

食窦魏斯氏菌 SJ-02 产胞外多糖发酵工艺优化

Optimization of fermentation process for exopolysaccharides production of *Weissella cibaria* SJ-02

陈媛¹ 贾斯斯¹ 胡露¹ 王博洋¹ 刘书亮^{1,2}

CHEN Yuan¹ JIA Si-si¹ HU Lu¹ WANG Bo-yang¹ LIU Shu-liang^{1,2}

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学食品加工与安全研究所, 四川 雅安 625014)

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2. Institute of Food Processing and Safety, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要:采用响应面法对影响食窦魏斯氏菌 SJ-02 (*Weissella cibaria* SJ-02) 产胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS) 的发酵培养基组分和发酵条件进行优化。以 EPS 产量为指标, 首先探究培养基中碳源、氮源对 EPS 产量的影响, 结果表明, 以 MRS 为基础培养基, 维持 2% 葡萄糖不变、用 1.5% 大豆蛋白胨替代蛋白胨, 可增加菌株 SJ-02 的 EPS 产量; 在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 中心组合试验设计对影响 EPS 产量的因素进行优化, 获得菌株 SJ-02 产 EPS 的最适发酵条件: 接种量 3.00%、培养时间 34 h、培养温度 37 ℃, 在此条件下理论预测 EPS 产量为 335.03 mg/L, 验证实验测得 EPS 产量为 331.47 mg/L, 比未优化前提高了 17%。

关键词:食窦魏斯氏菌; 胞外多糖; 发酵

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the components of fermentation medium and the fermentation conditions affecting the exopolysaccharides (EPS) production of *Weissella cibaria* SJ-02. Taking EPS production as an index, the effects of carbon sources and nitrogen sources in the medium on the yield of exopolysaccharides were explored. The results showed that using MRS as basal medium, keeping its 2% glucose and replacing peptone with 1.5% soy peptone increased the EPS production of strain SJ-02. The Box-Behnken central combination design was used to study the effects of exopolysaccharides production. The optimal fermentation conditions were as follows: inoculation amount 3.00%, fermentation time 34 h, fermentation temperature 37 ℃. Under these conditions, the theoretical prediction of EPS production is 335.03 mg/L, and the production of EPS by verification test is 331.47 mg/L, which is 17% higher than before.

基金项目:四川省农业科技成果转化资金项目(编号:14NZ0012); 四川农业大学双支计划项目(编号:03572188)

作者简介:陈媛, 女, 四川农业大学在读本科生。

通信作者:刘书亮(1968—), 男, 四川农业大学教授, 博士。

E-mail: lsliang999@163.com

收稿日期:2018-02-04

Keywords: *weissella cibaria*; exopolysaccharides; fermentation

乳酸菌胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS) 是乳酸菌生长代谢过程中分泌于细胞壁外常渗到培养基的一类多糖类化合物, 包括荚膜多糖与黏液多糖, 是乳酸菌的次级代谢产物^[1]。胞外多糖具有抗肿瘤、降低血清胆固醇、优化肠道微生态系统等生理功能^[2]。此外, EPS 能改善食品的黏稠度、质构及口感, 可作为天然增稠剂; 同时, 产 EPS 乳酸菌亦可直接作为益生菌菌种增加酸奶的凝固特性和赋予其保健功能^{[2-3][4] 7-10}。常见的产胞外多糖乳酸菌有 *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* 等^[5]。

由于乳酸菌产胞外多糖量低, 培养中 EPS 可发生降解, 限制了它的应用^[6]。影响乳酸菌产胞外多糖的因素包括菌株的遗传特性、培养基的组分及菌株生长环境^[7-8], 因此, 优化发酵条件对提高胞外多糖产量尤为重要。大量研究^[8-10]表明, 碳、氮源, 培养温度, 培养时间等是影响乳酸菌 EPS 产量的主要因素。本实验室在前期试验中筛得一株源于传统四川泡菜的具有产胞外多糖能力的食窦魏斯氏菌 SJ-02 (*Weissella cibaria* SJ-02) (目前关于魏斯氏菌产胞外多糖的报道鲜见, 且还未发现探究其发酵条件的研究), 拟对其产胞外多糖发酵条件进行优化, 旨在提高 EPS 产量, 为菌株发酵生产胞外多糖提供一定的数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

菌种: 食窦魏斯氏菌 SJ-02 (*Weissella cibaria* SJ-02), 分离于四川传统泡制的泡生姜盐水, 由四川农业大学食品微生物实验室保存;

透析袋: 选用 MD 34 mm, 截留量 8 000~14 000 Da, 上海源叶生物科技有限公司;

MRS 液体及固体培养基: 参考冯美琴等^[9]的方法;

苯酚、硫酸、三氯乙酸(TCA)等:分析纯,万科化学试剂公司。

1.1.2 主要仪器设备

立式自动电热压力蒸汽灭菌锅:LDZX-40AⅠ型,上海三申医疗核子仪器厂;

冷冻离心机:Sorvall ST 16R型,美国科俊仪器有限公司;

紫外-可见分光光度计:Carry60型,安捷伦科技有限公司;

精密电子天平:TE412-L型,德国Sartorius公司;

超纯水系统:Milli-Q Gradient型,美国Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备 将保藏于-80℃的食窦魏斯氏菌 SJ-02 甘油管进行 MRS 平板划线,37℃活化 24 h,挑取单菌落至 MRS 液体培养基中培养 24 h,按 2.0%接种量接种到 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h 制得种子液。

1.2.2 EPS 含量测定 采用苯酚-硫酸法^[11],以葡萄糖为标准品制作标准曲线。

1.2.3 碳、氮源对食窦魏斯氏菌 SJ-02 产 EPS 的影响

(1) 碳源对 EPS 产量的影响:以 MRS 培养基为基础培养基,其中的葡萄糖用等质量的果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖替换,接入 2%的种子液,37℃培养 24 h,测定培养液中 EPS 含量。

(2) 葡萄糖质量浓度对 EPS 产量的影响:以 MRS 培养基为基础培养基,葡萄糖浓度梯度设置为 1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%,接入 2%的种子液,37℃培养 24 h,测定培养液中 EPS 含量。

(3) 氮源对 EPS 产量的影响:以 MRS 培养基为基础培养基,其中的蛋白胨用等质量的大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酪蛋白胨替换,接入 2%的种子液,37℃培养 24 h,测定培养液中 EPS 含量。

(4) 大豆蛋白胨质量浓度对 EPS 产量的影响:以 MRS 培养基为基础培养基,大豆蛋白胨浓度梯度设置为 0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,接入 2%的种子液,37℃培养 24 h,测定培养液中 EPS 的含量。

1.2.4 食窦魏斯氏菌 SJ-02 产 EPS 发酵条件的优化

(1) 菌株 SJ-02 接种量对 EPS 产量的影响:以优化组分的 MRS 培养基为基础培养基,分别以 1%,2%,3%,4%,5%的接种量接入培养基中,37℃培养 24 h,测定培养液中 EPS 含量。

(2) 培养时间对 EPS 产量的影响:以优化组分的 MRS 培养基为基础培养基,按最优接种量接入培养基中,37℃分别培养 12,24,36,48,60 h,测定培养液中 EPS 含量。

(3) 培养温度对 EPS 产量的影响:以优化组分的 MRS 培养基为基础培养基,按最优接种量接入培养基中,分别于 22,27,32,37,42℃培养 24 h,测定培养液中 EPS 含量。

(4) 食窦魏斯氏菌 SJ-02 产 EPS 发酵条件的响应面试验:在单因素试验结果的基础上,选取菌株 SJ-02 接种量、培养时间和培养温度为影响因素,以 EPS 产量为响应值,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,进行三因素三水平响应面

试验设计,每组重复 3 次。

1.2.5 数据处理 运用 Design Expert 8.05 软件处理数据,并作显著性分析。

2 结果与分析

2.1 食窦魏斯氏菌 SJ-02 产 EPS 的最优培养基组分

2.1.1 最适碳源及其最适质量浓度 碳源对胞外多糖产量影响大,可为乳酸菌生长提供能量和营养物质。碳源的种类不仅会影响乳酸菌胞外多糖的产量,而且其相对分子质量大小也可能产生影响^[12]。本试验在 MRS 培养基中分别加入乳酸菌生长常用碳源,接种培养 24 h 后,培养液 EPS 产量见图 1。从图 1 中可以看出,葡萄糖作为碳源时,EPS 产量最高(310.1 mg/L),蔗糖次之(296.3 mg/L),而以麦芽糖作为碳源时 EPS 产量最低(188.9 mg/L),因此选择葡萄糖作为食窦魏斯氏菌 SJ-02 产胞外多糖的最适碳源。顾笑梅等^[13]、刘燕^{[4]17-19}分别比较了含有不同糖类的培养基对菌株 Z₂₂₂、德氏乳杆菌保加利亚亚种 G1 产 EPS 的影响,都是以葡萄糖为碳源时 EPS 产量最高,与本试验结果一致。

由图 2 可知,葡萄糖质量浓度为 2%时菌株 SJ-02 的 EPS 产量最高,为 310.3 mg/L。有报道^[14]也证明乳酸菌以 1.5%~2.0%葡萄糖为碳源时可得到最高产量的胞外多糖,当葡萄糖质量浓度超过 2.5%后 EPS 产量显著下降,可能是

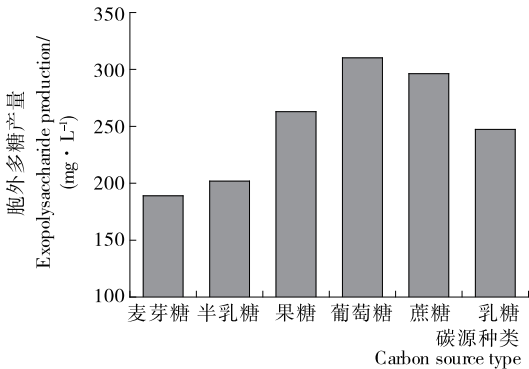


图1 碳源对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响
Figure 1 Effect of carbon source on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

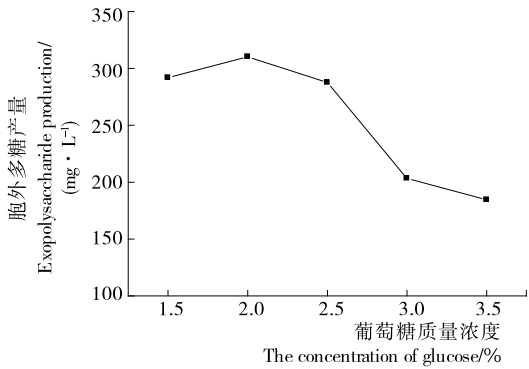


图2 葡萄糖质量浓度对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响

Figure 2 Effect of the concentration of glucose on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

较高葡萄糖质量浓度产生了一定的渗透压,不利于魏斯氏菌 SJ-02 在生长代谢过程中分泌胞外多糖,因此以质量浓度 2% 为葡萄糖最适添加量。Grobben 等^[15] 研究指出 *L. dezbrueckii* subsp. *Bulgaricus* NCFB2772 以葡萄糖为碳源时, EPS 产量比以果糖为碳源时提高 2 倍,本试验碳源选择结果与之一致。

2.1.2 最适氮源及其最适质量浓度 氮源是添加到培养基中给予微生物生命活动提供所需氮元素的营养物质,主要用于合成微生物细胞的结构成分,分为无机氮源和有机氮源 2 种^[16]。同碳源一样,氮源也是乳酸菌产胞外多糖的影响因素之一。有机氮源含有丰富的蛋白质、氨基酸和维生素等,因此本研究以大豆蛋白胨、普通蛋白胨、酪蛋白胨和胰蛋白胨作为食窦魏斯氏菌 SJ-02 生长所需氮源探讨胞外多糖产量的变化。由图 3 可知,大豆蛋白胨有利于胞外多糖的合成,产量达到 315.8 mg/L,普通蛋白胨次之(304.1 mg/L),而以胰蛋白胨作为氮源时胞外多糖的产量最低(276.8 mg/L),较以大豆蛋白胨为氮源时降低了 12.3%,因此选择大豆蛋白胨为魏斯氏菌 SJ-02 产胞外多糖的最适氮源。

由图 4 可知,大豆蛋白胨质量浓度为 0.5%~1.5% 时,随其质量浓度的增加,胞外多糖产量也逐步上升,当大豆蛋白胨质量浓度为 1.5% 时,胞外多糖产量达到最高(323.9 mg/L),大豆蛋白胨质量浓度为 2.0% 时胞外多糖产量与之无显著性

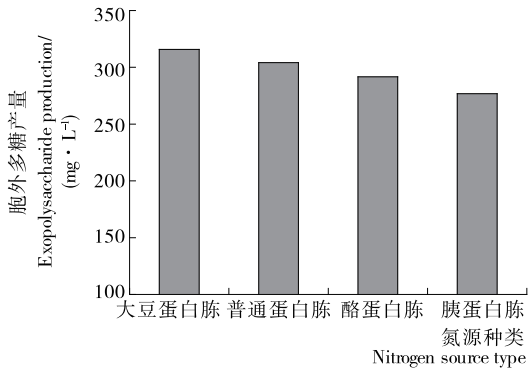


图 3 氮源对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响
Figure 3 Effect of nitrogen source on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

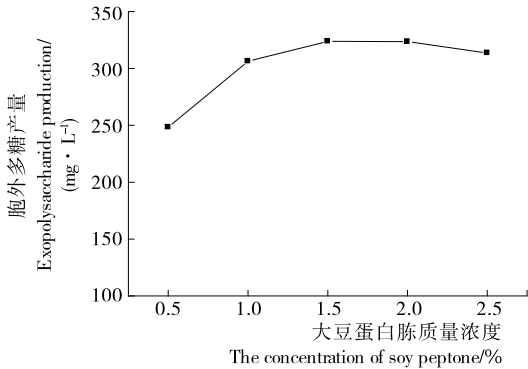


图 4 大豆蛋白胨质量浓度对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响
Figure 4 Effect of the concentration of soy peptone on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

差异,质量浓度继续升高至 2.5%,胞外多糖的产量反而降低,因此以大豆蛋白胨浓度 1.5% 为最适氮源质量浓度。崔景丽等^[17] 通过对内蒙古传统发酵酸马奶中分离出的 *L. casei* Zhang 进行胞外多糖合成条件的研究,当以酪蛋白胨替换普通蛋白胨为氮源时,其胞外多糖含量由 84.17 mg/L 提高至 107.58 mg/L。陶静等^[18] 通过正交试验得到乳酸乳球菌乳亚种 LL9 在选用乳糖作为碳源,大豆蛋白胨作为氮源,菌株在最佳培养条件下 EPS 产量可达到 262.628 mg/L。

2.2 食窦魏斯氏菌 SJ-02 产胞外多糖最优发酵条件

2.2.1 接种量对食窦魏斯氏菌 SJ-02 胞外多糖产量的影响

适接种量是乳酸菌生长与代谢产物积累的前提,接种量多少可影响培养液的初始菌量,进而影响菌体在生长过程中代谢产物的产量。如图 5 所示,当接种量由 1% 逐渐升至 3% 时,胞外多糖的产量显著增加,在接种量为 3% 时最高,可达 324.7 mg/L,而当接种量继续增加,胞外多糖产量逐渐下降,这是因为随着接种量的增加,菌种量逐渐增多其代谢产物也相应增加,当接种量过高时,培养基中有限的能量及营养物质不能满足菌体细胞正常的生长代谢,致使其代谢产物也相应减少。因此以 3.0% 种子液为菌种的适宜接种量。

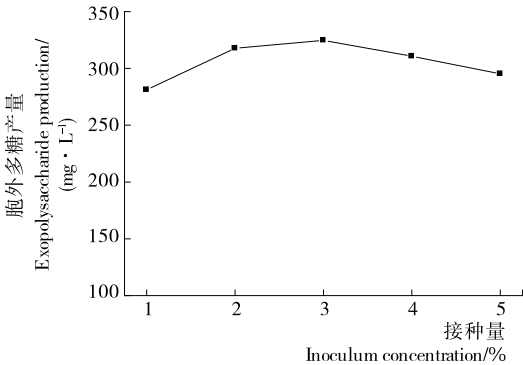


图 5 接种量对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响
Figure 5 Effect of inoculum concentration on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

2.2.2 培养时间对魏斯氏菌 SJ-02 胞外多糖产量的影响

由图 6 可知,不同的培养时间对胞外多糖的产量有影响。在培养前期胞外多糖产量较低,说明在菌株 SJ-02 对数生长期,由于培养基中营养物质充足,有利于菌体的生长繁殖但不利于 EPS 的积累。当培养至 36 h 时, EPS 产量为 313.7 mg/L(最大值),这时菌株 SJ-02 正好处于生长稳定期的后期,一般 EPS 产生于菌体的对数生长末期和稳定期,因此延长培养时间有利于 EPS 的积累^[6]。而进一步延长培养时间,菌体会分泌能够降解多糖的酶而使胞外多糖产量开始呈下降趋势^[19],在培养 60 h 时胞外多糖产量仅为 278 mg/L,比最大产量减少了 11%。故确定魏斯氏菌 SJ-02 合成胞外多糖的适宜培养时间为 36 h。

2.2.3 培养温度对食窦魏斯氏菌 SJ-02 胞外多糖产量的影响 培养温度不同,乳酸菌菌株的生长速度及其合成 EPS 的产量也有明显的区别^[10,20]。不同培养温度对胞外多糖产量的影响见图 7。当温度为 22 ℃ 时,由于培养温度较低,菌体生长繁殖缓慢,菌体细胞浓度不高,使合成 EPS 的类异戊

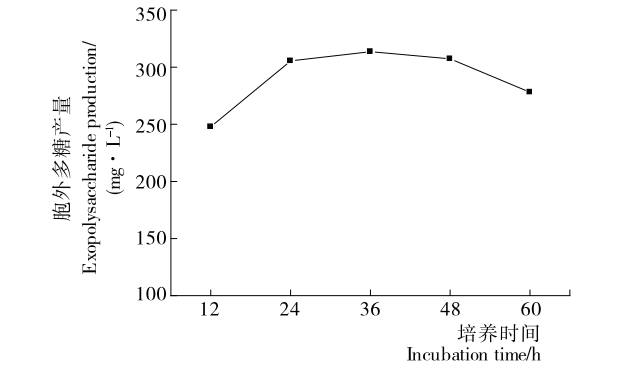


图 6 培养时间对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响

Figure 6 Effect of incubation time on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

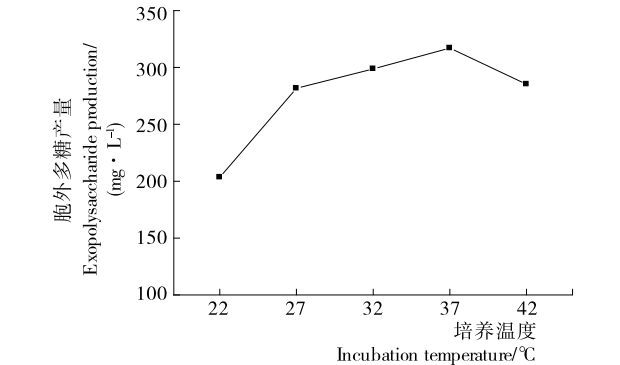


图 7 培养温度对 *Weissella cibaria* SJ-02 EPS 产量的影响

Figure 7 Effect of incubation temperature on EPS production by *Weissella cibaria* SJ-02

二烯脂质载体发生钝化作用,使胞外多糖合成产量较低^[20],仅为203.5 mg/L;随着培养温度的升高,胞外多糖产量也随之增大,培养温度为 37 ℃ 时胞外多糖产量达到峰值(317.1 mg/L),可能是魏斯氏菌的最适生长温度为 37 ℃ 左右,此时菌株生长旺盛,繁殖积累了较多的菌体,使 EPS 合成量也相应增加;当温度继续升高至 42 ℃ 时,过高的温度使菌体细胞生长和细胞壁的合成过快,不利于胞外多糖的产生,胞外多糖产量较之前明显下降^[21]。因此,选择 37 ℃ 为魏斯氏菌 SJ-02 合成胞外多糖的适宜培养温度。Bengoa 等^[10]研究认为,副干酪乳杆菌菌株(*L. paracasei* strains CIDCA 83124、CIDCA 83123、CIDCA 8339)在较低培养温度下有利于合成 EPS,其中菌株 CIDCA 8339 在 20、30 ℃ 培养比 37 ℃ 培养增加了约 1 倍 EPS 产量,菌株 CIDCA83124 在 20、30、37 ℃ 培养下,EPS 的产量分别为 1 170,527,373 μg/1×10⁸ CFU,而菌株 CIDCA 83123 在不同温度下 EPS 产量约有差异,而且不同培养温度影响 EPS 相对分子质量大小。这些研究结果表明了不同种类及菌株乳酸菌合成 EPS 的培养温度不同,进而说明菌株 EPS 发酵条件优化的意义。

2.2.4 响应面试验结果与分析

(1) Box-Behnken 试验设计和响应面分析:Box-Behnken 试验设计见表 1,响应面试验设计及结果见表 2。

对表 2 中魏斯氏菌 SJ-02 胞外多糖产量的试验数据进行多元回归拟合,获得胞外多糖产量对接种量、培养时间和培

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平表			
Table 1 Factor and level of Box-Behnken design			
水平	A 接种量/%	B 培养时间/h	C 培养温度/℃
−1	1	12	32
0	2	24	37
1	3	36	42

表 2 菌株 SJ-02 产 EPS 的响应面试验设计及结果

Table 2 Experiment design and result of RSA of EPS-producing by strain SJ-02

序号	A	B	C	Y EPS 产量/(mg·L ⁻¹)
1	0	0	0	314.4
2	0	1	1	291.9
3	1	1	0	330.1
4	−1	1	0	280.2
5	0	0	0	309.1
6	−1	0	1	256.8
7	0	−1	−1	246.2
8	0	−1	1	241.1
9	−1	−1	0	246.1
10	1	0	−1	301.8
11	1	−1	0	257.9
12	−1	0	−1	270.3
13	1	0	1	311.9
14	0	1	−1	308.9
15	0	0	0	311.1

养温度的二次多项回归方程:

$$Y = 311.53 + 18.54A + 27.50B - 3.21C + 9.52AB + 5.90AC - 3.03BC - 9.92A^2 - 23.04B^2 - 16.42C^2。$$
 (1)

对该模型方程进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,本试验所选用的二次多项模型具有显著性,失拟项不显著,其相关系数为 0.967 9,说明 EPS 产量的实测值与预测值之间具有较好的拟合度,此方法能够较好地模拟出各因素对胞外多糖产量的影响情况。

方程一次项中 A 和 B 因素均极显著($P < 0.01$),C 因素不显著($P > 0.05$),但二次项因素均显著,具有显著的曲面关系。AB 对响应值的影响显著($P < 0.05$),表明 A 和 B 之间的交互作用显著影响了 EPS 含量,C 和 A 及 B 之间的交互作用影响不显著($P > 0.05$)。因此,3 个因素之间并非简单线性关系,而存在交互作用。各因素按影响大小依次排序为培养时间>接种量>培养温度。

(2) 各因素交互作用对 EPS 含量的响应面分析:各因素交互作用的响应面图和等高线图见图 8~10。根据响应曲面和等高线变化看出,培养时间略显著于接种量,二者之间协同作用对 SJ-02 产 EPS 影响较大(图 8);接种量比培养温度对 SJ-02 产 EPS 的影响更为显著,二者之间的交互作用较弱(图 9);培养时间比培养温度对 SJ-02 产 EPS 的影响更为显著,二者之间的交互作用较弱,但这二者强于接种量与培养

温度的交互作用(图 9)。上述表明,3 个因素对菌株 SJ-02 的 EPS 产量的影响因素显著性顺序为:培养时间>接种量>培养温度,与方差分析结果一致。

通过比较图 8~10 可知,3 个因素在取值内均能产生最

佳响应值,说明取值选择合理。由 Design-Expert 8.05 软件对试验参数进一步优化,得出的产胞外多糖的最优条件为:接种量 3.00%,培养时间 33.63 h,培养温度37.04 ℃,可获得胞外多糖产量为335.03 mg/L。考虑到实际可操作性,将优

表 3 回归方程方差分析[†]
Table 3 Analysis of variance for regression model

方差来源	自由度	偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	Pr>F	显著性
A	1	2 749.11	2 749.11	95.91	0.000 2	* *
B	1	6 050.00	6 050.00	211.06	<0.000 1	* *
C	1	82.56	82.56	2.88	0.150 4	
AB	1	362.90	362.90	12.66	0.016 2	*
AC	1	139.24	139.24	4.86	0.078 7	
BC	1	36.60	36.60	1.28	0.309 7	
A ²	1	363.10	363.10	12.67	0.016 2	*
B ²	1	1 960.31	1 960.31	68.39	0.000 4	* *
C ²	1	995.10	995.10	34.72	0.002 0	* *
回归模型	9	12 365.38	1 373.93	47.93	0.000 3	* *
误差项	5	143.32	28.66			
失拟项	3	129.00	43.00	6.00	0.146 1	
纯误差	2	14.33	7.16			
所有项	14	12 508.70				

[†] “* *”表示差异极显著(P<0.01);“*”表示差异显著(P<0.05)。

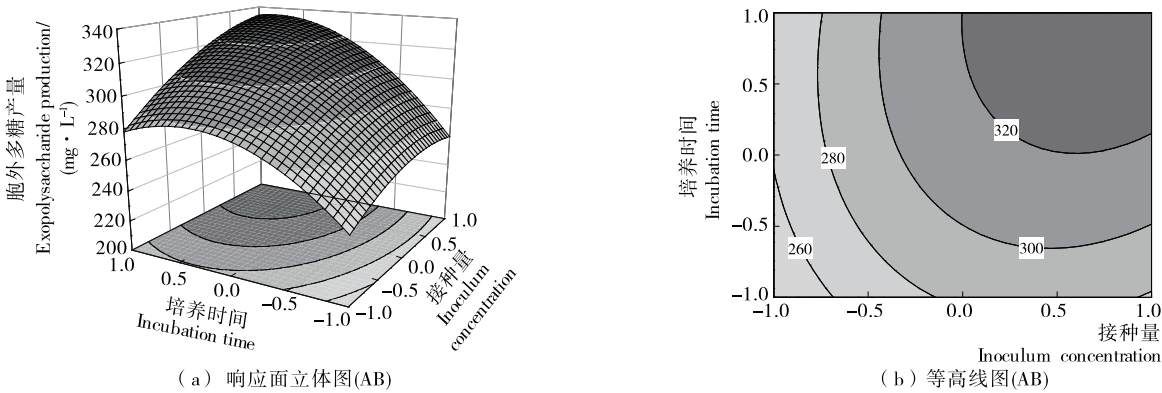


图 8 接种量和培养时间的响应面立体图和等高线图
Figure 8 Inoculum concentration and incubation time contour line graph and cubic graph of response surface

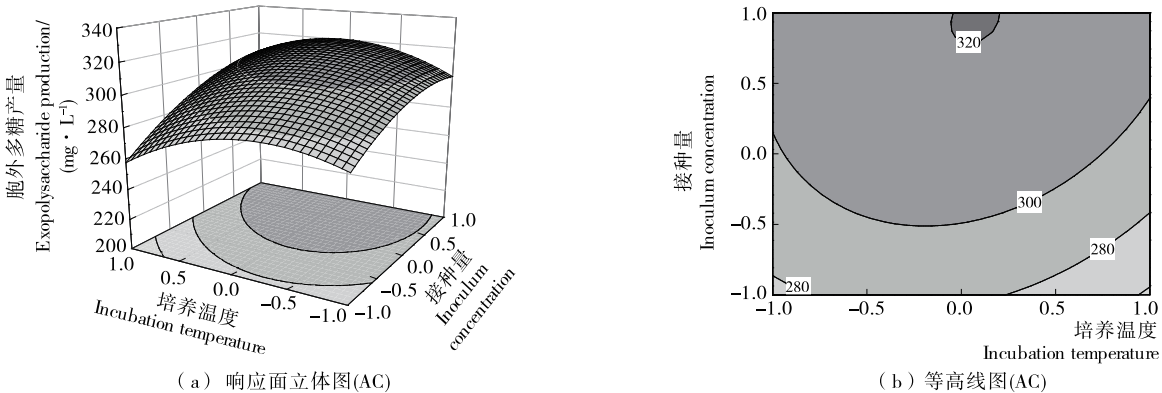


图 9 接种量和培养温度的响应面立体图和等高线图
Figure 9 Inoculum concentration and incubation temperature contour line graph and cubic graph of response surface

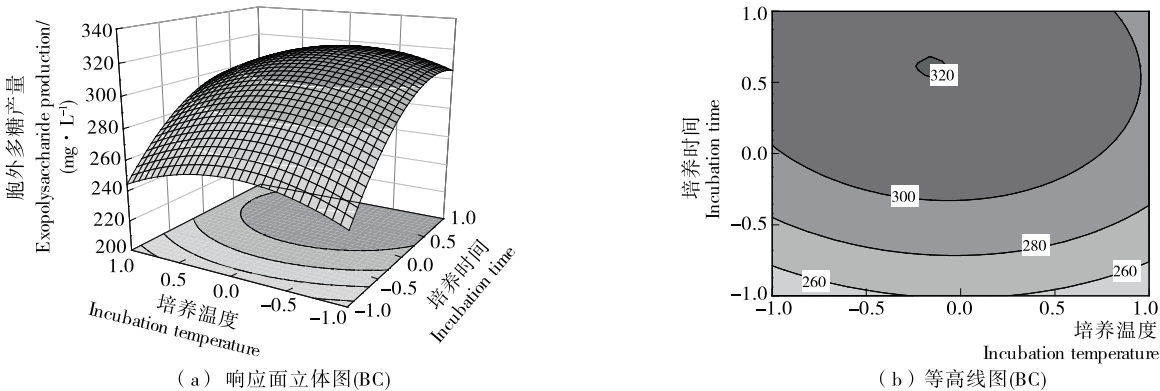


图 10 培养时间和培养温度的响应面立体图和等高线图

Figure 10 Incubation time and incubation temperature contour line graph and cubic graph of response surface

化参数调整为:接种量 3.00%,培养时间 34 h,培养温度 37 ℃。为检验响应面分析法的可靠性,采用所得优化参数进行食蜜魏斯氏菌 SJ-02 发酵实验,经 3 次平行实验,得菌株 SJ-02 胞外多糖产量平均值为 331.47 mg/L,与理论预测值的相对误差为 1.19%,说明本试验优化获得的发酵条件结果正确,具有实践意义。

3 结论

本试验以 MRS 为基础培养基,通过碳、氮源种类及其添加水平的优化,维持葡萄糖 2%添加量不变、可用 1.5%的大豆蛋白胨替代其中的普通蛋白胨,通过 Box-Behnken 设计对发酵条件进行优化,得出最优发酵条件为接种量 3.00%、培养时间 34 h、培养温度 37 ℃。此条件下食蜜魏斯氏菌 SJ-02 的 EPS 理论值为 335.03 mg/L,经过验证魏斯氏菌 SJ-02 在此条件下 EPS 产量为 331.47 mg/L,与理论预测值相对误差仅为 1.19%,比优化前提高了 17%。

参考文献

[1] 张丽, 张兰威, 韩雪. 乳酸菌胞外多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(17): 378-381.

[2] KODALI V P, SEN R. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium[J]. Biotechnology Journal, 2008, 3(2): 245-251.

[3] 孙海红. 三株海洋微生物中胞外多糖的分离, 结构和抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 16-20.

[4] 刘燕. 高产胞外多糖乳酸菌的筛选及培养基优化方法的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

[5] BADEL S, BERNARDI T, MICHAUD P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides [J]. Biotechnology advances, 2011, 29(1): 54-66.

[6] 陈亚, 梁琪, 杨敏, 等. 响应面法优化嗜热链球菌产胞外多糖的发酵条件[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 195-201.

[7] HAJ-MUSTAFA M, ABDI R, SHEIKH-ZEINODDIN M, et al. 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.

[8] SENGUPTA D, DATTA S, BISWAS D. Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2018, 102(2): 1-12.

[9] 冯美琴, 邢家深, 张琦, 等. 植物乳杆菌胞外多糖发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 215-219.

[10] BENGGA A A, LLAMAS M G, IRAPORDA C, et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains[J]. Food Microbiology, 2018 (69): 212-218.

[11] 覃倩倩. 嗜热链球菌 05-34 胞外多糖的结构分析及其在酸乳中的原位应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2012: 17-23.

[12] 马世敏. 副干酪乳杆菌胞外多糖的合成条件优化、特性分析及在酸乳中的应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2011: 16-22.

[13] 顾笑梅, 孔健, 王富生, 等. 一株乳酸菌所产胞外多糖对荷瘤小鼠机体免疫功能影响的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 251-256.

[14] 唐血梅, 李海英, 赵芳, 等. 新疆骏马奶中高产胞外多糖乳酸菌筛选鉴定及培养条件优化研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(8): 1 540-1 545.

[15] GROBBEN G J, SIKKE M A, SMITH M R, et al. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* NCFB2772 grown in a chemically defined medium[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 79: 103-107.

[16] 胡盼盼, 宋微, 单娟娟, 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.

[17] 崔景丽, 张磊, 高鹏飞, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 固态发酵条件的优化[J]. 工业微生物, 2009, 39(1): 28-31.

[18] 陶静, 许赛信, 孟德俊, 等. 乳酸菌发酵生产胞外多糖条件优化研究[J]. 食品工业, 2017(1): 28-31.

[19] GÓRSKA-FRACZEK S, SANDSTRÖM C, KENNE L, et al. Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a non-asaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(18): 2 926-2 932.

[20] 王辑, 田政, 赵笑, 等. 藏灵菇发酵产胞外多糖的影响因素及其应用研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(18): 203-208.

[21] 艾连中, 张灏, 陈卫, 等. 干酪乳杆菌 LC2W 胞外多糖的分离纯化及性质研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 9-11.