

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250228008

引用格式: 夏季, 杨琴, 李慧. 开菲尔粒中乳酸菌胞外多糖的提取及其抗氧化活性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 279–287.

XIA J, YANG Q, LI H. Extraction and antioxidant activity evaluation of exopolysaccharides from lactobacillus in kefir grains [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 279–287. (in Chinese with English abstract).

开菲尔粒中乳酸菌胞外多糖的提取及其 抗氧化活性评价

夏季^{1*}, 杨琴¹, 李慧²

(1. 南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省粮油品质控制及加工技术重点实验室/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 南京 210023; 2. 上海微谱检测认证有限公司南京分公司, 南京 210023)

摘要: **目的** 通过优化发酵条件提升乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的产量并对提取得到的 EPS 进行抗氧化活性评价。**方法** 本研究从开菲尔粒中筛选并用 16S rDNA 测序法分离鉴定得到一种高产 EPS 乳酸菌 P1-10, 同时研究并比较培养基碳源组成、含量及发酵时间对 P1-10 乳酸菌 EPS 产量的影响, 并将得到的 EPS 进行扫描电镜观察和体外抗氧化评价研究。**结果** 在从开菲尔粒中分离得到的 12 种菌株中, P1-10 菌株形成的菌落格兰氏染色镜检呈阳性, 能凝乳, 拉丝长度大于 15 mm, EPS 含量最高为 6.52 mg/mL; 经 16S rDNA 测序法鉴定为乳酸片球菌(MH143596.1 *Pediococcus acidilactici* strain D15)。P1-10 乳酸菌发酵的最适条件为: MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe medium)培养基且将培养基中的碳源更换为 40 g/L 的蔗糖, 培养温度 35 °C, pH 6.0 发酵 60 h, 此时 EPS 的产量最高, 为 29.09 mg/mL。同时在扫描电镜下观察, EPS 表面比较粗糙, 具有层叠感, 且存在大小不一的空洞。1.0 mg/mL 的维生素 C (vitamin C, VC)、EPS 和 P1-10 菌株发酵上清液的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基和 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]阳离子自由基消除率分别为 86.21%、95.03%; 81.32%、93.91%和 58.54%、65.73%。**结论** 本研究得到的乳酸菌 P1-10 经优化培养条件后, 可有效提高 EPS 的提取效率, 且在体外抗氧化实验中, EPS 的 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基消除率接近于 VC, 表明其具有较强的自由基清除能力和抗氧化能力。该研究可为乳酸菌高产 EPS 的筛选、提取及功能活性研究提供一定的理论依据。

关键词: 开菲尔粒; 乳酸菌; 胞外多糖; 抗氧化活性

Extraction and antioxidant activity evaluation of exopolysaccharides from lactobacillus in kefir grains

XIA Ji^{1*}, YANG Qin¹, LI Hui²

(1. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economic/Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing/Cooperative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Security of Jiangsu Province, Nanjing 210023, China; 2. Nanjing Branch of Shanghai WEIPu Testing Technology Group Co., Ltd., Nanjing 210023, China)

收稿日期: 2025-02-28

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者/*通信作者: 夏季(1992—), 男, 硕士, 实验师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: xiaji1992@foxmail.com

ABSTRACT: Objective To increase the production of exopolysaccharides (EPS) from lactobacillus by optimizing fermentation conditions and evaluate the antioxidant activity of the extracted EPS. **Methods** P1-10 was isolated as a high yield EPS producing lactobacillus from kefir grains and identified by 16S rDNA sequencing. Meanwhile, the effects of carbon source composition and content in the medium and fermentation time on the EPS yield of P1-10 were investigated and compared. Additionally, scanning electron microscopy and *in vitro* antioxidant study was studied from the obtained EPS as well. **Results** Among the 12 kinds of isolated strains from kefir grains, P1-10 formed gram-positive colonies under microscopic examination after Gram staining, could coagulate milk, and had a string length greater than 15 mm. It was identified as *Pediococcus acidilactici* strain (MH143596.1 *Pediococcus acidilactici* strain D15) by 16S rDNA sequencing and the maximum content of EPS was 6.52 mg/mL. In addition, the optimal conditions for P1-10 were obtained under the condition of MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe medium) medium with the carbon source replaced by 40 g/L sucrose and fermenting at 35 °C, pH 6.0 for 60 hours, while the highest yield of EPS was 29.09 mg/mL. Furthermore, the surface of EPS under the scanning electron microscopy was relatively rough, with a sense of layering and different sizes voids. Moreover, the elimination rates of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) free radicals in the 1.0 mg/mL vitamin C (vitamin C, VC), EPS and fermentation supernatant were 86.21%, 95.03%; 81.32%, 93.91% and 58.54%, 65.73%, respectively. **Conclusion** P1-10 can effectively increase the extraction efficiency of EPS compared to the normal culture with the optimizing of the culture conditions. As for the *in vitro* antioxidant experiments, EPS is indicated a strong ability to scavenge free radicals and antioxidant capacity due to the highly DPPH and ABTS radical scavenging rates. This study may provide a theoretical basis for the screening, extraction and functional activity research of EPS from lactic acid bacteria.

KEY WORDS: kefir grains; lactobacillus; exopolysaccharides; antioxidant activity

0 引言

开菲尔是一种传统发酵酸乳制品,具有一般的乳制品饮料所不具备的酸甜、清爽的口感与风味,在我国西北地区深受当地人民喜爱^[1-2]。用于开菲尔酸奶制作的开菲尔粒是一个复杂的微生物混合物,其主要是由乳酸菌、酵母菌及醋酸菌构成;乳酸菌作为其中占比最高的构成菌种,在开菲尔发酵制品的风味及组织形态形成中发挥了重要作用^[3-5]。开菲尔粒酸乳发酵过程中产生的主要代谢产物有乳酸、核酸、胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)、游离氨基酸等物质,其中 EPS 由于其独特的黏弹性、吸水性、生物亲和性及存在的多种生物活性而备受专家学者关注^[6-7]。EPS 是指一些细菌在生长代谢中产生分泌并转运到细胞壁外的一类糖类化合物,根据其分布位置及化学组成的不同,可将其分为荚膜多糖、黏液多糖和同型多糖、异型多糖两类^[8]。乳酸菌 EPS 作为微生物产 EPS 中最的一种,具有生物活性强、易生产、食用安全性高等优点,具有巨大的研究开发价值^[9-10]。

目前乳酸菌 EPS 的生产与提取工艺还存在着诸多问题,乳酸菌 EPS 的产量普遍较低,不同种类的菌种在发酵时产生的 EPS 差异很大,因此,筛选、分离并鉴定可以稳定发酵且产 EPS 较多的乳酸菌株是实现工业化开发及应用

的第一步。相比于传统的检验方法,荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术、高通量测序、16S rDNA 等分子生物学的手段能够快速有效地进行菌种鉴定,且人为误差较小,已被广泛应用于纯种菌种的筛选分离与鉴定^[11-12]。此外,对于相同的乳酸菌菌株,在不同的发酵条件下其 EPS 的产量也不同,有研究报道培养基中添加碳源、氮源、金属离子的不同会影响乳酸菌 EPS 的产量^[13]。WANG 等^[14]从不同地区的 6 种开菲尔粒中筛选分离得到一株乳酸菌菌株 XLM1,在以硫酸蔗糖培养基为原料,30 °C 条件下发酵时间 96 h EPS 的产量最高可达到 25.01 mg/mL。HAJ-MUSTAFA 等^[15]研究了不同碳源、氮源、发酵时间、pH、蔗糖浓度对鼠李糖乳杆菌 519 的 EPS 产量的影响,结果发现,在 pH 为 5.7 时发酵培养 49 h EPS 的产量最高可达到 256 mg/L, pH、培养时间和蔗糖浓度对 EPS 产量有显著影响。与其他多糖相比,乳酸菌 EPS 不仅具有发酵食品特有的优良功能特性,还有抗氧化、抗真菌、抗炎症、抗肿瘤等一系列生物活性,不同种类的乳酸菌 EPS 的功能特性也不完全相同;WANG 等^[16]发现植物乳杆菌 70810 产 EPS 具有多种功能特性,可以显著抑制 HepG-2、BGC-823 和 HT-29 肿瘤细胞的增殖,是一种天然的抗肿瘤药物;刘冰等^[17]对三地羊肚菌菌丝体 EPS 进行了提取与纯化,发现其中 MEP-H 和 MEP-N 两种 EPS 均具有降血糖和抗氧化活性;张茵等^[18]对甜菜汁中耐高糖乳酸菌

进行了筛选、分离和功能活性研究, 发现得到的 COFL4 菌株发酵获得的 EPS 具有良好的抗氧化活性。因此分离鉴定高产 EPS 乳酸菌菌株, 研究其 EPS 生产的最适条件及功能特性具有重要的意义。

本研究从开菲尔粒发酵酸乳中分离纯化产 EPS 的乳酸菌, 运用 16S rDNA 测序法对得到的乳酸菌进行菌种鉴定, 筛选鉴定产 EPS 能力较高的菌株; 并对其产 EPS 含量进行测定, 通过优化发酵时间及培养液碳源组成, 探究乳酸菌 EPS 的最适生产条件; 同时, 通过研究 EPS 对 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基和 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]阳离子自由基消除率的影响评价其抗氧化能力, 以期为乳酸菌发酵产 EPS 产品的工业化生产工艺及生物活性产品开发应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

开菲尔粒(直径约为 2~6 mm), 采自新疆喀什农牧民家庭; 生牛乳购于南京市栖霞区农贸市场; MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe medium)选择性固体培养基、MRS 琼脂培养基(上海阿拉丁试剂有限公司); 维生素 C (vitamin C, VC)、三氯乙酸、无水乙醇、蔗糖、乳糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、柠檬酸氢二铵、吐温-80、乙酸钠、磷酸氢二钾、硫酸镁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 快速 DEAE-琼脂糖凝胶、琼脂糖 CL-6B 凝胶、透析袋(截留分子量 8~14 kDa)、葡萄糖醛酸、牛血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司); 革兰氏染液试剂盒、DNA 提取试剂盒、引物、DPPH 自由基清除能力试剂盒、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。9 种液体培养基及其成分见表 1。

表 1 不同液体培养基的成分组成

Table 1 Composition of different liquid culture media

培养基名称	培养基组成	
	碳源	其他营养成分
MRS 液体培养基	葡萄糖 20 g/L	
mM1	乳糖 20 g/L	蛋白胨 10 g/L、 牛肉膏 10 g/L、
mM2	乳糖 40 g/L	酵母膏 5 g/L、
mM3	乳糖 60 g/L	柠檬酸氢二铵 2 g/L、
mM4	蔗糖 20 g/L	吐温-80 1 mL/L、
mM5	蔗糖 40 g/L	乙酸钠 5 g/L、
mM6	蔗糖 60 g/L	磷酸氢二钾 2 g/L、
mM7	/	硫酸 0.58 g/L、 硫酸锰 0.25 g/L;
mM8	葡萄糖 40 g/L	pH 6.2~6.6, 高压蒸汽灭菌 (121 °C, 20 min)
mM9	葡萄糖 60 g/L	

注: /表示无此项。

1.2 仪器与设备

COY-8375250 厌氧培养箱、NanoDrop One 微量紫外分光光度计、QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司); YP2001 N 分析天平(精度 0.1 g, 上海精密科学仪器有限公司); MQD-S3R 恒温振荡箱(上海旻泉仪器有限公司); SF-CF-1B 超净工作台(上海三发科学仪器有限公司); Axio Vert.A1 倒置显微镜(卡尔·蔡司公司股份公司); Tadvanced 96G 梯度 PCR 仪(德国耶拿分析仪器有限公司); YX-280A* 高压灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司); TM 3000 台式扫描电镜(日本日立集团); SCIENTZ-10N 真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 开菲尔粒的活化

称取开菲尔粒 5.0 g, 用无菌水冲洗干净并接种于灭菌过的生牛乳中, 接种量为 5%; 然后置于震荡培养箱中在 160 r/min、30 °C 的条件下培养 24 h, 连续培养 3 次至开菲尔粒的活性恢复。

1.3.2 菌种的分离

取 1.3.1 中的菌悬液 1 mL, 加入 9 mL 无菌水进行稀释并振荡混匀, 同时继续加入无菌水稀释至 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 个梯度。在厌氧培养箱中, 取 0.1 mL 最终稀释后的菌液分别涂布于 MRS 固体培养基中, 37 °C 恒温厌氧培养 72~96 h, 随后观察菌落形态特征, 并反复使用平板划线法进行分离纯化, 直至形成单个菌落。

1.3.3 产 EPS 菌株的筛选

根据田丰伟等^[19]的方法进行实验, 将 1.3.2 中的单个菌落进行编号并分别接种于营养琼脂平板上, 37 °C 厌氧培养观察 48 h。选择光滑黏稠的菌落, 用接种环检查是否能拉丝。对于分离的菌落进行革兰氏染色及凝乳实验, 并进行显微镜观察, 同时分别收集各个分离的菌落, 利用苯酚硫酸法测定 EPS 含量。通过评估包括形状、质地、颜色、拉丝长度、革兰氏染色、凝乳能力及 EPS 含量等因素, 初步筛选出产 EPS 乳酸菌菌株, 并将分离的菌株存储于保菌管中。

1.3.4 产 EPS 菌株的 16S rDNA 序列鉴定分析

将筛选出的菌株于 MRS 液体培养基中 37 °C 扩大培养 48 h 后, 按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书进行操作并提取菌株的 DNA。以通用引物 27F (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 具体条件如下: 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。PCR 扩增结束后使用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测。PCR 产物送至江苏赛索飞生物科技有限公司进行测序, 测序得到的 DNA 序列通过在美国国家生物技术信息中心(natioanal

center for biotechnology information, NCBI)数据库中利用基于局部比对算法的搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)上进行同源性序列对比,采用 Mega 7 软件绘制系统发育树。

1.3.5 菌株生长曲线及最适培养条件的确定

(1)生长曲线绘制

参照石兴民^[20]的方法,将菌株按 3%接种量接种至 MRS 液体每隔 2 h 取样测定在 600 nm 的 OD 吸光值至 72 h 结束,以培养时间为横坐标,对应时间段的 OD 吸光值为纵坐标,绘制生长曲线。

(2)最适生长温度确定

将菌株按 3%的接种量接入 MRS 液体培养基中,分别于 25、30、35、40 和 45 °C 培养 24 h,测定菌液在 600 nm 的 OD 值。

(3)最适生长 pH 确定

将菌株按 3%的接种量接入初始 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 MRS 液体培养基中,37 °C 培养 24 h,测定菌液在 600 nm 的 OD 值。

1.3.6 EPS 的提取及条件优化

(1)EPS 的提取

按薛艳蓉等^[21]的方法提取,并稍加修改。取 2 份 1.3.3 中初筛菌液 3%于 15 mL MRS 液体培养基中培养,发酵完成后,将一份发酵液于 10000 r/min、4 °C 离心 10 min 取上清,过 0.22 μm 滤膜后冷冻干燥,在 -20 °C 冰箱中保存备用。另一份发酵液于 10000 r/min、4 °C 离心 10 min 取上清,在上清液中加入 80%三氯乙酸搅拌均匀;再次离心除去沉淀蛋白后,取上清液缓慢加入 3 倍体积预冷无水乙醇,于 4 °C 静置 12 h 后离心取沉淀溶解于蒸馏水中,透析 48 h 后冷冻干燥,并将得到的冻干粉末保存在 -20 °C 冰箱中保存备用。

(2)EPS 的含量测定

以葡萄糖为标准单糖,利用苯酚硫酸法测定 EPS 含量。

(3)培养基的筛选

将筛选出菌株分别接种到 MRS 培养基、mM 培养基 1~9 上,140 r/min 振荡培养 24 h,对发酵液进行 EPS 的提取及含量测定。

(4)发酵时间的筛选

将筛选出菌株分别以 3%的接种量接种到 MRS 培养基中,振荡培养 24、36、48、60、72 h,对发酵液进行 EPS 的提取及含量测定。

1.3.7 EPS 的扫描电镜观察

将 1.3.5(1)中的 EPS 冻干样品固定在双面胶带上,用溅射镀膜机溅射金粉。然后,通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)系统在真空条件下进行扫描,记录 EPS 表面的微观结构。

1.3.8 EPS 的抗氧化活性研究

(1)DPPH 自由基清除率的测定

分别称取冻干 EPS、1.3.6(1)中发酵上清液冻干粉各 0.1 g,

加入 1 mL 提取液,按照 DPPH 试剂盒说明书步骤进行操作测定吸光度。DPPH 清除率计算见公式(1):

$$D/\% = \frac{C_{\text{空白}} - C_{\text{测定}}}{C_{\text{空白}}} \quad (1)$$

式中: $C_{\text{空白}}$ 表示空白组的吸光度; $C_{\text{测定}}$ 表示样品组的吸光度。

(2)ABTS 阳离子自由基清除率的测定

分别称取冻干 EPS、1.3.6(1)中发酵上清液冻干粉各 0.1 g,加入 1 mL 提取液,按照 T-AOC 试剂盒说明书步骤进行操作测定吸光度。ABTS 阳离子自由基清除率计算见公式(2):

$$D_1/\% = \frac{C_{\text{空白}} - C_{\text{测定}}}{C_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $C_{\text{空白}}$ 表示空白组的吸光度; $C_{\text{测定}}$ 表示样品组的吸光度。

1.4 数据处理

实验均重复 3 次,实验数据采用软件 SAS (version V8) 进行统计分析,结果以均值±标准偏差表示;多重数据采用 SPSS (version 17.0) Duncan's 新复极差法检验数据的差异性,分析水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 高产 EPS 乳酸菌菌株的筛选

将开菲尔粒活化后进行培养,通过平板划线的方式筛选出 12 种菌株,观察评估 12 种菌株的菌落形状、大小、颜色、质地,并使用接种环检查拉丝长度情况,结果如表 2 所示。其中编号 P1-1、P1-3、P1-4、P1-5、P1-6、P1-9、P1-10、P1-12 菌株菌落均为圆形,颜色为白色或乳白色,表面质地黏稠湿润。P1-1、P1-2、P1-4、P1-7、P1-8、P1-12 菌株革兰氏染色为阴性,P1-3、P1-5、P1-6、P1-9、P1-10、P1-11 菌株革兰氏染色为阳性,且 P1-1、P1-6、P1-9、P1-10、P1-12 菌落能够凝乳。P1-5、P1-6、P1-9、P1-10、P1-12 拉丝长度超过 5 mm,且 P1-5 和 P1-10 拉丝长度超过 15 mm,分别为 15.7 mm 和 15.9 mm。

菌落是菌株鉴定的一项重要标志之一,不同的微生物产生的菌落各不相同,且菌落特征与微生物的菌体形态结构也密切相关。在本研究中,P1-1、P1-6、P1-9、P1-10、P1-12 菌落呈圆形、白色或乳白色、表面黏稠湿润、能凝乳,是乳酸菌的典型特征^[22]。同时,在光学显微镜下观察,呈短杆状或圆球状,单独或成对存在,无芽胞,可初步判定它们均为乳酸菌。菌落的黏稠程度、拉丝长度的多少反映了乳酸菌代谢产物的高低,也在一定程度上反映其 EPS 产量的高低^[23-24],为了进一步验证 12 种菌株的 EPS 产量,采用苯酚硫酸法测定了 12 种菌株的 EPS 含量,其中 P1-10 菌株 EPS 产量最高,为 6.52 mg/mL;因此选用 P1-10 作为高产 EPS 乳酸菌菌株进行后续研究。

2.2 EPS 菌株 16S rDNA 序列分析

开菲尔粒中乳酸菌的系统发育进化树如图 1 所示, 根据对 P1-10 菌株的基因测序结果进行分析显示, 其 DNA 基因组经 PCR 扩增后测序, 与乳酸片球菌(MH143596.1 *Pediococcus acidilactici* strain D15)的同源性达到 100%, 可将其鉴定为乳酸片球菌。乳酸片球菌是乳酸菌的一种, 细胞呈球形, 属于片球菌属, 可作为乳制品发酵过程中的发酵剂, 具有改善风味、延长货架期的作用。同时有文献报道, 乳酸片球菌产生的片球菌素能够破坏细菌的表面结构及其能量代谢途径, 具有抑制其他细菌生长等功效^[25-26]。

2.3 EPS 发酵条件优化分析

EPS 的产量与多种因素密切相关, 如发酵条件(温度、pH 等)、培养基组成及菌株类型等。结合目前研究报道中的高产 EPS 产量^[27-28], 可以认为当菌株的 EPS 含量在 20 g/L 时以上具有高产 EPS 的潜力。菌株 P1-10 的生长曲线如图 2(a)所示, 其在培养 4 h 后进入指数生长期, 并于 18 h 后到达稳定期, 在稳定期可以持续到 70 h。菌株 P1-10 的最适温度和初始 pH 如图 2(b)和 2(c)所示, 在 30~40 °C 发酵温度范围内生长良好, 且最适温度为 35 °C; 但在超过 40 °C 及低于 25

时生长缓慢。菌株 P1-10 在 pH 5.5~6.5 的酸性环境下生长繁殖迅速, 且最适 pH 为 6.0, 这与大多数的乳酸菌的最适温度为 25~35 °C, 最适 pH 为 5.5~6.4 的研究结果一致^[29]。在后续优化 EPS 发酵条件时, 均采用菌株 P1-10 的最适温度 35 °C 和最适 pH 6.0。

碳源作为乳酸菌生长繁殖过程中必不可少的营养物质, 其种类和含量对于 EPS 的产量有直接的影响。培养基中碳源种类和添加量对乳酸菌 EPS 产量的影响如图 3(a)所示。由图 3(a)可知, 与空白对照组相比, 加入葡萄糖、蔗糖和乳糖作为碳源的培养基进行培养后, 发酵后产生的 EPS 的产量含量均有所增加。P1-10 菌株在 mM5、mM6 培养基中产生的 EPS 最多, 分别为 15.27 mg/mL 和 15.36 mg/mL; 这表明在葡萄糖、蔗糖和乳糖三者中, 以蔗糖为培养基碳源进行发酵时, EPS 的产量最高。这可能与 P1-10 菌株对蔗糖的利用效率较高有关, 以蔗糖作为碳源能够提高碳源底物向产物转化的速率, 并能提供给菌体更高效率的腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP), 从而促提升菌株 EPS 的产量^[30]。由于加入 40 g/L 和 60 g/L 蔗糖浓度的培养基中, EPS 的产量没有显著变化($P>0.05$), 因此为了节约成本考虑, 本研究选取 mM5 即 40 g/L 蔗糖浓度作为碳源的培养基用于后续实验。

表 2 开菲尔粒中菌株的颜色、质地、拉丝长度、革兰氏染色及凝乳能力对比
Table 2 Comparison of color, texture, drawing length, gram staining and curdling ability of strains in kefir grain

编号	形状、大小	颜色	表面质地	拉丝长度	革兰氏染色	凝乳实验	胞外多糖含量/(mg/mL)
P1-1	圆、小	白、亮	黏稠湿润	+	阴性	能	1.32
P1-2	圆、小	白、亮	干燥	-	阴性	否	/
P1-3	圆、小	乳白、亮	黏稠湿润	+	阳性	否	1.76
P1-4	圆、小	白、亮	黏稠湿润	+	阴性	否	0.82
P1-5	圆、小	白、亮	黏稠湿润	+++	阳性	否	6.07
P1-6	圆、大	乳白、亮	黏稠湿润	++	阳性	能	3.67
P1-7	点、小	透明	黏稠湿润	-	阴性	否	/
P1-8	圆、大	灰白、不亮	干燥	-	阴性	否	/
P1-9	圆、大	乳白、亮	黏稠湿润	++	阳性	能	4.47
P1-10	圆、小	乳白、亮	黏稠湿润	+++	阳性	能	6.52
P1-11	圆、中	灰白、不亮	干燥	-	阳性	否	/
P1-12	圆、小	白、亮	黏稠湿润	++	阴性	能	3.37

注: -. 不能拉丝; +. 拉丝 0~5 mm; ++. 拉丝 6~10 mm; +++. 拉丝大于等于 15 mm; /表示结果未测出。

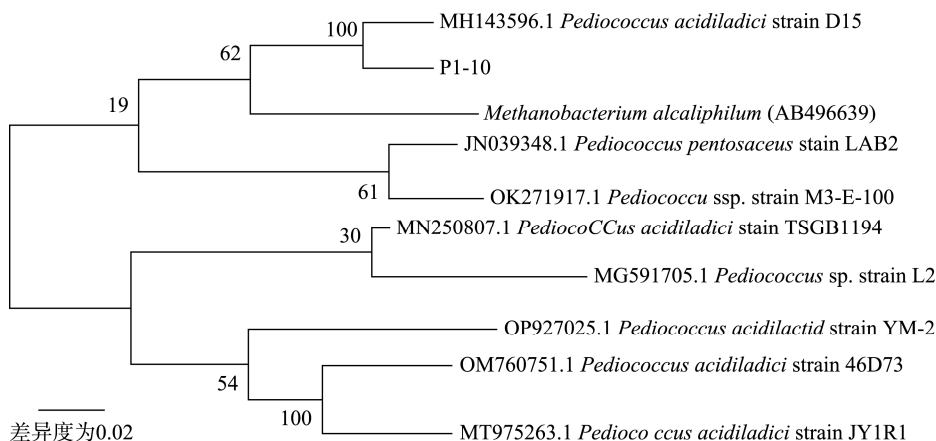
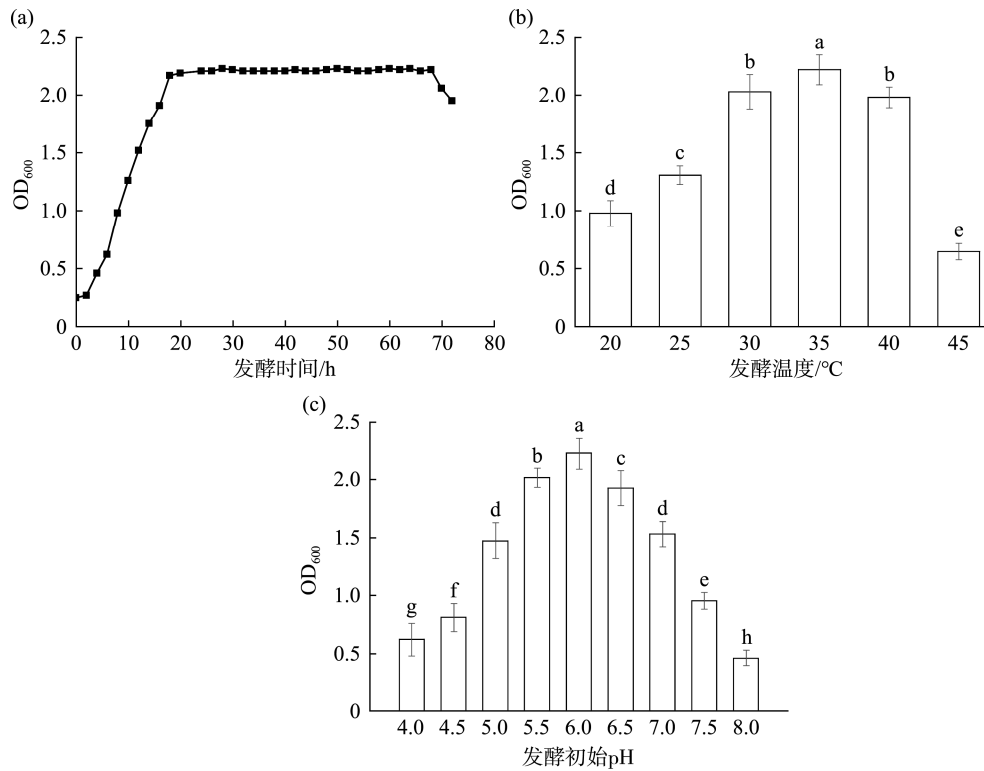


图 1 开菲尔粒中P-10菌株的系统发育进化树

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of kefir grains for P-10



注: 不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$), 图3、5同。

图2 P1-10菌株的生长曲线(a)及发酵温度(b)和初始pH(c)对P1-10菌株生长的影响

Fig.2 Growth curve of P1-10 (a) and the effects of fermentation temperature (b) and initial pH (c) on the growth of P1-10

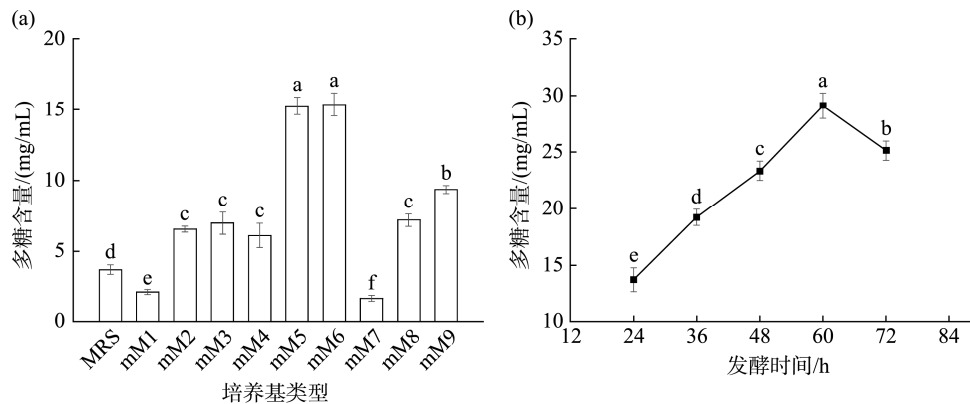


图3 培养基类型(a)及发酵时间(b)对乳酸菌EPS产量的影响

Fig.3 Effects of medium type (a) and fermentation time (b) on lactobacillus EPS of lactic acid bacteria

发酵时间对乳酸菌EPS产量的影响如图3(b)所示。发酵时间为24、36、48、60、72 h时, 乳酸菌EPS产量分别为15.27、19.25、23.34、29.09和25.13 mg/mL, 随着发酵时间的增加, 乳酸菌EPS产量呈现先增加后降低的趋势, 在培养60 h的时候EPS的产量达到最大。根据图2(a)可知P1-10菌株在培养60 h时仍处于稳定期, 可高效积累代谢产物, 因此本研究选取培养60 h作为最适宜的发酵培养时间用于后续实验。当发酵培养时间过长后EPS含量不再增加, 这可能与培养基内营养物质消耗过多, 产生的代谢废

物增多且乳酸菌产酸导致发酵pH变化有关。随着产酸增加, 培养液的pH不断降低, 菌株不再生产EPS并分解EPS来维持自身的营养生长^[31]。在本研究中使用P1-10菌株作为菌种, 以mM5培养基在温度35 °C、pH为6.0发酵60 h的条件下, 得到EPS的产量最大为29.09 mg/mL, 相比于普通条件下的发酵培养, 有效提高了EPS的生产效率。

2.4 EPS的SEM分析结果

近年来, SEM技术凭借其高分辨率、多模态分析能力, 已成为生物大分子表面形态微观结构表征的核心工具。根

据观察到的表面形态微观结构可以推断出乳酸菌 EPS 的某些理化特性, 更能推断出乳酸菌 EPS 可能存在的一些生物活性。乳酸菌 EPS 放大倍数为 1500×下的 SEM 照片如图 4 所示, 图 4 中显示 EPS 冻干粉末在 SEM 下外形呈现细致的、不规则碎片状和碎屑状结构, 放大后观察发现其表面比较粗糙, 具有层叠感, 且存在大小不一的空洞, 这可能与多糖分子之间结构较为紧密, 交联度相对较高有关。具备这种表面形态特性的 EPS 可以通过形成水化聚合物的方式改善产物的稳定性、溶解度、持水力等特性, 并将其广泛应用于发酵食品等相关领域^[32-33]。

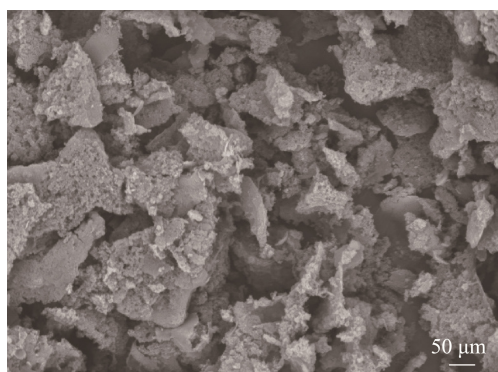


图4 EPS在1500×倍数下的SEM图

Fig.4 SEM image of EPS at 1500× multiples

2.5 EPS 的抗氧化功能特性评价分析

EPS 对 DPPH 自由基消除率(a)和 ABTS 阳离子自由基消除率(b)的影响如图 5 所示。DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基消除率是研究活性物质抗氧化能力和自由基清除能力的重要组成部分^[34]。以 VC 为代表的活性物质能够清除自由基, 防止过氧化、减轻氧化损伤, 因此以 VC 作为阳性对照可以直观地反映其抗氧化能力大小。在本研究中, 当 EPS 的质量浓度达到 1.0 mg/mL 时, VC、EPS、菌株发酵上清液的 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的消除率分别为 86.21%、95.03%; 81.32%、93.91%和 58.54%、65.73%。由图 5 可知, 乳酸菌 EPS 对 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基均具有一定的清除能力, 但整体上强于发酵上清液而弱于 VC。随着 VC、EPS 及发酵上清液的浓度逐渐增加, DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的消除率也呈现递增的趋势, 具有明显的质量浓度依赖性。EPS 的 DPPH 自由基消除率和 ABTS 阳离子自由基消除率与 VC 接近, 表明其具有较强的自由基清除能力和抗氧化能力; 发酵上清液的 DPPH 自由基消除率和 ABTS 阳离子自由基消除率明显低于 EPS, 表明 EPS 是乳酸菌 P1-10 菌株发酵后能够起到抗氧化的一类活性物质。本研究结果与张菡等^[35]研究高产乳酸菌 EPS 的提取, 并发现其对 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基均具有一定的清除能力的研究结果一致。

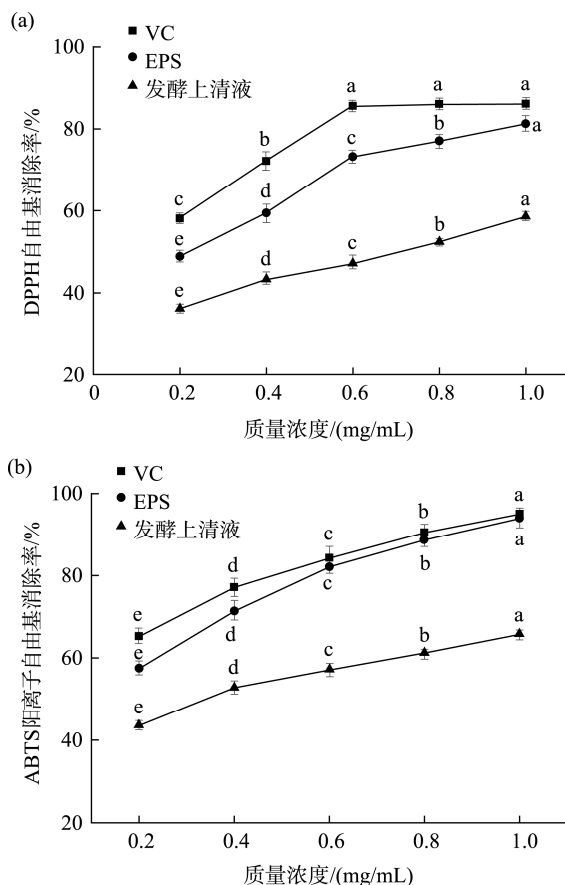


图5 VC、EPS和发酵上清液对DPPH自由基消除率(a)和ABTS阳离子自由基消除率(b)的影响

Fig.5 Effects of VC, EPS and fermentation supernatant on DPPH radical elimination (a) and ABTS radical elimination (b)

3 结论

本研究从开菲尔粒发酵酸乳中分离纯化出了一株高产 EPS 的乳酸菌 P1-10, 并运用 16S rDNA 测序法鉴定为乳酸片球菌。通过改良 MRS 培养基, 将培养基碳源替换为 40 g/L 蔗糖, 培养温度为 35 °C, pH 为 6.0, 发酵 60 h 后 EPS 的含量最高, 为 29.09 mg/mL, 很大程度上提高了乳酸菌 EPS 的提取量。乳酸菌 P1-10 所产 EPS 对 DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基均具有较强的清除能力, EPS 是该菌株发酵后能够产生抗氧化活性的一类功能性物质。本研究通过对菌株的筛选及发酵条件的优化, 为乳酸菌发酵产 EPS 产品的工业化生产工艺提供了一定的理论依据。在后续实验中, 将开展 EPS 的分离纯化、结构鉴定及表征, 同时完善 EPS 的抗氧化机制研究。

参考文献

[1] ROSA DD, DIAS MMS, REIS SA, *et al.* Milk kefir: Nutritional,

- microbiological and health benefits [J]. *Nutrition Research Reviews*, 2017, 30(1): 82–96.
- [2] BESHKOVA DM, SIMOVA ED, FRENGOVA GI, *et al.* Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures [J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(7): 529–535.
- [3] WITTHUHN RC, SCHOEMAN T, BRITZ TJ. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation [J]. *International Dairy Journal*, 2005, 15(4): 383–389.
- [4] 高洁, 崔璐, 袁昕蕾, 等. 基于宏基因组学技术的开菲尔粒中细菌组成分析[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(6): 225–230.
- GAO J, CUI L, YUAN XL, *et al.* Bacteria composition analysis of kefir grain by metagenomic technology [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(6): 225–230.
- [5] DERTL E, ÇON AH. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 85: 151–157.
- [6] JEONG D, KIM DH, KANG IB, *et al.* Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* DN1 isolated from kefir [J]. *Food Control*, 2017, 78: 436–442.
- [7] 赵丹, 赵守祺, 王烁, 等. 融合魏斯氏菌 P2 胞外多糖对巨噬细胞 RAW264.7 增殖及免疫调节活性的影响[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2024, 41(2): 200–206.
- ZHAO D, ZHAO SQ, WANG S, *et al.* Effect of exopolysaccharides from *Weissella confusa* P2 on the proliferation and immunomodulatory activity of macrophage RAW264.7 [J]. *Journal of Natural Science of Heilongjiang University*, 2024, 41(2): 200–206.
- [8] ZAJSEK K, GORSEK A, KOLAR M. Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1): 970–977.
- [9] 赵婧, 高永娇, 孙靖辰, 等. 乳酸菌胞外多糖的研究进展[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2023, 35(5): 51–56, 105.
- ZHAO J, GAO YJ, SUN JC, *et al.* Research progress of exopolysaccharide from lactic acid bacteria [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2023, 35(5): 51–56, 105.
- [10] 田政, 王辑, 郑喆, 等. 乳酸菌胞外多糖的结构及功能特性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(3): 783–790.
- TIAN Z, WANG J, ZHENG Z, *et al.* Research progress on the structure and functional characteristics of extracellular polysaccharides from lactic acid bacteria [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2013, 4(3): 783–790.
- [11] 张亦, 王亮, 吕自力, 等. 一种新型开菲尔风味复合发酵剂的研制[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(11): 80–89.
- ZHANG Y, WANG L, LV ZL, *et al.* Preparation of a novel kefir flavor compound fermentation starter [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(11): 80–89.
- [12] JU JH, HEO SY, KIM HJ, *et al.* Selective production of two prebiotic extracellular polysaccharides from an oral probiotic lactic acid bacterium, *Streptococcus salivarius* SY511 [J]. *LWT*, 2024. DOI: 10.1016/j.lwt.2024.116051
- [13] 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): 1–5.
- LI SY, ZENG XP, YANG ZN. Strategies for increasing of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(3): 1–5.
- [14] WANG L, DENG K, WU T, *et al.* Analysis of physicochemical properties of exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* strain XR1 and its application in fermented milk [J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2021, 146: 111449.
- [15] HAJ-MUSTAFA M, ABDI R, SHEIKH-ZEINODDIN M. Statistical study on fermentation conditions in the optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* 519 in skimmed milk base media [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015, 4(4): 521–527.
- [16] WANG K, LI W, RUI X, *et al.* Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 63: 133–139.
- [17] 刘冰, 李沛, 曾馨俞, 等. 三地羊肚菌菌丝体胞外多糖分离纯化及降血糖和抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2025, 16(5): 86–93.
- LIU B, LI P, ZENG XY, *et al.* Extraction and isolation of *Morchella eohespera* mycelium extracellular polysaccharides and its hypoglycemic and antioxidant activities [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2025, 16(5): 86–93.
- [18] 张茵, 任高宇, 甘好, 等. 甜菜汁中耐高糖乳酸菌的筛选及其发酵生产胞外多糖的抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(16): 262–270.
- ZHANG H, REN GY, GAN H, *et al.* Screening of high sugar tolerant lactic acid bacteria and study on the antioxidant activity of extracellular polysaccharides produced by fermentation in beet juice [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(16): 262–270.
- [19] 田丰伟, 丁虎生, 丁纳, 等. 产胞外多糖的乳酸菌的简便筛选与鉴定[J]. *食品与发酵工业*, 2008(3): 15–19.
- TIAN FW, DING HS, DING N, *et al.* Fast screening and identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2008(3): 15–19.
- [20] 石兴民. 产胞外多糖乳酸菌的筛选及其在沙棘饮料中的应用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
- SHI XM. Screening of extracellular polysaccharide-producing lactic acid bacteria and application in sea buckthorn beverage [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.
- [21] 薛艳蓉, 靳光, 王呈, 等. 新疆传统酸奶中产胞外多糖乳酸菌的筛选与鉴定[J]. *畜牧与饲料科学*, 2019, 40(9): 109–112.
- XUE YR, JIN G, WANG C, *et al.* Screening and identification of exopolysaccharides producing lactic acid bacteria from traditional Xinjiang yoghurt [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2019, 40(9): 109–112.
- [22] 赵时玮, 任静, 王荫榆, 等. 乳酸菌胞外多糖生物合成与遗传调控研究进展[J]. *山西农业科学*, 2010, 38(12): 94–99.
- ZHAO SW, REN J, WANG YY, *et al.* Research advance of biosynthetic and genetic regulation of exopolysaccharides from lactic acid bacteria [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2010, 38(12): 94–99.
- [23] 郑晓燕. 开菲尔粒中胞外多糖优质生产菌株的筛选、胞外多糖理化性质的表征及其在拉丝酸奶中的应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- ZHENG XY. Screening of high-quality exopolysaccharides-producing strains in kefir grains, characterization of physicochemical properties of exopolysaccharides and their application in the ropy yogurt [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020.

- [24] 龙丹丹, 叶淑红, 燕欣悦, 等. 黄褐假单胞菌 Y₁₁ 产胞外多糖发酵条件优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国酿造, 2024, 43(4): 115–122.
LONG DD, YE SH, YAN XY, *et al.* Optimization of fermentation conditions for extracellular polysaccharide production by *Pseudomonas syringae* Y₁₁ and its antioxidant activity [J]. China Brewing, 2024, 43(4): 115–122.
- [25] 蒋佳芸, 赵崇杰, 李雪宁, 等. 乳酸片球菌 HAO2018 胞外多糖的生物活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(22): 27–32.
JIANG JY, ZHAO CJ, LI XN, *et al.* Biological activity of exopolysaccharides from *Pediococcus acidilactici* HAO2018 [J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(22): 27–32.
- [26] 于文娜, 于连升, 王烁, 等. 乳酸片球菌 J1 产胞外多糖发酵条件优化[J]. 中国农学通报, 2024, 40(6): 143–151.
YU WN, YU LS, WANG S, *et al.* Exopolysaccharide production by *Pediococcus acidilactici* J1: Fermentation conditions optimization [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(6): 143–151.
- [27] 龚敏慧. 高产胞外多糖的乳酸菌对蓝莓汁发酵的影响研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023.
GONG HM. Study on the effect of lactic acid bacteria with high yield of exopolysaccharides on blueberry juice fermentation [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023.
- [28] 檀茜倩, 麻冰玉, 程笑笑, 等. 分离自泡菜中的 1 株高产胞外多糖植物乳杆菌的益生特性[J]. 中国食品学报, 2024, 24(11): 22–31.
TAN XQ, MA BY, CHENG XX, *et al.* Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* with high yield of exopolysaccharides (EPS) isolated from pickled vegetables [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(11): 22–31.
- [29] APA AC, MANCINI L, CALABRESE MF, *et al.* Almond skin spontaneous fermentation promotes the selection of lactic acid bacteria starters with exopolysaccharide-producing activities to be used as by-product industry applications [J]. Future Foods, 2025, 11: 100552.
- [30] 周晴晴. 产胞外多糖假肠膜明串珠菌 XG5 的分离及多糖结构和性质的研究[D]. 天津: 天津大学, 2018.
ZHOU QQ. Isolation of exopolysaccharide-producing *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and structure and properties analysis of exopolysaccharide [D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- [31] APA AC, MANCINI L, CALABRESE MF, *et al.* Almond skin spontaneous fermentation promotes the selection of lactic acid bacteria starters with exopolysaccharide-producing activities to be used as by-product industry applications [J]. Future Foods, 2025, 11: 100552.
- [32] 杨艳芳. 柠檬明串珠菌 N21 胞外多糖的分子结构和理化性质研究[D]. 天津: 天津大学, 2018.
YANG YF. Molecular structure and physicochemical properties research of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc citreum* N21 [D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- [33] 王纯玮, 白英. 开菲尔胞外多糖理化性质及其抗氧化特性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(21): 104–110.
WANG CW, BAI Y. Physicochemical properties and antioxidant properties of kefiran [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(21): 104–110.
- [34] 吴彤, 盛亚男, 田禹, 等. 绿豆多酚的提取纯化、成分鉴定及抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(11): 96–104.
WU T, SHENG YN, TIAN Y, *et al.* Detection of antioxidant activity and composition identification of mung bean polyphenols after extraction and purification [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils, 2024, 39(11): 96–104.
- [35] 张茜, 陈海军, 龙晓宇, 等. 1 株甜菜糖蜜源高产胞外多糖明串珠菌的分离鉴定、发酵工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 轻工学报, 2024, 39(3): 9–20.
ZHANG H, CHEN HJ, LONG XY, *et al.* Isolation and identification, fermentation process optimization and antioxidant activity of a high exopolysaccharides-producing *Leuconostoc* sp. from sugar beet molasses [J]. Journal of Light Industry, 2024, 39(3): 9–20.

(责任编辑: 于梦娇 安香玉)