



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106010997 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610278215.9

C12Q 1/68(2006.01)

(22)申请日 2016.04.29

C12Q 1/04(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12R 1/25(2006.01)

CCTCC NO: M2016037 2016.01.14

(71)申请人 周礼红

地址 550025 贵州省贵阳市贵安新区电子信息产业园

(72)发明人 周礼红 潘肇仪

(74)专利代理机构 北京卓唐知识产权代理有限公司 11541

代理人 龚洁

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/02(2006.01)

C07K 14/335(2006.01)

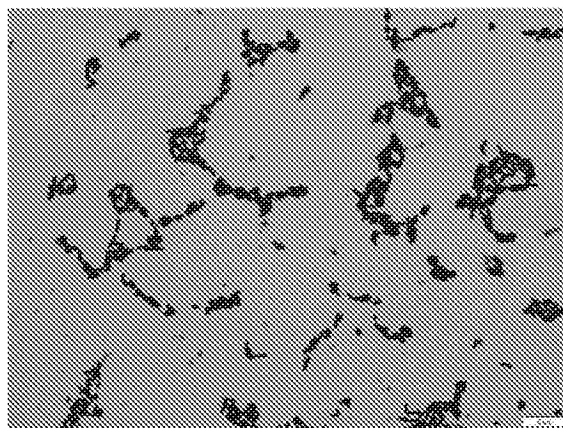
权利要求书2页 说明书11页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用

(57)摘要

本发明涉及微生物技术领域,具体涉及一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用,所述植物乳杆菌分类命名为:*Lactobacillus plantarum*,保藏于中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2016037,保藏日期为2016年1月14日。本发明提供的一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用,合理设计植物乳杆菌的培养分离方法和筛选方法,最终有效获得在混合果蔬汁中产酸能力强、耐酸性高且生长速率快的优质植物乳杆菌,且本发明筛选得到的植物乳杆菌具有很宽的温度适应性,在8℃至45℃范围内均能生长,本发明的植物乳杆菌能够广泛应用于酵素发酵和混合果蔬等乳酸菌发酵。



1. 一种植物乳杆菌,其特征在于,所述植物乳杆菌分类命名为:Lactobacillus plantarum,保藏于中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2016037,保藏日期为2016年1月14日。

2. 一种细菌素,其特征在于,所述细菌素由权利要求1所述的植物乳杆菌发酵制得。

3. 一种权利要求1所述的植物乳杆菌的培养分离方法,其特征在于,包括以下步骤:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25~38℃静置培养,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,25~38℃静置培养得到植物乳杆菌。

4. 根据权利要求3所述的种植物乳杆菌的培养分离方法,其特征在于,所述的静止培养的时间为2天。

5. 根据权利要求3所述的一种植物乳杆菌的培养分离方法,其特征在于,所述的分离培养基平板上的分离培养基为常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基中的一种或两种以上;

所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、MC培养基、MRS培养基和LB培养基中的一种或两种以上;

所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟;

所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

6. 一种权利要求1所述的植物乳杆菌的筛选方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一:植物乳杆菌菌株的培养分离:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25~38℃静置培养,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,25~38℃静置培养保存备用;

步骤二:植物乳杆菌菌体的制备:取步骤一得到的植物乳杆菌菌株于35~40℃静置培养后,取出细菌斜面菌种,用无菌水洗下菌苔,加入至灭菌离心管中,离心得到菌体沉淀物,将菌体沉淀物洗涤后得到植物乳杆菌菌体;

步骤三:植物乳杆菌序列分析:取步骤二制备的植物乳杆菌菌体进行DNA提取,以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物,对扩增产物进行测序,得到植物乳杆菌菌株的16SrDNA序列,进行分析鉴定,筛选出同类的植物乳杆菌菌株;

步骤四:植物乳杆菌的筛选:将步骤三得到的同类的植物乳杆菌菌株的单菌落分别接种到MRS液体中静止培养,得到菌液,将菌液接种至果蔬汁液体中培养,在培养过程中测定培养液的OD值、pH值和耐酸性,根据测定结果筛选植物乳杆菌。

7. 根据权利要求6所述的一种植物乳杆菌的筛选方法,其特征在于,所述步骤二中静置培养的时间为24h,离心条件为10000rpm的速度离心15,洗涤方法为用无菌水洗涤2次。

8. 根据权利要求6所述的一种植物乳杆菌的筛选方法,其特征在于,所述步骤三中,

以上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和下游引物5'-AAGGAGGTGAACCAGCCGCA-3'为特异性引物对提取的DNA为模板进行PCR扩增,PCR扩增反应条件为:94℃预变性4min后,

94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,2~4步循环30次,再72℃延长10min;

所述步骤四中,所述菌液以3%的接种量转接装有100mL果蔬汁液体的150mL摇瓶中,37℃培养24h。

9.根据权利要求6所述的一种植物乳杆菌的筛选方法,其特征在于,所述的分离培养基平板上的分离培养基包括常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基中的一种或两种以上,

所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、MC培养基、MRS培养基和LB培养基中的一种或两种以上;

所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟;

所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

10.一种权利要求1所述的植物乳杆菌的应用,其特征在于,所述的植物乳杆菌用于发酵制备果蔬醋、粮食醋和果蔬酵素。

一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,具体涉及一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用。

背景技术

[0002] 植物乳杆菌属于乳杆菌科中的乳杆菌属,最适生长温度为30~35℃,厌氧或兼性厌氧,菌种为直或弯的杆状,单个、有时成对或成链状,最适pH为6.5左右,属于同型发酵乳酸菌。植物乳杆菌与人类的生活关系密切,是一种常见于奶油、肉类及许多蔬菜发酵制品中的乳酸菌,能通过胃并定植于肠道发挥有益作用。它对肠道微生物有重要影响,无论在食品发酵,还是在工业乳酸发酵以及医疗保健等领域,都有着广泛的应用。

[0003] 目前我国拥有丰富的乳酸菌资源,可以筛选出发酵性能优良的酸敏性菌株,继而生产出高质量的酸敏性发酵剂,不但可以打破外国公司在该领域的垄断,还可以发展具有自主知识产权的商品发酵剂,降低生产成本,延长产品货架期,具有良好的社会效益和经济效益。例如申请号为200910033694.8的发明专利公开了一种酸敏性保加利亚乳杆菌菌株及其用法,在对天然乳品发酵剂—西藏灵菇的研究中分离、筛选到1株酸敏性菌株L.B-FM-6,经鉴定为德士乳杆菌保加利亚亚种。对由该菌株与其它微生物菌株组合的发酵剂发酵的发酵乳制品、发酵果汁、发酵蔬菜汁酸度的贮藏稳定性研究,解决活性乳酸菌饮品保质期短的缺陷,显示出由该菌株参与的发酵剂在发酵乳制品、活性乳酸菌果蔬汁方面的优势,开发成商业化的食品发酵剂有较大的经济价值。

[0004] 由于乳杆菌在代谢过程中能分解糖类产生大量有机酸类,其中主要是乳酸,随着发酵进程继续,乳酸含量逐渐增加,致使培养基的酸度升高,乳杆菌的繁殖便被抑制,所以普通发酵的最高活菌数仅能达到 $10^7\sim 10^8$ cfu/ml。为了促进乳杆菌的生长繁殖,一般采用化学中和法或缓冲盐法调节和控制发酵液pH,保证乳杆菌生长繁殖必需的条件,可使活菌数达 10^9 cfu/ml左右。当需要较高产酸量时,往往较难实现,尤其是在批量生产中操作繁杂,生产不便,工作量大,效率低下,针对性不强,难以在短时间内获得较高的酸量。

[0005] 由此可见,为了解决解决现有技术中的不足,迫切需要一种有效的植物乳杆菌筛选方法和培育分离方法,以得到一种生长速率快、产酸量高并且耐酸性强的植物乳杆菌。

发明内容

[0006] 本发明为了解决上述技术问题,提供一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用,本发明针对植物乳杆菌的培养分离方法及筛选方法易操作且方法简便,且使得最终筛选的植物乳杆菌具有产酸量高且生长速率快的有点。

[0007] 为了达到上述技术效果,本发明包括以下技术方案:

[0008] 一种植物乳杆菌,所述植物乳杆菌分类命名为:*Lactobacillus plantarum*,保藏于中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2016037,保藏日期为2016年1月14日。保藏地址,中国武汉,武汉大学。

- [0009] 所述植物乳杆菌的16s DNA序列见SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。
- [0010] 一种细菌素,所述细菌素由上述植物乳杆菌发酵制得。
- [0011] 一种上述植物乳杆菌的培养分离方法,包括以下步骤:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25~38℃静置培养,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,25~38℃静置培养得到植物乳杆菌。
- [0012] 进一步的,所述的静止培养的时间为2天。
- [0013] 进一步的,所述的分离培养基平板上的分离培养基为常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基中的一种或两种以上,
- [0014] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、MC培养基、MRS培养基和LB培养基中的一种或两种以上;
- [0015] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟;
- [0016] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。
- [0017] 进一步的,所述常规培养基的配制方法见中国科学院微生物研究所《菌种保藏手册》编著组Barnett J A所撰写的文章内容。
- [0018] 所述寡营养培养基:将LB培养基的两种营养成分(葡萄糖、蛋白胨)依次递减20%,以提供寡营养的生长环境,分别包括LB培养基II至LB培养基V,具体制备方法和成分如下:
- [0019] LB培养基II(LB II):酵母膏4.0g,蛋白胨8.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0020] LB培养基III(LB III):酵母膏3.0g,蛋白胨6.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0021] LB培养基IV(LB IV):酵母膏2.0g,蛋白胨4.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0022] LB培养基V(LB V):酵母膏1.0g,蛋白胨2.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0023] 模拟环境培养基(用于模拟环境培养):设计调整LB培养基的pH从7至3依次递减,来模拟细菌生长的原始酸性环境条件,以配合不同种类细菌对环境、营养条件不同程度的需要。分别包括LB培养基VI至LB培养基VIII,具体制备方法和成分如下:
- [0024] LB培养基VI(LB VI):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至6,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0025] LB培养基VII(LBVII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至5,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0026] LB培养基VIII(LBVIII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至4,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。
- [0027] 一种上述植物乳杆菌的筛选方法,包括以下步骤:

[0028] 步骤一:植物乳杆菌菌株的培养分离:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25~38℃静置培养,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,25~38℃静置培养保存备用;

[0029] 步骤二:植物乳杆菌菌体的制备:取步骤一得到的植物乳杆菌菌株于35~40℃静置培养后,取出细菌斜面菌种,用无菌水洗下菌苔,加入至灭菌离心管中,离心得到菌体沉淀物,将菌体沉淀物洗涤后得到植物乳杆菌菌体;

[0030] 步骤三:植物乳杆菌序列分析:取步骤二制备的植物乳杆菌菌体进行DNA提取,以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物,对扩增产物进行测序,得到植物乳杆菌菌株的16SrDNA序列,由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列组成,进行分析鉴定,筛选出同类的植物乳杆菌菌株;

[0031] 步骤四:植物乳杆菌的筛选:将步骤三得到的同类的植物乳杆菌菌株的单菌落分别接种到MRS液体中静止培养,得到菌液,将菌液接种至果蔬汁液体中培养,在培养过程中测定培养液的OD值、pH值和耐酸性,根据测定结果筛选植物乳杆菌。

[0032] 进一步的,所述的步骤一中,分离培养基平板上的分离培养基包括常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基中的一种或两种以上,

[0033] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、MC培养基、MRS培养基和LB培养基中的一种或两种以上;

[0034] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟;

[0035] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0036] 采用规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基共同培养,可有效并全面筛选本发明植物乳杆菌。

[0037] 进一步的,所述步骤二中静置培养的时间为24h,离心条件为10000rpm的速度离心15,洗涤方法为用无菌水洗涤2次。

[0038] 进一步的,所述步骤三中,以上游引物:

[0039] 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和下游引物

[0040] 5'-AAGGAGGTGAACCAGCCGCA-3'为特异性引物对提取的DNA为模板进行PCR扩增,所述上游引物和下游引物的核苷酸序列分别见SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3,PCR扩增反应条件为:94℃预变性4min后,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,2~4步循环30次,再72℃延长10min。

[0041] 进一步的,所述步骤四中,所述菌液以3%的接种量转接装有100mL果蔬汁液体的150mL摇瓶中,37℃培养24h。

[0042] 一种植物乳杆菌的应用,所述的植物乳杆菌用于发酵制备果蔬醋、粮食醋和果蔬酵素。

[0043] 采用上述技术方案,包括以下有益效果:本发明提供的一种植物乳杆菌及其培养

分离方法、筛选方法和应用,合理设计植物乳杆菌的培养分离方法和筛选方法,最终有效获得在混合果蔬汁中产酸能力强、耐酸性高且生长速率快的优质植物乳杆菌,且本发明筛选得到的植物乳杆菌具有很宽的温度适应性,在8℃和45℃下均能生长,本发明的植物乳杆菌能够广泛应用于酵素发酵和混合果蔬等乳酸菌发酵。避免了采用化学中和法或缓冲盐法调节和控制发酵液pH,保证乳酸菌生长繁殖必需的条件,来控制乳杆菌持续产生乳酸。

附图说明

- [0044] 图1为本发明植物乳杆菌菌落图;
- [0045] 图2为本发明植物乳杆菌100倍放大显微图;
- [0046] 图3为本发明实施例三中不同植物乳杆菌菌株生长曲线图;
- [0047] 图4为本发明实施例三中不同植物乳杆菌菌株产酸能力图。

具体实施方式

- [0048] 下面通过具体的实施例对本发明做进一步的详细描述。
- [0049] 实施例一:一种植物乳杆菌,所述植物乳杆菌分类命名为:*Lactobacillus plantarum*,保藏于中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2016037,保藏日期为2016年1月14日。
- [0050] 一种细菌素,所述细菌素由上述植物乳杆菌发酵制得。
- [0051] 一种上述植物乳杆菌的应用,所述的植物乳杆菌用于发酵制备果蔬醋、粮食醋和果蔬酵素。
- [0052] 实施例一的植物乳杆菌菌株的形态特征:
- [0053] 菌落形态特征描述:如图1所示,菌落呈圆形,菌落直径0.6~1mm,菌落凸起成近球形,表面光滑,乳白色。有酸、麻的气味。
- [0054] 个体形态特征:如图2所示,圆端短杆菌,为0.43~0.92 μm ×0.56~1.63 μm ,单个、成对或短链状。革兰氏阳性,不生芽孢。
- [0055] 实施例二:一种上述植物乳杆菌的培养分离方法,包括以下步骤:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25℃静置培养2天,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,38℃静置培养2天得到植物乳杆菌。
- [0056] 优选地,所述的分离培养基平板上的分离培养基为常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基,
- [0057] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、MC培养基、MRS培养基和LB培养基;
- [0058] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟;
- [0059] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0060] 一种上述植物乳杆菌的筛选方法,包括以下步骤:

[0061] 步骤一:植物乳杆菌菌株的培养分离:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25℃静置培养,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,38℃静置培养保存备用;

[0062] 步骤二:植物乳杆菌菌体的制备:取步骤一得到的植物乳杆菌菌株于35℃静置培养的细菌斜面菌种,用无菌水洗下菌苔,加入至灭菌离心管中,离心得到菌体沉淀物,将菌体沉淀物洗涤后得到植物乳杆菌菌体;

[0063] 步骤三:植物乳杆菌序列分析:取步骤二制备的植物乳杆菌菌体进行DNA提取,以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物,对扩增产物进行测序,得到植物乳杆菌菌株的16SrDNA序列,由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列组成,进行分析鉴定,筛选出同类的植物乳杆菌菌株;

[0064] 步骤四:植物乳杆菌的筛选:将步骤三得到的同类的植物乳杆菌菌株的单菌落分别接种到MRS液体中静止培养,得到菌液,将菌液接种至果蔬汁液体中培养,在培养过程中测定培养液的OD值、pH值和耐酸性,根据测定结果筛选植物乳杆菌。

[0065] 优选地,所述步骤二中静置培养的时间为24h,离心条件为10000rpm的速度离心15,洗涤方法为用无菌水洗涤2次。

[0066] 优选地,所述步骤三中,

[0067] 以上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和下游引物5'-AAGGAGGTGAACCAGCCGCA-3'为特异性引物对提取的DNA为模板进行PCR扩增,所述上游引物和下游引物的核苷酸序列分别见SEQ ID NO2和SEQ ID NO.3,PCR扩增反应条件为:94℃预变性4min后,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,2~4步循环30次,再72℃延长10min;所述步骤四中,所述菌液以3%的接种量转接装有100mL果蔬汁液体的150mL摇瓶中,37℃培养24h。

[0068] 优选地,所述的分离培养基平板上的分离培养基包括常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基,

[0069] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、MC培养基、MRS培养基和LB培养基;

[0070] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0071] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0072] 所述寡营养培养基分别包括LB培养基II至LB培养基V,具体制备方法和成分如下:

[0073] LB培养基II(LB II):酵母膏4.0g,蛋白胨8.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0074] LB培养基III(LB III):酵母膏3.0g,蛋白胨6.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0075] LB培养基IV(LB IV):酵母膏2.0g,蛋白胨4.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调

节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0076] LB培养基V(LB V):酵母膏1.0g,蛋白胨2.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0077] 所述模拟环境培养基分别包括LB培养基VI至LB培养基VIII,具体制备方法和成分如下:

[0078] LB培养基VI(LB VI):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至6,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0079] LB培养基VII(LBVII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至5,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0080] LB培养基VIII(LBVIII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至4,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0081] 实施例三:一种上述植物乳杆菌的培养分离方法,包括以下步骤:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,25℃静置培养2天,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,38℃静置培养2天得到植物乳杆菌。

[0082] 优选地,所述的分离培养基平板上的分离培养基为常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基中的一种,

[0083] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基和牛肉膏蛋白胨培养基中的一种;

[0084] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟;

[0085] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0086] 一种上述植物乳杆菌的筛选方法,包括以下步骤:

[0087] 步骤一:植物乳杆菌菌株的培养分离:取混合果蔬酵素自然发酵中期和后期的发酵醪样品,稀释后吸取涂布至分离培养基平板,38℃静置培养,挑取菌落大小为0.5~1.1mm,形态为圆形,颜色为乳白色的单菌落,转接至培养基斜面,25℃静置培养保存备用;

[0088] 步骤二:植物乳杆菌菌体的制备:取步骤一得到的植物乳杆菌菌株于40℃静置培养的细菌斜面菌种,用无菌水洗下菌苔,加入至灭菌离心管中,离心得到菌体沉淀物,将菌体沉淀物洗涤后得到植物乳杆菌菌体;

[0089] 步骤三:植物乳杆菌序列分析:取步骤二制备的植物乳杆菌菌体进行DNA提取,以提取的DNA为模板进行PCR扩增得到扩增产物,对扩增产物进行测序,得到植物乳杆菌菌株的16SrDNA序列,由SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列组成,进行分析鉴定,筛选出同类的植物乳杆菌菌株;

[0090] 步骤四:植物乳杆菌的筛选:将步骤三得到的同类的植物乳杆菌菌株的单菌落分别接种到MRS液体中静止培养,得到菌液,将菌液接种至果蔬汁液体中培养,在培养过程中测定培养液的OD值、pH值和耐酸性,根据测定结果筛选植物乳杆菌。

[0091] 优选地,所述步骤二中静置培养的时间为24h,离心条件为10000rpm的速度离心15,洗涤方法为用无菌水洗涤2次。

[0092] 优选地,所述步骤三中,

[0093] 以上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和下游引物5'-AAGGAGGTGAACCAGCCGCA-3'为特异性引物对提取的DNA为模板进行PCR扩增,所述上游引物和下游引物的核苷酸序列分别见SEQ ID NO2和SEQ ID NO.3,PCR扩增反应条件为:94℃预变性4min后,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,2~4步循环30次,再72℃延长10min;所述步骤四中,所述菌液以3%的接种量转接装有100mL果蔬汁液体的150mL摇瓶中,37℃培养24h。

[0094] 优选地,所述的分离培养基平板上的分离培养基包括常规培养基、寡营养培养基和模拟环境培养基中的一种,

[0095] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基和牛肉膏蛋白胨培养基中的一种;

[0096] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0097] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0098] 所述寡营养培养基分别包括LB培养基II至LB培养基V,具体制备方法和成分如下:

[0099] LB培养基II(LB II):酵母膏4.0g,蛋白胨8.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0100] LB培养基III(LB III):酵母膏3.0g,蛋白胨6.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0101] LB培养基IV(LB IV):酵母膏2.0g,蛋白胨4.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0102] LB培养基V(LB V):酵母膏1.0g,蛋白胨2.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0103] 所述模拟环境培养基分别包括LB培养基VI至LB培养基VIII,具体制备方法和成分如下:

[0104] LB培养基VI(LB VI):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至6,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0105] LB培养基VII(LB VII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至5,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0106] LB培养基VIII(LB VIII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至4,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0107] 实施例四:一种植物乳杆菌的培养分离方法,包括以下步骤:取混合果蔬酵素自然发酵中、后3个时期(即发酵第45、90天)的发酵醪样品10g,放入盛有90mL无菌水的三角瓶中,振荡5分钟,充分摇匀,稀释至合适浓度,吸取100μl涂布分离培养基平板,28±1℃静置

培养2d,根据菌落大小、形态和颜色等表型特征挑取单菌落,转接相应培养基斜面,28±1℃静置培养2d,编号保存备用。

[0108] 将涂布后的平板置于37±1℃静置培养2d,待培养基表面长出单个菌落,其中根据菌落大小、形态和颜色、透明圈等表型特征挑取单菌落,转接到相应培养基斜面,37±1℃静置培养2d。

[0109] 一种植物乳杆菌的筛选方法,包括以下步骤:

[0110] 步骤一:植物乳杆菌菌株的培养分离:取混合果蔬酵素自然发酵中、后3个时期(即发酵第45、90天)的发酵醪样品10g,放入盛有90mL无菌水的三角瓶中,振荡5分钟,充分摇匀,稀释至合适浓度,吸取100μl涂布分离培养基平板,28±1℃静置培养2d,根据菌落大小、形态和颜色等表型特征挑取单菌落,转接相应培养基斜面,28±1℃静置培养2d,编号保存备用。

[0111] 将涂布后的平板置于37±1℃静置培养2d,待培养基表面长出单个菌落,其中根据菌落大小、形态和颜色、透明圈等表型特征挑取单菌落,转接到相应培养基斜面,37±1℃静置培养2d。

[0112] 步骤二:植物乳杆菌菌体的制备:将于37±1℃静置培养24h左右的细菌斜面菌种,用无菌水洗下菌苔,加入到灭菌离心管中,以10000rpm的速度离心15s,将菌体沉淀物再用无菌水洗涤2次后,备用。

[0113] 步骤三:植物乳杆菌序列分析:取步骤二制备的植物乳杆菌菌体进行DNA提取,DNA提取按照试剂盒标准抽提步骤进行,以上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和下游引物5'-AAGGAGGTGAACCAGCCGCA-3'为特异性引物对提取的DNA为模板进行PCR扩增,在PCR反应管中加入DNA模版1μl,2×Mix 13μl,10μM BSF8/20 1μl,10μM BSR1541/20 1μl,ddH₂O 9μl,混匀后进行PCR反应.PCR扩增反应条件为:94℃预变性4min后,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,2-4步循环30次,再72℃延长10min,得到扩增产物,对扩增产物进行测序,DNA测序采用双脱氧终止法,采用Clusta1W2.1对分离菌株的16SrDNA序列进行多序列比对分析,将完全一致的序列所代表的菌株归为一类。然后利用BLASTN2.2.29+程序搜索核算数据库,下载得分高、序列一致性达到95%以上的序列,采用Clusta1W2.1进行多序列比对分析,用MEGA6.06软件采用N-J法重建系统发育树。数据分析采用最大组合似然模型(Maximum Composite Likelihood),采取1000次bootstrap检验(Larkin MA,2007;Tamura K,2013;Zhen Zhang,2000;Aleksandr Morgulis,2008)。采用常规培养基、寡营养培养基以及模拟环境培养基从自然发酵果蔬酵素中共分离到细菌9株乳酸菌菌株,编号为LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP2。经形态学、生理生化实验以及分子生物学16SrDNA序列鉴定这9个菌株均为*Lactobacillus plantarum*(植物乳杆菌)。

[0114] 步骤四:植物乳杆菌的筛选:将筛选得到的LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP2 9株植物乳杆菌单菌落分别接种到装有100mL MRS液体培养的150mL摇瓶中,37℃静止培养20h,分别制得菌液。

[0115] 所述常规培养基为西红柿琼脂培养基、西红柿汁琼脂培养基III、BCP培养基和牛肉膏蛋白胨培养基;

[0116] 所述寡营养培养基的制备方法包括以下步骤:分别称取重量分数为1~5份的酵母膏、2~10份的蛋白胨和20份琼脂,加热溶解于水中,调节pH至7,定容1L,分装后121℃灭菌

20分钟。

[0117] 所述模拟环境培养基包括pH值为3~7的LB培养基,其制备方法包括以下步骤:分别取酵母膏、蛋白胨和琼脂,加热溶解于水中,调节pH至3~7,定容1L,分装后121℃灭菌20分钟。

[0118] 所述寡营养培养基分别包括LB培养基II至LB培养基V,具体制备方法和成分如下:

[0119] LB培养基II(LB II):酵母膏4.0g,蛋白胨8.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0120] LB培养基III(LB III):酵母膏3.0g,蛋白胨6.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0121] LB培养基IV(LB IV):酵母膏2.0g,蛋白胨4.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0122] LB培养基V(LB V):酵母膏1.0g,蛋白胨2.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至7,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0123] 所述模拟环境培养基分别包括LB培养基VI至LB培养基VIII,具体制备方法和成分如下:

[0124] LB培养基VI(LB VI):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至6,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0125] LB培养基VII(LB VII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至5,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0126] LB培养基VIII(LB VIII):酵母膏5.0g,蛋白胨10.0g,琼脂20.0g,加热溶于适量水中,调节pH至4,定容至1L。分装后121℃灭菌20分钟。

[0127] 生长特性试验:将制得的菌株LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP2菌液按3%的接种量转接装有100mL混合果蔬汁液体培养的150mL摇瓶中,37℃,培养时间为24h。在培养的过程中每间隔2h取1次培养液测定OD值。

[0128] 产酸试验:将筛选得到的LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP2 9株植物乳杆菌单菌落分别接种到装有100mL混合果蔬汁液体培养的150mL摇瓶中,37℃静止培养20h,分别制得菌液。将制得的菌株LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP2菌液按3%的接种量转接装有100mL MRS液体培养的150mL摇瓶中,37℃,培养时间为48h。在培养的过程中每间隔2h取1次培养液进行pH的测定,培养液pH采用pH计在20℃条件下测定。

[0129] 耐酸试验:将筛选得到的LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP2 9株植物乳杆菌单菌落分别接种到装有100mL MRS液体培养的150mL摇瓶中,37℃静止培养20h,分别制得菌液。

[0130] 在pH7.4的PBS缓冲液基础上用盐酸调整pH至2.5,每150mL摇瓶中装140mL,121℃,高压灭菌20min,冷却。然后按6%(V/V)的量将LP4、LP18、LP16、LP3、LP13、LP8、LP15、LP12、LP29株植物乳杆菌菌液转入已灭菌的装有pH2.5的PBS缓冲液中,37℃厌氧,分别作用0h、1h、5h、10h、15h、20h测定活菌数。

[0131] 实施例四步骤四植物乳杆菌筛选的实验结果:

[0132] 按照实施例四所述的筛选方法,得到生长特性试验结果见图3,图3中菌株LP15在混合果蔬汁中能快速适应,并且迅速生长,生长速率显著快于其它菌株。

[0133] 得到耐酸试验结果见图4,图4中表明菌株LP15在混合果蔬汁中能快速合成乳酸,并且产酸量显著大于其它菌株。

[0134] 得到耐酸试验结果见表1,表1中表明LP15的耐酸性最强,在pH=2.5的缓冲液中处理20h仍还有82%的菌体存活见表1,而其它几个菌株的存活率仅有一半。因此最终筛选出LP15的植物乳杆菌。

[0135] 表1植物乳杆菌菌株在pH2.5不同时间处理的存活率

[0136]

菌株号	存活率 (%)					
	0 h	1 h	5 h	10 h	15 h	20 h
LP4	100	92	83	76	64	55
LP18	100	92	84	72	63	50
LP16	100	91	86	76	63	50
LP3	100	90	82	74	61	48
LP13	100	92	83	72	66	48
LP8	100	90	85	74	60	54
LP15	100	95	92	88	85	82
LP12	100	85	80	74	60	51
LP2	100	86	79	75	62	49

[0137] 菌株号为LP15的植物乳杆菌为本专利所保护的植物乳杆菌,其16s DNA序列见SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0138] 筛选的LP15菌株发酵特性分析与种类的鉴定:

[0139] 将筛选到的LP15菌株进行糖发酵试验,其结果见表2,能发酵葡萄糖但不产生气体,属同型乳酸发酵类型,细胞壁中不含有二氨基庚二酸(meso-DAP),产生DL-乳酸。均分解核糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、乳糖等产酸,不利用纤维二糖、松三糖、菊粉、肌醇、七叶苷、扁桃苷。根据伯杰氏手册(第八版)将LP15菌株鉴定为植物乳杆菌。温度生长试验发现,LP15菌株在8℃和45℃下均能生长,该菌株对温度具有很好的适应性。

[0140] 表2糖发酵试验

[0141]

糖类	菌株LP15	糖类	菌株LP15
阿拉伯糖	+	棉籽糖	+
木糖	+	松三糖	-

核糖	+	淀粉	+
葡萄糖	+	菊粉	-
甘露糖	+	甘露醇	+
果糖	+	山梨醇	+
半乳糖	+	肌醇	-
蔗糖	+	七叶苷	-
麦芽糖	+	水杨苷	+
纤维二糖	-	扁桃苷	-
乳糖	+	葡萄糖酸钠	+
草糖	+	-	-

[0142] 筛选的LP15菌株16s rDNA分子鉴定：

[0143] 通过PCR扩征获得LP15菌株16s rDNA分子序列，全长1417bp。通过Blast分析，与其它植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)16s rDNA 分子序列的相似性达到100%和99%。联合形态学特征，生理生化特征以及16s rDNA分子特征将LP15菌株鉴定为*Lactobacillus plantarum*。以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 周礼红

<120> 一种植物乳杆菌及其培养分离方法、筛选方法和应用

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1417

<212> DNA

<213> 植物乳杆菌 (Lactobacillus plantarum)

<223> 植物乳杆菌 LP15 菌株 16s DNA 序列

<400> 1

```

aatgcagteg acgaactetg gtattgattg gtgcttgcac catgatttac atttgagtga      60
gtggcgaact ggtgagtaac acgtgggaaa cctgcccaaga agcgggggat aacacctgga      120
aacagatget aataccgat aacaacttgg accgcattgt cegagcttga aagatggctt      180
eggctatcac ttttgatgg tcccgcgcg tattagctag atggtggggg aacggctcac      240
catggcaatg atacgtagcc gacctgagag ggtaategge cacattggga ctgagacacg      300
gcccnaacte ctacgggagg cagcagtagg gaatetteca caatggacga aagtctgatg      360
gagcaacgcc gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa aactctgttg ttaaagaaga      420
acatatctga gagtaactgt tcaggtattg acggtattta accagaaagc caccgctaac      480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt      540
aaagcgagcg caggeggttt titaagtctg atgtgaaage cttcggctca accgaagaag      600
tgcateggaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag tggaaactca tgtgtagcgg      660
tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg cggctgtctg gtctgttaact      720

```

[0002]

gacgctgagg ctcgaaagta tgggtagcaa acaggattag ataccctggt agtccatacc	780
gtaaacgatg aatgctaagt gttggagggt ttcgccectt cagtgetgca gctaacgcatt	840
taagcattcc gectggggag tacggccgca aggetgaaac tcaaaggaat tgacgggggc	900
ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac gcgaagaacc ttaccaggtc	960
ttgacatact atgcaaattc aagagattag acgttccctt cggggacatg gatacagggtg	1020
gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgc	1080
acccttatta tcagttgcca gcattaagtt gggeactctg gtgagactgc cggtgacaaa	1140
ccggaggaag gtgggatga cgtcaaatca tcattcccct tatgacctgg gctacacacg	1200
tgtacaatg gatggtacaa cgagttgca actecgaga gtaagctaat ctcttaaage	1260
cattctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagtcggaat cgttagtaat	1320
cgcgatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggectt gtacacaccg cccgtcacac	1380
catgagagtt tgtaacaccc aaagtcggtg gggtaac	1417

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

agagttgat cctggctcag 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

[0003]

aggaggtga ccagccgca

20

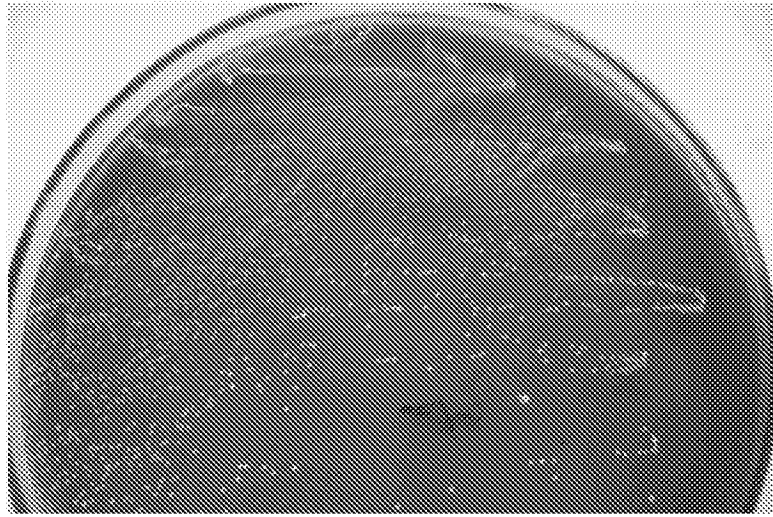


图1

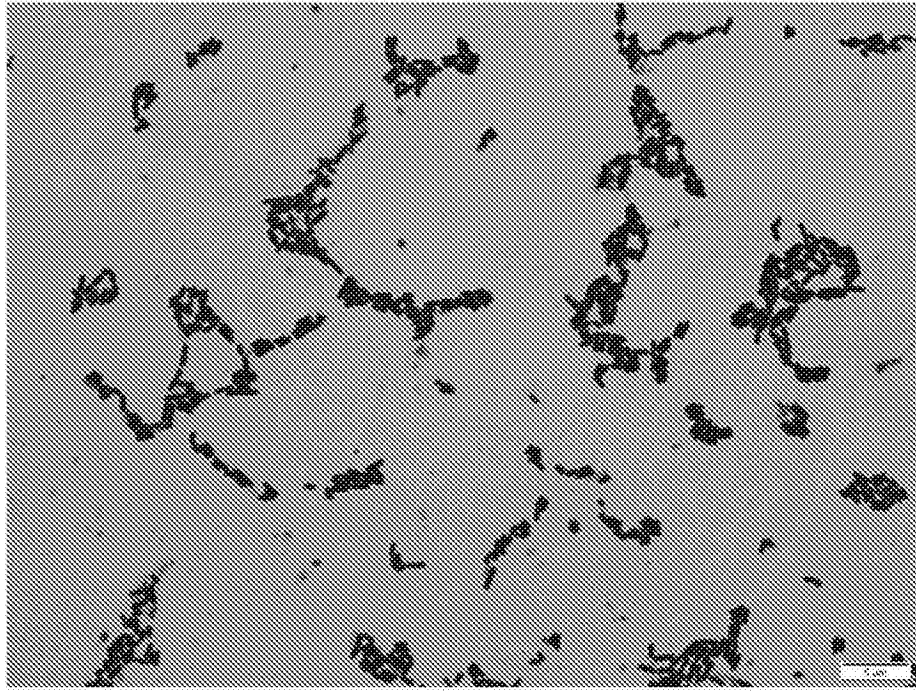


图2

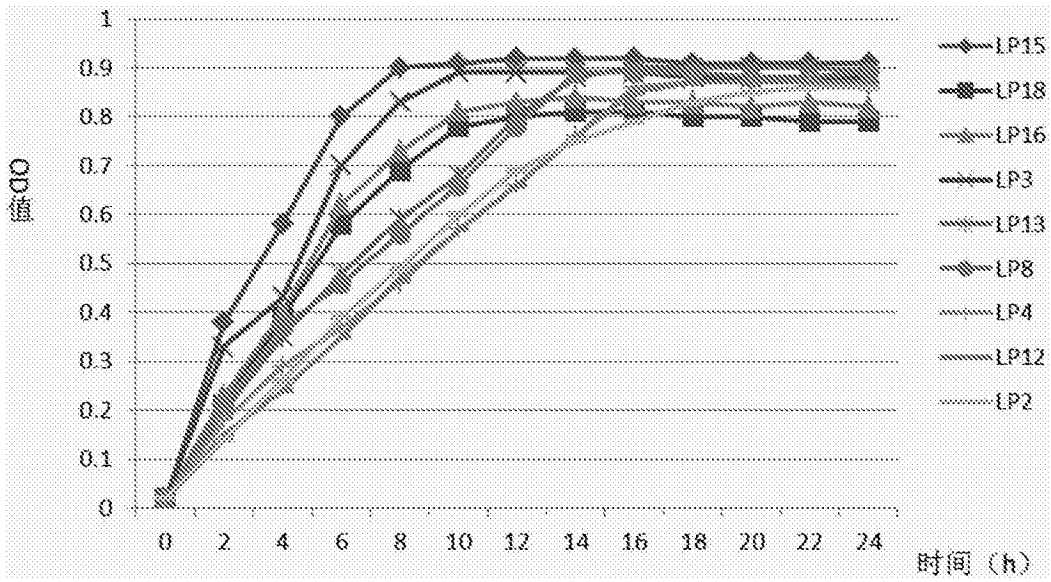


图3

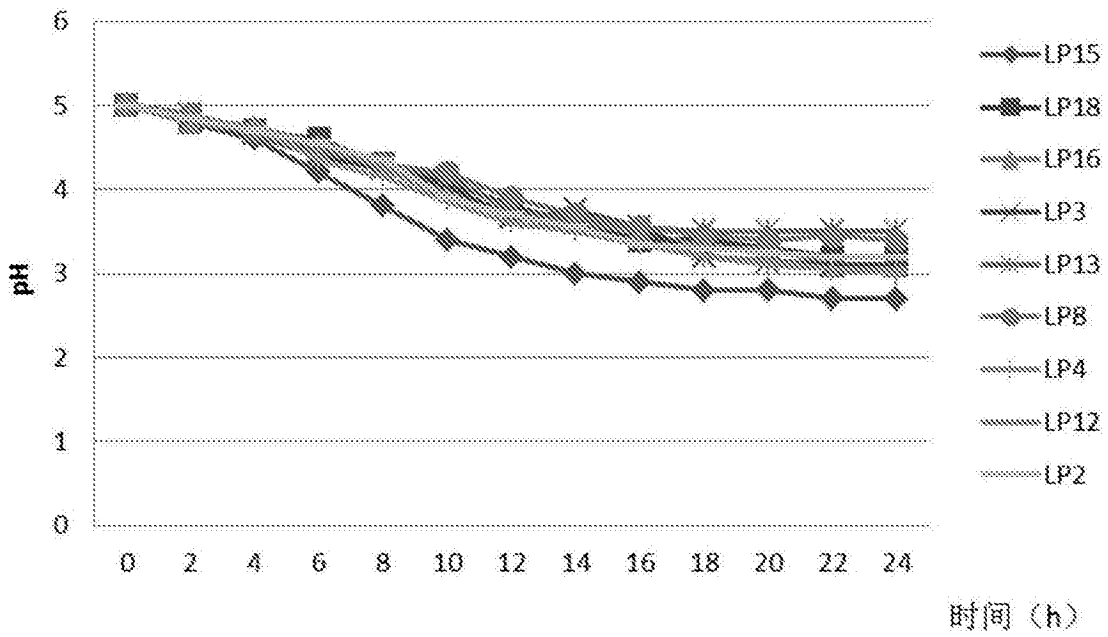


图4