一株产胞外多糖的植物乳杆菌及其应用

技术领域

本发明涉及微生物技术领域，特别涉及一株产胞外多糖的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)及其在食品中的应用。

背景技术

乳酸菌（Lactic acid bacteria，LAB）是一类能利用可发酵性糖产生大量乳酸的细菌总称，目前在自然界已发现的这类细菌在分类学上至少有 23 个属。在食品、医药等领域应用较多的乳酸菌主要有乳杆菌属、链球菌属、肠球菌属、乳球菌属、片球菌属和明串珠菌属等。乳酸菌是益生菌最主要的来源，许多乳酸菌是人体肠道固有的益生菌，已具有改善人体肠道菌群，调节机体免疫力，抑肿瘤，降低血清胆固醇，调节血压等重要的生理活性。

人类对乳酸菌在发酵乳制品和微生态制剂中的应用已取得了显著的进展。目前研究的热点是如何通过新型微生物发酵剂的开发而赋予发酵乳特定的功能性质。已知的乳酸菌发挥主要功能特性的作用机理，除了定殖、通过主要代谢产物（乳酸等）改善肠道内环境等以外，一些次生代谢产物如细菌素、胞外多糖等也发挥着非常重要的作用。其中具有理论和实际应用价值的乳酸菌胞外多糖（LAB EPS）引起了国内外许多学者的研究兴趣。

多糖是指由二十个以上单糖组成的糖类化合物。根据来源不同，多糖可以分为植物多糖、动物多糖和微生物多糖。乳酸菌胞外多糖是乳酸菌产生并分泌到细胞外的一种多糖。乳酸菌胞外多糖具有重要的工艺学功能，对酸乳、干酪及绝大多数发酵乳制品的流变性质、质构、口感以及风味具有重要的影响。乳酸菌胞外多糖可以改善乳制品的流变学特性和质构特性。由于天然增稠作用由产粘乳杆菌与非产粘球菌混合发酵形成的酸乳与非产粘菌株形成的酸乳相比口感滑润、粘度增加；产胞外多糖乳酸菌能够赋予酸乳更强的持

水力，从而避免乳清析出；此外，产胞外多糖而产生的持水性增强有助于提高干酪等产品的得率。乳酸菌胞外多糖还具有良好的生理功能，如增强黏膜吸附作用、抗肿瘤、抗溃疡、免疫调节、降胆固醇、降血压等。因此，开展产胞外多糖乳酸菌的研究，对于改善乳制品生产加工、开发具有特定功能性质的乳酸菌发酵乳制品，具有十分重要的研究意义和经济价值。开发具有益生功能的 LAB EPS 成为目前研究的热点。

20 世纪 60 年代以来，多糖被认为是一种广谱的非特异性的促进剂，在人类免疫中，可增强宿主细胞的细胞免疫和体液免疫功能，如激活巨噬细胞、T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等，激活补体及诱导产生干扰素等，其作用将是激活人体的非特异性防御机能，在抗病毒、抗肿瘤、抗辐射等方面有很好的疗效。（周世文, 徐传福. 多糖的免疫药理作用. 中国生化药物杂志, 1994, 15 (2): 143-147）。

发明内容

本发明要解决的技术问题就是针对现有技术中缺乏高产胞外多糖的乳酸菌的不足，提供一株较高产胞外多糖的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。

本发明的技术方案如下：

本发明技术方案一：一株产胞外多糖的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)，其保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号 CGMCC No.5222。

本发明的技术方案二：一种植物乳杆菌 CGMCC No.5222 的工作发酵剂，由包括以下步骤（a）或（b）的方法制备而得：

（a)将植物乳杆菌 CGMCC No.5222 菌种接种于添加乳清蛋白的灭菌乳中培养至凝乳，连续培养活化两代作为母发酵剂；将母发酵剂按 3-5%（v/v）接种于添加乳清蛋白的灭菌乳中培养至凝乳，即得工作发酵剂；

（b）将植物乳杆菌 CGMCC No.5222 菌种接种于液体培养基中连续活化两代，然后将活化培养物按 2-4%（v/v）接种于液体培养基中培养 16-18 h，固液分离得到细胞沉淀，将沉淀用无菌乳悬浮，即得工作发酵剂。

步骤（a）中，灭菌乳中添加乳清蛋白的量优选 0.5-5%（wt），更优选 1%（wt）。培养至凝乳的方法是常规方法，较佳的在 37℃条件下培养 14-16 h。

步骤（b）中，在液体培养基中活化的方法是植物乳杆菌的常规活化方法，较佳的在 37℃条件下培养 12-16 h。所用的液体培养基是常规的植物乳杆菌液体培养基，较佳的如 MRS 液体培养基。固液分离的方法是常规的菌体发酵液的固液分离方法，包括离心法、过滤法等，本发明优选离心法，更优选在 4℃条件下 4000 r/min 离心 15 min。

本发明所述的植物乳杆菌 CGMCC No.5222 的工作发酵剂中，活菌数优选 10^9 cfu/mL 以上。

本发明技术方案三：植物乳杆菌 CGMCC No.5222 在发酵食品中的用途。

其中，所述的发酵食品是常规的发酵类食品，优选乳酸菌奶饮料或者发酵乳。

优选的，所述的乳酸菌奶饮料是按照下述步骤制备的：原料乳灭菌后冷却然后加入植物乳杆菌 CGMCC No.5222 工作发酵剂混合均匀，使植物乳杆菌 CGMCC No.5222 浓度达到 10^6 cfu/mL 以上，即得到含有所述植物乳杆菌的乳酸菌奶饮料。

其中，所述的灭菌方法是常规的原料如灭菌方法，较佳的如超高温瞬时灭菌（140℃下高温热杀菌 2 s）。待灭菌乳冷却后再加入所述的植物乳杆菌工作发酵剂，冷却温度常规，较佳的冷却到 40℃。

优选的，所述的发酵乳是按照下述步骤制备的：原料乳灭菌后冷却然后加入 3-5%（V/V）植物乳杆菌 CGMCC No.5222 工作发酵剂和 3-5%（V/V）可共生的发酵乳商品发酵剂，混匀后发酵至滴定酸度以乳酸计 0.6-0.7，即得到含有所述植物乳杆菌的发酵乳。

其中，所述的灭菌方法是常规的原料如灭菌方法，较佳的如超高温瞬时灭菌（140℃下高温热杀菌 2 s），更佳的如在 95℃下加热杀菌 20 min。待灭菌乳冷却后再加入所述的植物乳杆菌工作发酵剂，冷却温度常规，较佳的冷却到 37℃。发酵温度常规，较佳的为 37℃。可共生的发酵乳商品发酵剂是常规的商品发酵剂，如保加利亚乳杆菌。

本发明的技术方案四：从植物乳杆菌 CGMCC No.5222 中提取的胞外多糖。

其中，所述的提取的方法是常规的微生物胞外多糖的提取方法，优选的包括将植物乳杆菌 CGMCC No.5222 的发酵液煮沸后离心以除去菌体和凝结蛋白，上清液用三氯乙酸法沉淀除去蛋白，然后用醇沉淀，沉淀溶解于水后再用水透析。

其中，所述的植物乳杆菌的发酵液是常规的植物乳杆菌发酵液，较佳的是将所述的植物乳杆菌以5%（V/V）的接种量接种于含1%（w/v）葡萄糖的12%（w/w）脱脂乳中发酵培养而得的发酵液。较佳的是在30℃条件下培养30 h而得发酵液。

其中，优选的离心条件是 20 min，10000 g，4°C。三氯乙酸法是除蛋白的常规方法，较佳的添加三氯乙酸至终浓度 4% (w/v)，静置过夜，4°C，10000 g，离心 20 min 除去沉淀蛋白。醇沉淀法也是常规的方法，较佳的采用乙醇，加乙醇至终浓度 75% (v/v)，4°C 静置 24h，离心(20 min，10000 g，4°C) 取沉淀。

本发明的技术方案五：所述的从植物乳杆菌CGMCC No.5222中提取的胞外多糖在增强免疫药物、保健品或食品中的用途。

本发明所用的原料或试剂除特别说明之外，均市售可得。

相比于现有技术，本发明的有益效果如下：本发明提供了一株植物乳杆菌 CGMCC No.5222，经试验证明它具有产胞外多糖的特征，并且与其它植物乳杆菌产胞外多糖的量不同，是一株新分离鉴定的植物乳杆菌菌株。所产

的胞外多糖能够刺激 B 淋巴细胞增殖，增强免疫，在提高免疫力的药品、保健品、食品的应用方面具有广阔的前景。

保藏信息

本发明提供的植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）菌株 BDLP0001，已于 2011 年 9 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏理委员会普通微生物中心，保藏地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，邮编：100101，其保藏编号为 CGMCC No.5222。

附图说明

以下结合附图说明本发明的特征和有益效果。

图 1 示本发明所述植物乳杆菌 CGMCC No. 5222 的菌落形态。

图 2 示本发明所述植物乳杆菌 CGMCC No. 5222 的细胞形态（×1000）。

图3示本发明所述植物乳杆菌CGMCC No. 5222的生长曲线。

图4示本发明所述植物乳杆菌CGMCC No. 5222的最适生长温度。

图5示本发明所述植物乳杆菌CGMCC No. 5222的最适pH。

具体实施方式

本发明从乳酸菌生境中采集样品，筛选产胞外多糖的乳酸菌野生菌株，并通过体外 T/B 淋巴细胞增殖实验初步确定多糖的免疫活性。

本发明从自然发酵的泡菜中筛选出一株乳酸菌 BDLP0001，利用形态特征、培养性状和生理生化特征等微生物学特性及其遗传特性 16s rDNA 将该乳酸菌 BDLP0001 鉴定为植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*），该菌株已于 2011 年 9 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC），其保藏编号为 CGMCC No.5222。

本发明植物乳杆菌CGMCC No.5222的形态学特征：

菌落特征：菌株在MRS平板上划线分离，37℃厌氧培养48 h，菌株生长

良好。其菌落形态如图1所示。菌落为圆形，凸起，边缘整齐，颜色乳白色稍微有点偏黄，不透明，表面湿润光滑，挑取能拉丝。

菌体特征：菌体呈杆状（图2），多排列成长短不一的链状，也有单个分散排列，菌体大小一般为0.6μm×1.5μm，不产芽孢，革兰氏染色阳性。

本发明植物乳杆菌 CGMCC No.5222 的培养特征：

植物乳杆菌 BDLP0001 的最低生长温度为 15℃，最高生长温度为 40℃，在 30-40℃生长温度最佳；最高和最低初始生长 pH 为 9.0 和 4.0，最适生长初始 pH 为 5.0；菌株 BDLP0001 的延迟期相对较短，2 h 进入对数生长期，10 h 达到稳定期；菌株在胆盐浓度 0.1%-0.4%范围内生长良好，具有良好的胆盐耐受性；BDLP 0001 在≤7%NaCl 浓度下生长良好，能够耐受 8%NaCl。

本发明的植物乳杆菌 BDLP0001 来源于传统发酵食品，属公认安全（Generally Recognized As Safe，GRAS）菌种，可用于乳酸菌食品中。

因此，本发明还涉及所述的植物乳杆菌 BDLP0001 在发酵食品中的用途。所述含有植物乳杆菌 BDLP0001 的发酵食品包括乳酸菌奶饮料和发酵乳。

本发明还提供所述植物乳杆菌 BDLP0001 工作发酵剂。

本发明工作发酵剂较佳的是采用下述制备方法制备的：将植物乳杆菌 BDLP0001 菌种接种于添加 1%乳清蛋白（WPC）的 12%（w/v）在 115℃灭菌 15 min 的脱脂乳中，在 37℃条件下培养 14-16 h 至凝乳，连续培养活化两代，作为母发酵剂使用；将母发酵剂按 3-5%（v/v）接种于上述的灭菌乳中，培养 14-16 h 至凝乳，此时凝乳中活菌数约在 10^9 cfu/mL，得到所述的工作发酵剂；或者将植物乳杆菌 BDLP0001 菌种接种于 MRS 液体培养基中，在 37℃条件下培养 12-16 h 进行活化，连续活化两代，然后将活化培养物按 2-4%（v/v）接种于 MRS 液体培养基中，培养 16-18 h，在 4℃条件下 4000 r/min 离心 15 min，去除上清液，得到细胞沉淀，将沉淀用一定量的无菌脱脂乳悬浮，得到所述的工作发酵剂。

本发明中优选的所述的乳酸菌奶饮料是按照下述步骤制备得到的：原料乳在 95℃下加热杀菌 20 min 或在 140℃下高温热杀菌 2 s，然后冷却到 40℃，再加入所述的植物乳杆菌 BDLP0001 工作发酵剂，使其浓度达到 10^6 cfu/mL

以上，在4℃冷藏保存即得到含有植物乳杆菌 BDLP0001 的乳酸菌奶饮料。

本发明中优选的所述的发酵乳是按照下述步骤制备得到的：原料乳在95℃下加热杀菌 20 min 或在 140℃下高温热杀菌 2 s，然后冷却到 37℃，再按照 3-5%（V/V）加入所述植物乳杆菌 BDLP0001，再加入 3-5%（V/V）可共生的制备发酵乳商品发酵剂，混匀后在 37℃下混菌发酵至滴定酸度以乳酸计 0.6-0.7，然后冷却至 40℃，再进行冷藏保存得到含有植物乳杆菌 BDLP0001 的发酵乳。

下面用实施例来进一步说明本发明，但本发明并不受其限制。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所述的“室温”是指进行试验的操作间的温度，一般为25℃。

实施例 1　植物乳杆菌 BDLP 0001 的采集、分离

（1）、样品采集

从自然发酵的泡菜、传统发酵乳制品（酸奶、酸马奶酒等）、生牛乳、生面团、发酵香肠、腊肠、开菲尔粒（藏灵菇）、青贮饲料、婴儿粪便等中取样。将收集的样品放入冰盒内冷藏，保持在较低温度下带回实验室并放置于 4℃冰箱内，尽快将乳酸菌进行分离。

（2）、样品预处理

取固体样品 20 g（液体样品 20 mL）放入装有 180 mL 0.1%无菌蛋白胨水（蛋白胨 1 g，蒸馏水 1000 g）的 250 mL 三角瓶（含玻璃珠）中，振荡后静置 20 min，备用。

（3）、产糖菌株的初步分离

使用 0.1%无菌蛋白胨水以体积计按照 1:10 对上述样品进行连续稀释，在每个稀释度取 0.1 mL 稀释样品，分别涂布 MRS 琼脂平板、M17 琼脂平板和 SM 琼脂平板，Modified MRS 琼脂平板和 ESM 平板，在 37℃厌氧条件下恒温培养 24-48 h，用无菌牙签挑取粘稠且有明显拉丝的单菌落。然后在相应的琼脂平板上划线分纯，得到纯的单菌落，进行革兰氏染色，接触酶实验。纯化菌株保藏在相应的分离培养基中，添加 20%的甘油作为保护剂，-20℃

冻存。

其中使用的培养基配方如下：

SM 培养基（g/L）： 120 g 脱脂乳粉，10 g 葡萄糖，880 g 水。

ESM培养基（g/L）： 90 g 脱脂乳粉，3.5 g 酵母抽提物， 3.5 g蛋白胨，20 g 葡萄糖。（Van den Berg, D. J. C., A. Smits, B. Pot, A. M. Ledeboer, K. Kersters, J. M. A. Verbakel, and C. T. Verrips. 1993. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food process and culture collections. Food Biotechnol. 7:189–205.）

MRS培养基（乳杆菌选择性培养基，德国Merck公司购得）。

M17培养基（乳球菌培养基 BD Difco公司）。

Modified MRS培养基：MRS培养基中葡萄糖的含量改为50 g/L，其他组分不变。

不同样品在MRS琼脂培养基、M17琼脂培养基、Modified MRS琼脂平板、ESM琼脂培养基和SM琼脂培养基上共分离出700株菌。这些菌株在分离平板上表现出粘丝状、粘稠状和粘液状。

（4）菌株产胞外多糖

将从平板上得到的分离株接种到MRS液体培养基中培养18 h，再按1%（V/V）的接种量接种到含50 g/L葡萄糖的MRS液体培养基中，在30℃发酵24 h。量取20 mL培养液，沸水浴10 min，冷却到室温，上清液加入80%质量分数的三氯乙酸至终浓度4%（m/v），4℃静置过夜，10000 g离心20 min，轻倾上清液于截留分子量14000的透析袋中，去离子水透析72 h，每8 h换水一次，定容。采用硫酸-苯酚法（Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Pebers PA, Smith F. (1956). Colorimetric method of determination of sugars and related substances. Analytical chemistry. 28(3):350-356.）测定胞外多糖的含量。实验结果列于表1中。从表中可以看出，菌株9-9产的粗多糖的产量相对较高，结合菌落的拉丝性能，选取这株菌，命名为BDLP0001。

表 1.产胞外多糖乳酸菌的初步分离（30℃，24 h 培养）

菌株编号	EPS(mg/L)
4-21	60.98
5-28	81.6
9-9	131.96
17-5	109.03
17-15	135.79
17-16	126.79
18-9	125.48
19-16	117.61
19-19	115.87
26-9	81.53
26-8	158.91
22-22	161.88
27-2	93.12
33-4	107.79
33-10	100.23

实施例 2　植物乳杆菌 BDLP 0001 的鉴定

（1）生理生化试验

菌株 BDLP0001 为革兰氏阳性、过氧化酶阴性、不运动的杆菌，在 15 ℃和 40℃能够生长，不水解淀粉，不液化明胶，不产生硫化氢，发酵葡萄糖产酸不产气，联苯胺试验阴性、吲哚试验阴性、甲基红试验阳性。

（2）利用糖发酵试验鉴定菌株

挑取少许菌株BDLP0001培养物划线MRS固体平板37°C厌氧培养24～48 h。从平板上挑取单菌落，接入API 50 CHL液体培养基（生物梅里埃中国有限公司，API 50 CHL Medium）中制成菌悬液，接入API 50 CHL鉴定试剂条（生物梅里埃中国有限公司），37°C厌氧培养24～48 h，记录菌株对49种碳水化合物的发酵结果，将其输入梅里埃公司的鉴定软件API LAB PLUS，这些反应结果如表2所示。经数据库查询，本发明的BDLP0001与植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*具有99.9%的同源性，因此，将本发明的植物乳杆菌BDLP0001菌株初步鉴定为植物乳杆菌。

表2. 菌株BDLP0001碳源利用情况

碳水化合物	反应结果	碳水化合物	反应结果
甘油	-	水杨苷	+
赤藻糖醇	-	D-纤维二糖	+
D-阿拉伯糖	-	D-麦芽糖	+
L-阿拉伯糖	-	D-乳糖	+
D-核糖	+	D-蜜二糖	+
D-木糖	-	D-蔗糖	+
L-木糖	-	D-海藻糖	+
D-侧金盏花醇	-	菊粉	-
甲基-β-D-吡喃木糖苷	-	D-松三糖	+
D-半乳糖	+	D-棉子糖	-
D-葡萄糖	+	淀粉	-
D-果糖	+	糖原	-
D-甘露糖	+	木糖醇	-
L-山梨糖	-+	D-龙胆二糖	+
L-鼠李糖	-	D-土伦糖	-
卫茅醇	-	D-来苏糖	-
肌醇	-+	D-塔格糖	-
甘露醇	+	D-岩藻糖	-
山梨醇	+	L-岩藻糖	-
甲基-α-D-吡喃甘露糖苷	+	D-阿拉伯醇	-
甲基-α-D-吡喃葡萄糖苷	-	L-阿拉伯醇	-
N-乙酰葡萄糖胺	+	葡萄糖酸钾	-
苦杏仁苷	+	2-酮基葡萄糖酸钾	-
ARBULIN	+	5-酮基葡萄糖酸钾	-
七叶灵柠檬酸铁	+		

注:“+”为反应阳性，“-”为反应阴性，“-+”为不能确定是否利用该碳源。

（2）菌株BDLP0001的16s rDNA序列分析

菌株BDLP0001基因组DNA提取方法：挑取纯化的BDLP0001单菌落接种到1 mL MRS液体培养基中，37℃培养14 h后将菌液离心（5000 g，10 min）收集菌体。采用基因组DNA抽提试剂盒（TIAN GEN公司）提取。PCR扩增采用两种合成的通用引物（16s 27F：GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG； 16s 1492R：CGGCTACCTTGTTACGACTT），PCR产物采用切胶回收试剂盒（BioFlux）回收，纯化后送Invitrogen生物技术公司测序。所得菌株BDLP0001的16s DNA核苷酸序列为1446bp（序列表中的SEQ ID NO:1），送GenBank（GenBank accetion number：JN86879）做Blast分析。菌株BDLP0001同源性最高菌株的是*L.plantarum* IMAU 80597（GenBank accetion number：HM958789），同源性为100%。

根据Goodfellow和O'Donnell所说的DNA的G+C(mol%)≤10%~12%及16S rRNA的序列同源性≥95%的种可归为一个属，并且Embley和Stackebrangdt认为当16S rRNA的序列同源性≥97%时可以认为是一个种。由此可以推断：菌株BDLP0001与*L.plantarum* IMAU 80597属于同一个种。菌株BDLP0001鉴定为植物乳杆菌。

依据形态特征、生理生化特征等微生物学特性及其遗传特性 16s rDNA 对乳酸菌 BDLP0001 鉴定为植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*），该菌株已于 2011 年 9 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC），其保藏编号为 CGMCC No.5222。

实施例 3　BDLP0001 菌株的生长特性

（1）BDLP0001 菌株生长曲线的绘制

将活化好的植物乳杆菌BDLP0001按1%（V/V）接种量接入MRS液体培养基中，37℃恒温培养24 h，每隔2 h在620 nm测定培养液的活菌数和pH值。培养液pH值用pH计测定，活菌数采用平板计数法，以活菌数对数值和pH值对时间作图得到菌株BDLP0001在MRS中的生长曲线，其结果（图3）表明：植物乳杆菌BDLP0001在MRS培养基中生长迅速，在2 h左右进入对数期，10

h左右进入稳定期。随着培养时间的延长，菌株生长产酸，pH不断降低，进入稳定期后，pH下降趋势渐缓。24 h培养结束时，培养液的pH值为3.89，培养液中活菌浓度可以达到10^8 CFU/mL。

（2）BDLP0001 菌株最适生长温度测定

将活化好的植物乳杆菌BDLP0001按1%（V/V）接种量分别接于10 mL MRS液体培养基中，分别置于15°C、37°C、40°C、45°C和65°C条件下恒温培养16 h，以未接种的MRS液体培养基作对照，于620 nm测定不同温度下培养的培养液的OD值，依据OD值的大小确定最适生长温度。结果表明：（图4）植物乳杆菌BDLP0001的生长温度范围较广，从15℃到45℃都生长，在30℃-40℃生长良好，最适生长温度为35℃。

（3）BDLP0001 菌株最适生长 pH 测定

将植物乳杆菌BDLP0001接种到不同初始pH值（3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0和10.0）的MRS液体培养基中，在37°C下培养16 h，以未接种的同pH值MRS液体培养基作对照，于620 nm处测定培养液的OD值，依据OD值的大小确定最适生长pH值。 结果表明（图5）：菌株BDLP0001在初始pH值4.0-8.0的MRS液体培养基中菌体生长良好，最适生长pH测定为6.0。

（4）植物乳杆菌 BDLP 0001 对胆汁的耐受性试验

将活化的植物乳杆菌BDLP 0001按1%（V/V）的接种量接种于含不同浓度（质量分数为0%，0.05%，0.1%，0.15%，0.2%，0.25%，0.3%，0.35%和0.4%）牛磺胆酸钠（TCA）的MRS液体培养基中，37℃恒温培养，于24 h测定OD_{620}，依据OD值的大小确定菌株对胆汁的耐受能力。人体小肠中胆盐含量在0.03%-0.3%之间波动，能够在正常生理胆盐浓度中生长和代谢的菌株才可能在肠道转运过程中存活。如表3所示，随着胆盐浓度的增大，菌株对胆盐的耐受能力下降。植物乳杆菌BDLP 0001表现出良好的胆盐耐受性，胆盐浓度在0.1%-0.4%范围内菌株生长良好，尤其在0.4%胆盐的培养基中，菌体的OD值仍能达到1.5以上。说明菌株在人体小肠中可正常存活并生长繁殖，

有开发为益生菌的潜力。

表 3. 植物乳杆菌 BDLP 0001 在不同胆盐浓度培养基中的生长情况

	牛磺胆酸钠（TCA）质量分数（%）						
	0	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4
OD_{620}	3.4785	3.1617	3.0336	2.7342	2.3217	1.8309	1.6635

（5）植物乳杆菌 BDLP 0001 对 NaCl 的耐受性试验

将活化的植物乳杆菌 BDLP 0001 按 1%（V/V）的接种量接种于含不同浓度（质量分数为 0%，2%，4%，6%，7%，8%，9%，10%和 11%）NaCl 的 MRS 液体培养基中，37℃恒温培养，以溴钾酚紫为指示剂，观察菌株 NaCl 的耐受性。结果列于表 4 中。植物乳杆菌 BDLP 0001 在含≤7%NaCl 浓度的培养基中生长良好，在 8%NaCl 浓度下生长缓慢，9%NaCl 以上不生长。BDLP 0001 具有良好的 NaCl 耐受性。

表 4. 植物乳杆菌 BDLP 0001 对 NaCl 的耐受性

NaCl 浓度（%）	生长情况
0	++
2	++
4	++
6	++
7	++
8	+
9	-
10	-
11	-

注： ++为生长良好，+为生长，-为不生长

实施例 4 植物乳杆菌 BDLP0001 产胞外多糖的提取

（1）菌种活化：将植物乳杆菌BDLP0001菌种接种于MRS液体培养基中，在37℃条件下培养12-16 h进行活化，连续活化两代。

（2）种子培养：植物乳杆菌BDLP0001经活化后，接种于含1%（w/v）

葡萄糖的12%（w/w）脱脂乳在115℃灭菌15 min的脱脂乳中，在37℃条件下培养14-16 h至凝乳，连续培养活化两代，用作母发酵剂。

（3）发酵培养：将植物乳杆菌BDLP0001以5%（V/V）的接种量接种于含1%（w/v）葡萄糖的12%（w/w）脱脂乳中，在30℃条件下培养30 h。

（4）EPS的提取纯化：将上述制备的发酵液首先经过沸水浴10 min，以失活可降解多糖的酶，然后离心（20 min，10000 g，4°C）除去菌体和凝结蛋白，上清液浓缩至原体积的1/2，添加80% (w/v)三氯乙酸至终浓度4% (w/v)，静置过夜，离心（20 min，10000 g，4°C）除去沉淀蛋白，浓缩液加95% (v/v)乙醇至终浓度75% (v/v)，4°C静置24 h，离心(20 min，10000 g，4°C)，取沉淀去离子水溶解，离心（20 min，10000 g，4°C）去沉淀，上清液去离子水透析72 h，每8 h换水一次，冷冻干燥得粗多糖样品。

实施例 5 多糖的体外免疫活性

EPS 细胞毒性实验及对 T/B 淋巴细胞的增殖反应

无菌操作取出 BALB/C 小鼠脾脏，制成脾细胞悬液。用淋巴细胞分离液（上海华美生物工程公司）分离淋巴细胞，PBS 缓冲液（每升含 0.144 g KH_2PO_4，9.0 g NaCl，0.795 g Na_2HPO_4 $7H_2O$，pH7.4）洗涤 2 次，用 RPMI1640 培养液（Biosharp Amresco 公司）调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL 的脾淋巴细胞悬液。96 孔培养板每孔加入 150 μL 脾淋巴细胞悬液和 50 μL 不同浓度（10 μg/mL、100 μg/mL、1000 μg/mL）的多糖样品，用有丝分裂原刀豆蛋白 A（ConA，5 μg/mL，Sigma）诱导 T 淋巴细胞增殖，脂多糖（LPS，10 μg/mL）诱导 B 淋巴细胞增殖，设阴性对照组（只含脾淋巴细胞悬液）和阳性对照组（添加有丝分裂原），细胞毒性检验时不添加有丝分裂原。每实验组设 3 孔重复，置 37℃，5%CO_2 饱和湿度条件下培养 72h。

（1）细胞毒性检验：采用 MTT 法（许德义, 贾宏彬. 大鼠杏仁核 5-HT3 受体参与免疫调制[J].生理学报, 2001, 53(5): 349-354），培养结束前 4 h，每孔加入 20 uL MTT（5 g/L，Sigma），继续培养 4 h。培养结束后加二亚基砜 DMSO 150μL。酶联免疫检测仪于 570 nm 测定 A_{570} 值。其中：MTT 溶液的

配制：用 D-hank's 液溶解 MTT，搅拌使之完全溶解，定容，使 MTT 浓度为 5 mg/mL。

MTT 法以实验周期短、操作简便、灵敏度高、重复性好而得到迅速发展和广泛应用，在细胞生物学、辐射生物学和免疫学等研究领域具有重要地位。MTT 比色法的原理在于活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使黄色的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结品物并沉积在细胞中（死细胞无此功能），经二甲亚砜（DMSO）溶解后，利用酶联免疫检测仪在一定波长下测定的吸光度与活细胞线粒体的代谢能力呈正相关，进而反映细胞的增殖活性。经 MTT 比色法测定可知，添加不同浓度的粗多糖体外培养的小鼠脾淋巴细胞培养液与对照组相比，OD 值之间没有显著差异，结果见表 6。这说明粗多糖未显示细胞毒性。

表 6.粗多糖的细胞毒性检测

	浓度 μg/mL	OD 值	P 值	细胞毒性
对照	-	0.124±0.001		
	10	0.109±0.016	0.2614	无
粗多糖	100	0.143±0.026	0.3304	无
	1000	0.267±0.000	0.0000	无

（2）细胞增殖检验：采用 ^{3}H-TdR 掺入法（郭曲练, 张阳德, 邹望远等. 鞘内泵入吗啡对大鼠细胞免疫功的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2005, 25(2): 118-121），培养结束 8 h，每孔内加入 20μL，^{3}H-TdR（370kBq/mL）。培养结束后将各管细胞收集在 49 型玻璃纤维滤纸上，将纸烘干并置于 PPO-POPOP（Sigma）闪烁液内过夜，用液闪仪测出各管的 CPM 值。其中：

^{3}H-TdR 工作液：原液为 37 MBq/mL，放射性比强度为 0.925 TBq/mmol，临用前用 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度（370 kBq/mL），^{3}H-TdR 一般临用时稀释。

闪烁液：POPOP（0.1-0.3 g）中加入少量二甲苯在 37℃水浴上溶解后，再加 PPO（5.0 g），然后补足二甲苯至 1L。配好的闪烁液需要闭光保存。

ConA 溶液的配制：精确称取 10 mg ConA，用 RPMI 1640 培养液充分溶

解，定容至 100 mL，浓度为 100 μg /mL。

LPS 溶液的配制：精确称 10 mg LPS，用 RPMI 1640 培养液充分溶解，定容至 100 mL，浓度为 100 μg/mL。

^{3}H-TdR 方法与 MTT 法相比灵敏度高、稳定性好、经济实惠。^{3}H-TdR 方法基于细胞增殖周期中 DNA，RNA 合成增加，^{3}H-TdR 能被作为原料摄入细胞，测定细胞内 ^{3}H-TdR 放射量，反映了细胞增殖情况。

脾脏淋巴细胞中包括 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞，两者含量基本相近。ConA 作为 T 淋巴细胞有丝分裂原，仅促进 T 淋巴细胞的增殖，对 B 淋巴细胞不起作用，相反 LPS 仅能诱导 B 淋巴细胞增殖。粗多糖对 LPS 激活的 B 淋巴细胞增殖具有明显的促进作用（$P<0.05$）（表 7），并且具有明显的剂量依赖关系。而粗多糖对经 ConA 激活的体外小鼠 T 淋巴细胞增殖并没有促进作用。

表 7. 粗多糖对 T/B 淋巴细胞增值反应的影响

	浓度	T 淋巴细胞		B 淋巴细胞	
	μg/mL	CMP 值	增强百分比（%）	CMP 值	增强百分比（%）
阴性对照	-	332±35	-	277±59	-
阳性对照	-	24911±822	-	11984±1287	-
粗多糖	10	28601±2515	15	14021±282	17
	100	28167±3162	13	15355±722	28
	1000	25658±3674	3	21243±2971	77

体外淋巴细胞培养实验显示，植物乳杆菌 BDLP0001 产的胞外多糖无细胞毒性。体外免疫活性实验可知，植物乳杆菌 BDLP0001 产的胞外多糖能显著增强 B 淋巴细胞的增殖反应，显示较强的免疫增强活性。

应用实施例 1　植物乳杆菌 BDLP0001 工作发酵剂

将植物乳杆菌 BDLP0001 菌种接种于添加 1%乳清蛋白（WPC）的 12%（w/v）在 115℃灭菌 15 min 的脱脂乳中，在 37℃条件下培养 14-16 h 至凝

乳，连续培养活化两代，作为母发酵剂使用；将母发酵剂按 3-5%（v/v）接种于上述的灭菌乳中，培养 14-16 h 至凝乳，此时凝乳中活菌数约在 10^9 cfu/mL，得到本发明的工作发酵剂（1）。

将植物乳杆菌 BDLP0001 菌种接种于 MRS 液体培养基中，在 37℃条件下培养 12-16 h 进行活化，连续活化两代，然后将活化培养物按 2-4%（v/v）接种于 MRS 液体培养基中，培养 16-18 h，在 4℃条件下 4000 r/min 离心 15 min，去除上清液，得到细胞沉淀，将沉淀用一定量的无菌脱脂乳悬浮，得到本发明的工作发酵剂（2）。

应用实施例 2 含有植物乳杆菌 BDLP0001 的乳酸菌饮料

原料乳在 95℃下加热杀菌 20 min 或在 140℃下高温热杀菌 2 s，然后冷却到 40℃，再加入应用实施例 1 所得的植物乳杆菌 BDLP0001 工作发酵剂【工作发酵剂（1）或者（2）】，使其浓度达到 10^6 cfu/mL 以上，在 4℃冷藏保存即得到含有植物乳杆菌 BDLP0001 的乳酸菌奶饮料。

应用实施例 3 含有植物乳杆菌 BDLP0001 的发酵酸乳

将原料乳鲜奶在 95℃加热灭菌 20 min 后，再冷却至 37℃，以 3-5%（v/v）的量加入应用实施例 1 所得的植物乳杆菌 BDLP0001 工作发酵剂【工作发酵剂（1）或者（2）】，以及加入可共生的制备发酵酸乳的商业发酵剂保加利亚乳杆菌，该混菌在 37℃发酵至滴定酸度为 0.6（以乳酸计），冷藏至 4℃并冷藏保存即得到含有植物乳杆菌 BDLP0001 的发酵酸乳。

应理解，在阅读了本发明的上述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

1、一株产胞外多糖的植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)，其特征在于，其保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号 CGMCC No.5222。

2、一种如权利要求 1 所述的植物乳杆菌的工作发酵剂，其特征在于，由包括以下步骤（a）或（b）的方法制备而得：

（a）将如权利要求 1 所述的植物乳杆菌菌种接种于添加乳清蛋白的灭菌乳中培养至凝乳，连续培养活化两代作为母发酵剂；将母发酵剂按 3-5%（v/v）接种于添加乳清蛋白的灭菌乳中培养至凝乳，即得工作发酵剂；

（b）将如权利要求 1 所述的植物乳杆菌菌种接种于液体培养基中连续活化两代，然后将活化培养物按 2-4%（v/v）接种于液体培养基中培养 16-18 h，固液分离得到细胞沉淀，将沉淀用无菌乳悬浮，即得工作发酵剂。

3、如权利要求 2 所述的植物乳杆菌的工作发酵剂，其特征在于，所述的工作发酵剂中活菌数为 10^9 cfu/mL 以上。

4、植物乳杆菌 CGMCC No.5222 在发酵食品中的用途。

5、根据权利要求 4 所述的用途，其特征在于，所述的发酵食品是乳酸菌奶饮料或者发酵乳。

6、根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的乳酸菌奶饮料是按照下述步骤制备的：原料乳灭菌后冷却然后加入如权利要求 2 所述的植物乳杆菌的工作发酵剂混合均匀，使所述的植物乳杆菌浓度达到 10^6 cfu/mL 以上，即得到含有所述植物乳杆菌的乳酸菌奶饮料。

7、根据权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的发酵乳是按照下述步骤制备的：原料乳灭菌后冷却然后加入 3-5%（V/V）如权利要求 2 所述的植物乳杆菌的工作发酵剂和 3-5%（V/V）可共生的发酵乳商品发酵剂，混

匀后发酵至滴定酸度以乳酸计 0.6-0.7，即得到含有所述植物乳杆菌的发酵乳。

8、从权利要求 1 所述的植物乳杆菌中提取的胞外多糖。

9、如权利要求 8 所述的胞外多糖，其特征在于，所述的提取的方法包括：将权利要求 1 所述的植物乳杆菌的发酵液煮沸后离心以除去菌体和凝结蛋白，上清液用三氯乙酸法沉淀除去蛋白，然后用醇沉淀，沉淀溶解于水后再用水透析。

10、如权利要求8或9所述的胞外多糖在增强免疫药物、保健品或食品中的用途。