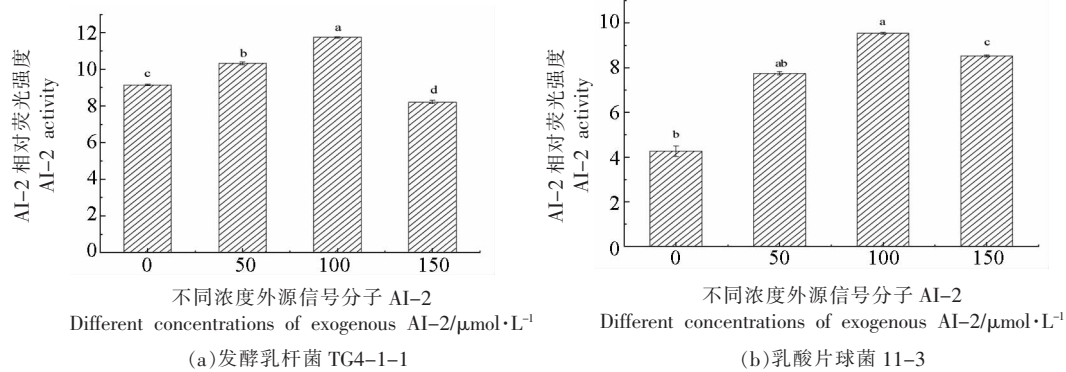
2.3 100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 对菌株的影响

以 100 $\mu\text{mol/L}$ 为最终添加浓度, 研究发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 不同培养时间下生长量、EPS 产量和 AI-2 活性变化以探讨信号分子 AI-2 对菌株 TG4-1-1 和 11-3 产 EPS 的调控。

2.3.1 外源信号分子 AI-2 对菌株不同培养时间生长量的影响 外源信号分子 AI-2 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 不同培养时间生长量的影响见图 6。从图

6中可以得出,与未添加组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,外源信号分子 AI-2 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,菌株 TG4-1-1 和 11-3 各阶段的生长量($\text{OD}_{595\text{nm}}$)均未

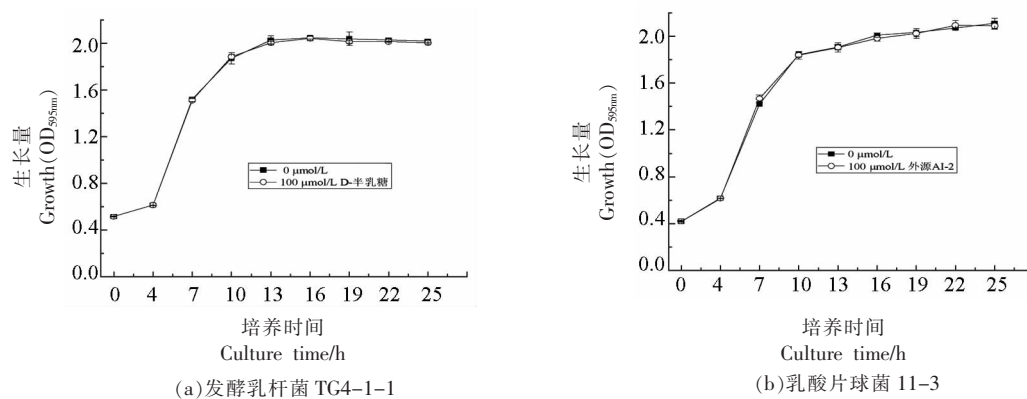
受到显著影响($P>0.05$),且进入各生长阶段的时间也与未添加的保持一致,说明 100 $\mu\text{mol/L}$ 的外源信号分子 AI-2 对菌株的生长无显著影响。



注:不同小写字母表示不同浓度外源信号分子 AI-2 对同一菌株 10 h AI-2 活性影响的差异显著。

图5 不同浓度外源信号分子 AI-2 对菌株 AI-2 活性的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of exogenous AI-2 on AI-2 activity of strain cultured for 10 h



注:不同小写字母表示不同浓度外源信号分子 AI-2 对同一菌株不同培养时间生长量影响的差异显著。

图6 外源信号分子 AI-2 对菌株不同培养时间生长量的影响

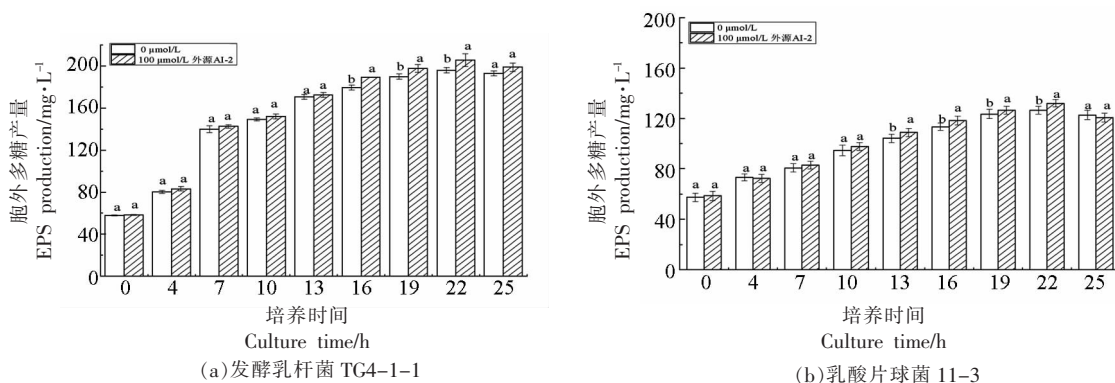
Fig.6 Effect of exogenous AI-2 on the growth of strains at different culture time

2.3.2 外源信号分子 AI-2 对菌株不同培养时间 EPS 产量的影响 外源信号分子 AI-2 终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 不同培养时间 EPS 产量的影响见图 7。由图可知,发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 在添加与不添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 的培养基中不同培养时间后产 EPS 的变化趋势具有一致的相似性。与未添加外源 AI-2(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 对发酵乳杆菌 TG4-1-1 不同培养时间的 EPS 产量

均在一定程度上起到促进作用,产量均有所提高,相较于其它阶段 16,19,22 h 的 EPS 产量得到了显著提高($P<0.05$)。从图 7b 可知,100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 同样对乳酸片球菌 11-3 13~22 h 各时间点 EPS 产量均有显著促进作用($P<0.05$)。以上结果表明 100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 均对两株菌产 EPS 有促进作用,可能是因为外源信号分子 AI-2 促进菌株参与合成 EPS 的相关基因的表达,但是本试验中并没有对测定与 EPS 合成相关基因的表达量,具体调控机制还需

进一步验证。Gu 等^[30]研究发现添加外源信号分子 AI-2 后,促进了乳酸菌 EPS 的产生和抑制了多糖

水解的相关基因 *lamC* 和 *ftsH* 的表达。



注:不同培养时间 EPS 产量的影响;不同小写字母表示同一时间点添加与未添加 AI-2 之间 EPS 产量差异显著。

图 7 外源 AI-2 对菌株不同培养时间 EPS 产量的影响

Fig.7 Effect of exogenous AI-2 on EPS production of strains at different culture time

2.3.3 外源信号分子 AI-2 对菌体形态的影响 发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 培养 13 h 后菌体放大 5 000 倍的扫描电镜图见图 8。由图 8a 可知,未添加外源 AI-2 时,发酵乳杆菌 TG4-1-1 的菌体形态比较完整,个别菌表面不平整,菌体边缘比较圆滑,菌体之间空隙较多、分布松散;由图 8b 可知,添加终浓度为 100 μmol/L 外源 AI-2 时,发酵乳杆菌 TG4-1-1 的菌体形状更加规则、形态更加丰满、表面更加光滑,菌体之间的空隙较小使得其聚集生长,表明添加外源 AI-2 有助于增加菌株产黏能力;菌体细胞体积相对变大,可能是因为菌体的胞外物质包裹导致的。由图 8c、8d 可知乳酸片球菌 11-3 的菌体形态也有相类似的变化。以上结果说明,两株试验菌株均在添加 100 μmol/L 外源信号分子 AI-2 时表现出明显的聚集现象,进一步说明 AI-2 可促进 EPS 的产生。

2.3.4 外源信号分子 AI-2 对多糖形态的影响 发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 在添加外源信号分子 AI-2 后培养 22 h 时所产 EPS 冷冻干燥后的多糖表面结构见图 9。从图 9a、9c 中可看出发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 所产的 EPS 结构比较疏松,排列分布许多小孔表面粗糙,具有片状和管状相结合的稳定和紧凑的三维网状结构,有的具有薄片紧的表面,有的具有褶皱而紧

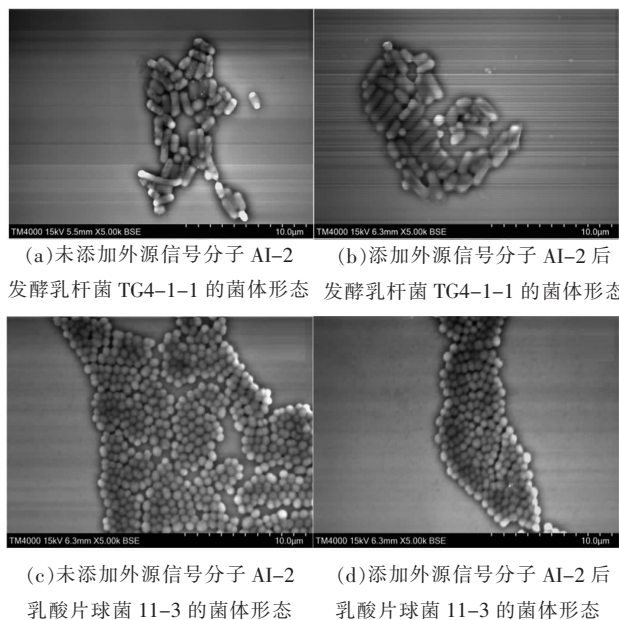
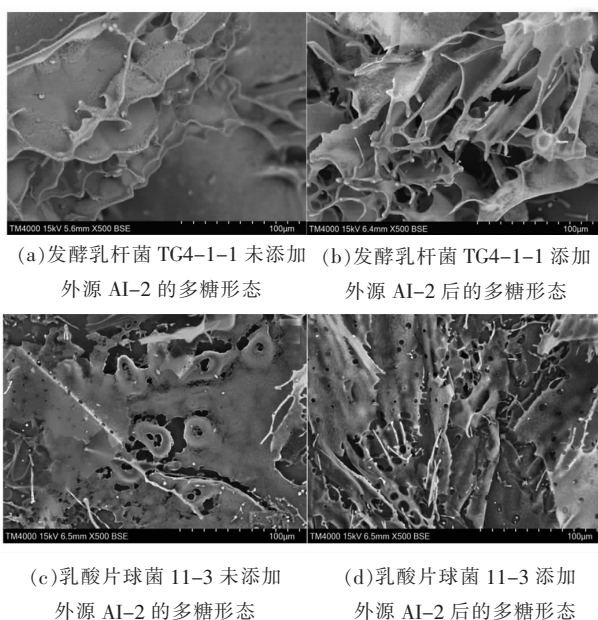


图 8 外源 AI-2 对菌株菌体形态的影响

Fig.8 The effect of exogenous AI-2 on bacterial morphology

密的表面。添加终浓度为 100 μmol/L 的外源信号分子 AI-2 时,对两株菌多糖表面没有明显的影响。EPS 的微观结构和表面形貌的差异很可能是由于样品提取、制备、纯化和干燥方法的不同以及 EPS 的组成和结构的不同造成的^[31]。



(a)发酵乳杆菌 TG4-1-1 未添加外源 AI-2 的多糖形态 (b)发酵乳杆菌 TG4-1-1 添加外源 AI-2 后的多糖形态

(c)乳酸片球菌 11-3 未添加外源 AI-2 的多糖形态 (d)乳酸片球菌 11-3 添加外源 AI-2 后的多糖形态

图9 外源信号分子 AI-2 对菌株多糖形态的影响

Fig.9 Effect of exogenous AI-2 on polysaccharide morphology of strain EPS

3 结论

发酵乳杆菌 TG4-1-1 和乳酸片球菌 11-3 均在 10 h 时 AI-2 活性最强,22 h 时 EPS 产量均达到最高;添加 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 外源 AI-2 对两株试验菌株的生长量无明显影响,但 EPS 产量随 AI-2 浓度的增加而增加,当浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ 时,菌株的生长量和 EPS 产量反而受到抑制;100 $\mu\text{mol/L}$ 外源信号分子 AI-2 对试验菌株的生长量无影响,但却可以影响菌株的表面形态并能显著促进不同生长阶段 EPS 的产量。综上所述,一定浓度的外源信号分子 AI-2 对乳酸菌 EPS 的产生具有调控作用,为进一步深入研究 LuxS/AI-2 QS 系统调控 EPS 的机理奠定基础。

参 考 文 献

[1] LIU X X, JI L, WANG X, et al. Role of RpoS in stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 270(2): 31-38.
[2] JERRY R F, JOS G B, L P M, et al. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition[J]. Applied Microbiology

and Biotechnology, 2018, 102(5): 2063-2073.

- [3] 燕彩玲. 乳酸菌产信号分子 AI-2 的研究及其与生物膜形成的关系[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
YAN C L. Study on signal molecule Autoinducer-2 in lactic acid bacteria and its role in biofilm formation[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
[4] WANG Y, WANG Y X, SUN L Y, et al. The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102 (17): 7231-7238.
[5] AI-SHABIBI N A, HUSAIN F M, REHMAN M T, et al. Food color 'Azorubine' interferes with quorum sensing regulated functions and obliterates biofilm formed by food associated bacteria: An *in vitro* and *in silico* approach[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2020, 27(4): 1080-1090.
[6] BISWAS S, PRITHWIRAJ M, TUHIN M, et al. Quorum sensing Autoinducer(s) and flagellum independently mediate EPS signaling in vibrio cholerae through LuxO -Independent mechanism [J]. Springer US, 2019, 77(3): 616-630.
[7] 姜黎明, 康子腾, 柳陈坚, 等. AI-2/LuxS 群体感应系统介导乳酸杆菌益生特性研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(4): 414-418.
JIANG L M, KANG Z T, LIU C J, et al. The research advances of AI-2/LuxS quorum sensing system mediating Lactobacillus probiotic properties [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26 (4): 414-418.
[8] LAURENT K, MICHAEL G, S. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective [J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4 (4): 249-258.
[9] 李雷兵, 朱寒剑, 郑心, 等. 乳酸菌群体感应的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(2): 5-11.
LI L B, ZHU H J, ZHENG X, et al. Research progress of lactic acid bacteria quorum sensing [J]. China Brewing, 2021, 40(2): 5-11.
[10] 蔡钊华. 群体感应信号分子 AI-2 高产乳酸菌株筛选及特性研究[D]. 太原: 山西师范大学, 2018.
CAI Z H. Screening and characterization research of quorum sensing signaling molecule AI-2 high-yield Lactobacillus strains[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2018.

- [11] 张悦, 贺银凤, 顾悦, 等. 高产生物膜乳酸菌抗逆性及其抗氧化特性[J]. 农业工程学报, 2021, 37(6): 282-288.
ZHANG Y, HE Y F, GU Y, et al. Stress resistance and antioxidant properties of lactic acid bacteria with high biofilm production[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2021, 37(6): 282-288.
- [12] NAICKER P R, KARAYEM K, HOEK K G P, et al. Biofilm formation in invasive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with the clonal lineage[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 90(1): 41-49.
- [13] VU B, CHEN M, CRAWFORD R J, et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation[J]. Molecules, 2009, 14(7): 2535-2554.
- [14] CAGGIANIELLO G, KLEER EB EZEM M, SPANO G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(9): 3877-3886.
- [15] WU J, ZHANG Y, YE L, et al. The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides in vitro: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 253(5): 117308.
- [16] 吴荣. 信号分子 AI-2 对乳酸菌生物膜形成的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
WU R. Effect of signal molecule AI-2 on biofilm formation of lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [17] 杨维, 唐标, 戴贤君. 溴化呋喃酮对单增李斯特菌生物膜形成及黏附作用的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 55-61.
YANG W, KANG B, DAI X J. Effect of Brominated 2 (5H)-Furanones on biofilm formation and adhesion to cells for *L. monocytogenes*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(2): 55-61.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验: GB 4789.35-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National Standard for Food Safety Microbiology Test of Food Lactobacillus Test: GB 4789.35-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [19] 纪亚楠. 环境胁迫对乳酸菌产生物膜、信号分子 AI-2 及胞外多糖的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
JI Y N. The Effects of Environmental stress on the production of biofilm, signal molecule AI-2 and EPS in lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [20] GONG R Z, WANG Y H, QI Y L, et al. Effects of different processing methods on water soluble polysaccharide contents and monosaccharide compositions in Cervi Cornu Pantotrichum[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(2): 194-200.
- [21] 顾悦, 李博, 吴荣, 等. 环境胁迫对屎肠球菌 8-3 LuxS/AI-2 群体感应系统的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 75-81.
GU Y, LI B, WU R, et al. Effects of environmental stress on LuxS/AI-2 quorum sensing system of *Enterococcus faecium* 8-3[J]. Food Science, 2018, 39(6): 75-81.
- [22] 顾悦. 环境胁迫及酵母菌对乳酸菌 LuxS/AI-2 群体感应系统的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
GU Y. The effects of environmental stresses and yeast on LuxS/AI-2 quorum sensing system of Lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [23] 黄承敏. 植物乳杆菌 Y-20 的分离鉴定及其所产胞外多糖的抗氧化作用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
HUANG C M. Studies on the isolation, identification of *Lactobacillus plantarum* Y-20 and the antioxidant activity of its exopolysaccharides[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019.
- [24] MOSLEHI-JENABIAN S, GORI K, LENE J. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(3): 295-302.
- [25] GORI K, MOSLEHI-JENABIAN S, PURROTTI M, et al. Autoinducer-2 activity produced by bacteria found in smear of surface ripened cheeses[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(1): 48-53.
- [26] 张煜琛. 基于群体感应分析对虾优势腐败菌对副溶血弧菌毒力因子的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015.
ZHANG Y C. Analyse the production of *V. para-*

- haemolyticus* virulence factors influenced by shrimp dominated spoilage organisms based on quorum sensing[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015.
- [27] 蔡针华, 程娜, 贾震虎, 等. 群体感应信号分子 AI-2 高产乳酸菌株筛选及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 66-71.
- CAI Z H, CHENG N, JIA Z H, et al. Screening and characterization research of quorum sensing signaling molecule AI-2 high-yield *Lactobacillus* strains [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 66-71.
- [28] 刘蕾. AI-2 对鸭疫里默氏杆菌生物学功能调控的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- LIU L. Regulation of AI-2 on Biological Functions of *Riemerella anatipestifer*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [29] 黎凡. 基于 AI-2/LuxS 群体感应系统金华火腿优势菌群风味形成机制的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- LI F. The mechanism of volatile compounds formation associated with predominant microbial community in Jinhua ham based on AI-2/LuxS quorum sensing system[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [30] GU Y, TIAN J J, ZHANG Y, et al. Dissecting signal molecule AI-2 mediated biofilm formation and environmental tolerance in *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 131(2): 153-160.
- [31] KANMANI P, ALBARRACIN L, KOBAYASHI H, et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 modulate innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells [J]. Molecular Immunology, 2018, 93(1): 253-265.

Effects of Exogenous AI-2 on Extracellular Polysaccharide Produced by *Lactobacillus fermentum* TG4-1-1 and *Pediococcus acidilactici* 11-3

Wang Yan, Gu Yue, Zheng Yanxue, Zhang Yue, He Yinfeng*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract In this study, the effect of quorum sensing signal molecule AI-2 on EPS production of *L. fermentum* TG4-1 and *P. acidilactici* 11-3 was investigated to explore the regulation mechanism of LuxS/AI-2 QS system on EPS secretion of lactic acid bacteria. EPS production and AI-2 activity of strains TG4-1-1 and 11-3 were measured by phenol-sulfuric acid method and *V. harveyi* BB170 bioluminescence method. The optimal concentration of exogenous AI-2 was selected and the growth, EPS production and AI-2 activity of the strain were measured. The morphology of the strain and polysaccharide after freeze-drying were observed by scanning electron microscopy. The results showed that both strains TG4-1-1 and 11-3 had the strongest AI-2 activity at 10 h, and the highest EPS yield at 22 h, reaching (195.863±1.643) mg/L and (125.179±1.458) mg/L, respectively. After screening, 100 μmol/L exogenous AI-2 was determined as the optimal supplemental concentration of strains TG4-1-1 and 11-3, which had no significant effect on the growth of the two strains at each stage ($P>0.05$). EPS production of strain TG4-1-1 at 16~22 h and strain 11-3 at 13~22 h were significantly promoted ($P<0.05$); meanwhile, the activity of AI-2 was significantly increased at 10 h ($P<0.05$). After 100 μmol/L exogenous AI-2 was added for 13 h, the cells had smooth surface, regular shape and full shape. However, it had no obvious effect on the surface structure and morphology of exopolysaccharides. These results indicated that exogenous AI-2 at a certain concentration could promote the production of EPS in strains TG4-1-1 and 11-3, providing a certain reference for the mechanism of LuxS/AI-2 QS system regulating EPS.

Keywords exogenous AI-2; *Lactobacillus fermentum*; *Pediococcus acidilactici*; exopolysaccharide