

# 美洲大嘴鱸腸道中葡聚糖 產生菌 (*Leuconostoc mesenteroides* B4) 之篩選

黃美瑩 · 朱惠真\* · 曾亮璋 · 許晉榮

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

## 摘 要

本研究自魚隻腸道篩選具有產生葡聚糖能力之細菌，估算其葡聚糖產生量、分析其所產葡聚糖之結構特性並鑑定該葡聚糖產生細菌之物種。結果顯示，自美洲大嘴鱸魚 (*Micropterus salmoides*) 腸道中篩選出 1 株具有合成葡聚糖能力之細菌 (B4)，B4 菌株於含有 20% 蔗糖之液體培養基培養 48 hr (28°C)，所產葡聚糖量估算為 50 mg/ml。B4 菌株所產葡聚糖之分子量為  $9.5 \times 10^5$  Da。該葡聚糖以酸液熱水解處理後，發現其單糖組成份中以葡萄糖為主。分析其  $^1\text{H}$  NMR 及  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜，顯示與文獻上其他論文報告中所述  $\alpha$  (1-6) 葡聚糖的鍵結資料相當接近，因此推斷該 B4 菌株所產葡萄糖聚合物為  $\alpha$  (1-6) 直鏈鍵結型態的葡聚糖，且有  $\alpha$  (1-3) 支鏈。葡聚糖產生菌 B4 菌株部分 16S rRNA 基因分析鑑定為 *Leuconostoc mesenteroides*，並將 B4 菌株命名為 *L. mesenteroides* B4。

關鍵詞：篩選、葡聚糖產生菌、腸道、大嘴鱸

## 前 言

葡聚糖 (dextran) 是葡萄糖的聚合物，目前研究發現，會產生葡聚糖的細菌主要為 *Lactobacillus* spp.、*Leuconostoc* spp.、*Streptococcus* spp. 及 *Weissella* spp. 等，都屬於乳酸菌 (Leemhuis *et al.*, 2013)。此類乳酸菌在有蔗糖的培養環境下，會利用本身分泌的葡聚糖蔗糖酶 (dextranase) 生物合成葡聚糖，該酵素將蔗糖水解所產生之葡萄糖逐一加到正在增長的葡聚糖鏈上之葡萄糖，而形成較大之  $\alpha$  (1-6) 鍵結型態的葡聚糖，也可能有支鏈，其支鏈主要包括  $\alpha$  (1-3)，也有  $\alpha$  (1-4) 或  $\alpha$  (1-2) 的鍵結。此類反應之副產物是果糖 (Korakli and Vogel, 2006)，依生物合成葡聚糖的微生物之差異，所形成的葡聚糖分子量大小及結構可能不同。目前有關葡聚糖的研究主要來自 *Leuconostoc mesenteroides*，尤其是 *L. mesenteroides*

NRRC B-512F (Jeanes *et al.*, 1948; Alsop, 1983; Kothari *et al.*, 2015a)。

*L. mesenteroides* 所產的葡聚糖為美國 FDA 核可之 GRAS (generally recognized as safe) 食品添加物 (Bhavani and Nisha, 2010; Kothari *et al.*, 2015a; Zannini *et al.*, 2016)，它在食物加工上可當乳化劑、成型劑、穩定劑、增稠劑及風味攜帶劑等 (Aman *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2012; Leemhuis *et al.*, 2013; Tingirikari *et al.*, 2014; Zannini *et al.*, 2016)。葡聚糖對於熱相當穩定，其裂解溫度將近 300°C，因此應用在食品穩定度很高 (Tingirikari *et al.*, 2014; Kothari *et al.*, 2015a, 2015b)。葡聚糖應用在糖果類可以預防糖結晶、提高含水量、增加黏度、保持風味。添加葡聚糖在冰淇淋，有助於提高冰淇淋的黏性，葡聚糖也可以作為冷凍乳製品的安定劑。在冷凍及乾燥食品方面，葡聚糖可以在食品上形成保護膜，保持食品比較不會發生氧化及其他化學反應，維持質地及風味 (Bhavani and Nisha, 2010; Kothari *et al.*, 2015b; Zannini *et al.*, 2016)。

葡聚糖也可以應用於動物飼料及醫藥界，分子量為  $1.0 \times 10^4 - 2 \times 10^7$  Da 的葡聚糖，醫藥上作

\*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjen@mail.tfrin.gov.tw

為血漿填充劑及藥物攜帶劑 (Bhavani and Nisha, 2010; Kothari *et al.*, 2015a; Zannini *et al.*, 2016)。在化妝品方面，含硫酸鹽的葡聚糖具有抗老化、抗皺紋、增加保水力、抗發炎及抗過敏等功能 (Bhavani and Nisha, 2010)。

保健方面，葡聚糖可做為益生菌 (prebiotic)，增加體內益生菌-雙歧桿菌 (bifidobacteria) 及乳酸菌的數量 (Sarbin *et al.*, 2014; Tingirikari *et al.*, 2014; Kothari *et al.*, 2015a, b; Meybodi and Mohammadifar, 2015; Torino *et al.*, 2015; Caggianiello *et al.*, 2016)。

Caggianiello *et al.* (2016) 報導，乳酸菌所產葡聚糖在益生菌與宿主之間相互作用，有助於益生菌對於腸道環境之耐受力，產葡聚糖的益生菌可以吸附在腸道表皮，提升免疫調節能力。此外，葡聚糖配合另一種多糖類-普魯蘭 (pullulan) 亦有助於骨骼修補及礦物化 (Schlaubitz *et al.*, 2014)。

Shukla and Goyal (2013) 指出，分離自發酵小黃瓜的 *Pedococcus pentosaceas* CRAG 3 所產的葡聚糖 (0.05 - 1.0 及 0.1 - 500  $\mu\text{g/ml}$ ) 具有抑制子宮頸癌細胞 (cervical cancer cell, Hela) 及直腸癌細胞 (colon cancer cell, HT29) 之功能，抑制率分別為 30 及 62%，此外，葡聚糖 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) 可以提高吞噬細胞之成長 (增加 2%)。Shukla and Goyal (2013) 推測 *P. pentosaceas* CRAG 3 所產的葡聚糖具有抑制癌細胞及提高吞噬細胞之成長可能的原因，為修飾癌細胞膜表面的蛋白質、干擾吸附、刺激細胞及調節免疫反應，因此有抗癌效果或活化吞噬細胞之功能。Shukla *et al.* (2014) 指出，*L. mesenteroides* B-1149 所產的葡聚糖 (100 及 1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) 具有抑制子宮頸癌細胞及直腸癌細胞之功能，抑制率分別為 25 及 40%，可能是刺激免疫細胞之反應；此外，該菌所產葡聚糖 (1,000  $\mu\text{g/ml}$ ) 可以提高吞噬細胞的存活率 (增加 70%)。

修飾過的葡聚糖也具有身體保健方面的功效，包括含鐵的葡聚糖可增加缺鐵性貧血之病人對鐵的吸收 (Bhavani and Nisha, 2010; Patel *et al.*, 2012)，含硫酸基的葡聚糖可以抵抗血液凝固，類似肝素 (heparin) (Alsop, 1983; Patel *et al.*, 2012)，含硫酸基的葡聚糖可作為抗人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 之藥物 (Piret *et al.*, 2000)，磷酸化的葡聚糖配合膠原蛋白

有助於骨骼再生 (Albu *et al.*, 2012)。Wiater *et al.* (2011) 報導，羧甲基化的葡聚糖具有抑制人類陰性子宮頸上皮細胞癌 (Human Negroid cervix epithelioid carcinoma) 的特性，抑制率為 30-60%。

Nácher-Vázquez *et al.* (2015) 指出，自肉製品分離出的乳酸菌 *Lactobacillus sakei* MN1 及 *L. mesenteroides* RTF10 所產葡聚糖 (1  $\text{mg/ml}$ ) 對於虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 的傳染性胰壞死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 及傳染性造血器官壞死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 均具有 50% 的抑制作用。動物試驗方面，餵食虹鱒予 *L. sakei* MN1 所產的葡聚糖 (50  $\mu\text{g}$ ) 3 天，可以降低虹鱒受 IPNV 及 IHNV 感染後的死亡率 (分別自 53.3% 降低為 6.5%，自 73.3% 降低為 20.0%)。

由於乳酸菌一般被認為是安全的益生菌，而葡聚糖為多用途之食品添加物，並具有多種保健功能，在水產養殖上也具有抵抗水產生物的病毒之效果 (Nácher-Vázquez *et al.*, 2015)，本研究擬自魚隻腸道中篩選具有葡聚糖產生力之細菌分離株，鑑定其種類、估算其葡聚糖產生量及分析其所產葡聚糖之結構特性，以進一步探討該乳酸菌及其所產葡聚糖產物應用於水產養殖及機能性食品之可行性。

## 材料與方法

### 一、魚隻腸道中產葡聚糖細菌之分離、保存與確認

#### (一) 魚隻腸道中產葡聚糖細菌之分離與保存

魚隻樣品包括購買自市場的美洲大嘴鱸魚 (*Micropterus salmoides*) 及點帶石斑 (*Epinephelus coioides*)，魚隻購入後，將魚隻以 75% 酒精進行表面殺菌，以滅菌後之剪刀剪開魚隻腹部，配合滅菌後之鑷子取出腸道，秤重後剪成數小段，加入適量無菌的生理食鹽水 (0.85% NaCl) 稀釋後，以均質機 (T18 basic Ultra Turrax®, IKA® Works Inc., Wilimington, NC, USA) 配合已滅菌之均質刀 (S18N-10 G Dispersing Tool, IKA® Works Inc.) 充分打碎，即為腸液樣品，適當稀釋後分別塗抹於含

有 12% 蔗糖的 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, Difco) 固體培養基, 石斑魚所用的 MRS 培養基另外添加 2% 氯化鈉, 置於  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  恆溫箱中培養 48 hr, 因為大部分產聚糖細菌會形成黏稠之菌落 (Sarwat *et al.*, 2008), 因此挑選菌落外觀具有黏稠狀者進行純化 3 次, 並以 MRS 液體培養基於  $28^\circ\text{C}$  培養 48 hr 後, 添加 15% 甘油 (glycerol) 後以  $-80^\circ\text{C}$  保存, 另, 將菌液離心 ( $10,000 \times g$ , 20 min) 去除上澄液後, 添加 10% 脫脂牛奶進行冷凍乾燥保存。

## (二) 菌株產葡聚糖之確認

### 1、還原糖的測定

將純化之產葡聚糖菌株培養於含有 12% 蔗糖之 MRS 液體培養基, 於  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  振盪培養 (150 rpm) 48 hr, 取菌液離心  $10,000 \times g$ , 20 min, 先以 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS, Sigma) 溶液分析其上澄液中是否有還原糖的產生 (Miller, 1959), 有正反應者再以高效能液相色層分析法 (high performance liquid chromatography, 以下簡稱 HPLC) 檢測反應液中的蔗糖、葡萄糖、果糖及葡聚糖 (Vidal *et al.*, 2011)。

### 2、蔗糖、葡萄糖、果糖及葡聚糖的測定

將上述測試菌株培養液離心, 取澄清液以  $0.22 \mu\text{m}$  濾膜過濾後, 使用高效能液相色層分析儀檢測反應液中的不同糖類。本試驗使用高效能液相色層分析儀 (Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 搭配 Sugar-Pak™ 1 ( $6.5 \times 300 \text{ mm}$  column) 管柱及折射計 (refractive index detector, Waters, 2414) 為檢測器來檢測蔗糖、葡萄糖、果糖及葡聚糖等。溶媒為 50 mg/L EDTA, 流速為 0.5 ml/min, 管柱溫度維持在  $90^\circ\text{C}$ 。蔗糖、葡萄糖、果糖及葡聚糖等標準品均購自 Sigma, 以 HPLC 分析後, 確定各標準糖類之特殊波峰位置, 用以比對樣品中各特殊波峰滯留時間上的不同糖類。

## 二、葡聚糖產量分析

將產葡聚糖菌株預先培養於含有 20% 蔗糖之液體培養基, 於  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  振盪培養 (150 rpm)

48 hr, 取菌液 2 ml 加入 200 ml 含有 20% 蔗糖之液體培養基, 於  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  振盪培養 (150 rpm) 48 hr, 取菌液離心  $10,000 \times g$  20 min, 離心後之上澄液加入 3 倍體積的冷乙醇(99%), 於  $4^\circ\text{C}$  放置隔夜, 再離心  $10,000 \times g$  30 min, 沉澱的葡聚糖以蒸餾水溶解後, 再重複乙醇沉澱及水洗步驟共 3 次, 得到純化之葡聚糖, 進行凍結乾燥後稱重, 以估算培養液中葡聚糖之含量 (Sarwat *et al.*, 2008)。

## 三、葡聚糖的分子量之分析

葡聚糖產生菌株培養在含有 12% 蔗糖之 MRS 培養液, 於  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$  振盪培養 (150 rpm)  $48 \pm 2 \text{ hr}$ , 將菌株培養液離心  $10,000 \times g$ , 20 min, 取澄清液以  $0.22 \mu\text{m}$  濾膜過濾後, 使用膠體過濾層析 (gel permeation chromatography, GPC) 分析葡聚糖產物的分子量。本試驗以 HPLC (Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 搭配膠體過濾層析管柱-Ultrahydrogel TM 125 ( $7.8 \times 300 \text{ mm}$  column) 及 Ultrahydrogel TM 250 ( $7.8 \times 300 \text{ mm}$  column), 並以折射計為檢測器。使用葡聚糖標準品 (分子量為 5.2、11.6、23.8、48.6、148、273、410 及 668 KDa, Polymer Standards Service-USA, Inc.) 建立標準曲線, 溶媒為 0.1 M  $\text{NaN}_3$  水溶液, 流速為 1.0 ml/min, 管柱溫度維持在  $80^\circ\text{C}$ 。

## 四、葡聚糖的單糖組成之分析

將依葡聚糖含量分析方法純化之葡聚糖, 利用過氯酸 (perchloric acid, 70%) 及加熱處理以水解葡聚糖後分析單糖組成, 葡聚糖樣品加入 15% 過氯酸於  $80^\circ\text{C}$  加熱 1 hr, 水解物再以 KOH (5 M) 中和, 離心  $10,000 \times g$ , 40 min, 取上澄液以  $0.22 \mu\text{m}$  濾膜過濾後, 以上述檢測蔗糖、葡萄糖、果糖及葡聚糖的方法, 以 HPLC 分析反應產物 (Notararigo *et al.*, 2013)。

## 五、葡聚糖的核磁共振 (NMR) 光譜分析

將葡聚糖以乙醇沉澱, 再以蒸餾水溶解, 重複 5 次後, 得到更精純之葡聚糖, 經凍結乾燥後以  $\text{D}_2\text{O}$  溶液充份溶解後, 於國立清華大學貴重儀器

使用中心，以 Varian Unity Inova 600 spectrometer 分析  $^1\text{H}$  NMR 及  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜。

## 六、葡聚糖產生菌株之鑑定

細菌之鑑定係依 16S rRNA 基因序列測定進行菌種鑑定，細菌總 DNA 的萃取、16S rRNA 基因序列測定與菌種鑑定係依照 Weisburg *et al.* (1991) 之方法進行。細菌 16S rRNA 基因序列以通用引子 (16S\_F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 及 16S\_R: 5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3') 經聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式擴增。細菌總 DNA 的萃取及 16S rRNA 基因序列測定委由明欣生物科技有限公司 (臺北, 臺灣) 進行。定序結果利用 BLAST 程式 (Pearson and Lipman, 1988) 與 GenBank 資料庫的基因進行比對，選取相似度最高的物種為細菌鑑定之依據。系統發生樹 (phylogenetic tree) 的建構採用 Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)，以 Accelrys Gene v2.5 (Accelrys, Inc., USA) 套裝軟體進行分析而得。

## 結果與討論

### 一、魚隻腸道中分離篩選葡聚糖產生菌

分別將美洲大嘴鱸魚及點帶石斑的腸道，剪成數小段，加入生理食鹽水並均質，適當稀釋後分別塗抹於含蔗糖的 MRS 固體培養基，經培養後，來自鱸魚樣品中有 1 個菌落 (B4) 之外觀具有黏稠狀之特性 (Fig. 1)，推測其具有產生胞外多糖的能力，經進一步將該菌株以含蔗糖之培養液進行測試發現，其培養液中有還原糖產生，以 HPLC 分析其上澄液發現有聚糖存在，推測該菌株作用蔗糖產生胞外多糖，因此進一步保存該株 B4 細菌。

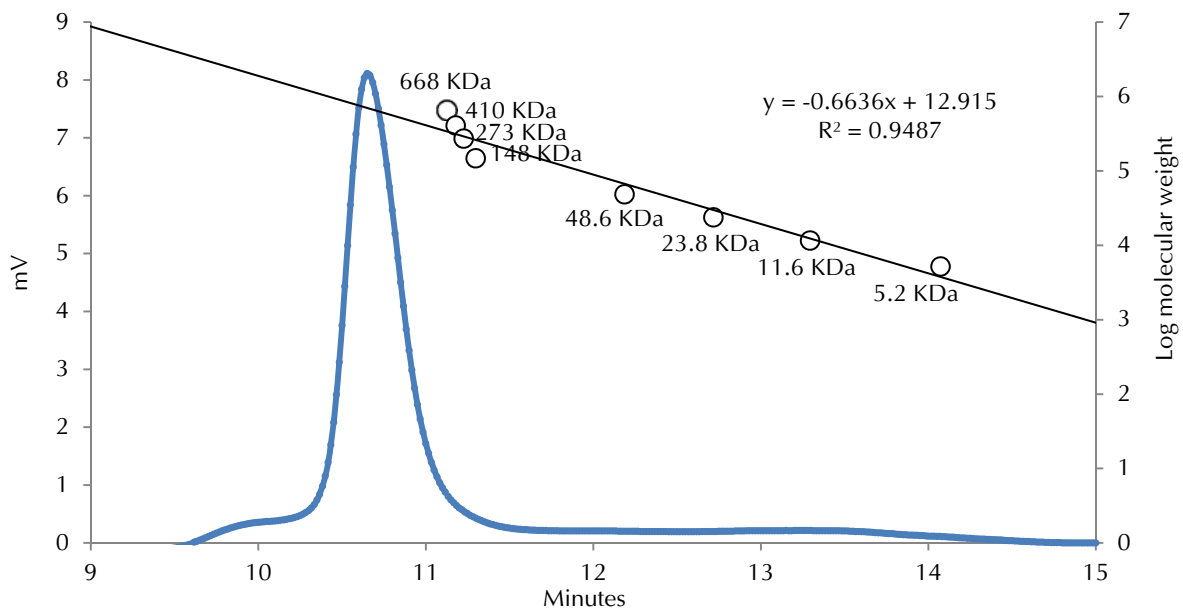
### 二、葡聚糖產量之分析

以 HPLC 分析 B4 菌株於含蔗糖的培養液時，在 5.0 - 6.0 min 處有葡聚糖之尖峰，但由於培養基中的鹽類在該時間點也有尖峰出現，因此無

法直接估算葡聚糖之濃度，改採用以乙醇沉澱、水洗及凍結乾燥後稱重之方法。產葡聚糖 B4 菌株培養於含有 20% 蔗糖之液體培養基，離心去除菌體，重複以乙醇沉澱及水洗葡聚糖後，純化之葡聚糖經凍結乾燥，所產葡聚糖量估算為 50 mg/ml。 *L. mesenteroides* B512F 以含有 4% 蔗糖之培養液培養 (27°C)，葡聚糖之產量約為 10 mg/ml (Dols *et al.*, 1997)。 Sarwat *et al.* (2008) 指出， *L. mesenteroides* CMG713，以含有 20% 蔗糖之培養液培養 (30°C，20 hr)，葡聚糖之產量約為 55 mg/ml。 *L. mesenteroides* AA1 以含有 20% 蔗糖之培養液培養 (25°C，24 hr)，葡聚糖之產量約為 61.1 mg/ml (Aman *et al.*, 2012)。 Leemhuis *et al.* (2013) 報導，一般乳酸菌所產葡聚糖含量為 10 mg/ml。 Notararigo *et al.* (2013) 指出， *L. mesenteroides* RTF10 以含有 0.8% 蔗糖之培養液培養 (30°C，12 hr)，葡聚糖之產量約為 1.8 mg/ml。 *Pedococcus pentosaceus* CRAG 3 以含有 2% 蔗糖之培養液培養 (30°C，48 hr)，葡聚糖之產量約為 4.5 mg/ml (Shukla and Goyal, 2013)。 Vasanthakumari *et al.* (2015) 報導， *Weissella cibaria* 以含有 8% 蔗糖之培養液培養，葡聚糖之產量為 9.8 mg/ml。由於文獻中各報導所使用產葡聚糖之菌株及培養條件不一，無法直接比較各菌株之葡聚糖產量；本研究 B4 菌株所產葡聚糖量 (50 mg/ml，於 20% 蔗糖，28°C，48 hr) 與 *L. mesenteroides* CMG713 (55 mg/ml，於 20% 蔗糖，30°C，20 hr) 相近。



**Fig. 1** Colonies of the strain B4 grown on medium with 12% (W/W) sucrose showing the mucoid appearance.



**Fig. 2** GPC chromatogram of dextran produced by the strain B4 after incubation at 28°C for 48 h on medium containing 12% sucrose. Dextran standards (molecular weight, 5.2, 11.6, 23.8, 48.6, 148, 273, 410 and 668 KDa) were used to construct a calibration curve. Column, Ultrahydrogel series (250 and 125) columns (7.8 × 300 mm); temperature, 80°C; eluent, 0.1 M NaNO<sub>3</sub>; flow rate, 1.0 ml/min; injection, 20 µl; refractometric detection.

### 三、葡聚糖的分子量之分析

由於葡聚糖之分子量大小物理特性不一，影響其應用功能 (Sarwat *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2011)，因此分析 B4 菌株所產葡聚糖之大小，將 B4 菌株在含有 12% 蔗糖培養液中培養 48 hr (28°C) 後取出樣品，以 GPC 分析其葡聚糖平均分子量，並以葡聚糖標準品進行估算。結果顯示，該菌株所產葡聚糖在 GPC 上只有 1 個尖峰 (Fig. 2)，估算分子量約為  $9.5 \times 10^5$  Da。

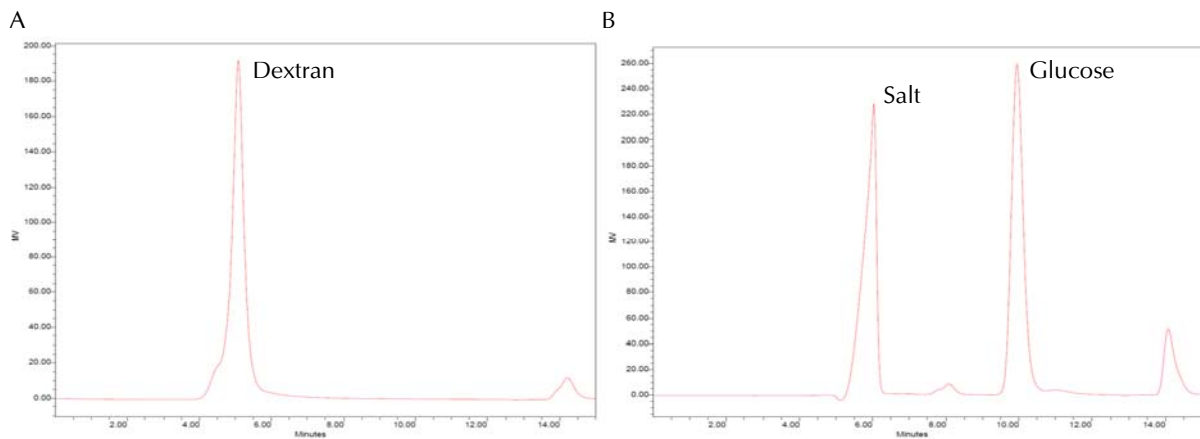
Jeanes *et al.* (1948) 指出，*L. mesenteroides* NRRL B-512 所產的葡聚糖分子量為  $2.1 \times 10^4$  -  $1.65 \times 10^6$  Da。Sarwat *et al.* (2008) 指出，*L. mesenteroides* CMG713 所產的葡聚糖分子量為  $5.0 - 20.0 \times 10^6$  Da。Qader and Aman (2012) 報導，分離自包心菜的 *L. mesenteroides* KIBGEHAI 所產的葡聚糖分子量為  $2.0 \times 10^6$  Da。Aman *et al.* (2012) 指出，分離自包心菜的 *L. mesenteroides* AA1，所產的葡聚糖分子量為  $1.0 - 4.0 \times 10^7$  Da。Vettori *et al.* (2012) 報導，*L. mesenteroides* FTO45B 所產的葡聚糖分子量為  $9.1 \times 10^4$  Da。Notararigo *et al.* (2013) 指出，*L. mesenteroides* RTF10 所產的葡聚糖分子量  $> 10^6$  Da。Kothari and

Goyal (2013) 報導，*L. mesenteroides* NRRL B-1426 所產的葡聚糖之分子量  $> 2 \times 10^6$  Da。Vidal *et al.* (2011) 報導，*L. citreum* B/110-1-2 所產的葡聚糖分子量為  $2 \times 10^6$  Da。Shukla and Goyal (2013) 指出，*P. pentosaceas* CRAG 3 所產的葡聚糖分子量為  $2.93 \times 10^5$  Da。Vasanthakumari *et al.* (2015) 報導，*W. cibaria* 所產葡聚糖之分子量為  $3.04 \times 10^6$  Da。

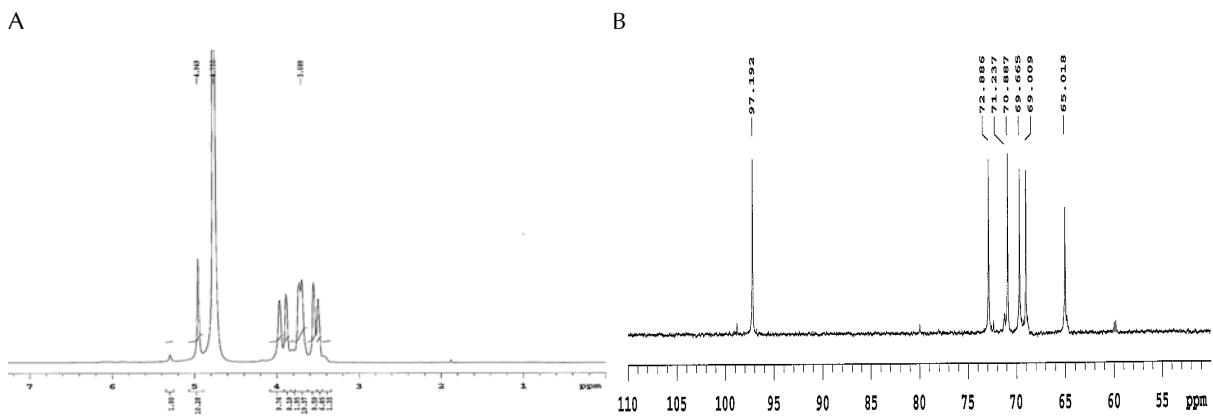
綜合上述資料顯示，*L. mesenteroides*、*L. citreum*、*P. pentosaceas* 及 *W. cibaria* 所產的葡聚糖分子量約為  $2.1 \times 10^4$  -  $4.0 \times 10^7$  Da，本研究 B4 菌株所產的葡聚糖之分子量約為  $9.5 \times 10^5$  Da，為中等大小的葡聚糖。

### 四、葡聚糖的單糖組成之分析

將篩選出的 B4 菌株所產葡聚糖以乙醇沉澱及水洗後，利用過氯酸熱水解處理，以 HPLC 分析發現，在原來葡聚糖的位置 (5.0 - 6.5 min) 之尖峰明顯變小許多 (Fig. 3)，推測該尖峰可能來自葡聚糖以酸水解後加入鹼中和所形成之鹽類或葡聚糖未完全水解所致。葡萄糖含量由原先未能檢出上升為約 47 mg/ml，原因可能是葡聚糖形成是由葡聚糖蔗糖酶的作用，逐一的將來自蔗糖的



**Fig. 3** HPLC of dextran produced by the strain B4 (A) and its hydrolytic products (B). Dextran was hydrolyzed with 15% of perchloric acid (70%) at 80°C for 1 hr. The hydrolysates were neutralized with 5 M KOH.



**Fig. 4**  $^1\text{H}$  NMR (A) and  $^{13}\text{C}$  NMR (B) of the dextran produced by the strain B4.

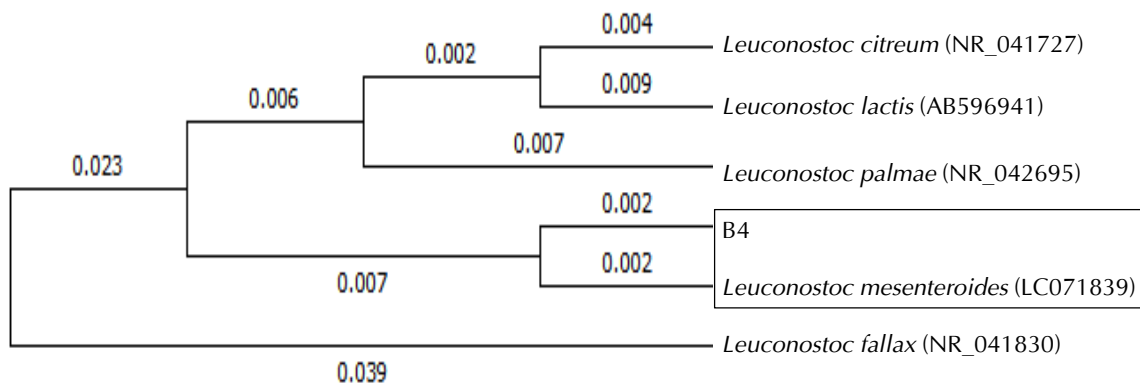
單一葡萄糖，加到正在增長的葡聚糖鏈上之非還原端葡萄糖上面，因此水解後有多量葡萄糖出現。本研究 B4 菌株所產葡聚糖經過氯酸熱水解處理後，主要產物為葡萄糖，此結果與 *L. mesenteroides* RTF10 所產的葡聚糖水解產物主要為葡萄糖之反應一致 (Notararigo *et al.*, 2013)，故推測本研究所篩選出的 B4 菌株在含蔗糖之培養液中所產聚糖為葡聚糖。

## 五、葡聚糖的 NMR 光譜之分析

將篩選出的 B4 菌株所產葡聚糖經乙醇多次沉澱及水洗後，分析其  $^1\text{H}$  NMR 及  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜，結果顯示， $^1\text{H}$  NMR 於 3.5 及 4.9 ppm 之間有 6 個質子 (Fig. 4)，與 *L. mesenteroides* NRRL B-1426、*L. mesenteroides* NRRL B-640、*L. pseudomesenteroides* R2、*P. pentosaceas* CRAG 3

及 *Weissella* sp. TN610 所產  $\alpha(1-6)$  鍵結型態葡聚糖之  $^1\text{H}$  NMR 圖譜很類似 (Purama *et al.*, 2009; Paulo *et al.*, 2012; Bejar *et al.*, 2013; Kothari and Goyal, 2013; Shukla and Goyal, 2013)，又，B4 菌株所產葡聚糖  $^1\text{H}$  NMR 在 5.3 ppm 處有較小的共振，依文獻資料顯示，該特點為 C3 有支鏈之鍵結 (Vettori *et al.*, 2012; Bejar *et al.*, 2013; Kothari and Goyal, 2013)。

B4 菌株所產葡聚糖的  $^{13}\text{C}$  NMR 在 65.0、69.0、69.7、70.9、72.9 及 97.2 ppm 有 6 個主要的共振 (Fig. 4)，該  $^{13}\text{C}$  NMR 與 *L. mesenteroides* NRRL B-640 所產  $\alpha(1-6)$  鍵結型態的葡聚糖之圖譜相近 (Table 1) (Purama *et al.*, 2009)，亦與 *L. mesenteroides* NRRL B-1426、*P. pentosaceas* CRAG 3 及 *Weissella* sp. TN610 所產  $\alpha(1-6)$  鍵結型態葡聚糖之  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜很類似 (Bejar *et al.*, 2013; Kothari and Goyal, 2013; Shukla and Goyal, 2013)，



**Fig. 5** Phylogenetic tree showing the 16S rRNA relationships of the strain B4 alongside other relevant species. The rectangular cladogram presents the results of the neighbor-joining method. The sequences were obtained from the GenBank databases and their nucleotide sequence accessions numbers are indicated in the brackets. The isolate and the species closest to it are indicated by the red bounding box. The nearly full-length 16S rRNA gene sequence was amplified by polymerase chain reaction using the universal 16S primers. Sequence analysis was performed using the BLAST program. Phylogenetic analysis was performed by the neighbor-joining method using Accelrys Gene v2.5.

且在 97.2 及 65.0 ppm 處共振強度相同，依資料顯示，該特性為  $\alpha$  (1-6) 鍵結型態的葡聚糖 (Purama *et al.*, 2009; Bejar *et al.*, 2013; Kothari and Goyal, 2013; Shukla and Goyal, 2013)。又，B4 菌株所產葡聚糖  $^{13}\text{C}$  NMR 在 99.5 及 80.8 ppm 處有較小的共振，依文獻資料顯示，該特點為 C3 有支鏈之鍵結 (Bejar *et al.*, 2013; Kothari and Goyal, 2013)。

**Table 1** Comparison of  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of dextran and the glucan produced by the strain B4

Carbon atom	Chemical shifts (ppm)	
	Dextran <sup>a</sup>	Isolate
C-1	97.8	97.2
C-2	71.6	70.9
C-3	73.6	72.9
C-4	69.7	69.0
C-5	70.3	69.7
C-6	65.7	65.0

<sup>a</sup>Cited from Purama *et al.* (2009)

分析 B4 菌株所產葡聚糖之  $^1\text{H}$  NMR 及  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜，顯示與上述文獻上其他論文報告中所述葡聚糖的鍵結資料相當接近，包括 *L. mesenteroides* NRRL B-1426、*L. mesenteroides* NRRL B-640、*L. mesenteroides* FTO45B、*P.*

*pentosaceas* CRAG 3 及 *Weissella* sp. TN610 等，這些菌株所產葡聚糖均以  $\alpha$  (1-6) 直鏈鍵結為主，及少部分的  $\alpha$  (1-3) 支鏈，因此推斷 B4 菌株所產葡萄糖聚合物亦為  $\alpha$  (1-6) 直鏈鍵結型態的葡聚糖，且有  $\alpha$  (1-3) 支鏈之鍵結。此外，*L. mesenteroides* NRRL B-512、*L. mesenteroides* NRRL B-1299、*L. mesenteroides* B-1299CB4、*L. mesenteroides* RTF10、*L. citreum* B/110-1-2 所產的葡聚糖也是  $\alpha$  (1-6) 直鏈鍵結及  $\alpha$  (1-3) 支鏈 (Jeanes *et al.*, 1948; Dols *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013; Notararigo *et al.*, 2013)。

## 六、葡聚糖產生菌株之鑑定

葡聚糖產生菌 B4 菌株部分 16S rRNA 基因分析鑑定為 *L. mesenteroides*，系統發生樹狀圖也顯示，B4 菌株與 *L. mesenteroides* 最接近 (Fig. 5)，因此將 B4 菌株命名為 *L. mesenteroides* B4。文獻資料顯示，*L. mesenteroides* 是最主要的葡聚糖生產菌之一，這類菌株主要分離自蔬菜及水果等，包括 *L. mesenteroides* NRRL B-512、*L. mesenteroides* NRRL B-640、*L. mesenteroides* NRRL B-1426、*L. mesenteroides* CMG713、*L. mesenteroides* KIBGEHAI、*L. mesenteroides* AA1、*L. mesenteroides* FTO45B、*L. mesenteroides* RTF10 等，均是葡聚糖生產菌 (Jeanes *et al.*, 1948; Sarwat *et al.*, 2008;

Purama *et al.*, 2009; Aman *et al.*, 2012; Qader and Aman, 2012; Vettori *et al.*, 2012; Kothari and Goyal, 2013; Notararigo *et al.*, 2013)。

*L. mesenteroides* 也存在許多水產生物的腸道中，具備有作為益生菌的特點，虹鱒、鮭魚 (Salmonids)、條紋鱧 (*Channa striatus*)、吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 及白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 腸道中均曾分離出 *L. mesenteroides* (Balcázar *et al.*, 2007; Kosin and Rakshit, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Allameh *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2012; Zapata and Lara-Flores, 2012)，上述報導自水產生物腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 會產生抗菌物質，具有抑制多種水產病原菌，包括乳酸鏈球菌 (*Lactococcus garvieae*)、親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、哈維氏弧菌 (*Vibrio haveyi*) 及海洋分枝桿菌 (*Mycobacterium marinum*) 等之效果，但是並沒有探討是否具有產生葡聚糖之能力。因此，目前可以查詢到的文獻資料中，本研究應該是第一篇證明分離自魚隻腸道中的 *L. mesenteroides* 具有產生葡聚糖能力之報告。

## 參考文獻

- Albu, M. G., V. Trandafir, D. M. Suflet, G. C. Chitanu, P. Budrugaec and I. Titorencu (2012) Biocomposites based on collagen and phosphorylated dextran for bone regeneration. *J. Mater. Res.*, 27: 1086-1096.
- Allameh, S. K., H. Daud, F. M. Yusoff, C. R. Saad and A. Ideris (2012) Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *Afr. J. Biotechnol.*, 11: 3810-3816.
- Alsop, R. M. (1983) Industrial production of dextrans. *Progress in Industrial Microbiology*, v. 18: Microbial Polysaccharides (M. E. Bushell ed.) Elsevier, Amsterdam, pp. 1-44.
- Aman, A., N. N. Siddiqui and S. A. U. Qader (2012) Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydr. Polym.*, 87: 910-915.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Vendrell, O. Gironés and J. L. Muzquiz (2007) Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 30: 111-118.
- Bejar, W., V. Gabriel, M. Amari, S. Morel, M. Mezghani, E. Maguin, C. Fontagné-Faucherb, S. Bejar and H. Chouayekh (2013) Characterization of glucansucrase and dextran from *Weissella* sp. TN610 with potential as safe food additives. *Int. J. Biol. Macromol.*, 52: 125-132.
- Bhavani, A. L. and J. Nisha (2010) Dextran - the polysaccharide with versatile uses. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 1: 569-573.
- Caggianiello, G., M. Kleerebezem and G. Spano (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 3877-3886.
- Desai, A. R., M. G. Links, S. A. Collins, G. S. Mansfield, M. D. Drew, A. G. Van Kessel and J. E. Hill (2012) Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350: 134-142.
- Dols, M., M. Remaud-Simeon and P. F. Monsan (1997) Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme Microb. Tech.*, 20: 523-530.
- Dols, M., M. R. Simeon, R. M. Willemot, M. R. Vignon and P. F. Monsan (1998) Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase. *Carbohydr. Res.*, 305: 549-559.
- Jeanes, A., C. A. Wilham and J. C. Miers (1948) Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biol. Chem.*, 176: 603-615.
- Kang, H. K., E. A. Ko, J. H. Kim and D. Kim (2013) Molecular cloning and characterization of active truncated dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 36: 857-865.
- Korakli, M. and R. F. Vogel (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycanases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 790-803.
- Kosin, B. and S. K. Rakshit (2010) Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous



- probiotics for application to white shrimp feed. *Aquaculture*, 306: 302-309.
- Kothari, D. and A. Goyal (2013) Structural characterization of enzymatically synthesized dextran and oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextranucrase. *Biochemistry (Moscow)*, 78: 1164-1170.
- Kothari, D., D. Das, S. Patel and A. Goyal (2015a) Dextran and food application, in *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, eds. by Ramawat, K. G. and J. M. Mérillon, Springer International Publishing, pp. 735-752.
- Kothari, D., J. M. R. Tingirikari and A. Goyal (2015b) In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioact. Carbohyd. Diet. Fibre.*, 6: 55-61.
- Leemhuis, H., T. Pijning, J. M. Dobruchowska, S. S. van Leeuwen, S. Kralj, B. W. Dijkstra and L. Dijkhuizen (2013) Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J. Biotechnol.*, 163: 250-272.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Meybodi, N. M. and M. A. Mohammadifar (2015) Microbial exopolysaccharides: a review of their function and application in food sciences. *J. Food Qual. Hazards Control*, 2: 112-117.
- Nácher-Vázquez, M., N. Ballesteros, Á. Canales, S. R. Saint-Jean, S. I. Pérez-Prieto, A. Prieto, R. Aznar and P. López (2015) Dextran produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohyd. Polym.*, 124: 292-301.
- Notararigo, S., M. Nácher-Vázquez, I. Ibarburu, M. L. Werning, P. F. de Palencia, M. T. Dueñas, R. Aznar, P. López and A. Prieto (2013) Comparative analysis of production and purification of homo- and heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Carbohyd. Polym.*, 93: 57-64.
- Patel, S., A. Majumder and A. Goyal (2012) Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian J. Microbiol.*, 52: 3-12.
- Paulo, E. M., E. F. Boffo, A. Branco, Â. M. Valente, I. S. Melo, A. G. Ferreira, M. A. Roque and S. A. D. Assis (2012) Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Ann. Braz. Acad. Sci.*, 84: 495-507.
- Pearson, W. R. and D. I. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield and I. Ruiz-Zarzuela (2011) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.*, 34: 499-507.
- Piret, J., J. Lamontagne, J. Bestman-Smith, S. Roy, P. Gourde, A. Desormeaux, R. F. Omar, J. Juhasz and M. G. Bergeron (2000) In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human deficiency viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 110-119.
- Purama, R. K., P. Goswami, A. T. Khan and A. Goyal (2009) Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohyd. Polym.*, 76: 30-35.
- Qader, S. A. U. and A. Aman (2012) Low molecular weight dextran: Immobilization of cells of *Leuconostoc mesenteroides* KIBGE HA1 on calcium alginate beads. *Carbohyd. Polym.*, 87: 2589-2592.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Sarbini, S. R., S. Kolida, E. R. Deaville, G. R. Gibson and R. A. Rastall (2014) Potential of novel dextran oligosaccharides as prebiotics for obesity management through *in vitro* experimentation. *Brit. J. Nutr.*, 112: 1303-1314.
- Sarwat, F., S. A. U. Qader, A. Aman and N. Ahmed (2008) Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.*, 4: 379-386.
- Schlaubit, S., S. M. Derkaoui, L. Marosa, S. Miraux, M. Renard, S. Catros, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee and J. C. Fricain (2014) Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. *PLoS One*, 9: e110251.
- Shukla, R. and A. Goyal (2013) Novel dextran from *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 isolated from fermented cucumber with anti-cancer properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 62: 352-357.
- Shukla, R., I. Iliev and A. Goyal (2014) *Leuconostoc*

- mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. *J. BioSci. Biotechnol.*, 3: 79-87.
- Tingirikari, J. M. R., D. Kothari and A. Goyal (2014) Superior prebiotic and physicochemical properties of novel dextran from *Weissella cibaria* JAG8 for potential food applications. *Food Funct.*, 5: 2324-2330.
- Torino, M. I., G. Font de Valdez and F. Mozzi (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers Microbiol.*, 6: 834. doi:10.3389/fmicb.2015.00834.
- Vasanthakumari, D. S., S. Harikumar, D. J. Beena, A. Pandey and K. M. Nampoothiri (2015) Physicochemical characterization of an exopolysaccharide produced by a newly isolated *Weissella cibaria*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 176: 440-453.
- Vettori, M. H. P. B., S. M. M. Franchetti and J. Contiero (2012) Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranucrase. *Carbohydr. Polym.*, 88: 1440-1444.
- Vidal, R. F., A. Martínez, C. Moulis, P. Escalier, S. Morel, M. Remaud-Simeon and P. Monsan (2011) A novel dextranucrase is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: an isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.*, 38: 1499-1506.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-703.
- Wiater, A., R. Paduch, M. Pleszczyńska, K. Próchniak, A. Choma, M. Kandefer-Szerszeń and J. Szczodrak (2011)  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-d-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol. Lett.*, 33: 787-795.
- Zannini, E., D. M. Waters, A. Coffey and E. K. Arendt (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 1121-1135.
- Zapata, A. A. and M. Lara-Flores (2012) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Nile tilapia intestine (*Oreochromis niloticus*). *J. Biol. Life Sci.*, 4: 164-171.

## Screening of the Dextran-producing Bacterium, *Leuconostoc mesenteroides* B4, in the Intestines of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*)

Mei-Ying Huang, Huei-Jen Ju\*, Liang-Wei Tseng and Jinn-Rong Hseu

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

### ABSTRACT

This study was devoted to the screening of a dextran-producing bacterium in the intestines of fishes. The structure of the dextran produced by the bacterium was characterized, the content of the dextran was estimated, and the dextran-producing bacterium was identified. The results indicated the presence of one strain, B4, which was isolated from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and had a dextran-producing property. The strain B4 was cultured in a 20%-sucrose nutrient medium. The amount of dextran produced by the strain B4 was 50 mg/ml after 48 hr of incubation at 28°C. The molecular weight of the dextran was  $9.5 \times 10^5$  Da. The hydrolysate derived from acid and heating treatments of the dextran was mainly glucose. In comparison with previous reports, the  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the dextran showed that its structure was similar to those of other dextrans which contain  $\alpha$  (1-6)-linked backbones. Thus, the glucose polymer produced by the strain B4 was identified as dextran with  $\alpha$  (1-6)-linked backbones that had  $\alpha$  (1-3) branches. The strain B4 was identified as *Leuconostoc mesenteroides* by partial 16S rRNA gene sequencing and named *L. mesenteroides* B4.

**Key words:** screening, dextran-producing bacterium, intestine, largemouth bass

---

\*Correspondence: Division of Aquaculture, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung, Taiwan 202. TEL: (02)2463-3101; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjen@mail.tfrin.gov.tw