**高产胞外多糖乳酸菌的筛选鉴定及培养条件优化研究**

摘 要 乳酸菌(lactic acid bacteria，LAB)，是食品工业中应用最广泛的微生物，既增加口感，又可增加营养，延长食品的保鲜期。这些作用除了与乳酸菌产生的有机酸、肽、氨基酸和香味物质有关外，还与其产生的EPS有重要关系。因此，本实验从酸面团中分离筛选产胞外多糖能力最强的乳酸菌ZH-7，经16s RNA鉴定后，确定其为植物乳杆菌，应用苯酚—硫酸法测定其胞外多糖的产量。分别改变其添加量、培养方式、培养温度、培养时间和pH等培养条件，探索这些因素对乳酸菌 ZH-7胞外多糖生物合成能力的影响。结果表明：在培养基pH为5-7，添加量为0.8%，在30℃ 恒温培养箱中静置培养18h时的产胞外多糖能力最强。

关键词 乳酸菌；胞外多糖；筛选；培养条件优化

**Screening and Identification of High-yield Extracellular Polysaccharide Lactic Acid Bacteria and Optimization of Culture Conditions**

**Abstract:**Lactic acid bacteria (LAB) is the most widely used microorganism in the food industry, which not only increases the taste, but also increases nutrition and prolongs the shelf life of food. In addition to the organic acids, peptides, amino acids and aromas produced by lactic acid bacteria, these effects are also related to the EPS produced. Therefore, in this experiment, the lactic acid bacteria ZH-7, which has the strongest ability to produce extracellular polysaccharides, was isolated and screened from the acid dough. After identification by 16s RNA, it was identified as Lactobacillus plantarum, and the yield of extracellular polysaccharide was determined by phenol-sulfuric acid method. The culture conditions of the addition amount, culture method, culture temperature, culture time and pH were changed respectively, and the effects of these factors on the biosynthesis ability of lactic acid bacteria ZH-7 extracellular polysaccharide were explored. The results showed that the pH of the medium was 5-7, the addition amount was 0.8%, and the ability to produce extracellular polysaccharide was the strongest when it was statically cultured for 30 hours in a constant temperature incubator at 30 °C.

**Keywords:** lactic acid bacteria; extracellular polysaccharide; screening; optimization of culture conditions

目 录

[1 绪论 1](#_Toc130406370)

[1．1 乳酸菌简介 1](#_Toc130406371)

[1．2 酸面团中乳酸菌的分离、筛选及鉴定 2](#_Toc130406372)

[1．3 乳酸菌胞外多糖 3](#_Toc130406373)

[1．4 国内外研究 5](#_Toc130406374)

[1．5 立题背景和意义 6](#_Toc130406375)

[2 材料与仪器 6](#_Toc130406376)

[2.1 主要试剂 6](#_Toc130406377)

[2．2 主要实验仪器 6](#_Toc130406378)

[2．3 培养基 7](#_Toc130406379)

[3 实验方法 7](#_Toc130406380)

[3．1 乳酸菌的的分离、筛选和鉴定 7](#_Toc130406381)

[3．2 形态学观察 8](#_Toc130406382)

[3．3 胞外多糖的测定 8](#_Toc130406383)

[3．4 乳酸菌的鉴定和系统发育树分析 8](#_Toc130406384)

[3．5 菌株产胞外多糖条件分析 10](#_Toc130406385)

[4 结果与分析 10](#_Toc130406386)

[4．1 乳酸菌的分离、筛选和鉴定 10](#_Toc130406387)

[4．2 乳酸菌产胞外多糖条件优化 15](#_Toc130406388)

# 1 绪论

乳酸菌是一类能发酵碳水化合物产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌的通称。以国际上普遍采用的 Bergey 氏系统细菌学手册中的生化及形态分类方法，乳酸菌目前分为四大类：革兰氏阳性无芽孢杆菌、形成内生芽孢的杆菌、革兰氏阳性兼性厌氧球菌、不规则形状的专性厌氧菌，共计23个属。目前已知乳酸菌发挥主要生理功能特性的机理,除了定植、主要代谢产物(如乳酸等)改善肠道内环境外,乳酸菌的次生代谢产物如细菌素、超氧化物歧化酶(superoxidase dismutase,SOD)、胞外多糖(exopolysaccharide,EPS)等也具有重要的作用。

多糖是指由20个以上单糖组成的糖类化合物，根据来源不同分为植物多糖、动物多糖和微生物多糖。根据糖类组成不同，又可分为同多糖和杂多糖。 乳酸菌胞外多糖（lactic acid bacterium expolysaccharides，LAB-EPS），是乳酸菌在生长代谢过程中合成并分泌到细胞壁外的多糖。乳酸菌胞外多糖作为食品增稠剂及凝胶剂，已经广泛应用到食品生产中。乳酸菌胞外多糖可以作为抗氧化剂，防止机体衰老，保持机体青春活力，并且能够刺激免疫细胞数量的增加，增强机体的免疫能力等，其可以作为抗氧化剂应用到医学中[1]，因此研究 LAB EPS 具有重要的理论意义和实践意义。

本实验致力于酸面团中的菌株进行富集，集中培养。再进行分析和筛选，复筛后找到其中的产胞外多糖乳酸菌进行形态学观察并单独培养，测定其中的胞外多糖含量。找到合适的乳酸菌后，对其进行乳酸菌产胞外多糖能力的测试，测试手段包括添加量、培养方式、培养温度、培养pH以及培养时间，从而确定该乳酸菌最适产胞外多糖的能力。

**1．1 乳酸菌简介**

乳酸菌是发酵糖类主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰染色阳性细菌的总称。凡是能从葡萄糖或乳糖的发酵过程中产生乳酸的细菌统称为乳酸菌。乳酸菌最早是从牛奶中分离出来的，随后又逐渐在一些发酵品和食物中发现了乳酸菌的存在。乳酸菌广泛分布在自然界中，并且乳酸菌的种类也是非常的繁多，细菌、球菌以及杆菌占了乳酸菌总数中的绝大部分[2]。目前，自然界中已发现的乳酸菌在分类学上至少有23个属，但在食品、医药等领域应用较多的主要有乳杆菌属(Lactobactillus)、乳球菌属(Lactococcus)、肠球菌属、明串珠菌属(Leuconostoc)、片球菌属、链球菌属(Streptococcus)及双歧杆菌属（Bifidobacterium）等[3]。其主要生理功能有提供营养、增强免疫功能、改善肠道功能等[4]。有研究表明，乳酸菌有干预肝脏胆固醇堆积，降低血清胆固醇的作用[5-6]。而在对天然抗氧化剂的研究中显示，具有抗氧化功能的菌株多分布于乳酸杆菌属[7]。目前，乳酸菌在人类健康食品方面的应用也非常广泛，至少包括益生菌食品（含饮料、固体饮料、保健食品等）、乳制品、果蔬食品、酒、调味品、食品保鲜等。随着我国经济稳定发展，人们对健康食品的需求愈来愈强烈，乳酸菌相关研究及应用也成为热点之一[8]。

**1．2 酸面团中乳酸菌的分离、筛选及鉴定**

我国传统的面食发酵剂类似于西方发酵面包用的酸面团，在我国一般被称为“老面”、“酵子”、“面肥”等[9]，具有悠久的使用历史。酸面团受乳酸菌的影响改变了质构，延缓老化，并且延长了其面制品的货架期[10]，因此从酸面团中分离、筛选及鉴定优良的乳酸菌菌种并加以应用，对发酵面制品的工艺起着至关重要的作用。

陈军丽[11]从不同来源的传统发酵剂中分离得到 16 株乳酸菌，将这 16 株菌添加到面团中应用于馒头制作，并进行感官评价，筛选出评分较高的 2 株菌乳酸菌即 DN812 和 DM616，经鉴定分别为：植物乳杆菌（Lactobacillus planetarium）和嗜热链球菌（Streptococcus thermophilus）。由刘同杰等[12]从北方地区 6 份发酵剂样品中，测定了其酸度和菌落总数，并对分离、纯化、初筛后得到的 75 株细菌和 60 株酵母菌进行了测序鉴定。结果发现了 8 种乳酸菌，分别为短乳杆菌（Lactobacillus brevis）、植物乳杆菌（Lactobacillus plantarum ）、 旧 金 山 乳 杆 菌 （ Lactobacillus sanfranciscensis ）、 面 包 乳 杆 菌 （ Lactobacillus crustorum）、戊糖片球菌（Pediococcus pentosaceus）、类食品乳杆菌（Lactobacillus paralimentarius）、明登乳杆菌（ Lactobacillus mindensis ）和粪 肠 球 菌（Enterococcus faecium）。李自红[13]从民间采集的传统发酵剂中分离、筛选出了乳酸菌 27株和酵母菌 25 株，通过单因素实验选出对馒头品质影响较大的乳酸菌和酵母菌各三株，在馒头的制作过程中复合分离出的乳酸菌和酵母菌的添加量，通过正交实验得出结论啤酒酵母添加量为 0.15g、乳酸乳球菌亚中添加量为 0.10g、发酵时间为 60min、发酵温度为 32℃ 时制作出的馒头品质最佳。郦金龙等[14]通过考察碳源、氮源、pH 值、培养温度、摇瓶转速、接种量等影响因素，来提高乳酸菌的产酸能力。分子生物学鉴定结果表明，筛选到的 3 株乳酸菌同为球菌属的粪肠球菌，该乳酸菌的最佳产酸条件为：葡萄糖为碳源，酵母提取物为氮源，培养基初始 pH 值 6.8，装液量50mL，培养温度 25 ℃，转速 80 r/min，接种量 2.0%。感官评价结果表明：该乳酸菌对馒头的表皮颜色和表皮状况均有较显著影响。

**1．3 乳酸菌胞外多糖**

1.3.1 概述

乳酸菌是历史悠久的工业生产菌，被广泛用于乳制品、蔬菜和肉类制品的加工，尤其在各种酸乳和干酪等发酵乳制品生产中，对其风味、质构和提高产品的营养保健特性发挥着极其重要的作用，这些功能主要是通过其代谢过程中形成的 EPS 物质来完成的[15-16]。

乳酸菌胞外多糖,是乳酸菌在合成代谢过程中分泌到细胞外常渗于培养基的一类糖类化合物，有的依附于微生物细胞壁形成荚膜，成为荚膜多糖；有的进入培养基形成粘液，成为粘液多糖[17],它们都是微生物代谢次产物，分子量多在 4.0×104～6.0×106之间。LAB EPS 可赋予发酵乳制品特殊的质构和风味，起到食品添加剂的作用，而广泛被用于各种食品的增稠、稳定、乳化、胶凝及持水[18]；胞外多糖还具有生物活性如免疫活性、抗肿瘤和抗溃疡，可应用于医药领域。

1.3.2 乳酸菌胞外多糖的化学结构

胞外多糖从化学结构上可分为同型胞外多糖和异型胞外多糖两种。同型胞外多糖由一种类型的单糖构成，而异型胞外多糖则由两种以上不同单糖构成的重复单位组成[19]。

同型胞外多糖分为α-D-葡聚糖、β-D-葡聚糖、果聚糖、半乳聚糖等4种类型[20]。α-D-葡聚糖的代表例有右旋糖酐(dextran)和普鲁兰(pullulan)；β-D-葡聚糖的代表例有可得然胶(curdlan)和硬葡聚糖(scleroglucan)；果聚糖的代表例有果聚糖(levan)[20-22]。这些微生物多糖在配糖键、分枝类型、多聚体链长以及高级结构等方面都有明显差异。在乳酸菌同型胞外多糖中较为著名的有右旋糖酐，右旋糖酐的主链由α-D-Glcp(1→6)、α-D-Glcp(1→3)连接而成。这种特殊的化学结构赋予右旋糖酐独特的物理特性，能改善产品的流变学特性，增加产品的黏性和稳定性，在食品、医药等诸多领域中发挥重要作用。

一般来说，乳酸菌异性胞外多糖主链骨架是由 D-葡萄糖、D-半乳糖、L-鼠李糖等单糖构成的复单位连接而成[23]。自Doco等[24]报道了嗜热链球(Streptococcus thermophilus)胞外多糖的结构以来，已知化学结构的乳酸菌胞外多糖超过50种，其中，具有独特结构的多糖有34种。与同型胞外多糖比，异型胞外多糖重复单位的主链及其支链的结构具有多样性，少数异型胞外多糖重复单位中含有N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和葡糖醛酸等取代基，有时还发现含有磷酸基、乙酰基和甘油等非糖残基的胞外多糖。在已报道的胞外多糖中，S. thermophilus Sc136和S. thermophilus SFi20异型胞外多糖的重复单位中含有N-乙酰基[25]。S. thermophilus MR-1C的重复单位中含有L-果糖残基，该多糖的主链由半乳糖、鼠李糖残基构成，在鼠李糖残基上分别链接两个半乳糖残基和一个L-果糖残基，是迄今为止报道的胞外多糖中构成重复单位单糖数最多的多糖[25]。

乳酸菌生产的胞外多糖种类繁多，它们的化学结构也存在明显差异。一般来说，β-1,4结合键链接的胞外多糖比β-1,3键或β-1,2键链接的胞外多糖具有更强的黏性[26]，由α结合键链接的胞外多糖比β结合键链接的胞外多糖具有更强的弹性[26]。

1.3.3 乳酸菌胞外多糖的生物合成机理

微生物胞外多糖的生物合成因菌种不同而发生在生长的不同阶段和环境条件下。按合成位点和合成模式的不同，微生物胞外多糖的合成分为位于细胞壁外的同源多糖的合成和位于细胞膜上的异源多糖的合成。同源多糖的合成不依赖 C55-lipid-PP 的合成模式，异源多糖的合成则依赖 C55-lipid-PP 的合成模式。

（1）乳酸菌同型胞外多糖的生物合成

同型胞外多糖是以蔗糖为基质，在高特异性糖基转移酶的催化作用下，在细胞外合成的多糖[27]。同型胞外多糖的代表例有右旋糖酐，它的生物合成途径受到广泛关注。右旋糖酐的主要生产菌株为肠膜明串珠菌(Leuconostoc，mesenteroides subsp.mesenteroides或Leuconostoc，mesenteroides subsp. dextranicun)，这些菌株以蔗糖为基质，在糖基转移酶(glucansucrase)的催化作用下，在细胞表面或细胞外合成。

（2）乳酸菌异型胞外多糖的生物合成

多糖是天然生物大分子物质，几乎存在于所有有机体中。乳酸菌异型胞外多糖的生物合成过程比较复杂，与细胞壁的构成成分肽聚糖、脂多糖的合成过程相似。这些碳水化合物在构成成分、细胞膜上的合成机制以及向细胞膜外的输送等方面具有一定的相似性[23]。以Lc. *lactis* NIZO B40异型胞外多糖的生物合成途径为例，详细介绍乳酸菌异型胞外多糖糖核苷酸的生物合成、重复单位的合成、聚合以及向细胞外的输出过程。

**1．4 国内外研究**

微生物次级代谢产物的积累不仅需要碳源、氮源、水分和多种无机盐，而且需要适宜的值、培养温度和发酵时间[28]。当我们需要获得较为理想的代谢产物量时，通过对微生物的生长环境进行优化及控制，可以使微生物在适宜的环境中生长，从而积累更多的代谢产物，达到我们所需产物的目标量。

1.4.1 国外研究

在微生物生长过程中，对培养基的成分进行优化，可以提高菌株潜在能力的发挥，从而提高菌株在发酵过程中的生产效率。培养基成分的优化方法，主要有单因素法、正交设计实验法以及响应面分析法等。Gancel 等[29]以庶糖、乳糖、葡萄糖和果糖作为碳源，对唾液链球菌嗜热亚种产EPS的发酵条件进行优化，研究发现：用乳糖作为碳源时，唾液链球菌嗜热亚种合成EPS的量最大。Cerning等[30] 通过对干酪乳杆菌的研究，结果表明：以葡萄糖作为碳源时，干酪乳杆菌LC2W合成的EPS量最大。刘翠平等[31]采用响应面法（RSA）对干酪乳杆菌合成胞外多糖的培养条件进行优化，最后得出干酪乳杆菌LC2W合成胞外多糖的最优培养条件为：接种量4%，发酵温度31.5℃ ，发酵时间32h，在此条件下胞外多 糖的产量可达157.46mg/L ,比优化前产量提高了30.81%。

1.4.2 国内研究

2008年，张天琪等[32] 对乳酸菌产EPS的培养条件进行优化研究，结果表明：在脱脂乳培养基中添加1%的酪氨酸和5%的葡萄糖，乳酸菌EPS的产量可以达到155mg/L。2009年，张秀丽等[33]对戊糖乳杆菌的保水性进行研究，结果表明：当培养基不同时，合成的胞外多糖的产量也不同。当用合成和半合成培养基培养戊糖乳杆菌时，其产量在40-600mg/L之间；以脱脂乳为培养基进行培养时，其产量在50-425mg/L之间。刘晶等[34]在前期从芬兰传统混菌发酵乳制品Viili中分离得到1株副干酪乳杆菌的基础上，进一步探究营养条件和培养条件对其产胞外多糖的影响，结果表明：优化的营养条件：果糖添加量 2%，大豆蛋白胨 2.5%，柠檬酸三铵 0.4%，在此条件下胞外多糖的产量为193.99 mg/L，比未优化前提高 2.6 倍。 优化的培养条件：接菌量 4%、培养时间 28 h、温度 32 ℃，此条件下胞外多糖产糖量达 263.74 mg/L，比之前高 36%。孙军德等[35]从酸菜汁和生鲜奶中筛选出一株高产胞外多糖的乳酸菌 L3，分别改变基础培养基的碳源、氮源、发酵温度、时间、pH 等条件，探索其对乳酸菌 L3 胞外多糖生物合成能力的影响。 结果表明：该菌株胞外多糖的最佳生物合成条件为：初始 pH 值 6.5，发酵温度 37℃，发酵时间 24h，此条件下胞外多糖的生物合成量为 108.49mg·L-1。综上所述，通过改变微生物的生长环境，可以提高微生物的代谢产物量。

**1．5 立题背景和意义**

LAB EPS是由乳酸菌在生长代谢过程中发酵产生并分泌到细胞外的黏液或荚膜多糖，是常渗入培养基中的一种糖类化合物[36-37]。 乳酸菌 EPS 可以改善发酵乳的组织状态和菌株对肠道黏膜的吸附。 RAWSOM 等研究结果认为利用产 EPS 嗜热乳酸菌生产发酵乳，可以改善搅拌型酸乳的组织状态，防止乳清分离，无需添加稳定剂。 此外，自从 GABRIETA 在 1998 年报道了乳酸菌 EPS 具有抗肿瘤作用，就引起了许多学者的广泛注意[38]。 除明串珠菌发酵生产的葡聚糖已广泛应用于石油、化工、医疗等行业外，目前还未见其他乳酸菌 EPS 应用报道，这主要是由于这些产品生产成本高，在普通产品中不具备应用价值。 因此必须进一步提高生物合成量的研究，如高产菌株的筛选、发酵工艺的优化、新型发酵方法的研究等，以便具有实际应用和开发价值。本课题主要从酸面团中分离出产胞外多糖能力最强的乳酸菌，并提取其胞外多糖，通过改变添加量、培养方式、培养温度、培养时间和pH等培养条件，得到了优化后的乳酸菌 EPS 合成条件。 这一最优合成条件，为今后进一步对胞外多糖进行分离纯化和结构分析奠定基础。

# 2 材料与仪器

**2.1 主要试剂**

葡萄糖，氢氧化钠，琼脂，蒸馏水，酵母膏，酵母粉，蛋白胨，溴甲酚绿指示剂，吐温，K2HPO4，柠檬酸二铵，乙酸钠，MgSO4.7H2O，MnSO4，碳酸钙，苯酚，硫酸，酒石酸钾钠等以上试剂均为国产分析纯试剂。

**2．2 主要实验仪器**

表1 实验仪器

Table.1 Experimental Instruments

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 型号 | 产地 |
| 生物显微镜 | BM-1000型 | 南京江南永新光学有限公司 |
| 电子天平 | BS224S | 多利斯科学仪器（北京）有限公司 |
| 电子分析天平 | LE204E/02型 | 梅特勒-托利多仪器有限公司 |
| 水浴恒温振荡器 | SHA-C型 | 常州澳华仪器有限公司 |
| 生物安全柜 | AC2-4S1 | ESCO |
| 紫外分光光度计 | 722s型 | 常州澳华仪器有限公司 |
| 立式自动压力蒸汽灭菌器 | GI54DWS | 致微（厦门）仪器有限公司 |
| 生化培养箱 | MIR-150A型 | 上海三腾仪器有限公司 |

**2．3 培养基**

MRS液体培养基：蛋白胨10g，牛肉膏10g，酵母提取物5g，K2HPO4 2g，柠檬酸二铵2g，乙酸钠5g，葡萄糖20g，吐温-80 lmL，MgSO4.7H2O 0.5g，MnSO4 0.25g，蒸馏水1000mL，pH值6.2-6.4，12l℃灭菌20min。固体培养基在液体培养基的基础上添加2%的琼脂。

MRS-溴甲酚绿（MRS改良培养基）培养基：牛肉膏10g，蛋白胨10g，酵母膏10g，番茄汁200g，葡萄糖10g，吐温0.5ml，碳酸钙20g，溴甲酚绿0.1g，琼脂20g，蒸馏水1000 mL，12l℃灭菌20min。

**3 实验方法**

**3．1 乳酸菌的的分离、筛选和鉴定**

初筛：准确称取活化后的老面面团样品10g，放入盛有90mL无菌水已灭菌的三角瓶中，震荡搅拌摇匀，使老面与水充分混合。在无菌条件下用移液枪吸100uL富集液于装有4.9mL无菌水的试管中，进行梯度稀释，稀释至10-1到10-6，取10-3到10-5的稀释液200μL稀释液涂布于MRS-溴甲酚绿培养基上，将MRS-溴甲酚绿培养基放置于37℃恒温培养箱中倒置培养48h，观察其颜色变化。理论上其周围是黄色的圆圈，记录菌落特征和形态，并在MRS固体培养基的平板上进行多次划线分离，重复3-4次，最终获得纯的单菌落。将纯化好的单菌落接入MRS液体培养基中，培养过夜后用 30%的甘油保菌，于-80℃冰箱中保存。

复筛：将初筛筛到的纯种菌株分别接种于MRS液体培养基中，30℃发酵24h，测定发酵液中胞外多糖的含量，选择产胞外多糖含量最高的菌株进行ITS鉴定。

**3．2 形态学观察**

将初筛后的纯种菌株接种到MRS固体培养基上，37℃恒温培养箱中培养48h，挑取一菌环，在无菌水中进行适当稀释，制成菌悬液，于生物安全柜用移液枪移取菌悬液于载玻片上，盖上盖玻片并将菌悬液压制均匀且无气泡。1min后在显微镜下观察。

**3．3 胞外多糖的测定**

3.3.1 乳酸菌活化

将低温保存的乳酸菌取出，置于37℃水浴锅中3小时，将液体乳酸菌通过平板涂布法接入固体培养基中，经37℃生化培养箱培养3天，再将乳酸菌通过平板划线法接入MRS固体培养基中培养24小时，重复3次，得到完全活化的乳酸菌备用。

3.3.2 胞外多糖的提取

将筛选得到的菌株接种于筛选MRS液体培养基中，30℃发酵24h，取2mL发酵液，沸水中煮沸10min，冷却至室温，然后在离心机中离心（4℃ 8000r/min)20min，沉淀物用蒸馏水洗涤一次，再离心，合并两次上清液。于上清液中加入8%三氯乙酸（TCA)，4℃沉淀蛋白过夜，离心(4℃ 12000r/min)15min，去除沉淀，于上清液中加入其三倍体积的95%的无水乙醇，4℃沉淀过夜，离心(4℃ 10000r/min)20min，得到多糖沉淀。

3.3.3 硫酸-苯酚法测定乳酸菌胞外多糖的含量

乳酸菌胞外多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法，用葡萄糖作标准曲线。将3.3.2得到的多糖沉淀重新溶于水中，制成多糖溶液，采用苯酚-硫酸法在波长为490nm处测其吸光度值，并将测得的吸光度值代入葡萄糖标准曲线，查找其相对应的糖含量，即得其胞外多糖的产量，以空白培养基为对照，扣除背景干扰。

**3．4 乳酸菌的鉴定和系统发育树分析**

3.4.1 乳酸菌的鉴定

（1）乳酸菌PCR序列扩增

根据乳酸菌的16S rDNA基因序列的保守区域，本研究中扩增引物（生工生物工程（上海）股份有限公司合成）采用细菌通用引物为27F:5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。先把引物在10000rpm,离心3min,加双蒸水配置成自己所要的浓度,置于-20℃冰箱保存备用。

参考碱裂解法Carle P, Saillard C, Bové J M. DNA EXTRACTION AND PURIFICATION[M]// Methods in Mycoplasmology. 1983.提取每株菌的基因组DNA并作修改。由于细菌无细胞壁，不需要进行破壁处理，因此用无菌牙签挑取少量单菌落体重重悬于无菌双重蒸馏水（ddH2O）中，震荡混匀得菌株模板，阴性对照以ddH2O为模板，同条件下进行菌株PCR序列扩增。乳酸菌扩增的PCR扩增体系见表2，总体积为100uL，整个体系构建过程应在冰盒上进行操作，PCR扩增条件见表3。

表2 PCR扩增体系

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 5X Buffer | 20uL |
| 引物1 | 2uL |
| 引物2 | 2uL |
| 模板 | 2uL |
| dNTP | 10uL |
| ddH2O | 63uL |
| Primstar(高保真) | 1uL |
| 总体积 | 100uL |

表3 PCR扩增条件

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 温度 | 时间 | 备注 |
| 94℃ | 5min |  |
| 94℃ | 30s | 30个cycle |
| 55℃ | 30s |
| 72℃ | 1min 45s |
| 72℃ | 10min |  |
| 4℃ | 10h |  |

（2）凝胶电泳

PCR扩增结束后将溴酚蓝和试样混合点样时,点一个maker作为指示标样同时做一个空白对照实验,共同和PCR产物进行0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,GeLstain染色液染色后在紫外凝胶扫描仪中进行扫描,照相后保存图像。将扩增出来的菌体的 16S rRNA 基因产品送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行序列测序，测序使用的是通用引物。

3.4.2 菌株发育树绘制

测得的 16S rRNA 序列长约 1500dq 与NCBI数据库中的己知种属序列进行Blast同源性比对,选择与待测菌株序列同源性最高的己知序列,根据比对结果确定待测乳酸菌株的种属。并利用MEGA6.0等软件,采用Neighbour-Joinninng法构建菌株的系统发育树,研究菌株之间的亲缘关系。

**3．5 菌株产胞外多糖条件分析**

3.5.1 乳酸菌添加量对乳酸菌产胞外多糖的影响

将筛选出的乳酸菌菌株活化后，菌种母液（OD600=1.680)按0、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%和2%的接重量分别接种到MRS液体培养基中，将其放置在37℃恒温培养箱中倒置培养24h，测其产胞外多糖的含量。

3.5.2 培养方式对乳酸菌产胞外多糖的影响

将筛选出的乳酸菌菌株活化后，菌种母液（OD600=1.680)按1.2%的接重量接种到MRS液体培养集中，分别将其放置在37℃恒温培养箱、100r/min、150r/min、200r/min和液体石蜡液封的无氧培养基中倒置培养24h，测其产胞外多糖的含量。

3.5.3 培养温度对乳酸菌产胞外多糖的影响

将筛选出的乳酸菌菌株活化后，菌种母液（OD600=1.680)按1.2%的接重量接种到MRS液体培养基中，分别将其放置于20、25、30、37、42℃恒温培养箱中培养24h,测其产胞外多糖的含量。

3.5.4 培养时间对乳酸菌产胞外多糖的影响

将筛选出的乳酸菌菌株活化，菌种母液（OD600=1.680)按1.2%的接重量接种到MRS液体培养基中在37℃的恒温培养箱内培养0、6h、12h、24h、、36h、42h和48h后，用不接种的液体MRS培养基做空白对照，测定其胞外多糖的产量。

3.5.5 pH对乳酸菌产胞外多糖的影响

将筛选出的乳酸菌菌株活化，菌种母液（OD600=1.680)按1.2%的接重量接种到pH为3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7的MRS液体培养基中，于37℃的恒温培养箱内倒置培养24h,测其胞外多糖的含量。

# 4 结果与分析

**4．1 乳酸菌的分离、筛选和鉴定**

4.1.1 乳酸菌的分离和筛选

根据乳酸菌菌落形态特征以及 能在MRS-溴甲酚绿培养基上形成黄色圆圈的特点，进行划线分离纯化，得到10株乳酸菌疑似菌株,菌落编号依次为ZH1-10。对分离得到的菌株通过对其菌落形态和细胞形态观察可以分为三类，其菌落形态及细胞形态见表5。Ⅰ类乳酸菌（菌落编号ZH-1、ZH-4、ZH-7、ZH-10），Ⅱ类乳酸菌（菌落编号ZH-3、、ZH-8），Ⅲ类乳酸菌（菌落编号ZH-2、ZH-5、ZH-6、ZH-9），其菌落形态如图1，显微镜观察如图2所示。

由表4、图1、图2可知，该3类乳酸菌颜色各异，Ⅱ类乳酸菌颜色为灰白色，Ⅰ、Ⅲ类酵母都是白色系。Ⅰ、Ⅱ类乳酸菌形态一样为圆形，Ⅲ类乳酸菌形态为卵圆形。3类乳酸菌中央均凸起，且边缘整齐。Ⅰ类乳酸菌直径大小为3mm,表面湿润光滑，Ⅱ类乳酸菌直径大小为2mm,表面光滑，Ⅲ类乳酸菌直径大小为1mm,表面湿润。从透明度来看，3类乳酸菌均不透明。Ⅰ类乳酸菌细胞形态呈杆状，Ⅱ类乳酸菌细胞形态呈短杆状或短链状，Ⅲ类乳酸菌细胞形态呈球状或链状。由此可知，该三类乳酸菌属于不同种类。

表4 乳酸菌菌落形态与细胞形态

Table 4 Colony Morphology and Cell Morphology of Lactic Acid bacteria

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 菌类 | 颜色 | 形状 | 中央 | 边缘 | 直径大小 | 表面 | 透明度 | 细胞形态 |
| Ⅰ | 白色 | 圆形 | 凸起 | 整齐 | 3mm | 光滑 | 不透明 | 杆状 |
| Ⅱ | 灰白 | 圆形 | 凸起 | 整齐 | 2mm | 湿润光滑 | 不透明 | 短杆状或短链状 |
| Ⅲ | 白色 | 卵圆形 | 凸起 | 整齐 | 1mm | 湿润 | 不透明 | 球状或链状 |

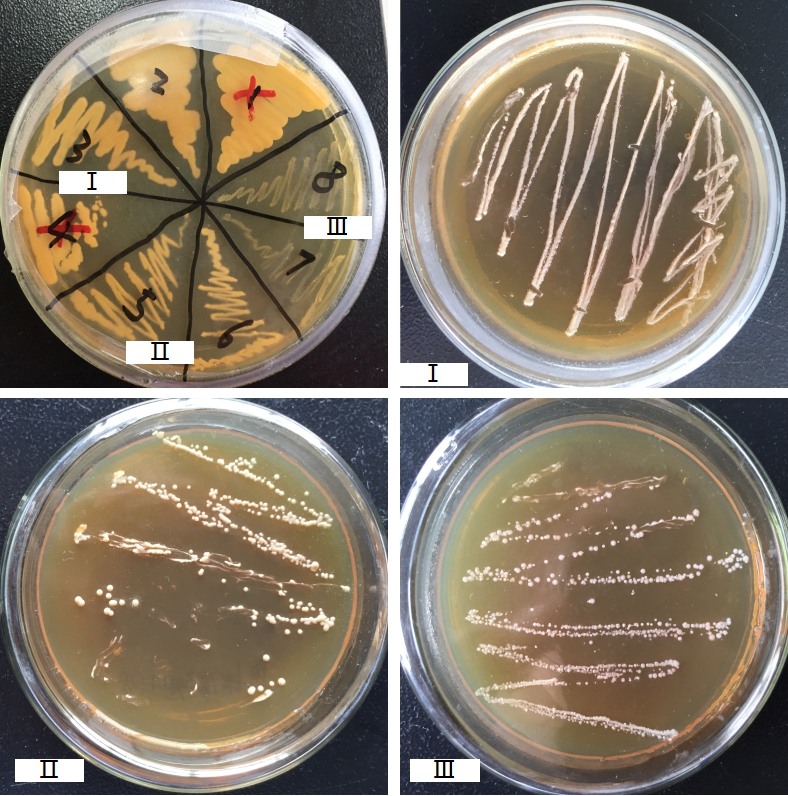


图1乳酸菌菌落图

Fig.1 Lactic acid bacteria colony diagram

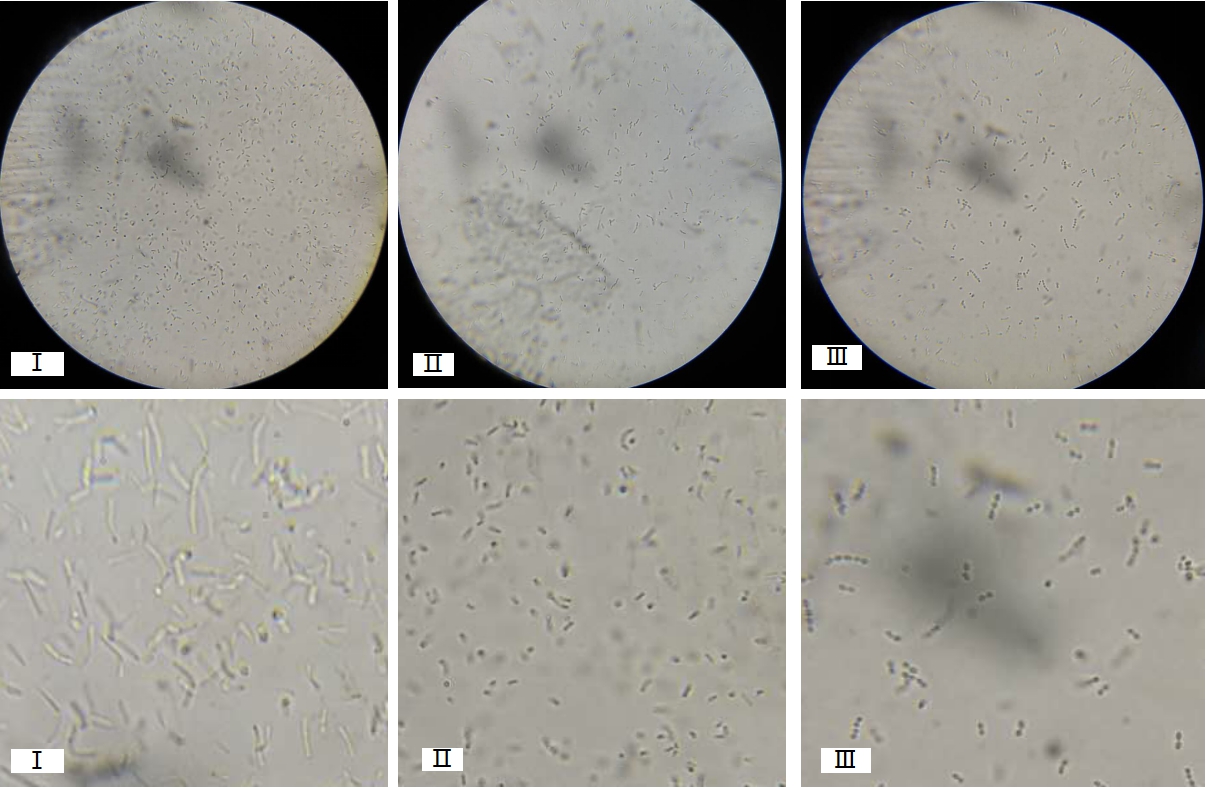


图2 乳酸菌显微镜观察

Fig.2 microscopic observation of lactic acid bacteriat

4.1.2 乳酸菌的复筛

4.1.2.1标准曲线的绘制

以葡萄糖稀释液的质量浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制葡萄糖标准曲线（如图）。标准曲线为y=0.6266x+0.0332,R2=0.9959,这表明葡萄糖质量浓度在范围内0.2-1.8(x100mg/L)，葡萄糖质量浓度与吸光度值之间的线性关系良好。

图3 葡萄糖标准曲线

Fig.3 Glucose standard curve

4.1.2.2胞外多糖含量测定

将分离出来的乳酸菌按1%的接种量接种于液体MRS培养集中，置于37℃的生化恒温培养箱中培养24h，通过苯酚-硫酸法测得发酵液的产糖量如图4。

图4 不同乳酸菌菌株产胞外多糖含量

Fig.4 Content of extracellular polysaccharide produced by different lactic acid bacteria strains

由图4可以看出,在相同培养条件下，菌株ZH-1、ZH-3、ZH-4、ZH-7、ZH-8、ZH-10的产胞外多糖含量高于培养基中所含有得胞外多糖含量，其中乳酸菌菌株ZH-7得产胞外多糖能力最高，达到0.14g/l，且发酵性能稳定，为理想的产胞外多糖乳酸菌。

4.1.3 乳酸菌的鉴定

对酸面团中筛选得到的株菌ZH-7的 DNA 进行 PCR 扩增，用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物浓度，检测结果如图5所示。

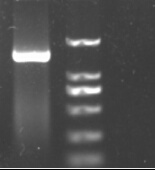
C:\Users\ADMINI~1\AppData\Local\Temp\1509087759(1).png

图5菌株ZH-7 16SrDNA扩增结果

Fig.5 ZH-7 16SrDNA amplification results

由图5可知，与 Marker 电泳结果对比，株菌均在泳道 1500 bp 附近出现了一条清晰的亮带，无特异性扩增，且亮带无弥散、拖尾现象，符合测序要求。

将测序结果通过NCBI的BLAST比对分析，结果见表 5（乳酸菌菌株的 16S rDNA 序列与模式菌株的同源性不小于 99%，可直接鉴定至种），确定分离得到的产胞外多糖乳酸菌为植物乳杆菌。E值表示表示随机匹配的可能性，E值越大，随机匹配的可能性也越大。E值接近零或为零时，具本上就是完全匹配了。

表5 ZH-7菌株ITS鉴定结果

Table5 Identification of ZH-7strain ITS

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
| Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2590 | 2590 | 96% | 0.0 | 99% | [NR\_115605.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NR_115605.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=HENN95HN015) |

通过MEGA6软件构建该菌株16sRNA序列的系统发育树，结果如图6。由图6可以看出，在系统发育树上该株乳酸菌与其对应的模式菌株归于同一个分枝中，说明它们之间存在较近的亲缘关系，ZH-7与 BLAST比对结果一致。

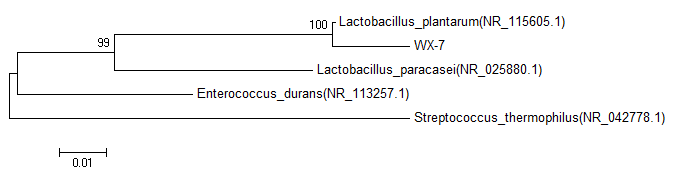
图6 基于16S rDNA序列采用邻接法构乳酸菌菌株的系统发育树

Fig.6 Construction of phylogenetic tree of lab based on 16SrDNA sequence

**4．2 乳酸菌产胞外多糖条件优化**

4.2.1 添加量对乳酸菌产胞外多糖能力的影响

糖含量开始下降。因此，接种量为0.8%时最适宜菌株产胞外多糖。在MRS液体培养基中，接种菌种母液（OD600=1.680)按0、0.4%、0.8%、1.2%、1.6%和2%，发酵24h，其发酵液中的胞外多糖含量如图7所示。

图7添加量对乳酸菌产胞外多糖能力的影响

Fig.7Construction of phylogenetic tree of lab based on 16SrDNA sequence

由图7可知，添加量对植入乳杆菌产胞外多糖含量有影响。（固定其他指标前提下，根据其他论文中描述及经验分析）经过t检验，接种量在0.8%时胞外多糖产量显著高于其他处理组（p＜0.05）。随着菌株接种量的增加，菌株产胞外多。

4.2.2 培养方式对乳酸菌产胞外多糖能力的影响

在MRS液体培养基中，接种1.2%菌种母液（OD600=1.680)，培养方式分别为静置、厌氧、转速分别为100、150和 200，在37℃培养箱中培养24h，其发酵液中的胞外多糖含量，如图8所示。

图8 产酯酵母在不同培养方式下的产酯情况

Figure.8 The production of ester producing yeast under different culture methods

由图8可知，植物乳杆菌在厌氧和转速为100和200时培养，植物乳杆菌产胞外多糖含量基本一致，当转速为150时，胞外多糖含量增加，但其含量略低于静置培养，且在静置培养时，植物乳杆菌产胞外多糖含量达到0.275g/L。因此，静置培养最适宜菌株产胞外多糖。

4.2.3 发酵时间对乳酸菌产胞外多糖能力的影响

在MRS液体培养基中，接种1.2%菌种母液（OD600=1.680)，在37℃培养箱中分别培养6、12、18、24、36和42h，其发酵液中的胞外多糖含量，如图9所示。

图9培养时间对胞外多糖产量的影响

Fig.9 Effect of culture time on Production of EPS

由图9可知，培养时间对植物乳杆菌产胞外多糖的产量有影响。在一定时间范围内，随着发酵时间的延长，植物乳杆菌产胞外多糖的产量增加，当培养时间为18h时，胞外多糖产量达到最大值，即0.292g/L。超过该培养时间范围，继续发酵培养，胞外多糖产量下降。因此，发酵培养18h最适宜菌株产胞外多糖。

4.2.4 发酵温度对乳酸菌产胞外多糖能力的影响

在MRS液体培养基中，接种1.2%菌种母液（OD600=1.680)，分别在20、25、30、37和42℃培养箱中培养24h，其发酵液中的胞外多糖含量，如图10所示。

图10 温度对产酯酵母生长情况及产酯能力的影响

Figure10. Effect of temperature on growth and yield of ester producing yeast

由图10可知，不同的发酵温度,植物乳杆菌胞外多糖的产生情况明显不同。在发酵温度为30℃,胞外多糖产量最高。虽然对于植物乳杆菌而言，37℃是最适合菌体生长的最适温度，但胞外多糖属于次级代谢产物，随着温度的升高，会导致菌株的稳定期提前到来，多糖的产量会明显的降低。因此,发酵温度30℃最适宜菌株产胞外多糖。

4.2.5 pH对乳酸菌产胞外多糖能力的影响

在MRS液体培养基中，接种1.2%菌种母液（OD600=1.680)，发酵起始pH值分别为3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8，在37℃培养箱中培养24h，其发酵液中的胞外多糖含量，如图11所示。

图11 pH对产酯酵母生长情况及产酯能力的影响

Figure11. Effect of pH on growth and yield of ester producing yeast

由图11可知，随着pH的增加，胞外多糖产量呈现先增加后下降的趋势。pH值过高或过低都不利于植物乳杆菌产胞外多糖。这是由于在pH值5.0以下,因为酸的抑制作用，导致乳酸菌不宜生长,产生的胞外多糖产量较少，而pH在7.0以上时，超过了其最适生长pH值范围，菌体亦不宜生长，因而胞外多糖产量较少。因此当pH值5.0一7.0的范围内,可以最大量的生产胞外多糖。

结 论

通过本实验的研究的结果分析，所得出的结论为：

1.从酸面团中分离筛选的产胞外多糖能力最强乳酸菌ZH-7，经16s RNA鉴定后，确定其为植物乳杆菌。

2.通过对菌株ZH-7产胞外多糖条件优化，最终确定其在培养基pH为5-7，添加量为0.8%，在30℃恒温培养箱中静置培养18h时的产胞外多糖能力最强。

参 考 文 献

[1] 唐血梅. 新疆酸马奶中高产胞外多糖乳酸菌的筛选及培养条件优化研究[D].新疆农业大学,2012.

[2] 王姝妤.浅谈乳酸菌的生物学基础以及应用[J].学周刊,2018(06):169-170.

[3] 王娟. 老面中主要微生物的筛选、鉴定及发酵特性研究[D].内蒙古农业大学,2015.

[4] 代永刚,田志刚,南喜平.乳酸菌及其生理功能研究的进展[J].农产品加工(学刊),2009(07):24-26+29.

[5] 田建军,张开屏,李权威,赵艳红,靳烨.乳酸菌对胆固醇代谢调控的物质基础研究进展[J/OL].食品科学:1-9[2019-01-16].http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181218.1334.058.html.

[6] 郭晶晶,张鹏飞,曹承旭,邹婷婷,乌日娜.自然发酵豆酱中降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及对大鼠血清胆固醇的影响[J/OL].食品与发酵工业:1-12[2019-01-16].https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017244.

[7] 赵彤,钟宜科,荀一萍,张栋,王永霞,朱宏,王世杰.乳酸菌抗氧化性及其作用机制研究进展[J].中国食品添加剂,2018(09):202-209.

[8] 张雪东,罗璠,刘云,夏赟,刘冠中.乳酸菌在健康食品中的应用进展[J].上海医药,2018,39(15):25-28.

[9] 张国华,何国庆.我国传统馒头发酵剂的研究现状[J].中国食品学报,2012,12(11):115-120.

[10] 刘长建,姜波,崔玉波,刘秋,齐小辉.生物防腐剂乳酸菌素的研究进展[J].微生物学杂志,2010,30(03):87-90.

[11] 陈军丽. 乳酸菌对馒头面团发酵影响的研究[D].河南工业大学,2012.

[12] 刘同杰,李云,吴诗榕,金乐天,张国华,杨浣漪,何国庆.传统酸面团中细菌与酵母菌的分离与鉴定[J].现代食品科技,2014,30(09):114-120+148.

[13] 李自红. 传统发酵剂微生物的筛选、鉴定及对馒头品质的影响[D].河南工业大学,2011.

[14] 郦金龙,师雨梦,滕超,朱运平,李秀婷.老面中乳酸菌产酸性能优化及对馒头品质的影响[J].中国食品学报,2018,18(05):106-114.

[15] Patricia Ruas-Madiedo,Jeroen Hugenholtz,Pieternela Zoon.An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal . 2002

[16] Philippe Duboc,Beat Mollet.Applications of exopolysaccharides in the dairy industry.International Dairy Journal . 2001

[17] 赵玉臣,王迎俊,王忠凤.乳酸菌胞外多糖[J].中国乳业,2003(04):32-35.

[18] 钟颜麟,彭志英,赵谋明.乳酸菌胞外多糖的研究[J].中国乳品工业,1999(04):7-10.

[19] HASSAN A N. ADSA Foundation Scholar Award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy

foods[J]. J Dairy Sci, 2008, 91(4): 1282-1298.

[20] MALIK A, RADJI M, KRALJ S, et al. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different Weissella confusa strains from soya[J]. FEMS

Microbiol Lett, 2009, 300: 131-138.

1. BADEL S, BERNARDI T, MICHAUD P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides[J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(1): 54-66.

[22] van HIJUM S A, KRALJ S, OZIMEK L K, et al. Structure-function

relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70: 157-176.

[23] de VUYST L, DEGEEST B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23: 153-177.

[24] DOCO T, WIERUSZESKI J M, FOURNET B, et al. Structure of an exocellular polysaccharide produced by Streptococcus thermophilus[J]. Carbohydr Res, 1990, 198: 313-321.

[25] LOW D, AHLGREN J A, HORNE D, et al. Role of Streptococcus thermophilus MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture

retention[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2147-2151.

1. KLEEREBEZEM M, van KRANENBURG R. Exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis: from genetic engineering to improved rheological properties?[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76(1/4): 357-365.
2. SCHWAB C, WALTER J, TANNOCK G W, et al. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in Lactobacillus reuteri[J]. Syst Appl Microbiol, 2007, 30(6): 433-443.

[28] P. Ruas-Madiedo,C.G. de los Reyes-Gavilán. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria[J]. Journal of Dairy Science,2005,88(3).

[29] F Gancel,G Novel.Exopolysaccharide production by Streptococcus salivarius ssp. thermophilus cultures. 1. Conditions of production. Journal of Dairy Science . 1994

[30] Cerning,Renard,Thibault, et al.Carbon source requirements for EPS Produced by LactobacillusCGll and Partial structure analysis of the Polymer. applied and envir.Micro . 1994

[31] 刘翠平,吴正钧,王荫榆,郭本恒.响应面法优化干酪乳杆菌LC2W合成胞外多糖的培养条件[J].食品与发酵工业,2008,34(12):85-89.

[32] 张天琪,杨贞耐,孔保华.乳杆菌胞外多糖及其在酸乳中的应用[J].食品科学,2008(09):637-642.

[33] 张秀丽. 戊糖乳杆菌胞外多糖合成条件优化及在酸乳中应用研究[D].北京林业大学,2009.

[34] 刘晶,杨森,陈杨扬,李岩,李雪丹,桑亚新.副干酪乳杆菌VL8产胞外多糖条件优化及其抗氧化性质[J].中国食品学报,2017,17(05):82-89.

[35] 孙军德,刘先.高产胞外多糖乳酸菌的筛选及培养条件优化[J].沈阳农业大学学报,2010,41(01):90-93.

[36] [比]E J 旺达姆,[比]S De 贝特斯,[德]A 斯泰因比歇尔. 多糖Ⅰ—原核生物多糖[M].北京：化学工业出版社,2004:431-433.

[37] SUTHERLAND I W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides[J].Biotech Adv,1994,12（2）:393-4

[38] 李全阳,夏文水.乳酸菌胞外多糖的研究[J].食品与发酵工业,2002,29(5):86-90.