

植物乳杆菌荚膜缺陷型菌株的诱变选育

周丹^{1,2} 曾宪鹏² 李盛钰² 赵玉娟² 张雪² 谢达平¹ 杨贞耐^{2*}

(1. 湖南农业大学生物安全科学技术学院 湖南 长沙 410128)

(2. 吉林省农业科学院农产品加工研究中心 吉林 长春 130033)

摘要: 以自主分离和鉴定的产荚膜多糖植物乳杆菌 C88 为出发菌株, 采用亚硝基胍诱变、墨汁负染和显微镜观察筛选获得一株荚膜缺陷型突变株, 命名为植物乳杆菌 C88M3, 经多次传代突变菌株具有良好的遗传稳定性。通过 16S rDNA 序列分析、菌株生长曲线和 RAPD 分析比较了野生型菌株和荚膜缺陷型菌株在遗传特性和产荚膜情况方面的差异。通过化学诱变方法获得了乳杆菌荚膜缺陷型菌株, 对进一步研究荚膜多糖在乳杆菌益生性中的功能和作用机制具有重要意义。

关键词: 乳杆菌, 荚膜多糖, 诱变

Mutagenesis and Breeding of Capsule-deficient *Lactobacillus plantarum*

ZHOU Dan^{1,2} ZENG Xian-Peng² LI Sheng-Yu² ZHAO Yu-Juan² ZHANG Xue²
XIE Da-Ping¹ YANG Zhen-Nai^{2*}

(1. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(2. Center of Agro-food Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033, China)

Abstract: The capsular polysaccharides-producing *Lactobacillus* strain isolated from traditional fermented products was used in this study. Using *Lactobacillus plantarum* C88 as an original strain for treatment with nitrosoguanidine and screening with negative staining, the capsule-deficient mutant strain was obtained, it was named *L. plantarum* C88M3. On the basis of the results of 16S rDNA sequence analysis, growth test and RAPD analysis, compared with the wild type strain C88, the mutant strain C88M3 showed the difference in genetic characteristics and capsular polysaccharide production. In this paper, a capsule-deficient mutant strain was obtained by inducing mutation methods, and the results of this work would provide further insight into the function and mechanism of probiotic action.

Keywords: Lactobacilli, Capsular polysaccharide, Mutagenesis

乳酸菌的益生性与荚膜多糖、细胞膜脂肪酸和表面蛋白等细胞表面分子关系十分密切^[1-3]。荚膜多糖通过对菌体的保护作用提高菌株对各种不良环境

(低 pH、高胆盐和渗透压等)的抵抗能力, 增强菌株的耐受性。荚膜多糖能够改善乳酸菌细胞表面特性(如疏水性、表面电荷和自聚合能力等), 增强乳酸菌

细胞与肠道的黏附性, 提高菌株的定殖能力。目前, 有关致病菌荚膜多糖的结构和功能方面有学者做了大量研究工作^[4-5]。但对于乳酸菌产荚膜多糖的研究报道较少, 这主要与过去对肠道致病菌的重视而忽视益生菌的作用有很大关系。随着益生菌在人类生活中起的作用和受到重视程度越来越大, 对益生菌荚膜多糖的功能及其作用机理的研究也迫在眉睫。

获得缺陷型菌株的常见方法有在基因组水平上构建缺陷型菌株, 包括转座子突变、同源重组和反义 RNA 技术等^[6-7]。国外近些年研究较多的是利用同源重组方法阻断某些关键基因获得缺陷型。但与一些常用基因工程菌如大肠杆菌、酵母菌等相比, 乳酸菌作为基因工程菌的研究起步较晚, 技术不够成熟。另一方面乳杆菌表达型质粒载体存在种类较少、载体电击转化效率低及在宿主乳杆菌中表达量少等缺点, 给基因工程菌的构建带来一定难度。

亚硝基胍是一种相当有效的化学诱变剂, 能大大提高突变频率, 操作简便, 一次性可处理大量材料, 所以常采用亚硝基胍诱变获得突变菌株^[8]。为了进一步探讨荚膜多糖在乳酸菌益生性中的作用和机制, 本研究对自主筛选获得的一株具有潜在益生性的产荚膜多糖植物乳杆菌 C88, 通过化学诱变筛选得到一株荚膜缺陷型菌株, 并比较了野生型菌株 C88 和荚膜缺陷型菌株 C88M3 在遗传特性和产荚膜情况方面的差异。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

植物乳杆菌 C88 为本实验室保藏菌株, 分离自内蒙古传统发酵奶豆腐, 经表型、生理生化、API 试验和 16S rDNA 鉴定为植物乳杆菌。菌株在含 30% (V/V) 甘油的 MRS 培养基中^[9], -80°C 冻存。

MRS 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 牛肉膏 10, 无水乙酸钠 5, 柠檬酸钠 5, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4$ 0.05, 葡萄糖 20, 吐温 80 1 mL, pH 6.6, 若配置固体培养基则加入 15 g 琼脂粉。

SDM 培养基^[10](g/L): 胰蛋白胨 10, 无水乙酸钠 5, 柠檬酸钠 5, K_2HPO_4 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05, 吐温 80 1 mL, 葡萄糖 20, 酵母

氮源混合液(无氨基酸氮源 5 g、L-His 10 mg、L-Met 20 mg、L-Try 20 mg), pH 6.6。

1.2 主要仪器与试剂

超净工作台 BCN-1360B (北京东联哈尔仪器制造有限公司), 光学显微镜 BX51 (Olympus), PCR 仪 Mastercycle gradient (Eppendorf), 电泳仪(北京六一仪器厂), 凝胶成像分析系统 AlphaImager HP (深圳市宇德立生物科技有限公司), 亚硝基胍(NTG) 1 g/L 溶液(上海润成生物科技有限公司), QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 公司), 蛋白酶 K (Clontech Laboratories 公司), Ex Taq 酶(Clontech Laboratories 公司)。引物合成与序列测定由北京华大基因公司完成。其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 植物乳杆菌 C88 的化学诱变: 取对数生长期的植物乳杆菌 C88 菌液 7 份制备单细胞菌悬液(约 10^9 CFU/mL), 加入 1 g/L 的亚硝基胍溶液, 使菌悬液亚硝基胍终浓度分别为 0、200、300、400、500、600 和 700 mg/L。37°C 培养箱处理 45 min 后, 用灭菌生理盐水洗涤 3 次, 离心(6000 r/min, 4°C, 10 min), 除去亚硝基胍, 终止诱变。加入 5 mL MRS 液体培养基, 37°C 下培养 2 h, 然后取样稀释涂布于 MRS 琼脂平板, 37°C 下培养 40 h 后菌落计数, 计算致死率, 确定最佳诱变剂量并挑取该诱变剂量下菌落进行筛选。

1.3.2 荚膜缺陷型菌株的筛选: 荚膜缺陷型菌株的筛选采用墨汁负染法, 在光学显微镜下观察诱变菌株表面是否包被荚膜。在 Ferreira 等^[11]方法的基础上, 略加调整, 具体如下: 挑取单菌落置于洁净载玻片上, 加一滴印度墨水, 用盖玻片轻轻涂布均匀, 室温下自然风干后, 甲醇固定, 加一滴结晶紫染色, 自然风干后, 用流水轻轻冲洗, 吹干, 光学显微镜下观察。

1.3.3 16S rDNA 的克隆、测序和分析: 植物乳杆菌 C88 及其荚膜缺陷型菌株基因组 DNA 的提取参照文献[12]进行。16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增引物是 16SF (5'-TGAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 16SR (5'-CATCGACCTCACGCTTATC-3')。PCR 扩增条件: 94°C 8 min; 94°C 1 min, 55°C 1.5 min, 72°C 1.5 min, 34 个循环; 72°C 8 min。PCR 扩增产物连入克隆载体 pMD18-T 并测序。序列相似性比较采用

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 软件在线分析。多序列比对采用 Clustal W 程序在线分析 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>)。

1.3.4 RAPD 分析: 以植物乳杆菌 C88 和荚膜缺陷型菌株基因组 DNA 为模板, 按文献[13]设计的寡核苷酸序列为随机引物进行 RAPD-PCR 扩增。设计的寡核苷酸引物分别为: Z1 (5'-TAATCACTGT-3'), Z2 (5'-TAGTCACTGT-3'), Z3 (5'-TGGTCACTGT-3'), Z4 (5'-CGGTCACTGT-3'), Z5 (5'-CGGCCACTGT-3'), Z6 (5'-CGGCCCTGT-3'), Z7 (5'-CCGGCGGCG-3'), Z8 (5'-ACGCGCCCT-3'), Z9 (5'-CCGAGTCCA-3')。PCR 反应体系: 10×Ex Buffer 2.5 μL, dNTPs 2 μL, 单链引物 2 μL, Ex Taq 酶 0.2 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 17.3 μL, 总反应体系 25 μL。PCR 反应程序采用: 94°C 5 min; 94°C 40 s, 36°C 60 s, 72°C 90 s, 40 个循环; 72°C 5 min。扩增完毕, 0.5 mg/L EB 染色, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳后, 转入凝胶成像系统上分析, 实验重复 2 次。

1.3.5 生长曲线: 将植物乳杆菌 C88 和荚膜缺陷型菌株以 3% 接种量接入装有 500 mL SDM 液体培养基的三角瓶中, 37°C 培养, 每隔 8 h 取样稀释涂布于 MRS 琼脂平板, 37°C 培养 48 h 后, 菌落计数。同时每隔 8 h 吸取 50 mL 培养液测定 pH, 并提取黏液多糖 (SPS) 和荚膜多糖 (CPS)。每个试验设 2 次重复。黏液多糖和荚膜多糖提取参照文献[14]的方法进行。多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[15]。

2 结果与分析

2.1 亚硝基胍化学诱变

选择不同浓度的亚硝基胍对植物乳杆菌 C88 进行化学诱变, 计算致死率, 以确定最佳诱变剂量, 结果见图 1。一般认为较高的致死率更有利于缺陷型突变菌株的产生, 以 90% 或更高的致死率为好。由图 1 可知, 植物乳杆菌 C88 对亚硝基胍非常敏感, 200 mg/L 处理 45 min 时致死率就达到了 56.80%。当诱变浓度达到 600 mg/L、处理 45 min 时, 致死率为 93.52%, 故将亚硝基胍诱变浓度确定为 600 mg/L。

2.2 荚膜缺陷型菌株的筛选

以植物乳杆菌 C88 为出发菌株, 在亚硝基胍浓度为 600 mg/L 处理 45 min 的条件下分 5 批对菌液进行诱变处理, 挑取 MRS 琼脂平板上的 150 株菌用

墨汁负染法快速染色并镜检, 最终获得一株荚膜多糖缺陷型突变菌株。突变菌株经多次传代(超过 10 次)遗传性状稳定。将该诱变缺陷型菌株命名为: 植物乳杆菌 C88M3。由图 2 可知, 经结晶紫染色后的野生型菌株菌体呈紫色, 背景呈黑色, 荚膜因不能着色而在菌体周围形成白色亮带, 而荚膜缺陷型菌株菌体周围未见荚膜亮带。

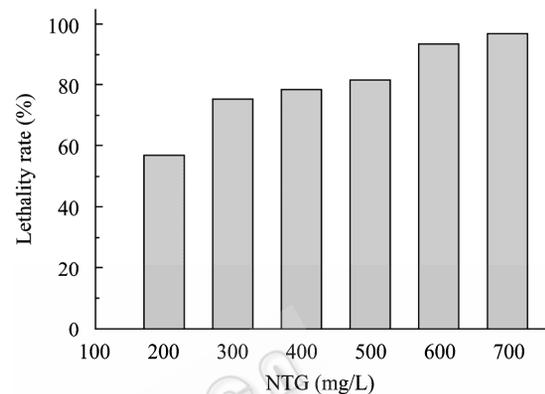


图 1 植物乳杆菌 C88 野生型菌株经亚硝基胍诱变处理 45 min 后的致死率

Fig. 1 Lethality rate of original strain *L. plantarum* C88 after treatment with nitrosoguanidine for forty-five minutes

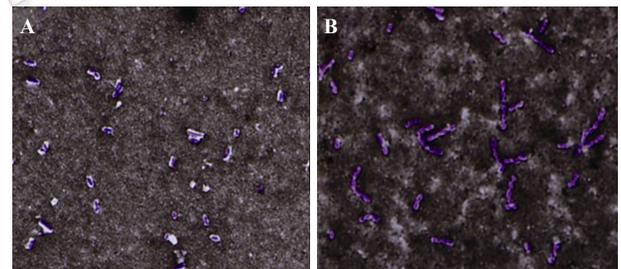


图 2 产荚膜多糖野生型菌株 C88 (A) 和荚膜多糖缺陷型菌株 C88M3 (B) 负染后的光学显微镜照片 (× 4000)

Fig. 2 Optical micrographs of CPS-producing strain C88 (A) and capsule-deficient mutant strain C88M3 (B) after negative staining (× 4000)

2.3 荚膜缺陷型菌株的鉴定

利用乳酸菌 16S rDNA 引物对 16SF2 和 16SR2, 应用 PCR 技术从菌株 C88 及其荚膜缺陷型菌株 C88M3 基因组 DNA 中扩增到预期大小的特异片段, 将扩增到的特异片段经纯化、克隆、测序, 结果表明: 16S rDNA 基因扩增片段含有 1474 bp, 该片段的序列分析结果表明, 该片段与已报道的植物乳杆菌 16S rDNA 部分序列同源率均达到 99% 以上, 而与其他组的乳酸菌 16S rDNA 序列的同源率均低于 96%。故认为菌株为植物乳杆菌 (*L. plantarum*)。而 C88 与

其荚膜缺陷型菌株 C88M3 16S rDNA 序列同源性达 100%。

2.4 菌株生长特性与产糖情况比较

从图 3 可以看出, 植物乳杆菌 C88 可同时产黏液多糖(SPS)和荚膜多糖(CPS)两种胞外多糖。在对数生长期和稳定期(32 h 前), SPS 和 CPS 随活菌数增加而增加, SPS 在稳定期末(32 h)达到最大量为 22.8 mg/L。延长培养时间, SPS 产量开始下降, 培养 56 h 后, SPS 产量下降到 14.6 mg/L。而 CPS 的产量随发酵时间延长而增加, 培养 32 h 时, CPS 产量达到 15.2 mg/L, 32 h 后 CPS 产量迅速降低。活菌数在 16 h 达到最高(log CFU/mL = 9.79), 培养 56 h 后活菌数仍然超过 10^8 (log CFU/mL = 8.48)。培养基中的 pH 值在前 16 h 迅速下降, 在 32 h 降至 3.7。

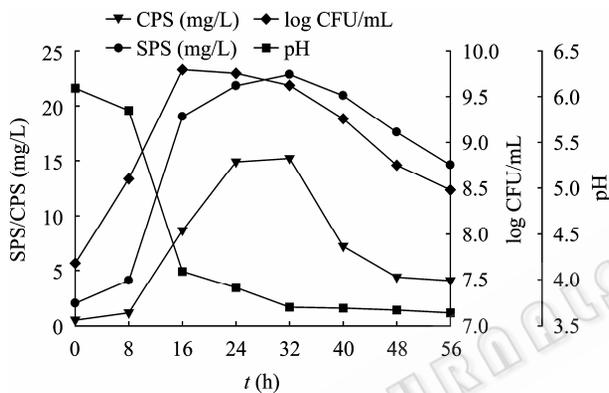


图 3 植物乳杆菌 C88 发酵曲线

Fig. 3 Fermentation curves of *L. plantarum* C88

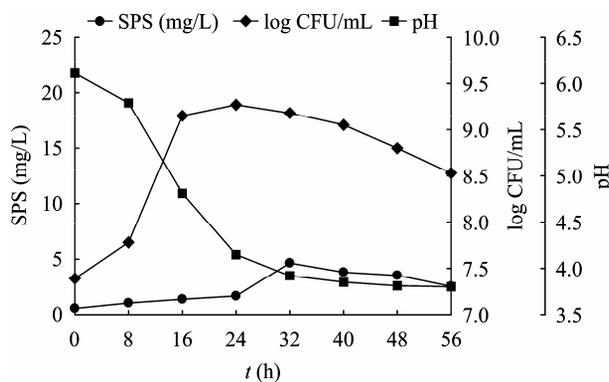


图 4 荚膜缺陷型植物乳杆菌 C88M3 发酵曲线

Fig. 4 Fermentation curves of CPS-deficient strains *L. plantarum* C88M3

由图 4 可见, 荚膜缺陷型菌株 C88M3 在培养过程中未检测到 CPS, 发酵 32 h 只产生少量黏液多糖(4.6 mg/L), 说明 C88M3 为不产 CPS 的菌株。

C88M3 菌株生长情况与野生型菌株(植物乳杆菌 C88)相比存在差异。活菌数在 24 h 时才达到最高值(log CFU/mL = 9.27), 比野生型菌株延后了 8 h, 培养 56 h 后活菌数超过 10^8 (log CFU/mL = 8.53)。培养基中的 pH 值在前 24 h 迅速下降, 在 48 h 达到 3.8。而在 8–16 h, 荚膜缺陷型菌株 C88M3 培养基中 pH 值下降速度明显低于野生型菌株 C88, 表明这一阶段 C88M3 菌株产酸较 C88 菌株慢。

2.5 RAPD 分析

在多条单链引物中筛选得到 DNA 扩增条带较多且稳定的 6 条引物, 分别为 Z3、Z5、Z6、Z7、Z8、Z9, 逐一与 C88 和 C88M3 基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 1.5%琼脂糖凝胶电泳后得图谱。如图 5 所示, 植物乳杆菌 C88 与各引物扩增的条带数为 6–11 条, 而荚膜缺陷型菌株 C88M3 的仅为 1–8 条, 扩增片段的 DNA 分子量主要在 500–2400 bp 之间。Z6、Z7、Z8 引物下, 两株菌 DNA 随机扩增条带数相同且亮度接近, 说明其 DNA 具有高度的同源性。而在 Z3、Z5、Z9 引物下, 植物乳杆菌 C88 DNA 随机扩增条带明显多于荚膜缺陷型菌株 C88M3, 说明两株菌在基因水平上存在差异。

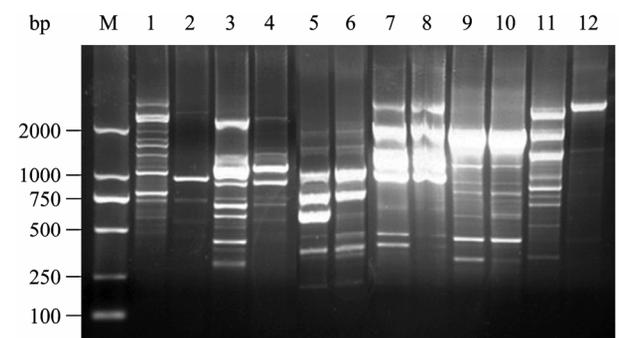


图 5 植物乳杆菌野生型菌株 C88 和荚膜缺陷型菌株 C88M3 RAPD 分析

Fig. 5 RAPD analysis of wild-type strain C88 and CPS-deficient mutant strain C88M3

注: M: DNA marker DL2000; 1、3、5、7、9、11: 植物乳杆菌 C88; 2、4、6、8、10、12: 植物乳杆菌 C88M3。引物使用情况: 1、2: Z3; 3、4: Z5; 5、6: Z6; 7、8: Z7; 9、10: Z8; 11、12: Z9。

Note: M: DNA marker DL2000; 1,3,5,7,9,11: *L. plantarum* C88; 2,4,6,8,10,12: *L. plantarum* C88M3. Primer: 1,2: Z3; 3,4: Z5; 5,6: Z6; 7,8: Z7; 9,10: Z8; 11,12: Z9.

3 讨论

在亚优化生长条件下, 微生物出于对自身的保护作用, 可分泌多糖于细胞外, 有的多糖黏于细胞

表面形成荚膜多糖(Capsular polysachardes, CPS),有的分泌至周围培养基中形成黏液多糖(Slime polysaccharides, SPS)。胞外多糖是这两类多糖的总称。胞外多糖的形成有利于微生物抵抗不良环境因素如干燥条件、抗生素或有毒物质作用、渗透压作用以及巨噬细胞或噬菌体的侵袭等。目前,人们已经从乳酸菌中筛选出了多株同时产黏液多糖和荚膜多糖的菌株,如鼠李糖乳杆菌 GG、植物乳杆菌 EP56 和 162RM 等^[16-18]。胞外多糖的形成有利于细胞抵抗低 pH 和高胆盐环境,可以延长菌株的存活时间,提高菌株的存活率。Alp 等^[19]研究了胞外多糖在双歧杆菌株耐受低 pH 和胆盐的作用,表明双歧杆菌产胞外多糖对肠道生态系统有很好的保护作用。另外,一些研究表明胞外多糖能够改善细胞表面的疏水性和表面电荷,能够显著增强细胞与肠道的黏附能力,有利于菌株在肠道上皮的定殖^[4,20-22]。因此,胞外多糖在乳酸菌发挥益生特性中的作用至关重要,可以将产胞外多糖与否作为筛选益生菌的一个重要指标^[23]。本研究通过化学诱变方法筛选获得荚膜缺陷型菌株,这对进一步研究乳杆菌耐受不良环境因素和定殖作用中细胞表面荚膜多糖的特定功能,揭示乳酸菌的益生作用机理奠定了基础。

通常情况下,可以通过电镜观察乳酸菌的荚膜。Dabour 等^[24]用透射电镜观察钨红染色的乳酸球菌的荚膜清晰可见。Robitaille 等^[25]用荧光染色的方法在透射电镜下观察 *S. thermophilus* MR-1C, 可以看到无定形的荚膜结构。但是观察需要对样品固定等处理,实验操作复杂,费用也较高,不适合荚膜的快速检测。而使用激光共聚焦扫描显微技术可以在乳的培养基中直接观察到荚膜与水的结合形式,不需要对样品固定^[26]。乳酸菌的荚膜也可以在光学显微镜下观察到。传统的细菌荚膜染色法有 Hiss 法、Muir 法、墨汁负染法以及常用的吕氏美蓝染色法等。本研究通过改进的墨汁负染法,在光学显微镜下可以清晰的观察到荚膜,这种方法简单、快速,适合实验室对产荚膜乳酸菌进行筛选。

参 考 文 献

- [1] Vélez MP, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, **276**(2): 140-148.
- [2] Paul C, Colin H. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, **67**(3): 429-453.
- [3] Maurilia R, Ascencio F, Conway P. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, **68**(5): 2330-2336.
- [4] Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, et al. Effect of exopolysaccharide isolated from "Viili" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *Journal of Dairy Science*, 2006, **89**(7): 2355-2358.
- [5] Magalhães A, Gomes J, Ismail MN, et al. Fut2-null mice display an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated *Helicobacter pylori* adhesion to gastric mucosa. *Glycobiology*, 2009, **19**(12): 1525-1536.
- [6] Lebeer S, Verhoeven TLA, Francius G, et al. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied and Environment Microbiology*, 2009, **75**(11): 3554-3563.
- [7] Bouazzaoui K, LaPointe G. Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **65**(2): 216-225.
- [8] 张春玲. 紫外线与亚硝基胍复合诱变选育高产海藻糖菌株的研究. *食品科学*, 2009, **30**(21): 188-191.
- [9] De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 1960, **23**(1): 130-135.
- [10] Kimmel SA, Roberts RF. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, **40**(1/2): 87-92.
- [11] Ferreira EO, Falcão LS, Vallim DC, et al. Bacteroides fragilis adherence to Caco-2 cells. *Anaerobe*, 2002, **8**(6): 307-314.
- [12] Bouazzaoui K, LaPointe G. Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **65**(2): 216-225.
- [13] Johansson ML, Quednau M, Molin G, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, **21**(3): 155-159.
- [14] Yang Z, Li S, Zhang X, et al. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: potential application in fermented milk products. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, **110**(1): 53-57.

- [15] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, **28**(3): 350–356.
- [16] Landersjö C, Yang Z, Huttunen E, *et al.* Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG(ATCC 53103). *Biomacromolecules*, 2002, **3**(4): 880–884.
- [17] Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 2003, **154**(10): 705–712.
- [18] François ZN, Ahmed NE, Félicité MT, *et al.* Effect of ropycapsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese. *African Journal of Biotechnology*, 2004, **3**(10): 512–518.
- [19] Alp G, Aslim B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide(EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 2009, **16**(2): 101–105.
- [20] Doco T, Wieruszkeski JM, Fournet B, *et al.* Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydrate Research*, 1990, **198**(2): 313–321.
- [21] Oda M, Hasegawa H, Komatsu S, *et al.* Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* ssp.. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1983, **47**(7): 1623–1625.
- [22] Looijesteijn PJ, Trapet L, Vries E, *et al.* Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, **64**(1/2): 71–80.
- [23] Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, *et al.* Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of *Bifidobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, **91**(4): 351–372.
- [24] Dabour N, LaPointe G, Benhamou N, *et al.* Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *International Dairy Journal*, 2005, **15**(10): 1044–1055.
- [25] Robitaille G, Moineau S, St-Gelais D, *et al.* Detection and quantification of capsular exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* using lectin probes. *Journal of Dairy Science*, 2006, **89**(11): 4156–4162.
- [26] Hassan AN, Frank JF, Farmer MA, *et al.* Observation of encapsulated lactic acid bacteria using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*, 1995, **78**(12): 2624–2628.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。