

专题研究专栏

编者按:发酵乳制品是乳品工业中增速最快的产品,平均年复合增长15%~20%。发酵乳制品行业最核心的技术是乳酸菌发酵剂的研制。本期的4篇文章,其中2篇对乳酸菌菌种及其发酵特性进行了研究,另2篇分别就乳杆菌和酵母菌菌种的发酵特性和增殖培养条件进行了研究,希望这些工作能够为乳酸菌发酵剂领域的研究提供有益借鉴。

(主持人:张和平教授)

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.01.004

文章编号:2095-6002(2018)01-0025-10

引用格式:姜云芸,蔡森,邵淑娟,等.植物乳杆菌K25发酵产胞外多糖的影响因素及其应用[J].食品科学技术学报,2018,36(1):25-34.



JIANG Yunyun, CAI Miao, SHAO Shujuan, et al. Factors affecting of *Lactobacillus plantarum* K25 fermentation to produce exopolysaccharide and its application [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018,36(1):25-34.

植物乳杆菌 K25 发酵产胞外多糖的影响因素及其应用

姜云芸¹, 蔡森¹, 邵淑娟², 付冰冰¹, 黎润坤¹, 李晓琬¹,
张健¹, 杨贞耐^{1,*}

(1. 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心/食品质量与安全北京实验室,
北京工商大学, 北京 100048;

2. 菏泽市食品药品检验检测研究院, 山东 菏泽 250014)

摘要:植物乳杆菌胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)可赋予发酵乳制品独特的质构和风味,还具有增强免疫力、抗肿瘤和调节肠道菌群平衡等生物活性,在食品和医药领域具有良好的应用前景。但是,植物乳杆菌 EPS 的产量偏低,而影响其产量的因素具有菌株特异性,有关添加植物乳杆菌 EPS 对产品稳定性影响的研究也较少。采用单因素实验和响应面法确定了植物乳杆菌 K25 产 EPS 的优化培养基组成:每升含胰蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、葡萄糖 20 g、磷酸氢二钾 2.0 g、无水乙酸钠 5.0 g、柠檬酸钠 5.0 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g 和吐温 80 1.0 mL。优化的发酵条件:发酵温度 30 ℃、发酵时长 24 h 和培养基初 pH 值 6.5。在此条件下 EPS 产量为 250.21 mg/L。流变学研究表明,该 EPS 水溶液的黏度具有随着浓度和剪切速率升高而升高,以及剪切变稠的特性。扫描电镜观察发现,该 EPS 具有长方形块状微观结构,有利于稳定溶液的质构并保持水分。将该 EPS 加入到酸性乳饮料中,进一步验证了其具有良好的保水特性,表明植物乳杆菌 K25 产生的 EPS 可以作为一种具有潜在应用价值的新型食品稳定剂。

关键词:植物乳杆菌;胞外多糖;产量;影响因素;乳饮料

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

收稿日期:2017-12-06

基金项目:公益性行业(农业)科研专项项目(201303085);国家自然科学基金面上项目(31371804);国家级大学生创新创业训练计划项目(201710011007)。

作者简介:姜云芸,女,博士,在站博士后,主要从事乳品加工方面的研究;

* 杨贞耐,男,教授,博士,主要从事乳品科学及加工技术方面的研究,通信作者。

乳酸菌胞外多糖 (extracellular polysaccharide, EPS) 是菌体在其生长代谢过程中分泌到细胞壁外的水溶性大分子糖类物质, 是细菌的次级代谢产物^[1]。乳酸菌 EPS 可赋予发酵乳制品特殊的质构和风味, 可以作为天然安全的食品级多糖类添加剂, 具有增稠、稳定、乳化、胶凝及持水等特性^[1]。此外, EPS 还具有调节免疫力、抗肿瘤、调节肠道菌群平衡和抑制病原菌等生物活性, 可应用于功能食品和医药领域^[2-6]。

一般来说, 乳酸菌的 EPS 产量偏低, 菌株产 EPS 的稳定性欠佳^[1,7-9]。培养基组分 (碳源、氮源、微量元素及无机盐等) 和生长条件 (接种量、培养温度、时间及发酵初始 pH 值等) 影响 EPS 的最终产量^[7-9]。据报道, 乳酸菌以葡萄糖为碳源时, 其 EPS 产量明显高于其他碳源^[7]。例如, 干酪乳杆菌 CG II 以葡萄糖为碳源时, EPS 产量比半乳糖和乳糖作为碳源的产量高。氮源的添加有利于细胞生长, 增加菌体的密度, 可以促进菌体将糖类物质转化为多糖^[10], 例如, 明串珠菌 NRRLB-1146 产 EPS 受蛋白胨和酵母粉的显著影响^[10]。温度是影响菌体产 EPS 的重要因素之一^[8-9], 温度过高, 导致菌体在培养过程中容易过早衰老而发生自溶现象, 使菌体浓度下降, 从而降低 EPS 产量。研究表明, 菌体达到一定浓度时 EPS 开始合成^[11], 温度过低, 生长缓慢, 使菌体浓度低而影响 EPS 的合成。培养基 pH 值的影响主要通过改变酶的活性来间接调控 EPS 的合成^[8-9]。乳杆菌产 EPS 的最适 pH 值一般在 5.8 ~ 6.0, 较其他微生物偏低, 但若 pH 值过低, 会导致 EPS 的合成过程中失去异戊二烯类载体而受到抑制^[8-9]。

前期研究表明, 源于藏灵菇的一株产 EPS 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) K25, 其发酵乳对饲喂高脂饲料小鼠模型具有良好的降胆固醇功效, 并可增加小鼠肠道内乳酸杆菌的数量, 还具有抗氧化作用^[12-13]。该菌株在发酵乳冷藏期间, 表现出较好的存活能力, 并且不会造成发酵乳后酸化^[14]。此外, 该菌株所产 EPS 对变异链球菌菌膜的形成具有明显抑制作用, 其 MIC 值较低 (1.25×10^7 CFU/mL), 同时可以显著降低变异链球菌的黏附率^[15]。鉴于植物乳杆菌 K25 产 EPS 的优良功能特性, 本研究旨在探讨该菌株发酵产 EPS 的影响因素, 优化其发酵条件, 提高 EPS 产量, 同时进一步研究此 EPS 作为天然的增稠剂和稳定剂在酸性乳饮料中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要化学试剂和培养基

三氯乙酸 (TCA)、无水乙醇、浓硫酸、苯酚、盐酸、氢氧化钠、胰蛋白胨等均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 透析袋 (截流分子质量为 8 000 ~ 14 000 Da), 北京生物技术有限责任公司。

半合成培养基 (SDM): 胰蛋白胨 10.0 g、YNB (酵母氮源) 6.7 g、葡萄糖 20.0 g、磷酸氢二钾 2.0 g、无水乙酸钠 5.0 g、柠檬酸钠 5.0 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、吐温 80 1.0 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL, 调节 pH 值至 6.6, 121 °C 灭菌 15 min。

磷酸盐缓冲液 (PBS): 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g K_2HPO_4 , 0.2 g KCl, 8 g NaCl, pH 值 7.4。

1.2 实验菌株

植物乳杆菌 K25 菌株由吉林省农业科学院提供, 保藏在含 30% 甘油的脱脂乳中, 于 -80 °C 冰箱保存。

1.3 仪器设备

电热恒温培养箱, 上海一恒实验设备有限公司; MLS-3750 型高压蒸汽灭菌锅, 日本三洋公司; CR21G III 型高速冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司; 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; Elx800 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; S20 型数显 pH 计, 上海梅特利-托利多公司。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株培养

植物乳杆菌 K25 在 SDM 液体培养基中活化, 37 °C 培养 12 h, 连续活化两代作为种子培养液。

1.4.2 植物乳杆菌产 EPS 的提取与测定^[5]

植物乳杆菌 K25 发酵培养 24 h 后, 测定发酵液 pH 值以及 600 nm 下的吸光度值 OD_{600} 。发酵液中加入质量浓度为 800 g/L 的三氯乙酸溶液, 调节其质量浓度至 40 g/L, 室温下震荡 2 ~ 4 h。离心 ($10\,000\text{ r/min}$, 4 °C) 30 min, 除去菌体细胞和蛋白质, 取上清液。上清液中加入 3 倍体积的无水乙醇, 4 °C 条件下静置 12 h。离心 30 min ($10\,000\text{ r/min}$, 4 °C), 弃上清液。蒸馏水溶解沉淀, 透析 48 h, 每 8 h 换一次水。

采用苯酚-硫酸法测定植物乳杆菌 K25 EPS 含量。以葡萄糖溶液为标准品, 490 nm 下测吸光度, 得到回归线方程, 见式 (1)。

$$y = 0.0087x + 0.0232, R^2 = 0.9994. \quad (1)$$

取 20 μL 透析液稀释至 200 μL , 加入 100 μL 的 6% 苯酚和 500 μL 浓硫酸混匀, 静置 20 min, 置于酶标仪上测定 490 nm 下的吸光度。

1.4.3 EPS 的单因素实验

依据前期实验选定的单因素为: 碳源(果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉和葡萄糖)、二价金属离子(钙、镁、铁、锰、铜、锌)、钠离子、氮源(蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、脱脂乳粉)、发酵时间、发酵温度和培养基初始 pH 值。

1.4.4 响应面试验

根据单因素实验结果, 选取对植物乳杆菌 K25 产 EPS 影响显著的 3 个因素(葡萄糖浓度、发酵温度、培养基初始 pH 值), 以 EPS 产量作为响应值, 根据 Box - Behnken 软件设计三因素三水平响应面试验。Design - Expert 软件设计中心组合试验, 每组做 3 个平行样品。

1.4.5 扫描电镜观察

称取 5 mg EPS 样品于载玻片, 用双面胶均匀粘贴于云母表面, 洗耳球吹去多余粉末和未帖服的样品残余, 并在表面喷金(约 10 nm), 在扫描电子显微镜 scanning electron microscope (SEM) 下观察 EPS 样品形态。

1.4.6 EPS 溶液流变学分析

分别配制 0.3、0.5、1.0 mg/mL 的 EPS 溶液, 使用 HAAKE MARS 流变仪(CC16 号转子)分别测定其不同剪切速率(0 ~ 300 r/s)以及不同温度(0 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$)条件下的流变学特性。

1.4.7 含 EPS 的酸性乳饮料稳定性实验

配制含 3.6% 巴氏杀菌奶和 5% 蔗糖的料液, 然后分别加入质量比为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、

0.5% 的 EPS, 果胶、CMC、羟丙基淀粉酯和大豆多糖, 混合均匀。静置冷却到 20 $^{\circ}\text{C}$ 以下, 用柠檬酸(10%)调节 pH 值至 5.5。均质 2 min 置于牛奶瓶(50 mL/瓶), 巴氏杀菌(75 $^{\circ}\text{C}$, 15 min), 室温保存。

取调制好的饮料 20 mL, 记录试管质量 m_0 和加入样品后的质量 m_1 。离心(4 500 r/min, 20 min), 弃去上清液, 准确称量沉淀物质量 m_2 , 利用式(2)计算保水率。

保水率 = $(m_2 - m_1) / (m_1 - m_0) \times 100\%$ 。(2)

用布式流变仪测定各酸性乳饮料黏度, 方法同

1.4.6 节。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 培养条件对 EPS 产量的影响

1) 发酵时间和温度。以 SDM 培养基为基础, 测定分析不同的培养时间和温度对植物乳杆菌 K25 EPS 产量的影响(图 1)。随着发酵时间的延长, EPS 产量呈现出先增加后降低的趋势(图 1a)。培养至 24 h 时, 植物乳杆菌 EPS 的产量达到最大值 179.22 mg/L, 随后大幅度下降。这可能是由于发酵时间的延长, 菌体自溶释放出分解代谢多糖的酶, 从而使 EPS 降解, 降低了 EPS 产量^[16-18]。在后续的实验选取 24 h 为植物乳杆菌 K25 产 EPS 的最佳发酵时间。

发酵温度对植物乳杆菌 EPS 产量的影响如图 1b。30 $^{\circ}\text{C}$ 时, EPS 产量达到最大值 235.7 mg/L, 但是随着温度的升高, EPS 的产量下降。这可能与菌体合成多糖的酶活性在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时较高有关^[16-17], 因此选择 30 $^{\circ}\text{C}$ 为植物乳杆菌 K25 产 EPS 的最佳发酵温度。

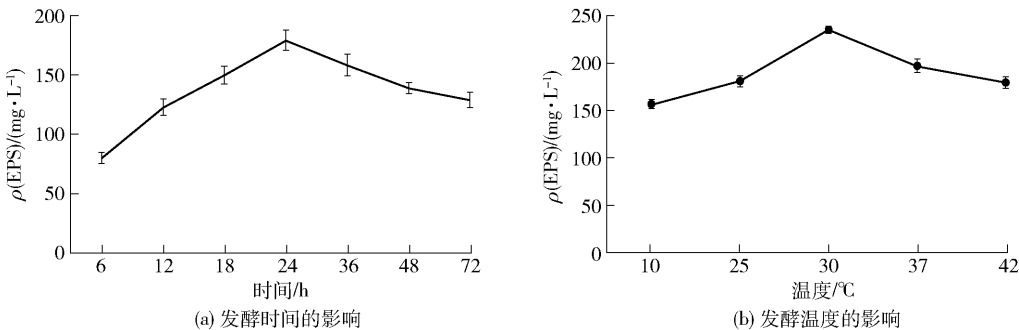


图 1 发酵时间和温度对植物乳杆菌 EPS 产量的影响

Fig. 1 Effect of fermentation time and temperature on yield of EPS from *L. plantarum*

2) 培养基初始 pH 值。每株菌都有最适合自身生长和产 EPS 的 pH 值范围, 此范围内 pH 值能够最大程度地提高酶促反应速率, 进而使微生物的生长

和合成代谢速率达到最大值^[19]。培养基初始 pH 值(分别为 5.5、6.5、7.5、8.5、9.0)对植物乳杆菌 K25 产 EPS 的影响如图 2。随着培养基初始 pH 值的

增加, EPS 产量呈现出先增大后减小的变化, 当 pH 值为 6.5 时, EPS 产量达到最大值 198.4 mg/L, 因此选择植物乳杆菌 K25 产 EPS 的最适初始 pH 值为 6.5。

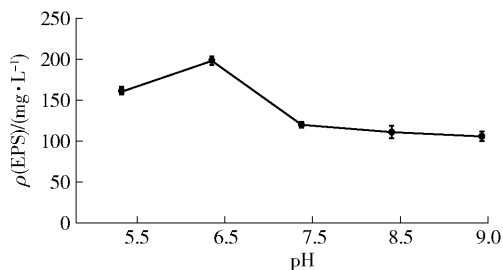
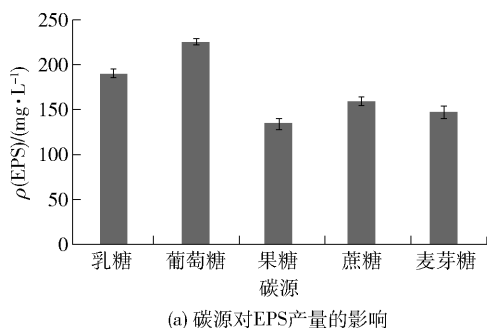
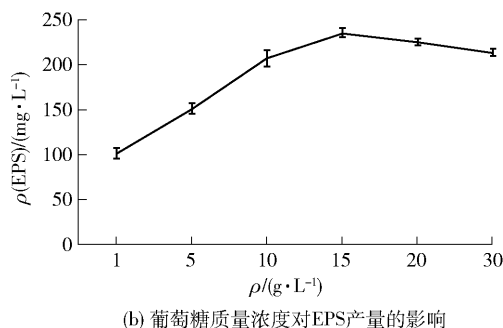


图2 培养基初始 pH 值对植物乳杆菌 EPS 产量的影响

Fig. 2 Effect of initial pH of culture medium on yield of EPS from *L. plantarum*



(a) 碳源对EPS产量的影响



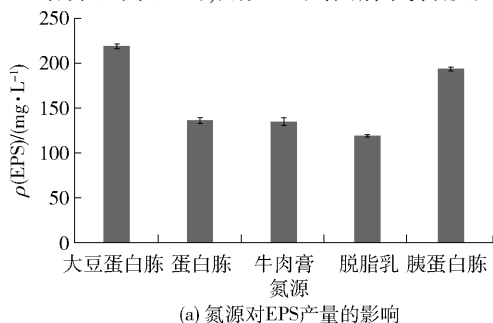
(b) 葡萄糖质量浓度对EPS产量的影响

图3 碳源对植物乳杆菌 EPS 产量的影响

Fig. 3 Effect of carbon source on EPS yield of *L. plantarum*

氮源能够为菌体生长代谢提供氮素, 组成生物体的核酸、蛋白质及其他氮素化合物, 是影响植物乳杆菌 EPS 产量的主要因素之一^[8]。本实验选用大豆蛋白胨、胰蛋白胨、蛋白胨、脱脂乳粉和牛肉膏作为氮源, 考察氮源对 K25 产 EPS 的影响, 结果如图 4a。由图 4a 可知, 大豆蛋白胨作为氮源时 EPS 产量最高, 为 218.3 mg/L, 其他依次为胰蛋白胨、蛋白胨、牛肉膏和脱脂乳粉, 因此, 选择大豆蛋白胨作为植物乳杆菌 K25 产 EPS 的最佳氮源。

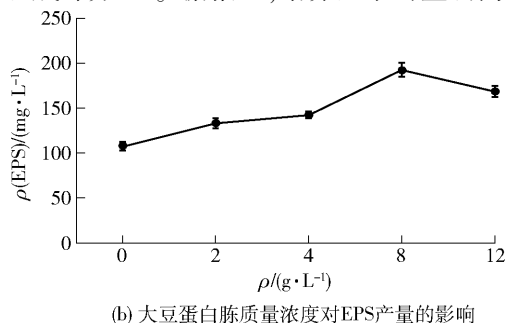
以 SDM 培养基为基础, 用大豆蛋白胨代替胰蛋



(a) 氮源对EPS产量的影响

白胨, 添加量分别为 0、2、4、8、12 g/L, 结果如图 4b。由图 4b 可见, 随着大豆蛋白胨质量浓度增加, 可供菌体利用的氮源增加, 当大豆蛋白胨质量浓度为 8 g/L 时, EPS 产量达到最大值 192.7 mg/L。继续增加大豆蛋白胨浓度, 反而抑制菌体生长, 这可能是高浓度的氮源对菌体产生渗透压胁迫^[8], 因此大豆蛋白胨的最适质量浓度为 8 g/L。

金属离子是维持多相体系的渗透平衡的重要组成部分, 也是大部分酶, 尤其是金属酶类反应的必要组成部分^[22]。据报道, 培养基中的金属离子能影响



(b) 大豆蛋白胨质量浓度对EPS产量的影响

图4 氮源对植物乳杆菌 EPS 产量的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen source on EPS yield of *L. plantarum*

植物乳杆菌的生长代谢,并能通过影响相关的酶活性,或者改变培养基的渗透压、pH 值和氧化还原电位等因素来影响 EPS 的生成^[22]。培养基中缺乏有关微量元素时会抑制菌体生长速度,但过量时又会产生毒害作用^[22],因此有必要控制培养基中金属离子的种类以及比例,确保菌体有效地产生 EPS。本实验研究了 7 种金属离子对 EPS 产量的影响,实验结果见图 5。由图 5 可以看出,正二价铁离子对 EPS 产量的影响最明显($p < 0.05$),添加量为 1.0 g/L 时,植物乳杆菌 EPS 产量达 218.6 mg/L。

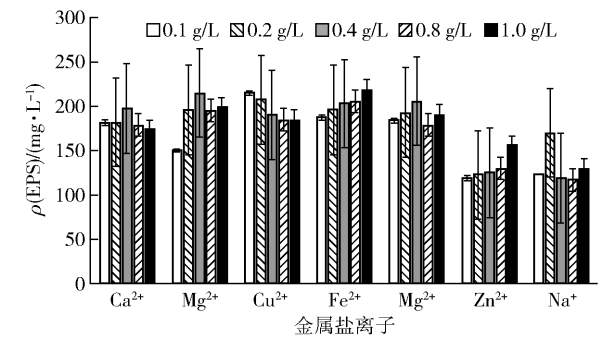


图 5 金属盐离子对植物乳杆菌 EPS 产量的影响
Fig.5 Effect of metal ions on yield of EPS from *L. plantarum*

2.2 响应面试验结果分析

根据碳源、二价金属离子、氮源、发酵时间、发酵温度和培养基初始 pH 值的单因素实验结果,可以确定能够显著影响植物乳杆菌 EPS 产量的因素为:葡萄糖(15 g/L)、发酵温度(30 ℃)、培养基初始 pH 值(6.5)。以 EPS 产量作为响应面值,选取葡萄糖浓度、发酵温度和培养基初始 pH 值 3 个因素,设计试验因素水平表,见表 1。

表 1 响应面试验因素水平

Tab.1 Factors and levels of response surface methodology		
因素	-1	1
X_1 ρ (葡萄糖)/(g·L ⁻¹)	15	20
X_2 $t/^\circ\text{C}$	30	37
X_3 pH	5.0	6.5

根据 BBD 原理,设计三因素三水平的响应面分析试验。使用 Design - Expert 响应面设计软件分析,共有 17 个实验点,以葡萄糖糖浓度、发酵温度、初始 pH 值为自变量,以 EPS 产量为响应值。在不同条件下所得的多糖产量见表 2。根据表 2 结果,由 Design Expert (Version 8.0.6) 软件获得拟合方程,见式(3)。

$$Y = 194.00 + 14.51X_1 - 15.80X_2 - 4.61X_3 - 21.55X_1X_2 + 1.72X_1X_3 - 6.60X_2X_3 - 9.19X_1^2 + 1.99X_2^2 - 2.84X_3^2。$$

(3)

式(3)中, Y 是 EPS 产量, X_1 是葡萄糖质量浓度, X_2 是温度, X_3 是 pH。

方差分析和模型以及各参数分析如表 3。回归诊断表示模型的 F 值为 7.36,而 p 值远远小于 0.01,

表 2 Design - Expert 设计方案及响应值结果

Tab.2 Design scheme of Design - Expert and response values results				
序号	ρ (葡萄糖)/(g·L ⁻¹)	pH	$t/^\circ\text{C}$	EPS 产量/(mg·L ⁻¹)
1	17.50	5.75	33.50	194.0
2	17.50	5.75	33.50	194.0
3	15.00	5.00	33.50	174.5
4	17.50	6.00	37.00	169.9
5	20.00	6.50	33.50	192.9
6	20.00	5.00	33.50	196.0
7	17.50	5.75	33.50	194.0
8	17.50	5.75	33.50	194.0
9	15.00	5.75	37.00	166.4
10	15.00	6.00	33.50	169.9
11	15.00	5.50	30.00	168.7
12	17.50	5.50	33.50	194.0
13	17.50	6.50	30.00	200.9
14	17.50	5.00	37.00	198.6
15	20.00	5.75	37.00	161.8
16	20.00	5.75	30.00	250.3
17	17.50	5.00	30.00	203.2

表 3 回归模型的方差分析

Tab.3 Regression model analysis of variance						
来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	6 273.74	9	697.08	7.36	0.007 7	**
X_1	1 684.90	1	1 684.90	17.78	0.004 0	**
X_2	1 997.12	1	1 997.12	21.07	0.002 5	**
X_3	138.61	1	138.61	1.46	0.265 8	
X_1X_2	1 857.61	1	1 857.61	19.60	0.003 1	**
X_1X_3	11.90	1	11.90	0.13	0.047 4	*
X_2X_3	174.24	1	174.24	1.84	0.172 7	
X_1^2	355.41	1	355.41	3.75	<0.000 1	**
X_2^2	16.63	1	16.63	0.18	<0.000 1	**
X_3^2	33.90	1	33.90	0.36	0.002 5	**
残差	663.39	7	94.77			
失拟项	663.39	3	221.13	1.87	0.217 2	
纯误差	0.000	4	0.000			
总和	6 937.13	16				

**为较显著($p < 0.01$), *为显著($p < 0.05$)。

即说明该模型显著影响。函数的相关系数 $R^2 = 0.9004$, R^2 的数值越靠近 1 则说明误差越小,即证明该公式可以比较好地模拟植物乳杆菌产生 EPS 的发酵全过程。校正系数 $R^2_{adj} = 0.9529$,表明该模型能够较好说明 95.29% 的响应值变化。失拟项的 $F = 1.87$, $p = 0.2172 > 0.05$,则表明了失拟并不明显。说明该方程可以充分地表达真实的发酵情况。由 F 值的比较可以得出各因素对植物乳杆菌 EPS 产量的影响由大到小顺序是:发酵温度、葡萄糖质量浓度、pH 值。观察 X_1 、 X_2 、 X_3 彼此之间的关系可以得知各因素对发酵条件的影响并不只是简单的线性关系。

2.3 响应面交互作用分析

3 个显著因素(葡萄糖质量浓度、pH 值和发酵

温度)的交互影响对响应值植物乳杆菌 EPS 的产量的影响可以从图 6 至图 8 的响应面图和等高线图直接看出。图 6 至图 8 表示 X_1 、 X_2 、 X_3 中任意的一个影响因素取零水平时,剩下的两个变量影响因素对 EPS 产量的交互影响。响应面的平面投影和等高线的形状可以表明交互效应的强弱,椭圆形则表示两因素交互影响的作用显著,而圆形则表明交互作用较弱。

由图 6 可以得出,pH 值和葡萄糖浓度的等高线图呈现椭圆形,则说明二者交互作用比较显著。随着葡萄糖浓度的升高,EPS 产量也随之提高。培养基初始 pH 值会对菌体的生长代谢产生较大影响。初始 pH 值不同时,植物乳杆菌的生长情况不同,从而对葡萄糖的利用程度及 EPS 产量影响也不同。

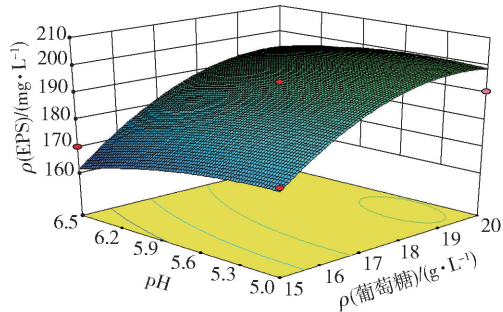
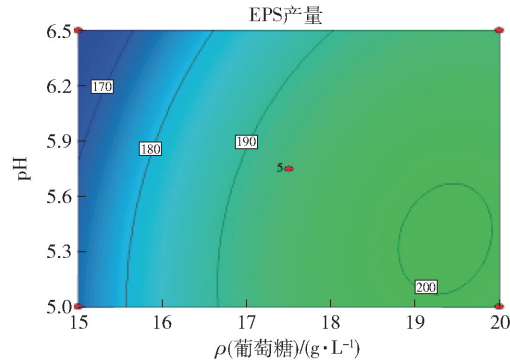


图 6 葡萄糖质量浓度和初始 pH 值对 EPS 产量影响的等高线及响应面图

Fig.6 Response surface and contours map of effects of glucose concentration and pH on EPS yield

由图 7 可以得出,葡萄糖浓度和发酵温度的等高线呈现椭圆形,说明葡萄糖浓度和发酵温度之间的交互作用比较显著。将发酵初始 pH 值控制为零时,葡萄糖的浓度设定为固定值,随着发酵温度的不断升高,EPS 的产量先增大后减小。分析等高线图

中葡萄糖浓度和发酵温度变化的密集度可看出发酵温度的等高线比较密集,发酵温度对 EPS 产量的影响比葡萄糖浓度要大。随着葡萄糖浓度的增加,用于合成 EPS 的原料也就不断地增加,但是葡萄糖过多,会产生渗透压,进而抑制菌株的生长,导致 EPS

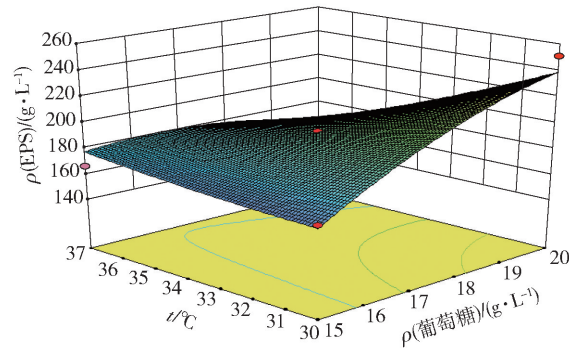
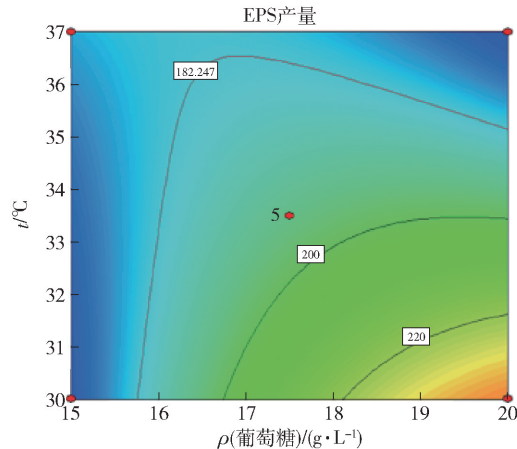


图 7 葡萄糖浓度和发酵温度对 EPS 产量的影响的等高线及响应面图

Fig.7 Response surface and contour map of effects of glucose concentration and fermentation temperature on EPS yield

产量下降;同时如果发酵温度也发生变化,就会影响细胞的生长速度从而影响其对葡萄糖的利用,也许这就是葡萄糖浓度和发酵温度的交互作用比较显著的原因。

由图 8 可以得出,发酵温度和发酵初始 pH 值的等高线图接近于圆形,即说明二者之间的交互作用并不显著。固定葡萄糖浓度为零,当发酵温度一定时,随着初始 pH 值减小,EPS 产量逐渐增大。

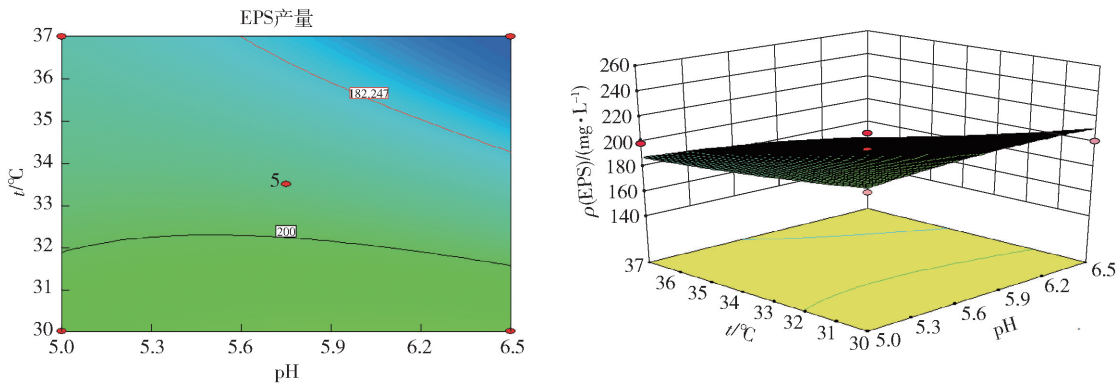


图 8 发酵温度和初始 pH 值对 EPS 产量影响的等高线及响应面图
Fig. 8 Response surface and contour map of effects of fermentation temperature and pH on EPS yield

通过软件分析得出植物乳杆菌发酵产 EPS 有最大值,其发酵的优化条件为:葡萄糖质量浓度 20 g/L、初始 pH 值 6.5、发酵温度 30 ℃,在此条件下植物乳杆菌 EPS 产量的拟合函数值为 245.30 mg/L。利用得到的优化发酵条件进行验证实验,设置 3 组平行实验,并对实验结果取平均值,得到 EPS 产量为 250.21 mg/L,与预测的结果基本一致。

2.4 EPS 的流变学特性

乳酸菌 EPS 作为一种天然的食品添加剂用于发酵乳制品,不仅能够增添良好的口感和风味,还可以改善乳制品的质构^[16]。使用乙醇沉淀法得到 EPS。分别研究在不同温度和转数条件下 EPS 水溶液的流变学特性,结果如图 9。不同剪切速率下

的黏度图(图 9a)表明,EPS 溶液的黏度随着 EPS 质量浓度的升高而升高,不同 EPS 质量浓度的 EPS 溶液黏度与剪切速率呈正相关,即随着剪切速率的升高而升高,体现为增稠特性^[23]。EPS 溶液的黏度随着温度的升高而下降(图 9b),原因可能是高温使 EPS 分子原有的结构变得不规则,呈现一种相对稀松的分子构象,降低了 EPS 分子间的接触面积和频率,在 EPS 分子内部也会发生分子重排现象,破坏了结构的完整性^[23]。

2.5 EPS 微观结构分析

扫描电镜是研究 EPS 微观结构的有效手段,对于 EPS 微观结构的了解可以为进一步研究 EPS 对食品质构的影响提供重要依据。植物乳酸菌 EPS

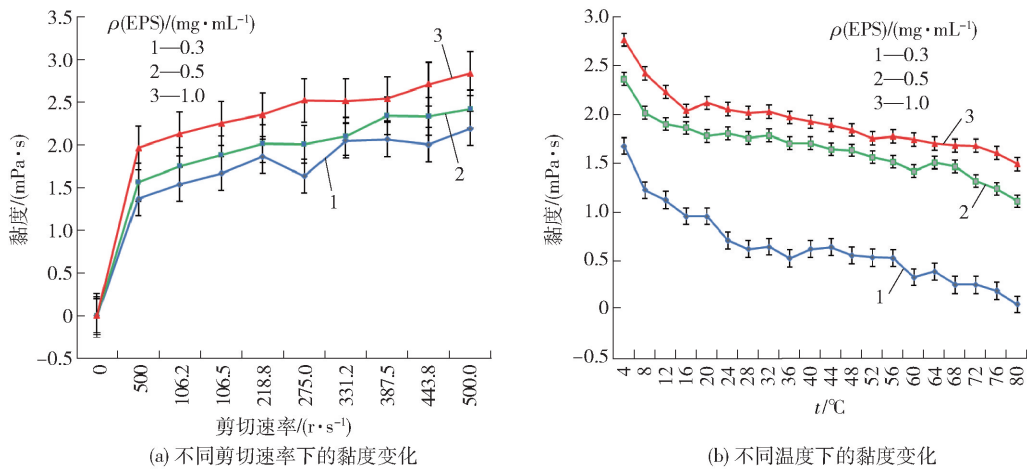


图 9 不同质量浓度的 EPS 溶液在不同的剪切速率和温度下的黏度变化
Fig. 9 Viscosity change of EPS solution affected by different shear rate and different temperature

的 SEM 图像如图 10。植物乳杆菌 EPS 呈现大小不一、外形近似长方体并紧凑叠加的微观结构,表面较为光滑。这种结构较为稳定,赋予了 EPS 特殊的流变学性质,例如提升产品的黏度、改善质构和保水特性^[24]。

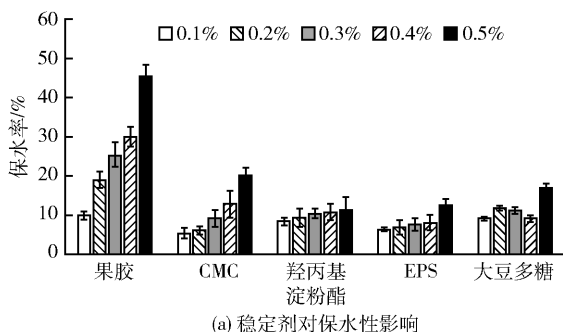


图 10 植物乳杆菌 EPS 扫描电镜图

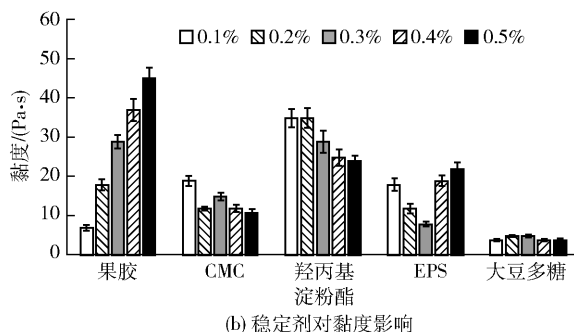
Fig. 10 SEM image of EPS from *L. plantarum*

2.6 EPS 在酸性乳饮料中应用的稳定性评价

酸性乳饮料中分别加入植物乳杆菌 EPS、果胶、羧甲基纤维素 (CMC)、羟丙基淀粉酯和大豆多糖,



(a) 稳定剂对保水性影响



(b) 稳定剂对黏度影响

图 11 EPS 和稳定剂添加量对酸性乳饮料的保水性和黏度影响

Fig. 11 Effect of concentrations of EPS and stabilizers on water retention and viscosity of acid milk beverage

果胶和羟丙基淀粉酯的使用易导致酸性乳饮料过于黏稠。大豆多糖具有良好的保水性,但是对产品的黏度没有明显的改善作用。EPS 表现出很大的潜能,具有良好的稳定性,选择适当的浓度添加,酸性乳饮料不易产生过稠现象,EPS 在食品加工中作为稳定剂具有潜在的应用价值。

3 结 论

通过单因素实验和响应面法分析,对一株源自传统藏灵菇的植物乳杆菌 K25 产 EPS 的条件进行了优化。得到优化的培养基组成为每升含胰蛋白胍 10 g、酵母浸粉 5 g、葡萄糖 20 g、无水乙酸钠 5.0 g、

巴氏杀菌后,通过测定溶液的保水率来评估其稳定性^[16],结果如图 11a。由图 11a 可见,果胶的保水作用,随其质量比的升高而增强,较其他稳定剂表现出更好的保水作用。CMC、羟丙基淀粉酯和大豆多糖的保水作用也随其质量比的增加而增强,但是,添加了 CMC、羟丙基淀粉酯、大豆多糖或 EPS 的酸性乳饮料,它们之间的保水率没有明显差异。EPS 对酸性乳饮料的稳定保水作用,在其质量比达到 0.5% 时最强。

从图 11b 中可知,乳饮料的黏度随果胶添加量的增加而明显增大,而添加等量的大豆多糖的乳饮料黏度没有明显变化,且随其添加量的增加也变化不大。羟丙基淀粉酯表现出明显的增稠效果,但随其添加量增加,黏度下降。CMC 和 EPS 的稳定效果最为理想,添加了二者的乳饮料黏度总体变化不大,而且随着 EPS 添加量的增加,黏度先下降后上升,EPS 质量比为 0.2% 时效果最佳。在酸性乳饮料体系中,EPS 与酸和蛋白等物质之间发生较复杂的相互作用,并协同影响发酵乳饮料的理化性质^[25]。

柠檬酸钠 5.0 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、吐温 80 1.0 mL;优化的发酵条件为:发酵温度 30 ℃、发酵时长 24 h 和培养基初 pH 值 6.5。在此条件下植物乳杆菌 K25 的 EPS 产量达 250.21 mg/L。对 EPS 流变学特性的研究结果表明,该 EPS 溶液的黏度随着浓度和剪切速率的增加而增加,随着温度增加而降低,不同于多数乳酸菌 EPS 具有的剪切变稀现象。采用扫描电镜观察 EPS 分子形态,表明该 EPS 具有近似方块并紧密叠加的立体微观结构。将 EPS 添加于酸性乳饮料中,该产品的稳定性和黏度与添加 CMC 的酸性乳饮料相接近。因此植物乳杆菌 K25 所产的 EPS 具有作为天然食品稳定剂应用的潜力。

参考文献:

- [1] ZANNINI E, WATERS D M, COFFEY A, et al. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016,100(3):1121–1135.
- [2] TANG W, XING Z, LI C, et al. Molecular mechanisms and *in vitro* antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2[J]. Food Chemistry, 2017,221:1642–1649.
- [3] ZHANG Z, LIU Z, TAO X, et al. Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2016,153:25–33.
- [4] WANG K, LI W, RUI X, et al. Chemical modification, characterization and bioactivity of a released exopolysaccharide (r-EPS1) from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. Glycoconjugate Journal, 2015,32:17–27.
- [5] WANG J, ZHAO X, YANG Y W, et al. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015,74:119–126.
- [6] WANG J, ZHAO X, TIAN Z, et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir [J]. Carbohydrate Polymers, 2015,125:16–25.
- [7] BOELS I C, VAN KRANENBURG R, HUGENHOLTZ J, et al. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2001,11(9):723–732.
- [8] 胡盼盼, 宋微, 单毓娟, 等. 影响乳酸菌胞外多糖产量的因素 [J]. 食品科技, 2014,39(9):31–37.
- HU P P, SONG W, SHAN Y J, et al. Factors contributing to the yield of exopolysaccharide by lactic acid bacteria [J]. Food Science and Technology, 2014,39(9):31–37.
- [9] 李盛钰, 曾宪鹏, 杨贞耐. 提高乳酸菌胞外多糖产量的途径 [J]. 食品与生物技术学报, 2009,28(3):289–293.
- LI S Y, ZENG X P, YANG Z N. Strategies for increasing of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009,28(3):289–293.
- [10] MAJUMDER A, SINGH A, GOYAL A. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 2009,75(1):150–156.
- [11] ROMLING U, GALPERIN M Y, GOMELSKY M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2013,77(1):1–52.
- [12] ZHANG L, ZHANG X, LIU C, et al. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic *Lactobacillus plantarum* K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013,29(1):127–135.
- [13] 王辑, 王影, 张雪, 等. 植物乳杆菌 K25 发酵乳对衰老模型小鼠的抗氧化作用 [J]. 吉林农业大学学报, 2013,35(1):98–101.
- WANG J, WANG Y, ZHANG X, et al. Antioxidative effect of *Lactobacillus plantarum* K25 fermented milk on aged model mice [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2013,35(1):98–101.
- [14] 王辑, 张雪, 李达, 等. 植物乳杆菌 K25 的技术特性 [J]. 食品与生物技术学报, 2012,31:518–524.
- WANG J, ZHANG X, LI D, et al. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* K25 [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012,31:518–524.
- [15] 郭夏蕾, 张健, 杨贞耐. 抑制口腔变异链球菌的乳酸菌筛选及其抑菌机理 [J]. 食品科学, 2016,37(19):117–122.
- GUO X L, ZHANG J, YANG Z N. Screening of lactic acid bacteria for inhibiting oral *Streptococcus mutans* and preliminary study of antibacterial mechanism [J]. Food Science, 2016,37(19):117–122.
- [16] DUBOC P, MOLLET B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry [J]. International Dairy Journal, 2001,11(9):759–768.
- [17] YEESANG C, CHANTHACHUM S, CHEIRSILP B. Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefirianofaciens* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008,24(7):1195–1201.
- [18] POLAK-BERECKA M, CHOMA A, WASKO A, et al. Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources [J]. Carbohydrate Polymers, 2015,117:501–509.
- [19] TORINO M I, TARANTO M P, SESMA F, et al. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001,91(5):846–852.
- [20] QIN Q L, LI Y, SUN M L, et al. Comparative transcriptome analysis reveals that lactose acts as an inducer and provides proper carbon sources for enhancing exopolysaccharide yield in the deep-sea bacterium *Zunongwangia profunda* SM-A87 [J]. Plos One, 2015,10(2):e0115998.
- [21] YILMAZ M, CELIK G Y, ASLIM B, et al. Influence of

- carbon sources on the production and characterization of the exopolysaccharide (EPS) by *Bacillus sphaericus* 7055 strain[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2012,20(1):152–156.
- [22] NOCELLI N, BOGINO P C, BANCHIO E, et al. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia[J]. Materials, 2016, 9(6): 418.
- [23] HAN Y Z, LIU E Q, LIU L S, et al. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061[J]. Carbohydrate Polymers, 2015,115:230–237.
- [24] AHMED Z, WANG Y P, ANJUM N, et al. Characterization of new exopolysaccharides produced by coculturing of *L. kefirnofaciens* with yoghurt strains [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013,59:377–383.
- [25] LAWS A P, MARSHAL V M. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2001,11(9): 709–721.

Factors Affecting of *Lactobacillus plantarum* K25 Fermentation to Produce Exopolysaccharide and Its Application

JIANG Yunyun¹, CAI Miao¹, SHAO Shujuan², FU Bingbing¹, LI Runkun¹, LI Xiaowan¹,
ZHANG Jian¹, YANG Zhennai^{1,*}

(1. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health/Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. Heze Institute for Food and Drug Control, Heze 250014, China)

Abstract: The extracellular polysaccharide (EPS) from *Lactobacillus plantarum* plays important roles in the special texture and flavor of fermented dairy products. These EPSs possess biological activities such as immunomodulation, antitumor and regulating the balance of intestinal flora and so on, which can be used in food and medicine fields. However, the yield of *Lactobacillus plantarum* EPS is relatively low, factors affecting the EPS production are strain specific, and the influence of *Lactobacillus plantarum* EPS on the stability of the products is still rarely studied. The optimal fermentation conditions obtained by single factor experiments and response surface analysis were as follows: peptone 10 g/L, yeast extract powder 5 g/L, glucose 20 g/L, potassium hydrogen phosphate 2.0 g/L, anhydrous sodium acetate 5.0 g/L, sodium citrate 5.0 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L, manganese sulfate 0.05 g/L, twain 80 1.0 mL/L, fermentation temperature 30 °C, fermentation time 24 h, and initial pH of culture medium of 6.5. The maximal production of EPS was 250.21 mg/L under the above conditions. The results of rheological characteristics studies indicated that the EPS aqueous solution exhibited the increased viscosity as the concentration of the EPS and the share rate increased, and shear thickening properties. The scanning electron microscopy verified the cuboid microstructure of the EPS molecules, facilitating stabilization of the texture and water retention in solution. Application of this EPS for preparation of acid milk beverage showed that the use of the EPS could improve stability of the beverage, indicating that the EPS from *Lactobacillus plantarum* K25 can be potentially used as a novel food stabilizer.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; extracellular polysaccharide; yield; influencing factors; milk beverage

(责任编辑:叶红波)