

藏灵菇中高产胞外多糖乳酸菌的筛选 及其发酵性能的研究

刘 慧, 熊利霞, 易欣欣, 张红星*, 张金永
(北京农学院食品科学系, 北京 102206)

摘 要: 本研究采用高通量筛选技术和苯酚-硫酸法获得高产胞外多糖的乳酸菌菌株, 并对其发酵性能和酸奶品质进行测试。筛选的八株菌均具有高产胞外多糖和良好的发酵性能。其菌种鉴定结果是: 菌株KT_x、KL₁、J₁为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*), 菌株T_x为嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*), 菌株KS₄、J₄、P₁、P₅为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 其中嗜热链球菌T_x制备发酵剂的粘度最高, 凝乳时间最短, 感官综合评分最高, 可利用此菌株进一步开发研制具有良好稳定性的功能性酸奶。

关键词: 藏灵菇; 乳酸菌; 胞外多糖; 发酵性能

Study on Screening and Fermentation Capability of Lactobacter Yielding Exopolysaccharide from Kefir Grains

LIU Hui, XIONG Li-xia, YI Xin-xin, ZHANG Hong-xing*, ZHANG Jin-yong
(Department of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstract: In this paper, the strain of high yield exopolysaccharide was obtained by high throughput screening technology and phenol-H₂SO₄ method. These strains prosecution test were assayed for fermentation capability and yogurt quality. Eight strains were screened for high yield exopolysaccharide and good fermentation capability. The results of identified bacteria species are: strain KT_x, KL₁ and J₁ as *Lactobacillus casei*, strain T_x as *Streptococcus thermophilus*, strains KS₄, J₄, P₁, P₅ as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The viscosity of starter produced by *Streptococcus thermophilus* T_x is the best, coagulating time is the shortest, and sensory evaluation is the highest. This strain to exploit can be used and manufacture functional kefir yogurt with good stability.

Key words kefir grains; Lactobacter; exopolysaccharide; fermentation capability

中图分类号: Q939.117

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0211-05

藏灵菇(又称开菲尔粒)是由数种乳酸菌与酵母菌等微生物之间的共生作用而形成的特殊粒状或片状结构。人们直接将开菲尔粒添加到经加热灭菌、冷却后的牛乳中, 使之发酵而生成具有爽快酸味和起泡性的酒精性保健饮料——开菲尔(Kefir)。最近研究证实, Kefir 饮品中含有抑制癌细胞增殖的乳酸菌胞外多糖

(exopolysaccharide, EPS)或荚膜多糖(Capsular polysaccharide), 可降低癌症的发病率。目前, 国内外对乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、明串珠菌属等乳酸细菌产生的EPS研究较多。乳酸菌在生长代谢过程中合成胞外多糖的机制非常复杂, 其生理功能也随营养条件和环境条件的改变而有差异。国外从分子水平上对

收稿日期: 2007-01-31

*通讯作者

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(5062006)

作者简介: 刘慧(1963-), 女, 副教授, 研究方向为食品微生物学技术与发酵工程。

peptides from soybean β -Conglycinin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1995, 43: 574-578.

[13] 张学忠, 王寰宇, 陈松明, 等. 大豆新加工技术原理与应用[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 181-200.

[14] 张英, 董绍华. 氨基酸清除活性氧自由基作用的研究[J]. 科技通报,

1997(5): 312-315.

[15] NIRANJAN R, ERESHA M, WON KJ, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38: 175-182.

产EPS的酶, EPS基因调控和表达因子、EPS基因簇的结构和功能、EPS的生物合成、EPS的分子结构作了有益而深入探讨^[1-2], 而我国在乳酸菌EPS方面的研究工作起步较晚, 只是在近几年才有为数不多的研究报道。本试验从藏灵菇中筛选与鉴定高产EPS的乳酸菌菌株, 并通过对单一菌种发酵剂品质和酸奶品质的测试, 筛选发酵牛乳性能优良的菌株, 旨在利用乳酸菌产生的EPS替代酸奶增稠剂或稳定剂, 即可改善发酵乳流变学特性, 控制酸奶的脱水收缩, 防止乳清析出, 又可利用高产EPS的益生菌株研制功能性酸奶, 具有十分重要意义与长远的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藏灵菇

粒状、片状、家乡型藏灵菇(取自吉林白城、内蒙呼和浩特、哈尔滨市)由本实验室保存。

1.1.2 试剂

3%过氧化氢溶液、10%三氯乙酸、95%和50%乙醇、6%苯酚、含2%碳酸氢钠的1mmol/L EDTA溶液、浓硫酸、0.1mol/L氢氧化钠标准溶液、0.005%靛天青标准溶液、0.5%酚酞指示剂等。

1.1.3 培养基

MRS固体培养基(含碳酸钙、纳他霉素)、普通MRS斜面 and 液体试管培养基、BUA+B培养基^[3]、灭菌脱脂乳(市售蒙牛鲜牛乳)等。

1.1.4 仪器设备

SCR-20BA型高速冷冻离心机 日本MicroStation型全自动微生物鉴定仪 美国Biolog公司; 130万像素数码显微摄像系统 Motic实业集团; OLYMPUS三目生物显微镜、OLYMPUS照相机 日本奥林帕斯公司; BS224S型电子天平(220g/0.1mg) 德国赛多利斯公司; 868型酸度计 美国奥利龙公司; SA-300VL型微处理器控制全自动高压灭菌锅 台湾NDJ-8S型数字式粘度计上海天平厂; UV7500型紫外可见分光光度计 上海天美公司; SW-LJ-IF型无菌超净工作台 苏净集团安泰公司; TG16-WS台式高速离心机 湘仪离心机厂; GHP-

9160型隔水式恒温培养箱 上海一恒公司; DH-101-2BS型电热鼓风干燥箱 天津中环公司; BCD-301型冰箱 青岛海尔公司。

1.2 方法

1.2.1 操作流程

藏灵菇→活化→滤液→稀释→平板接种→分离培养→观察菌落特征→斜面纯种培养→镜检→过氧化氢酶试验→保种→产EPS乳酸菌的筛选→菌种鉴定→发酵性能测定→MRS斜面保种

1.2.2 操作要点

1.2.2.1 藏灵菇的活化

藏灵菇按5%的比例接种至灭菌脱脂乳中, 于25~28℃培养至牛乳凝固。

1.2.2.2 稀释液的制备

取藏灵菇滤液5ml注入带玻璃珠的45ml无菌生理盐水中, 充分振荡后, 吸取1ml注入9ml无菌生理盐水中。重复以上操作, 制备 10^{-4} ~ 10^{-6} 样品稀释菌液。

1.2.2.3 平板接种与分离培养

以稀释倾注法接种平板, 倒入含碳酸钙和纳他霉素的MRS培养基, 混匀, 每个稀释度作两个重复。或直接平板划线接种。于37℃培养后, 观察菌落特征。

1.2.2.4 斜面纯种培养

挑取有溶解圈、粘性较高的单菌落划线接种于MRS斜面培养基中, 于37℃培养24h。

1.2.2.5 镜检

取一环培养物进行革兰氏染色, 油镜观察个体形态和纯度。同时取一环培养物于载玻片上做 H_2O_2 酶实验, 无气泡者视为阴性。将培养物转接入灭菌脱脂乳中连续传代, 37℃培养至乳凝固, 保种备用。

1.2.2.6 产EPS乳酸菌的筛选

将上述筛选发酵性能良好的乳酸菌分别接种于MRS液体培养基中, 37℃增菌培养活化2~3代, 再以1%~2%接种量分别转接入10ml培养基中, 每菌株做3个重复, 37℃培养过夜后, 以苯酚-硫酸法测定培养液中EPS的含量。

葡萄糖标准曲线的制作: 准确称取标准葡萄糖100mg于500ml容量瓶中, 加水至刻度^[4]。各种试剂按

表1 苯酚-硫酸法测多糖标准曲线
Table 1 Standard curve as phenol- H_2SO_4 method

试剂(ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
标准葡萄糖溶液	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
蒸馏水	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
6%苯酚	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
浓硫酸	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
相当于葡萄糖含量($\times 100$ mg/L)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
A _{490nm}	0.000	0.166	0.343	0.514	0.690	0.882	1.050	1.225	1.376	1.583	1.690

表1所示在比色管中均匀混合操作(每一加样量设三管重复),静置冷却后于490nm测定EPS吸光值(以2.0ml蒸馏水按同样显色操作为空白调0)。以葡萄糖含量(100mg/l)为横坐标,吸光度(A_{490nm})为纵坐标绘制标准曲线,如图1所示。

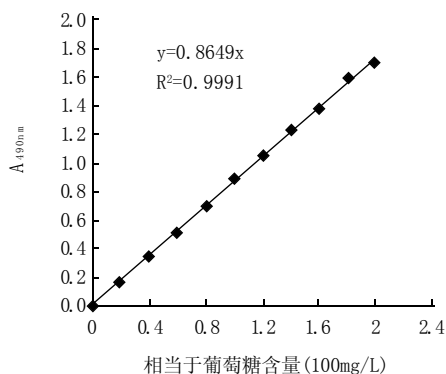


图1 以葡萄糖为基准物质的多糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of polysaccharide for glucose as benchmark substantial

样品EPS含量的测定:取乳酸菌MRS培养液10ml,于4℃,8000r/min离心10min;取上清液加入1/5体积10%三氯乙酸于4℃处理30min,使样品中蛋白质变性沉淀,再于4℃,10000r/min离心10min^[5];取上清液加入三倍体积的95%冷乙醇于4℃过夜后,离心(条件同上),收集沉淀的多糖物质,以蒸馏水溶解后,再用透析袋于4℃透析过夜(期间换无菌蒸馏水3~4次)。取透析后的多糖溶液用蒸馏水定容至10ml,取2ml样品液于25ml比色管中,加入6%的苯酚2ml,迅速加入10ml浓硫酸,于490nm测定吸光值,在标准曲线上查得样品的多糖含量,据此筛选EPS产量较高的乳酸菌株。

1.2.2.7 高产EPS菌株的鉴定

常规生理生化试验鉴定^[6-7]:糖醇类发酵试验,耐盐试验(7.5% NaCl),不同温度试验(10、40℃)。Biolog全自动微生物鉴定仪鉴定^[3]:挑取MRS平板上目的菌的单菌落划线接种于BUA+B平板上(含5%无菌脱纤维绵羊血),37℃培养得到单菌落后,以Biolog专用接种液调整菌悬液的浊度至65%±2%T,接种于微量鉴定板中,37℃厌氧培养24~48h后,鉴定仪上读取鉴定结果。

表2 分离乳酸菌的性状观察结果

Table 2 Observe results of properties of separated Lactobacter

菌种	菌落形态特征	个体形态特征	H ₂ O ₂ 酶试验
乳球菌	大小1~2mm,表面光滑,边缘整齐,呈圆形,无光泽,凸起,灰白色,半透明,菌落周围有溶解CaCO ₃ 的透明圈,有较高黏性。	大小均一,呈球形或卵圆形,一般成对或链状排列,不运动,无芽孢,G ⁺ 菌。	(-)
乳杆菌	大小2~3mm,表面粗糙如雪花状,边缘不规则,无光泽,扁平,灰白色,半透明,菌落周围有溶解CaCO ₃ 的透明圈,有较高黏性。	形态为多样,粗长杆、细长杆、弯曲杆,短杆和棒状杆等,菌体呈长短不一的链杆状排列,不运动,无芽孢,G ⁺ 菌。	(-)

1.2.2.8 分离菌株发酵性能测定

将脱脂乳试管保种的菌株活化2~3代,37℃培养过夜至牛乳凝固。再以1%接种量转接入盛脱脂乳的三角瓶中,每菌株做3个重复,于37℃培养过夜至牛乳凝固后,再冷藏后熟过夜,测定发酵剂的活力(包括凝乳时间、酸度、黏度、还原初天青时间,乳酸菌活菌数量^[3])。分别于37、40、43℃培养过夜至牛乳凝固后,进行感官综合评定(包括色泽5分、滋味和气味30分、组织状态15分,总分50分),据此,筛选出高产EPS且发酵性能优良的菌株。

2 结果与分析

2.1 藏灵菇中乳酸菌的分离结果

采用含碳酸钙和纳他霉素的MRS培养基分离培养结果发现,样品稀释度为10⁻⁴~10⁻⁶菌悬液的平板菌落较清晰,且其周围产生透明圈。这是因乳酸菌产生较多乳酸将培养基中的CaCO₃溶解之故。此外,在MRS培养基中加入一定浓度的纳他霉素,能有效抑制酵母菌和霉菌的生长,因而可达到高通量筛选藏灵菇中乳酸菌的目的。选取典型乳酸菌的单菌落120个,纯粹培养后进行粘性试验、革兰氏染色与H₂O₂酶试验,结果见表2。从中分离出菌落有较高粘性、H₂O₂酶阴性、G⁺的乳酸菌T_x、KS₄、KL₁、J₁、J₄、P₁、P₅、KT_x菌株。

2.2 高产EPS乳酸菌的筛选

表3 分离菌株产胞外多糖测试结果

Table 3 Test result EPS of separated Lactobacter

菌株代号	多糖 A_{490nm}	多糖含量(mg/L)
J ₁	1.204	139.21
J ₄	1.414	163.49
P ₁	1.238	143.14
P ₅	1.320	152.62
T _x	1.192	137.82
KL ₁	1.226	141.75
KS ₄	1.303	150.65
KT _x	1.230	142.21

注:表中数据为n=6测定之平均值。

由表3可知,在MRS培养基中,八株菌EPS的产量差别较大。其中J₄菌株EPS的产量最高,为163.49mg/L;

T_x、KS₄、KL₁、J₁、P₁、P₅、KT_x 菌株EPS 的产量在 137.82%~152.62% 之间,在有关文献报道中均属于产 EPS 能力较强的菌株。

综上所述,采用高通量筛选技术和苯酚-硫酸法获得较高合成EPS 的乳酸菌是: T_x、KS₄、KL₁、J₁、J₄、P₁、P₅、KT_x 菌株。其中, J₄ 菌株EPS 的产量最高,其次是 P₅、KS₄、P₁、KL₁、J₁、T_x、KT_x 菌株。可进一步通过发酵性能试验筛选出发酵剂品质优良的菌株。

2.3 高产 EPS 菌株的鉴定

表 4		分离乳酸菌的生化鉴定结果						
Table 4	Biochemistry identification of separated Lactobacter							
鉴定项目	菌株代号							
	K T _x	T _x	KS ₄	KL ₁	J ₁	P ₁	P ₅	J ₄
D- 半乳糖	+	—	+	+	+	+	+	+
D- 甘露醇	+	—	+	+	+	+	+	+
棉籽糖	—	+	—	—	—	—	—	—
海藻糖	+	+	—	+	+	—	—	—
山梨醇	+	—	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+
松三糖	+	—	—	+	+	—	—	—
七叶苷	+	—	—	+	+	—	—	—
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨苷	+	—	+	+	+	+	+	+
松二糖	+	—	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+
蜜二糖	—	—	—	—	—	—	—	—
乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+
7.5% NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—
10℃	+	—	+	+	+	+	+	+
40℃	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”95% 以上的菌株为阳性;“-”95% 以上的菌株为阴性。

根据表 4 常规生理生化试验结果,查阅《常见细菌系统鉴定手册》^[6],又采用全自动微生物鉴定仪进一步鉴定。其鉴定结果是:菌株 KL₁、J₁、KT_x 为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*),菌株 T_x 为嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),菌株 KS₄、P₁、P₅、J₄ 为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)。

本试验分离筛选的 8 株菌均具备了高产 EPS 和优良的发酵性能。其个体形态如图 2 所示(MRS 培养基)。

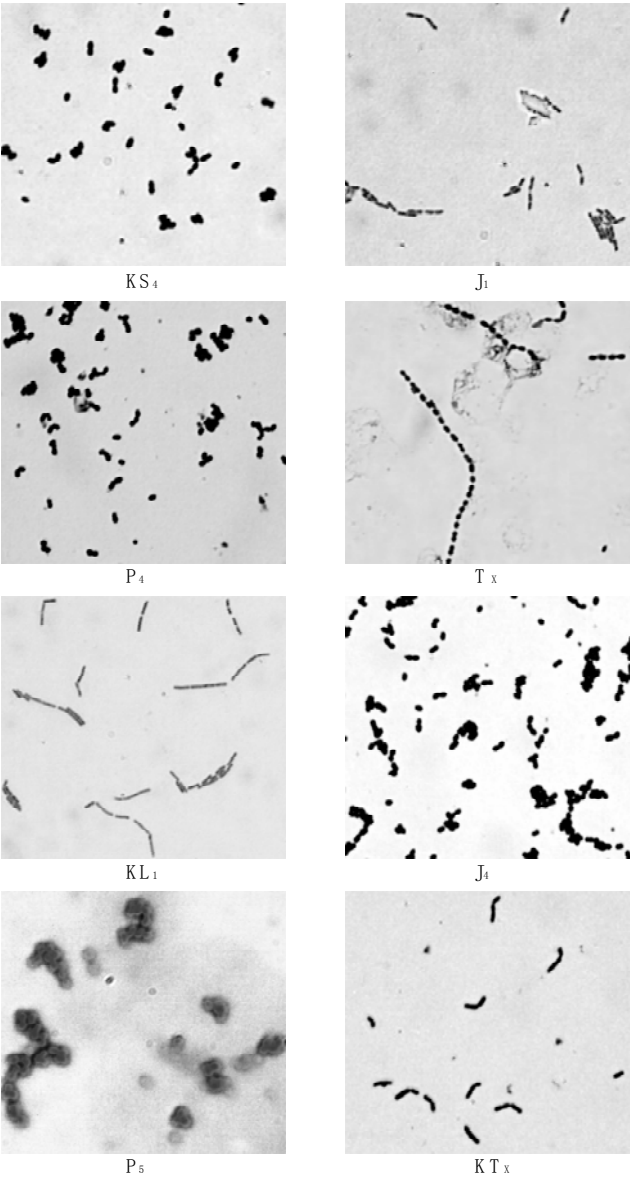


图 2 分离乳酸菌的形态
Fig.2 Configuration of separated Lactobacter

表 5 分离乳酸菌发酵牛乳性能测试结果								
Table 5		Ferment ability of separated Lactobacter						
菌株代号	凝乳时间(h)	还原初天青时间(min)	酸度(°T)	粘度(mPa·s)	活菌数量(1×10 ⁸ CFU/ml)	感官综合评分(满分50)		
						37℃	40℃	43℃
T _x	8	20	54.5	4080	1.60	50	45	40
KS ₄	10	25	54.4	3600	1.30	37	34	45
KL ₁	12	30	56.4	3940	1.08	45	48	40
J ₁	12	30	65.0	3960	1.15	50	45	38
J ₄	12	20	50.8	4000	1.20	50	43	38
P ₁	12	30	48.0	3700	1.02	50	48	39
P	12	20	50.0	3820	1.10	44	50	38
K T _x	11	25	56.2	3720	1.25	44	48	39

注:表中数据为 n=3 测定之平均值。

2.4 分离菌株发酵性能测定

由表5可知,分离的八株菌均在8~12h凝乳,其中T_x菌株凝乳时间最短,其次是KS₄菌株。用各菌株制备单一发酵剂还原酪天青的时间愈短,其活力愈高。又由表5可知,八株菌还原酪天青的时间均在35min之内(酪天青由青蓝色变为淡粉红色为还原终点),说明各菌株活力均很强。用各菌株制备单一发酵剂的酸度越高,说明产生乳酸能力愈强。其中J₁菌株酸度最高,其次是KS₄、KL₁、T_x菌株。用各菌株制备单一发酵剂的粘度越高,说明产生EPS能力愈强。其中T_x菌株粘度最高,其次是J₄、J₁、KL₁菌株。利用这些菌株产生的EPS替代酸奶增稠剂或稳定剂,即可增加酸奶的粘稠度,使其凝乳结实、细腻,无乳清析出,又可利用高产EPS的益生菌株研制功能性酸奶。用各菌株制备单一发酵剂的活菌数量均大于 1×10^8 CFU/ml,符合高活力发酵剂的品质要求。由表5可见,八株菌分别在三种温度下制备发酵剂的感官综合评分各有差异。在37℃条件下菌株T_x、J₁、J₄、P₁评分最高,P₅在40℃亦最高,KL₁、KT_x及KS₄分别在40℃和43℃评分较高。具有乳凝固细腻、结实,有诱人纯正的芳香酸味和乳脂香味,无苦味或其他异味,无或少有乳清析出。

综上所述,菌株T_x、KS₄、KL₁、J₁、J₄、P₁、P₅、KT_x均具有良好的发酵性能。其中由T_x菌株制备发酵剂的粘度最高,凝乳时间最短,感官综合评分最高;其次是J₁、KL₁、KS₄、J₄、P₁、P₅、KT_x菌株。可利用这些产EPS的乳酸菌株进一步开发研制功能性酸奶,并以T_x菌株作为高产EPS发酵条件优化的试验菌株。

3 结 论

3.1 采用高通量筛选技术和苯酚-硫酸法获得较高合成

EPS的乳酸菌是:T_x、KS₄、KL₁、J₁、J₄、P₁、P₅、KT_x菌株。其中,J₄菌株EPS的产量最高,其次是P₅、KS₄、P₁、KL₁、J₁、T_x、KT_x菌株。可进一步通过发酵性能试验筛选出发酵剂品质优良的菌株。

3.2 采用常规生理生化试验及全自动微生物鉴定仪鉴定菌种结果是:菌株KL₁、J₁、KT_x为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*),菌株T_x为嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*),菌株KS₄、J₄、P₁、P₅为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis subsp. lactis*)。

3.3 证实了八株菌(T_x、KS₄、KL₁、J₁、J₄、P₁、P₅、KT_x菌株)均具有高产EPS和优良的发酵性能。其中由*Streptococcus thermophilus* T_x菌株制备发酵剂的粘度最高,凝乳时间最短,感官综合评分最高;其次是J₁、KL₁、KS₄、J₄、P₅、P₅、KT_x菌株。可利用这些产EPS的乳酸菌株进一步开发研制具有良好稳定性的功能性酸奶。

参考文献:

- [1] 杨贞耐, HUTTUNEN E. 乳酸菌分泌胞外多糖的生物学基础和分子结构修饰[C]//第三届中国乳业科技大会论文集, 2006: 95-100.
- [2] 贾建波, 严学伟. 产粘乳酸菌的筛选及其产粘多糖条件的研究[C]//第三届中国乳业科技大会论文集, 2006: 185-192.
- [3] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 262-265.
- [4] 李平兰, 贺稚非. 食品微生物学实验原理与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 248-250.
- [5] 孟利, 张兰威. 聚酰胺柱层析法去除西藏灵芝胞外多糖发酵液中蛋白质的研究[C]//第三届中国乳业科技大会论文集, 2006: 225-227.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 453-500.
- [7] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 130-131.



研究显示女性干细胞再生能力较卓越

根据英国匹兹堡大学医学中心(University of Pittsburgh Medical Center; UPMC)儿童医院的研究者最新研究显示,由女性肌肉中所分离出的干细胞再生能力优于男性。这项结果于4月9日发表在《Journal of Cell Biology》期刊中,是首次着眼于性别差异的干细胞再生相关研究。

这项发现对于以干细胞为基础的各项相关疗法会带来不小的影响。干细胞研究中心主任 Johnny Huard 博士表示,未来以干细胞来发展组织再生药物的相关应用时,应当视性别为一个重要的决定因素。

研究者在找寻研究杜馨氏肌肉失养症(Duchene muscular dystrophy, DMD)等肌肉萎缩遗传疾病疗法时发现,分离的雌性个体干细胞具有优良的再生新骨骼肌组织的能力。在给予患有DMD的实验鼠分别注射雌性与雄性干细胞之后,他们发现仅10%的注射雄性干细胞老鼠其再生系数(regeneration index, RI)超过200者,而注射雌性干细胞者则高达40%。

我们推测是雌性与雄性细胞对于周围的氧化压力承受能力不同;匹兹堡大学医学中心整形外科与生物工程专家 Deasy 博士指出。对于许多无法再生的组织伤害,干细胞是唯一的希望;这项研究无疑使干细胞疗法发展更往前跨展一步。