



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114085875 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 202111324791.X

(22) 申请日 2021.11.10

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114085875 A

(43) 申请公布日 2022.02.25

(73) 专利权人 四川大学  
地址 610000 四川省成都市武侯区一环路  
南一段24号

(72) 发明人 吴重德 张敏 陈鸿 金垚 黄钧  
周荣清

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务  
所(特殊普通合伙) 11463  
专利代理师 张金铭

(51) Int. Cl.  
C12P 19/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106222103 A, 2016.12.14

CN 109475170 A, 2019.03.15

CN 111363693 A, 2020.07.03

审查员 郝攀

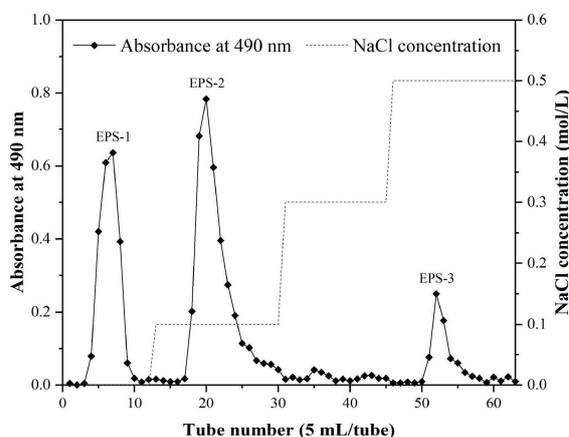
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种胞外多糖、制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种胞外多糖、制备方法及其应用,涉及微生物技术领域,所述胞外多糖由嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)发酵产生,所述嗜盐四联球菌保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为CGMCC No.3792。本发明的胞外多糖含有三种不同的组分,不仅具有抗氧化活性,而且对其他菌种具有促生长活性和低温保护活性,适合推广应用。



1. 一种胞外多糖,其特征在于,所述胞外多糖由嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)发酵产生,所述嗜盐四联球菌保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为CGMCC No. 3792;

所述胞外多糖的制备方法包括在发酵培养基中培养所述嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*),从发酵液中获得所述胞外多糖;

所述培养包括在30~35℃下静置培养50~60 h;

所述胞外多糖的制备方法还包括所述胞外多糖的提取和纯化步骤;

所述胞外多糖的提取包括将所述发酵液离心后取上清液,加入三氯乙酸去除蛋白,再次离心取上清液经醇沉淀后,重溶、透析和冷冻干燥;所述胞外多糖的纯化包括将提取到的胞外多糖用溶剂溶解后,经DEAE-Sephadex Fast Flow阴离子交换色谱柱分级、Sephadex G-100凝胶层析柱分离后收集胞外多糖组分。

2. 根据权利要求1所述的胞外多糖,其特征在于,所述胞外多糖包括三种不同的组分:EPS-1、EPS-2和EPS-3。

3. 根据权利要求2所述的胞外多糖,其特征在于,所述EPS-2包含半乳糖、鼠李糖、葡萄糖和甘露糖;其中,所述半乳糖、鼠李糖、葡萄糖和甘露糖的摩尔比为1.00:1.98:6.69:39.68。

4. 权利要求1~3中任一项所述的胞外多糖在促进鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)生长中的应用;

所述鲁氏酵母菌为保藏号CGMCC No.3791的鲁氏酵母菌。

5. 权利要求1~3中任一项所述的胞外多糖在对乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)低温保护方面的应用;

所述乳酸乳球菌为MG1363乳酸菌。

## 一种胞外多糖、制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,尤其是涉及一种胞外多糖、制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 微生物胞外多糖(EPS)因其独特的理化性质和生物活性而受到广泛关注,包括抗氧化、抗菌、抗病毒、抗癌、免疫调节以及重金属吸附活性等。根据存在形式,胞外多糖可分为附着在微生物细胞壁上的荚膜多糖和由微生物分泌到周围环境的粘液多糖。根据单糖组成,胞外多糖又分为同多糖和杂多糖。据报道,胞外多糖可以保护细菌免受不利环境的影响,并有助于细菌定植和形成生物膜。

[0003] 胞外多糖的性质和结构受菌株、培养基成分和培养条件等多种因素的影响。胞外多糖的抗氧化、免疫调节和抗肿瘤等活性主要取决于链长、功能基团、糖苷键构型和取代、单糖组成、分支度和分子量等。

[0004] 嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)是一种中度嗜盐乳酸菌,可在氯化钠浓度高达25%的条件下生长,广泛存在于高盐高糖环境中。嗜盐四联球菌是发酵食品生产中的一种潜在发酵剂,可改善发酵食品风味,抑制生物胺的形成和积累。此外,嗜盐四联球菌具有免疫调节活性、重金属吸附活性和降解黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的能力,对常年性变应性鼻炎有临床疗效。

[0005] 对嗜盐四联球菌产生的胞外多糖(EPS)进行分离纯化,阐明其结构特征,探索其潜在功能活性,为其在工业上的应用奠定理论基础,具有重要意义。

[0006] 有鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种胞外多糖、制备方法及其应用,本发明的胞外多糖含有三种不同的组分,不仅具有抗氧化活性,而且对其他菌种具有促生长活性和低温保护活性。

[0008] 本发明提供的技术方案如下:

[0009] 在一个方面,本发明提供了一种胞外多糖,所述胞外多糖由嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)发酵产生,所述嗜盐四联球菌保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为CGMCC No.3792。所述嗜盐四联球菌从酱油酱醪中分离得到,经生理生化和16S rDNA序列分析鉴定。

[0010] 本发明所涉及的嗜盐四联球菌菌株已经于2010年4月29日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所。该菌株为已公开的菌株,本发明的侧重点在于所述嗜盐四联球菌在生产胞外多糖中的应用以及其所发酵产生的胞外多糖及其制备方法与应用。

[0011] 在一个实施方案中,所述胞外多糖包括三种不同的组分:EPS-1、EPS-2和EPS-3。

[0012] 在一个实施方案中,所述EPS-1的分子量为846KDa,其包含鼠李糖、半乳糖、葡萄

糖、甘露糖和葡萄糖醛酸；其中，所述鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸的摩尔比为1.00:1.47:22.24:10.73:4.37。

[0013] 在一个实施方案中，所述EPS-2的分子量为539KDa，其包含半乳糖、鼠李糖、葡萄糖和甘露糖；其中，所述半乳糖、鼠李糖、葡萄糖和甘露糖的摩尔比为1.00:1.98:6.69:39.68。

[0014] 在一个实施方案中，所述EPS-3的分子量为13.6KDa，其包含葡萄糖、半乳糖、核糖和葡萄糖醛酸；其中，所述葡萄糖、半乳糖、核糖和葡萄糖醛酸的摩尔比为1.00:2.41:7.93:33.89。

[0015] 在另一个方面，本发明保护上述胞外多糖的制备方法，所述方法包括在发酵培养基中培养所述嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)，从发酵液中获得所述胞外多糖。

[0016] 在一个实施方案中，所述培养包括在30~35℃温度下静置培养50~60h。培养的温度可以包括但不限于30、31、32、33、34或35℃；培养的时间包括但不限于50、51、52、53、54、55、56、57、58、59和60h。

[0017] 在一个具体的实施方案中，所述发酵培养基包含以下组分：蛋白胨8~12g、牛肉浸粉7~9g、酵母提取物3~5g、葡萄糖18~22g、山梨醇单油酸酯0.8~1.2mL、磷酸氢二钾1.5~2.5g、三水合乙酸钠4~6g、柠檬酸铵1.5~2.5g、七水合硫酸镁0.1~0.3g、四水合硫酸锰0.03~0.06g、蒸馏水1000mL。

[0018] 在一个优选的实施方案中，所述发酵培养基由以下组分组成：蛋白胨10g、牛肉浸粉8g、酵母提取物4g、葡萄糖20g、山梨醇单油酸酯1mL、磷酸氢二钾2g、三水合乙酸钠5g、柠檬酸铵2g、七水合硫酸镁0.2g、四水合硫酸锰0.05g、蒸馏水1000mL。

[0019] 在一个实施方案中，所述方法还包括所述胞外多糖的提取和纯化步骤。

[0020] 在一个实施方案中，所述胞外多糖的提取包括将所述发酵液离心后取上清液，加入三氯乙酸去除蛋白，再次离心取上清液经醇沉淀后，重溶、透析和冷冻干燥；所述胞外多糖的纯化包括将提取到的胞外多糖用溶剂溶解后，经DEAE-Sephacel阴离子交换色谱柱分级、Sephadex G-100凝胶层析柱分离后收集胞外多糖组分。

[0021] 经胞外多糖的提取步骤获得胞外多糖粗品，加溶液溶解分散，经DEAE-Sephacel离子交换柱分离，再经Sephadex G-100凝胶层析柱分离后收集胞外多糖组分，经检测得到3个分离组分EPS-1、EPS-2和EPS-3，经透析、真空冷冻干燥后，制得纯化的胞外多糖。

[0022] 在一个具体的实施方案中，本发明胞外多糖的制备包括以下步骤：

[0023] (1) 将嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*) CGMCC No.3792进行活化、扩大培养；

[0024] (2) 将步骤(1)制得的扩培液接种至发酵培养基中，30℃静置培养60h，获得含有嗜盐四联球菌胞外多糖的发酵液；

[0025] (3) 将步骤(2)制得的液体发酵液离心，收集上清液；

[0026] (4) 将步骤(3)制得的上清液中加入终浓度为4%的三氯乙酸，室温搅拌半小时，离心，收集上清液；

[0027] (5) 将步骤(4)制得的上清液中加入三倍体积的无水乙醇，经醇沉后，离心，收集沉淀；

- [0028] (6)将步骤(5)制得的沉淀用水溶解,透析,真空冷冻干燥后,制得粗胞外多糖;
- [0029] (7)将步骤(6)制得的粗胞外多糖用水溶解,制得粗胞外多糖溶液;
- [0030] (8)将步骤(7)制得的粗胞外多糖溶液通过DEAE-Sepharose Fast Flow阴离子交换色谱柱获得胞外多糖分级组分,再经过Sephadex G-100凝胶层析柱分离,收集多糖组分;
- [0031] (9)将步骤(8)制得的胞外多糖溶液经透析、真空冷冻干燥后,制得纯化的胞外多糖。
- [0032] 在一个实施方案中,所述方法的胞外多糖产量为450mg/L。
- [0033] 在另一个方面,本发明保护所述胞外多糖在促进鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)生长中的应用;优选地,所述鲁氏酵母菌为保藏号CGMCC No.3791的鲁氏酵母菌;例如可以促进鲁氏酵母菌在不同盐浓度下的生长。
- [0034] 在另一个方面,本发明保护所述胞外多糖在对乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)低温保护方面的应用;优选地,所述乳酸乳球菌为MG1363乳酸菌。本发明的胞外多糖可以保护乳酸乳球菌免受低温损伤。
- [0035] 在另一个方面,本发明保护胞外多糖在促进鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)生长和对乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的低温保护中的应用;优选地,所述鲁氏酵母菌为保藏号CGMCC No.3791的鲁氏酵母菌,所述乳酸乳球菌为MG1363乳酸菌。
- [0036] 在另一个方面,本发明保护所述胞外多糖在制备药品、化妆品或保健品中的应用;本发明的胞外多糖具有清除自由基、抗氧化的作用,例如可用于制备抗氧化剂、DNA保护剂、化妆品添加剂、药品添加剂以及食品添加剂。
- [0037] 有益效果:
- [0038] (1)本发明提供的胞外多糖具有清除DPPH自由基、羟自由基和ABTS<sup>•+</sup>自由基的能力,在抗氧化方面具有重要应用价值;
- [0039] (2)本发明提供的胞外多糖具有促进鲁氏酵母菌在不同盐浓度下生长的能力以及保护乳酸乳球菌免受低温损伤的能力;可用于促进细胞生长、进行细胞低温保护;
- [0040] (3)本发明提供的胞外多糖对细胞无毒害、无损伤;
- [0041] (4)本发明通过特定的嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)进行胞外多糖的生产制备,制备方法简单高效。

## 附图说明

[0042] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0043] 图1为本发明提供的嗜盐四联球菌粗胞外多糖的DEAE-Sepharose Fast Flow阴离子交换色谱柱洗脱图;

[0044] 图2为本发明提供的嗜盐四联球菌胞外多糖组分EPS-2的单糖组成;

[0045] 图3为本发明提供的嗜盐四联球菌胞外多糖组分EPS-2的红外光谱图;

[0046] 图4为本发明提供的嗜盐四联球菌胞外多糖组分EPS-2以抗坏血酸为阳性对照的抗氧化活性;其中,a为DPPH自由基清除活性;b为羟自由基清除活性;c为ABTS<sup>•+</sup>自由基清除

活性；

[0047] 图5为本发明提供的嗜盐四联球菌胞外多糖对鲁氏酵母菌生长的促进作用(a-c)和对乳酸乳球菌的低温保护活性(d)。

### 具体实施方式

[0048] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0049] 实施例1.本发明嗜盐四联球菌胞外多糖的制备

[0050] (1)将嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)CGMCC No.3792进行活化、扩大培养；

[0051] (2)将步骤(1)制得的扩培液以5%的接种量接种至发酵培养基中,30℃静置培养60h,获得含有嗜盐四联球菌胞外多糖的发酵液；

[0052] 发酵培养基由以下组分组成:蛋白胨10g、牛肉浸粉8g、酵母提取物4g、葡萄糖20g、山梨醇单油酸酯1mL、磷酸氢二钾2g、三水合乙酸钠5g、柠檬酸铵2g、七水合硫酸镁0.2g、四水合硫酸锰0.05g、蒸馏水1000mL；

[0053] (3)将步骤(2)制得的液体发酵液离心,收集上清液；

[0054] (4)将步骤(3)制得的上清液中加入终浓度为3-8%的三氯乙酸,室温搅拌半小时,离心,收集上清液；

[0055] (5)将步骤(4)制得的上清液中加入三倍体积的无水乙醇,经醇沉后,离心,收集沉淀；

[0056] (6)将步骤(5)制得的沉淀用水溶解,透析,真空冷冻干燥后,制得粗胞外多糖；

[0057] (7)将步骤(6)制得的粗胞外多糖用水溶解,制得粗胞外多糖溶液；

[0058] (8)将步骤(7)制得的粗胞外多糖溶液通过DEAE-Sephacel阴离子交换色谱柱获得胞外多糖分级组分,再经过Sephadex G-100凝胶层析柱分离,收集多糖组分；

[0059] (9)将步骤(8)制得的胞外多糖溶液经透析、真空冷冻干燥后,制得纯化的胞外多糖。

[0060] 图1为本发明嗜盐四联球菌粗胞外多糖的DEAE-Sephacel阴离子交换色谱柱洗脱图。

[0061] 实施例2.本发明嗜盐四联球菌胞外多糖的鉴定和性能测定

[0062] 如图1所示,EPS-1和EPS-3含量相对较低,EPS-2含量最高,因此后续测定和研究以EPS-2作为侧重点。

[0063] 2.1分子量测定

[0064] 具体步骤如下：

[0065] (1)取10mg实施例1得到的EPS-2,加1mL硝酸钠(0.1M)溶解,离心(12 000g,4℃,10min),收集上清液；

[0066] (2)将步骤(1)制得的上清液(100μL)注入凝胶排阻色谱柱(Ohpak SB-805 HQ(300×8mm),Ohpak SB-804 HQ(300×8mm),Ohpak SB-803 HQ(300×8mm)),用硝酸钠溶液

(0.1M)以0.4mL/min流速进行洗脱,柱温45℃,得到响应值数据;

[0067] (3)将得到的数据收集和处理,根据马克·霍温克方程(Mark-Houwink Equation)计算分子量。

[0068] 测定结果为:组分EPS-2的平均分子量为539KDa。

[0069] 2.2单糖的组成测定

[0070] 具体步骤如下:

[0071] (1)将5mg实施例1得到的EPS-2用三氟乙酸(TFA)在121℃水解2小时;

[0072] (2)通入氮气,吹干,加入甲醇清洗,再吹干,重复甲醇清洗2-3次;

[0073] (3)加入无菌水溶解,转入色谱瓶中待测;

[0074] (4)以标准岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸作为对比,通过高效阴离子交换色谱(HPAEC)连同脉冲安培检测器和Dionex™CarboPac™PA10(250mm×4.0mm,10μm)液相色谱柱测定水解产物的单糖组成和单糖含量;

[0075] 其中,HPAEC操作条件如下:

[0076] 流动相A:水;流动相B:100mM NaOH;流速:0.5mL/min。

[0077] 梯度洗脱条件如下:0~30min,97.5%A、2.5%B;30~30.1min,80%A、20%B;30.1~45min,60%A、40%B;45~45.1min,60%A、40%B;45.1~60min,97.5%A、2.5%B。

[0078] 将测定结果与标准品对比计算,结果发现:组分EPS-2由半乳糖、鼠李糖、葡萄糖和甘露糖以1.00:1.98:6.69:39.68的摩尔比组成。

[0079] 图2为本发明嗜盐四联球菌胞外多糖组分EPS-2的单糖组成。

[0080] 2.3FT-IR光谱检测

[0081] 具体步骤如下:

[0082] 将实施例1得到的EPS-2和KBr分别以1:100的比例混合研磨,然后通过抽真空压成薄片;将压成薄片的EPS在4000~400cm<sup>-1</sup>的范围内在IRTracer-100傅里叶变换红外光谱仪上测定。

[0083] 测定结果为:如图3,在3600~3200cm<sup>-1</sup>区域的宽峰代表O-H的伸缩振动;在2930cm<sup>-1</sup>附近的弱峰表示C-H伸缩振动;在1735和1655cm<sup>-1</sup>左右的信号是由于C=O的伸缩振动;在1410.95cm<sup>-1</sup>处的吸收峰是由C-O的伸缩振动引起的;1200~1000cm<sup>-1</sup>是多糖的特征区域,主要由C-O-C和C-OH键振动引起;在818.80cm<sup>-1</sup>的峰表明组分EPS-2中甘露糖单元的α型构型。

[0084] 结果表明,组分EPS-2含有羧基和羟基等主要官能团。

[0085] 2.4 DPPH自由基清除活性的测定

[0086] 具体步骤如下:

[0087] (1)将反应体系进行混合并将混合物在室温下反应30分钟;

[0088] (2)在517nm处测量吸光度并使用去离子水和抗坏血酸分别作为空白和阳性对照;

[0089] 其中,反应体系由0.5mL实施例1得到的EPS-2(浓度分别为2、4、6、8和10mg/mL)、1mL 0.25mM DPPH乙醇溶液和1mL水组成;

[0090] 清除率(%) =  $(1 - (A_s - A_0) / A_b) \times 100$ ;

[0091] 其中,As为样品与反应液的吸光度,A0为样品的背景吸光度,Ab为空白对照。

[0092] 测定结果如下:如图4中a,在10mg/mL浓度时,组分EPS-2的清除率达56.03%。

- [0093] 结果表明,组分EPS-2具有清除DPPH自由基的能力。
- [0094] 2.5羟自由基清除活性的测定
- [0095] 具体步骤如下:
- [0096] (1)将反应体系进行混合并将混合物在25℃反应30分钟;
- [0097] (2)在510nm处测量吸光度并使用去离子水和抗坏血酸分别作为空白和阳性对照;
- [0098] 其中,反应体系由1mL 9.0mM硫酸亚铁、1mL 9.0mM水杨酸、1mL 0.03% $H_2O_2$ 和1mL实施例1得到的EPS-2(浓度分别为2、4、6、8和10mg/mL)组成;
- [0099] 清除率(%) =  $(1 - (A_s - A_0) / A_b) \times 100$ ;
- [0100] 其中, $A_s$ 为样品与反应液的吸光度, $A_0$ 为样品的背景吸光度, $A_b$ 为空白对照。
- [0101] 测定结果如下:如图4中b,在10mg/mL浓度下,EPS-2的清除率为37.72%。
- [0102] 结果表明,组分EPS-2具有清除羟基自由基的能力。
- [0103] 2.6 ABTS $^{\bullet+}$ 自由基清除活性的测定
- [0104] 具体步骤如下:
- [0105] (1)将7mm ABTS水溶液与2.45mM(终浓度)过硫酸钾水溶液混合,在室温黑暗条件下反应12-16h,得到ABTS $^{\bullet+}$ 储液;
- [0106] (2)用乙醇稀释1ml ABTS $^{\bullet+}$ 储液,使其在734nm处吸光度为 $0.70 \pm 0.02$ ,得到ABTS $^{\bullet+}$ 工作液;
- [0107] 将实施例1得到的EPS-2(浓度分别为2、4、6、8和10mg/mL)与ABTS $^{\bullet+}$ 工作液以1:20的比例混合,在30℃黑暗条件下反应6分钟;
- [0108] 清除率(%) =  $(1 - (A_s - A_0) / A_b) \times 100$ ;
- [0109] 其中, $A_s$ 为样品与反应液的吸光度, $A_0$ 为样品的背景吸光度, $A_b$ 为空白对照。
- [0110] 测定结果如下:如图4中c,在10mg/mL浓度下,组分EPS-2的清除率为39.80%。结果表明,组分EPS-2具有清除ABTS $^{\bullet+}$ 自由基的能力。
- [0111] 实施例3.本发明嗜盐四联球菌胞外多糖的功能
- [0112] 3.1嗜盐四联球菌胞外多糖EPS(3种EPS的混合物)对鲁氏酵母菌生长的促进作用
- [0113] 具体步骤如下:
- [0114] (1)将鲁氏酵母菌CGMCC 3791在YPD培养基中30℃静置培养24h,获得种子培养液;
- [0115] (2)将鲁氏酵母菌CGMCC 3791种子培养液以5%接种量接种到不同的新鲜YPD培养基中;
- [0116] (3)测定不同时间600nm处的吸光度;
- [0117] 其中,不同的新鲜YPD培养基包括:0%NaCl,6%NaCl,12%NaCl,0%NaCl+5mg/mL EPS,6%NaCl+5mg/mL EPS,12%NaCl+5mg/mL EPS。
- [0118] 结果如图5中a-c所示,有EPS的鲁氏酵母菌的生物量显著高于无EPS的鲁氏酵母菌的生物量,尤其是在6%NaCl条件下,结果表明,嗜盐四联球菌EPS对鲁氏酵母菌的生长具有一定的促进作用。
- [0119] 3.2本发明嗜盐四联球菌胞外多糖(3种EPS的混合物)对乳酸乳球菌的低温保护作用
- [0120] 具体步骤如下:
- [0121] (1)取5mL乳酸乳球菌MG 1363的发酵液,离心(8 000g,4℃,5min),弃上清;

[0122] (2) 分别加入1mL 0.9%生理盐水、20%甘油、2%EPS和5%EPS水溶液充分震荡摇匀；

[0123] (3) 在-80℃冷冻5天，复溶，采用稀释涂布平板法计算活菌数，存活率用冷冻后活细胞数相对于未冷冻活细胞数的百分比表示。

[0124] 测定结果如下：如图5中d，冷冻5天后，未添加任何保护剂的细胞存活率为83.13%，添加20%甘油、2%EPS和5%EPS的细胞存活率分别为95.48%、93.29%和96.72%。

[0125] 结果表明，嗜盐四联球菌胞外多糖(EPS)对乳酸乳球菌在冷冻条件下具有与20%甘油相当的保护作用，可以作为潜在的细菌冷冻保护剂进行开发与应用。

[0126] 最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

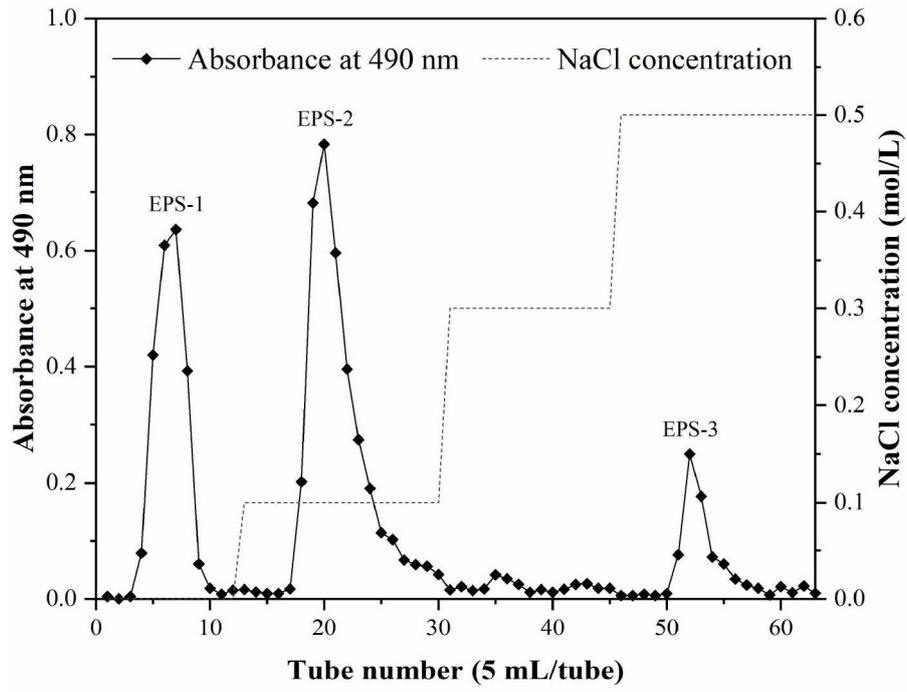


图1

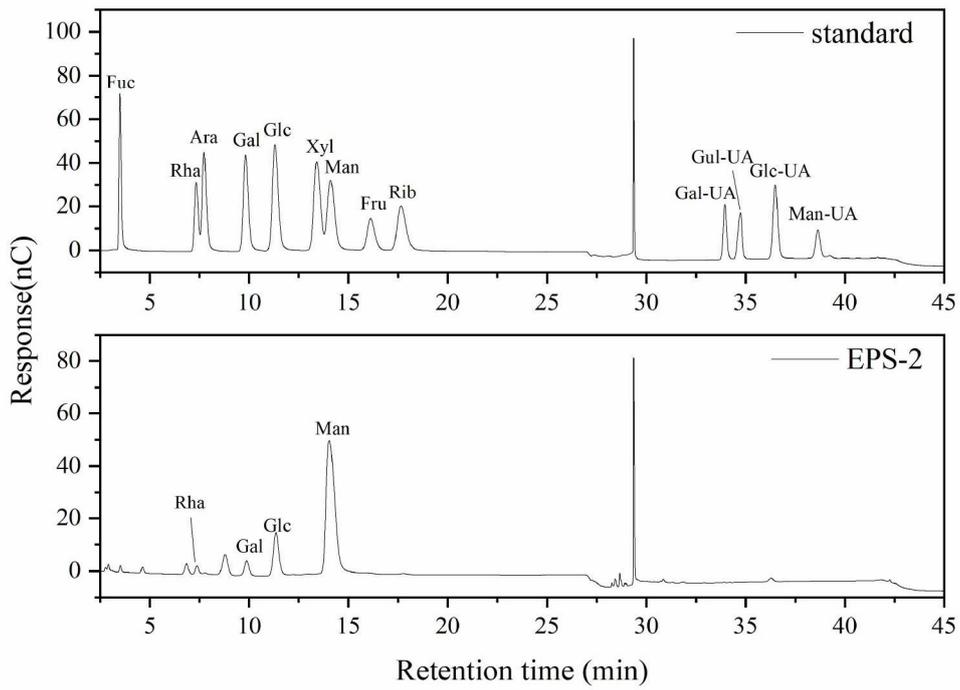


图2

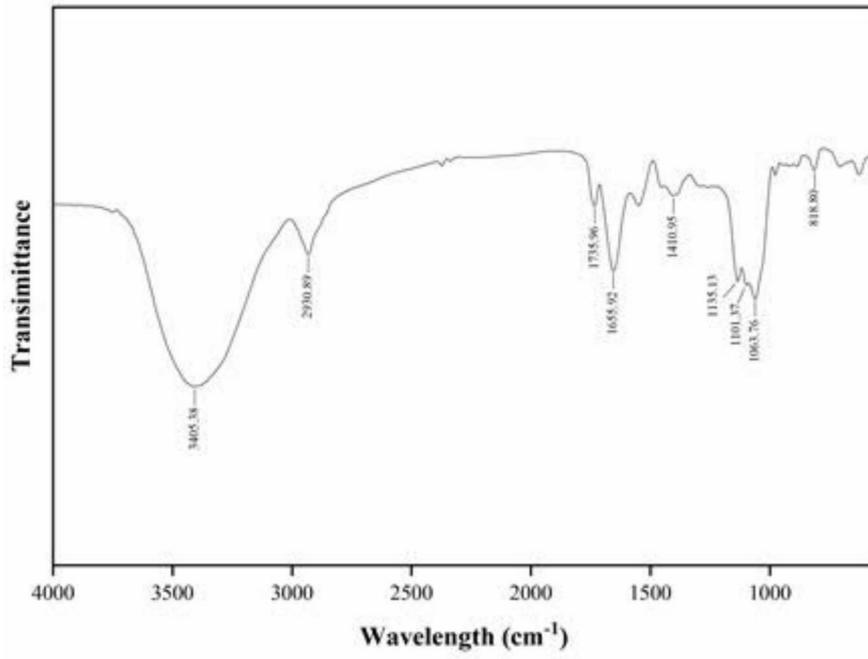


图3

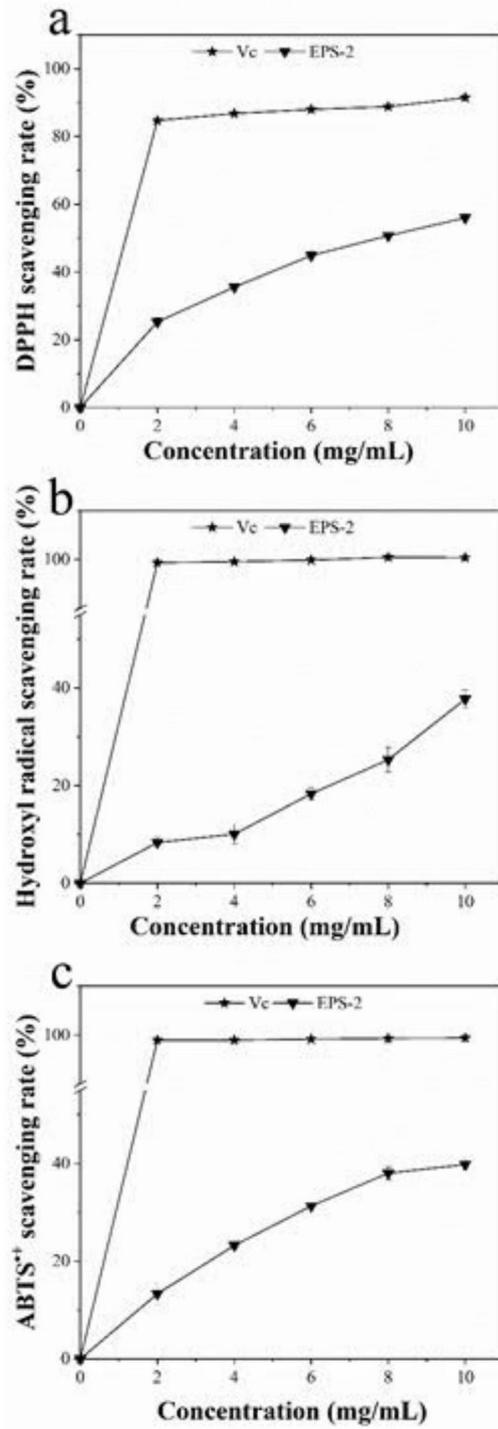


图4

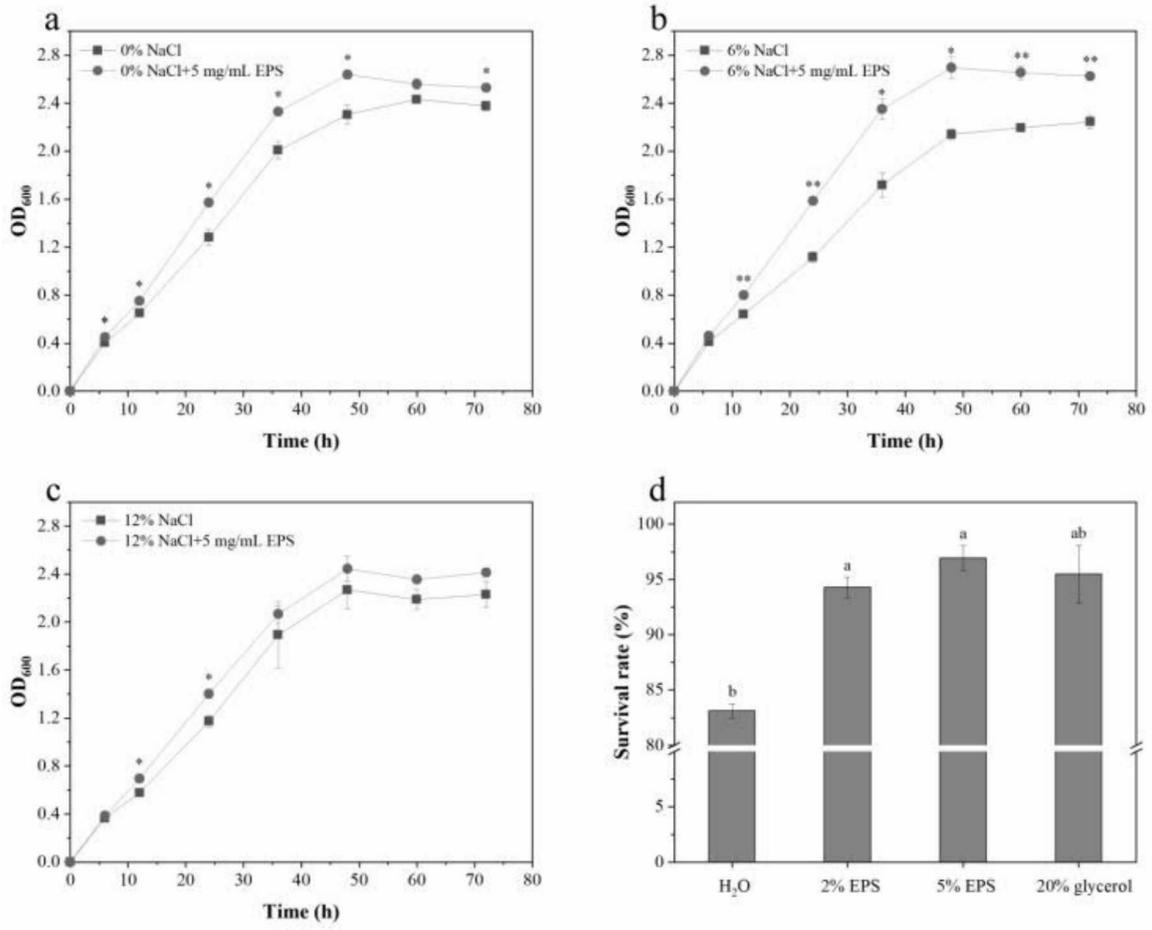


图5