

乳酸菌增菌培养基的营养因子优化

柏建玲,莫树平,郑婉玲,贺鹰传

(广东省微生物研究所,广东广州,510070)

摘 要 以改良 MRS 发酵培养基为基础,选择玉米浆、牛肉膏、乳糖、番茄汁、胨蛋白胨等 7 个营养因子增菌培养乳酸菌进行优化。利用 $L_8(2^7)$ 正交实验,优化出培养基营养因子最佳组成是:玉米浆 3%、牛肉膏 1%、乳糖 1%。研究表明,嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、嗜酸乳酸菌,在优化后的 MRS 培养基发酵液中,37℃ 培养 20 h,菌落数均高于原 MRS 培养基发酵液的菌落数,达到 10^9 cfu/mL 以上,乳酸菌发酵液得到了浓缩,大大降低了乳酸菌发酵培养基的成本,原料成本降低了约 40%。

关键词 乳酸菌,营养因子,优化培养

随着人民生活水平的提高和健康意识的增强,乳酸菌类保健食品和药品引起人们广泛关注。1986 年,法国 ST. Hubert 公司,从日本森永奶厂引进生产技术,扩大了双歧杆菌酸奶销路;中国自 1980 年代开始生产乳酸菌制品。早期乳酸菌制品还是以液体状态产品出现,活菌保存期短及活菌数量很难提高,难以保证产品中的活菌数。后来日本发明了“表飞鸣”药品,治疗胃肠道疾病取得良好效果,但此药是死菌制剂,后又采取“冻干”技术生产“新表飞鸣”,但价格昂贵。

用冻干菌粉生产出来的产品越来越受到重视,经乳酸菌培养基 MRS 培养、收集菌体制成的冻干菌粉,菌数高达 10^{10} cfu/mL,但其生产成本较高,这除了与繁琐的发酵生产工艺有关外,菌种营养要求高是导致生产原料昂贵的主要原因。如用于幼儿肠胃保健的乳酸菌活菌制剂——“妈咪爱”,价格昂贵,仅能作为药品出售。日本的“新表飞鸣”采用冷冻真空法,生产乳酸菌活菌干燥粉,其生产成本非常高(生产成本一度每高达 500 美元/kg),且菌粉还需升高温度,经过及乳酸菌复壮过程。

为了降低成本,提高制品的活菌数,实验主要对原 MRS 培养基进行了优化及选择廉价的原料为营养添加剂,旨在选出适合的最佳营养因子组成。

1 材料与方法

1.1 菌 种

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) ATCC4356。

第一作者:硕士,助理研究员。

收稿日期:2006-11-06, 改回日期:2006-12-30

嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) ATCC1987。

保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) ATCC11842。

1.2 培养基

1.2.1 菌种培养传代培养基及计数培养基(MRS)

胨蛋白胨 1%,牛肉膏 1%,乳糖 1%,酵母浸膏 0.5%,葡萄糖 1%,柠檬酸铵 0.2%,乙酸钠 0.5%,
 $MgSO_4$ 0.01%, $MnSO_4$ 0.005 %, K_2HPO_4 0.2%, Tween80 0.1%。番茄汁 10%, pH 6.2~6.5。

1.2.2 单因子试验和正交试验基础培养基(改良 MRS)

酵母浸膏 0.5%, 柠檬酸铵 0.2%, 乙酸钠 0.5%, $MgSO_4$ 0.01%, $MnSO_4$ 0.005 %, K_2HPO_4 0.2%, Tween80 0.1%。pH 6.2~6.5。

将 MRS 培养基中以上配方固定,采用 7 个因子 2 个位级的正交表 $L_8(2^7)$ 设计试验优化其他营养因子,因素水平见表 1。

表 1 营养因子优化正交试验因素水平表 $L_8(2^7)$

因 素	水平 1(添加量)/%	水平 2(添加量)/%
葡萄糖	0	1
乳 糖	0	1
番茄汁	0	10
马铃薯汁	0	10
牛肉膏	0	1
玉米浆	0	3
胨蛋白胨	0	1
帕拉金糖	0	1

1.3 番茄汁的制备

将番茄 500 g 洗净,加水打碎,煮 0.5 h,过滤得到 500 mL 汁液(若不足,加水补足)。

1.4 马铃薯汁的制备

将 500 g 马铃薯洗净,加水打碎、煮 0.5 h,过滤得到 500 mL(若不足,加水补足)。

1.5 乳酸菌菌落测定方法

稀释平板计数法(37℃,抽真空后充氮气培养)。

2 结果与分析

2.1 单因子试验

用添加不同营养因子的培养基(作为对照)分别接种嗜酸乳杆菌,37℃发酵培养 20 h,用平板计数法(无氧培养)检测,研究不同营养因子对嗜酸乳杆菌发酵液菌数的影响,结果见表 2。

表 2 嗜酸乳杆菌单因子试验结果

营 养 因 子	菌落数 $\times 10^{-7}/\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照	8.3
葡萄糖	11.1
乳 糖	12.8
番茄汁	10.8
马铃薯汁	15.5
牛肉膏	14.1
玉米浆	17.9
胨蛋白胨	11.2
帕拉金糖	10.1

由表 2 中可以看出,添加不同营养因子培养基的菌落数和对照相比,不同营养因子对嗜酸乳杆菌生长

影响大小顺序为:玉米浆>马铃薯汁>牛肉膏>乳糖>胨蛋白胨>葡萄糖>番茄汁>帕拉金糖,对嗜酸乳杆菌生长影响最大的营养因子是牛肉膏,影响最小的因素是帕拉金糖。但是仅添加一种营养因子进行发酵,发酵水平不高,发酵液菌数均较低(10^8 cfu/mL 左右),需要通过正交试验进一步优化各种营养因子进行组合,以期达到较高的发酵水平。

2.2 正交试验

培养基中共取 7 个营养因子:牛肉膏、乳糖、番茄汁、马铃薯汁、葡萄糖、玉米浆、胨蛋白胨。

采用 7 个因子 2 个位级的正交表 $L_8(2^7)$ 设计试验,接种嗜酸乳杆菌采用二级发酵试验,37℃发酵培养 20 h,测定发酵液中嗜酸乳杆菌活菌数并进行分析。实验方案及结果分析见表 3。

由 7 个因子的 R 值,得出它们作用的主次顺序为:玉米浆>牛肉膏>乳糖>胨蛋白胨>马铃薯汁>番茄汁>葡萄糖。玉米浆的 R 值稍高于其他因子,是影响乳酸菌生长浓度的主要因素,而因子葡萄糖的 R 值远远小于其他,说明其变化对发酵液菌体浓度的影响较小。结合成本等其他实际情况,优化的发酵高浓度培养基最佳营养因子组成是:玉米浆 3%、牛肉膏 1%、乳糖 1%。

表 3 嗜酸乳杆菌营养因子正交试验结果及分析

试验号	牛肉膏	乳糖	番茄汁	马铃薯汁	葡萄糖	玉米浆	胨蛋白胨	菌落数/cfu · mL ⁻¹	菌落数对数 log (cfu/mL)
A	1	1	1	2	2	1	2	4.7×10^8	8.67
B	2	1	2	2	1	1	1	5.6×10^8	8.75
C	1	2	2	2	2	2	1	1.3×10^8	8.11
D	2	2	1	2	1	2	2	1.1×10^7	7.04
E	1	1	2	1	1	2	2	1.1×10^8	8.04
F	2	1	1	1	2	2	1	3.7×10^8	7.59
G	1	2	1	1	1	1	1	2.4×10^8	8.38
H	2	2	2	1	2	1	2	3.9×10^7	7.59
k_1	33.20	33.05	31.68	31.60	32.21	33.39	32.83		
k_2	30.97	31.12	32.49	32.57	31.96	30.78	31.34		
极差 R	2.23	1.93	0.81	0.97	0.25	2.61	1.49		

注:表中“1”代表不加,“2”代表添加。

2.2.3 不同乳酸菌发酵营养因子的最佳组合

利用正交试验所优化培养基组成(即:玉米浆 3%、牛肉膏 1%、乳糖 1%,加其他盐),进一步用 3 种乳酸菌进行发酵试验,验证培养基的发酵增菌效果,并与 MRS 培养基进行比较,分别接种 3 种乳酸菌,37℃发酵培养 20 h,用平板计数法(无氧培养)进行检测,均进行 3 次发酵,测定发酵液菌落数,结果见表 4。

表 4 三种乳酸菌发酵液的菌落数 cfu/mL

菌 种	MRS 培养基	优化 MRS 培养基
<i>L. acidophilus</i>	6.5×10^8	3.1×10^9
<i>S. thermophilus</i>	9.3×10^8	5.6×10^9
<i>L. bulgaricus</i>	5.6×10^8	1.4×10^9

注:优化 MRS 培养基是经正交试验优化后所得。

由表 4 可知,在优化后的培养基上发酵 3 种乳酸菌,发酵液中菌落数均高于原 MRS 培养基发酵液的

菌落数,均达到 10^9 cfu/mL 以上。更重要的是,优化后的培养基利用的营养因子为:玉米浆 3%、牛肉膏 1%、乳糖 1%;原 MRS 培养基的营养因子配比为:胨蛋白胨 1%,牛肉膏 1%,乳糖 1%,葡萄糖 1%,番茄汁 10%,其中胨蛋白胨价格昂贵(零售价格约 160 元/kg),而优化后培养基的主要营养因子为玉米浆,其为生产玉米蛋白的副产品,价格低廉(价格约 5~6 元/kg),进行酸处理后成本也不过 7~8 元/kg。因此,优化后的 MRS 培养基成本降低约 40%,大大降低了乳酸菌发酵原料成本。

3 讨 论

通过正交试验优化了乳酸菌发酵培养基,用价格低廉的原料(如玉米浆等)代替了价格昂贵的原料(如胨蛋白胨),用其发酵嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌等,发酵液中菌落数均高于原 MRS 培养基发酵液的菌落数,达到 10^9 cfu/mL 以上,取得了较好的效果,大大降低了乳酸菌的发酵成本,对乳酸菌

保健食品的开发具有实际意义。

参 考 文 献

- 1 Neij W C. Determination of growth parameters of lactococci in milk and ultra-filtered milk[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78: 17~23
- 2 王 禾,韩春然,王金凤. 蔬菜乳酸发酵菌株的筛选及培养条件的研究[J]. 食品科学, 1999(1): 39~41
- 3 吴 定等. 不同酸性条件对保加利亚乳杆菌存活性影响[J]. 食品科学, 2000, 21(6): 25~30
- 4 万红兵. 嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌麦芽复合汁增菌培养基的优化筛选[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 52~55
- 5 刘丹,潘道东. 直投式乳酸菌发酵剂增菌培养基的优化[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 204~207
- 6 郭清泉,张兰威,林淑英. 酸奶发酵机理及后酸化控制措施[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(2): 80~83
- 7 朱俊晨. 厌氧青春双歧杆菌在复合蔬菜汁中发酵工艺的研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(1): 37~39, 47
- 8 刘振民,骆承庠. 乳酸菌发酵剂生物工程技术[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(4): 68~72

Optimization of the Nutrient Factors for Lactic Acid Bacteria Enrichment Medium

Bai Jianling, Mo Shuping, Zheng Wanling, He Yingtuan

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

ABSTRACT In the paper, we used the improved MRS as a basic medium and considering seven nutrient factors in optimizing the enrichment medium of lactic acid bacteria. The optimum nutrient factors were determined by orthogonal experiment as follows: 3% corn syrup, 1% beef extract, 1% lactose. The results showed that: The living-cell number of *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* was over 10^9 cfu/mL, cultivating for 20 hours in the optimum MRS medium at 37°C. The production cost was decreased about 40% compared with that of using MRS medium.

Key words lactic acid bacteria, nutrient factors, optimization culture

信 息 窗

日本以环保理念设计食品包装机械

日本食品包装已不只是一要看和实用,还要考虑环保,包装食品尽量以不污染环境为原则,如用纸袋取代塑料容器。日本 90% 的牛奶都是以有折痕线条的纸包装出售。这种包装袋容易压扁,不但生产成本低,而且能够减少占用空间,日本最常见的饮料包装通过机械制作后是一种底部可撕开的特别设计的杯形容器。在撕开底部后,人们能够轻易地把容器压扁,方便送往再循环。还有一种衬袋盒,其主要目的就是要让人们能够轻易地把纸盒和袋子分开,送去再循环时就较容易处理了。目前,日本市场上的酒类饮料通过机械化包装后,大半是采用这类包装。

被日本消费者接受的新包装设计是立式袋。由于开袋子比开瓶子更容易使内部液体溢出,因此这种袋子的开口都特别设计,方便打开。这类袋子取代了塑料瓶,其塑料使用量只及塑料瓶的 1/5。除了酒和饮料,日本市面出售的食油,很多也都是以复合纸包装出售的,大大减少了塑料的使用。

日本碗碟清洁剂的包装也一样重视环保。消费者第一次用完清洁剂后,能够在市场上买到以立式袋出售的清洁剂,再把清洁剂倒入原有的塑料容器中继续使用,使塑料容器不需丢掉。