

乳酸菌增菌培养基研究进展

邵秀丽, 张慎璞, 申顺先, 张 丹

(河南农业职业学院 园艺园林系, 河南 郑州 451450)

摘 要:乳酸菌具有抗菌、降低胆固醇、维持微生态系统平衡、抑癌和增强免疫力等重要生物学功能,且能赋予食品特殊的风味。为制备高活性乳酸菌培养基提供较经济实惠的培养基配方,现对乳酸菌多种增菌培养基配方的研究进展进行了综述,以期对乳酸菌制作提供参考。

关键词:乳酸菌;增菌;培养基

中图分类号:Q 939.11⁺7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0184-03

随着我国乳制品工业的发展,发酵乳制品以营养丰富、易于消化、健胃整肠、降低血清胆固醇、控制内毒素等诸多优点深受消费者青睐。而制备乳酸菌发酵剂首先必须要有好的培养基,而传统的液体发酵存在菌种扩大培养操作繁琐、周期长;菌种易污染、退化、变异、发酵剂活菌含量低($10^7 \sim 10^8$ mL)、生产接种量较大^[1]等众多弊端。因而研制经济实惠、易收获菌体且活菌数高的增菌培养基是众多研究者共同关注的问题。

1 基础培养基研究方面的进展

适合乳酸菌生长的基础培养基是制备发酵剂的前提,适宜的基础培养基应具备能够提供菌体生长必需的营养成分、来源广泛、价格低廉、细胞产率高、存活率高、易保持混合菌相平衡、适于菌体富集以及易于收获等特点。以往基础培养基大致分为 MRS 培养基、脱脂乳培养基、乳清蛋白培养基。

国外主要使用以乳清为原料的培养基,而国内主要使用以脱脂乳为原料的培养基。但乳清蛋白培养基中的乳清蛋白易发生热变性,产生沉淀,且活菌数不如脱脂乳培养基;脱脂乳培养基虽然经济易得、价格低廉,但是粘度大,菌体不易浓缩分离。其中 MRS 培养基增殖速度慢、价格贵。山丽杰等^[2]在浓缩型乳酸菌发酵剂制备中几个技术关键问题的探讨中指出,脱脂乳的价格较低,菌体细胞收获较困难,但添加柠檬酸盐可得到改善;对于乳清基质培养基,虽然调节 pH 值可避免热处理引起的蛋白质沉淀,但制备的发酵剂中乳酸菌活菌数约是同等条件下脱脂乳的 50%,MRS 培养基成本显著高于

前二者,约 1 600 元/t。

目前,随着酶技术的发展,脱脂乳酶解液已被用作基础培养基。李志成等^[3]在对乳酸菌基础培养基比较研究中得出,脱脂乳酶解液是保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌混合菌种较好的基础培养基,制备的冻干发酵剂的活菌数可达 3.5×10^{11} cfu/g,冻干发酵剂的重量是脱脂乳的 1.93 倍,所以不论是质量,还是数量,以脱脂乳酶解液作为乳酸菌的基础培养基优于脱脂乳培养基。随后,隋欣等^[4]在乳酸菌混合菌株基础培养基及增殖因子的筛选中用蛋白水解酶 I 和蛋白水解酶 II,分别于脱脂奶、乳清中进行酶解反应,来选择适宜乳酸菌生长的基础培养基,得出经蛋白水解酶 I 处理后的脱脂奶为最佳基础培养基。即将脱脂奶粉(10%左右)经蛋白水解酶 I 处理,控制一定的水解条件及水解时间,使其达到部分程度的水解(注:水解度的测定可用茆三酮等方法得出),经酶灭活后加入称量好的增殖因子,进行高压灭菌(121℃,15 min)即可制得。

由以上分析可知,最好的乳酸菌发酵剂基础培养基是脱脂乳酶解液培养基。此外,脱脂乳中大分子营养物质多,不易被菌体细胞利用,但加入酶后,酶分解或吸收了大分子而使其解液中的小分子物质较多,利于菌种的生长繁殖。在数量方面,一是由于脱脂乳大分子物质的缘故,其活菌数较少,二是由于脱脂乳本身是胶体悬浊液,黏度较高,不利于菌体细胞的沉积,而其酶解液却相反。总之,脱脂乳酶解液培养基是乳酸菌增菌基础培养基的发展方向,以后要加大对酶品种和特性的研究。

2 增菌培养基优化方面的研究

在生产中应用的乳酸菌增菌培养基有很多种,大致分为配制培养基、乳基质培养基和乳清基质培养基,而后二者因其增殖慢,或不易分离菌体而不宜采用,或常常又配合以其它生长因子方可使用。此外,据培养基 pH 值的调控方式可分为内外控型增菌液,外控型因需

第一作者简介:邵秀丽(1984-),女,河南濮阳人,讲师,现主要从事蔬菜栽培生理等研究工作。E-mail:shaoliulinihao@163.com。

基金项目:河南省教育厅自然科学研究资助项目(2007210027);国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(nyhyzx07-050)。

收稿日期:2014-01-24

要专用的自动控制发酵罐而受到限制,而内控型则是将适宜的缓冲盐类加于培养基中使用。

目前,从低成本的生产实际出发,对乳酸菌生长的营养物质、增菌因子及添加适宜的缓冲液进行综合研究,以得到最大菌数的生成量和最小成本的投入是研究的目的。故许多研究从增菌因子、培养条件和碳源、氮源替代物出发,寻求高效实惠的乳酸菌培养基。

2.1 营养因子的添加及筛选

许多研究者基于价格低、细胞产率高、存活率高,易收获和保持混合菌相平衡的基础上,对增菌培养基进行选择和优化。黄君红等^[5]在对乳酸菌的培养基进行筛选的试验中得出,在添加了胡萝卜汁的乳酸菌分离半固体培养基上,乳酸菌菌落出现早,生长最好,活菌数含量最高,菌落及溶钙圈最大。得出最优培养基配方:牛肉膏 1 g,蛋白胨 1 g,酵母膏 1 g,葡萄糖 1 g,番茄汁 20%,吐温-80 0.05%,CaCO₃ 2 g,溴甲酚绿 0.01%,琼脂 1.5 g,蒸馏水 100 mL,胡萝卜煮汁 40 g。张继英等^[6]在对不同选择性培养基对乳酸菌生长的影响试验中,也得出添加胡萝卜汁的乳酸菌分离半固体培养基最适合乳酸菌的培养,活菌数最多,菌落最大。

张兰威等^[7]通过研究发现,在脱脂乳与蛋白水解酶配合作为嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌的基础培养基中再加入番茄汁作为营养强化因子,嗜热链球菌还需加适量麦芽汁后,可大大提高菌落数量和质量;余华等^[8]采用正交实验对冻干保加利亚乳杆菌的增菌培养基进行了筛选,结果表明,在 MRS 基础培养基中添加体积分数为 10%的麦芽汁、体积分数 10%的番茄汁、质量分数为 1.0%的乳糖后,增菌培养基增菌效果明显,经增菌培养基培养所得活菌数是基础培养基的 202 倍,且菌活力也较基础培养基强,OD 值和滴定酸度分别是基础培养基的 5.6 倍和 1.3 倍。

隋欣等^[4]在乳酸菌混合菌株基础培养基及增殖因子的筛选试验中也得出,在经蛋白水解酶 I 处理后的 10%的脱脂奶中,添加适宜其富集培养的增殖因子:蛋白胨 0.8%、酵母粉 0.8%、吐温 0.1%、乳糖 0.5%,可大大促进乳酸菌的富集培养。付荣霞等^[9]对几种果蔬汁对乳酸菌增殖的影响中得出黄豆芽汁对乳酸菌的生长具有明显的促进作用。

2.2 营养因子的综合优化及研究

在添加营养因子可大幅度提高乳酸菌菌落数量和质量的基础上,为了获得更好、更经济实惠的培养基,许多学者又对各个营养因子进行了优化培养及筛选。柏建玲等^[10]在乳酸菌增菌培养基的营养因子优化的试验中,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、蛋白胨等 7 个营养因子增菌培养乳酸菌进行优化,利用 L₈(2⁷)正交实验,优化出培养基营养

因子最佳组合是:玉米浆 3%、牛肉膏 1%、乳糖 1%。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 10⁹ 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%。

刘云鹤^[11]为了获取高效廉价的乳酸菌增殖培养基,通过正交实验及混料回归试验,确定了培养基的组成成分以及各成分的配比。其配方为 2%蔗糖、0.58%蛋白胨、10.92%大豆粉(均为质量分数)在上述增殖培养基中添加质量分数 0.5%的 KH₂PO₄-Na₂HPO₄,可增强其缓冲能力,促进细胞的积累。培养液中发酵乳杆菌和植物乳杆菌细胞数量分别达 6.02×10⁹ cfu/mL, 5.88×10⁹ cfu/mL 适用于大规模生产乳酸发酵剂。

付荣霞等^[9]对几种果蔬汁对乳酸菌增殖的影响中,对几种果蔬汁添加量、乳酸菌接种量、培养时间、黄豆发芽时间进行了单因素试验,在此基础上,通过正交实验又对乳酸菌生长的最佳工艺条件进行了研究。结果表明,乳酸菌生长的最佳工艺条件为:果蔬汁添加量 4%,乳酸菌接种量 3.5%,培养时间 13 h,黄豆发芽时间 2 d,在此条件下,乳酸菌的菌数为 13.8×10⁷ cfu/mL, pH 为 3.97。吕加平等^[12]采用有交互作用正交实验优化设计了乳酸菌(嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌)增菌液,结果表明,对嗜热链球菌宜采用每 200 mL 蒸馏水中,酪蛋白水解物 1 g、乳糖 2 g、番茄汁 20 mL、B-磷酸甘油二钠 1 g。保加利亚乳杆菌则宜采用 200 mL 蒸馏水中鱼肉蛋白胨 1 g、乳糖 2 g、酵母浸膏 1 g、K₂HPO₄-KH₂PO₄ 各 0.5 g,在 37℃ 下培养 24 h 后菌落总数分别可达 5.76×10⁹ cfu/mL、4.69×10⁸ cfu/mL。

张建友等^[13]在冻干乳酸菌菌种增菌培养基增殖因子的优化试验,在基础培养基的基础上确定了嗜热链球菌(S. t)和保加利亚乳杆菌(L. b)的增菌配方分别为:平菇浸汁 14 mL、胡萝卜汁 10 mL、玉米浆 0.6 mL、维生素 E 0.2 g 和啤酒 10 mL、番茄汁 10 mL、胡萝卜汁 15 mL、平菇浸汁 16 mL,同时测定其最佳培养时间分别为 9 h 和 15 h。

2.3 乳酸菌培养条件的优化

添加增殖因子后,乳酸菌混合菌株进入对数生长长期的时间大大提前,这是由于增殖因子提供的营养促进了乳酸菌的生长,另一方面,乳酸菌的最适生长温度、初始 pH 值、培养时间及培养方式等,也是影响乳酸菌富集生长的重要因素。史媛英等^[14]对传统乳酸菌 L. b 和 S. t 进行了高浓度混合培养的研究,发现添加质量分数为 0.25%磷酸氢二氨,培养过程中控制 pH 为 5.8~6.3,乳酸菌生长较好,菌数达 25.75×10⁹ cfu/mL。汤保贵等^[15]在对 1 种乳酸菌培养条件的研究中发现,初始 pH 为 6.5 的培养基中乳酸菌一直保持较高的生长性能,这

表明,培养基的适宜初始 pH 是 6.5。这与熊素玉等^[16]、史媛英等^[14]的研究结果一致,但与嗜酸乳杆菌的适宜 pH 条件有明显差异。

黄良昌等^[17]从多种培养基中优选出改良的 MRS 培养基作为保加利亚乳杆菌的增菌培养基,同时将初始 pH 调到 5.8,在 40℃条件下培养,添加生长促进剂后菌落数达到 10^{10} cfu/mL 以上,往富集培养基中添加适宜的 CaCO_3 也能促进乳酸菌的富集生长。此外,温度通过影响蛋白质、核酸等生物大分子的结构和功能、细胞结构如细胞膜的流动性和完整性以及胞内酶的活性来影响微生物的生长、繁殖和新陈代谢。不同的培养温度不仅影响乳酸菌的生长,还影响代谢产物的产量和质量,以及产品的酸度、风味和组织状态。张兰威等^[7]的研究表明温度影响混合生长的菌株的比例,而较高温度(44℃)有利于这种比例达到平衡。

另外,许多研究者对乳酸菌分离培养基的半固体培养、固体培养进行比较时发现,半固体培养基中菌落出现早,活菌数多更有利于乳酸菌的生长,其原因是乳酸菌虽都是厌氧细菌,但大多数乳酸菌对氧气并不敏感,在有氧或无氧条件下都能生长,所以它们是耐氧的厌氧细菌,半固体培养基具有较好的厌氧性能,能更好地满足乳酸菌的生长特性,而固体培养基是在有氧条件下培养的,对乳酸菌生长有一定的影响。

3 结语

伴随我国乳制品工业的飞速发展,产品的推陈出新,对乳酸菌的综合开发势在必行,而且极有前途。因而研制经济实惠、易收获菌体且活菌数高的培养基更是亟待解决的问题。在基础培养基中添加增殖因子后,乳酸菌混合菌株进入对数生长期的时间有不同程度的提前,这是由于增殖因子提供的营养促进了乳酸菌的生长;另一方面,由于缓冲盐的中和作用,使乳酸菌的对数生长期有所延长,促使了菌株的富集生长。因此,添加

增殖因子与缓冲盐于基础培养基中,可以大大地促进乳酸菌混合菌株的富集,是今后乳酸菌增菌培养基研究进展。

参考文献

- [1] 房兴利,晋津. 酸奶生产液体发酵剂的研究[J]. 中国乳品工业,1994,22(5):207-208.
- [2] 山丽杰,田洪涛,贾英民,等. 浓缩型乳酸菌发酵剂制备中几个技术关键问题的探讨[J]. 中国乳品工业,2002,30(5):66-69.
- [3] 李志成,严佩峰,李博. 乳酸菌基础培养基比较研究[J]. 食品研究与开发,2007,11(28):71-73.
- [4] 隋欣,姜铁民,王建,等. 乳酸菌混合菌株基础培养基及增殖因子的筛选[J]. 食品研究与开发,2005,26(6):49-52.
- [5] 黄君红,成洁珊,陈清荷,等. 乳酸菌生长最佳培养基的筛选[J]. 中国酿造,2001(2):9-11.
- [6] 张继英,张娅婷. 不同选择性培养基对乳酸菌生长的影响[J]. 信阳农业高等专科学校报,2006,11(16):21-24.
- [7] 张兰威,鄂志强,万海峰,等. 乳酸菌增菌培养基筛选及干燥保护剂的选择[J]. 中国乳品工业,2000(2):7-10,18.
- [8] 余华,颜军,刘海燕,冻干保加利亚乳杆菌增菌培养基的筛选[J]. 食品科学,2004,4(25):82-83.
- [9] 付荣霞,鲍雅楠,崔艳,等. 几种果蔬汁对乳酸菌增殖的影响[J]. 贵州农业科学,2012,40(6):187-188.
- [10] 柏建玲,莫树平,郑婉玲,等. 乳酸菌增菌培养基的营养因子优化[J]. 食品与发酵工业,2007,2(33):79-81.
- [11] 刘云鹤. 高效乳酸菌增菌培养基的筛选[J]. 淮海工学院学报,2003,12(4):59-60.
- [12] 吕加平,梁占东,骆承痒,等. 乳酸菌增菌培养基优化设计[J]. 中国乳品工业,1999,27(3):12-15.
- [13] 张建友,李艳武,赵群波,等. 冻干乳酸菌菌种增菌培养基的优化[J]. 中国乳品工业,2002,30(5):40-43.
- [14] 史媛英,肖冬光. 酸奶发酵剂高浓度培养的研究[J]. 天津轻工业学院学报,1999(1):22-25.
- [15] 汤保贵,欧柱荣,徐中文,等. 乳酸菌培养条件的优化[J]. 饲料研究,2007(8):49-50.
- [16] 熊素玉,姚新奎,谭小梅,等. 不同温度及 pH 条件对乳酸菌生长影响的研究[J]. 新疆农业科学,2006,6(43):533-538.
- [17] 黄良昌,吕晓玲,姚秀玲,等. 保加利亚乳杆菌浓缩培养的研究[J]. 中国乳品工业,2002,30(1):12-16.

The Research Progress of Enrichment Medium of Lactic Acid Bacteria

SHAO Xiu-li, ZHANG Shen-pu, SHEN Shun-xian, ZHANG Dan
(Henan Agricultural Professional College, Zhengzhou, Henan 451450)

Abstract: Lactic acid bacteria have many important biological function, such as resisting to bacterial, lowering cholesterol, maintaining a micro-ecosystem balance, eliminating cancer and strengthening the immune system, and can give the food a special flavor. For the preparation of highly active lactobacillus culture medium to provide economical culture medium formula, a variety of lactic acid bacteria culture media formulations progress enrichment were reviewed, in order to provide a reference for lactic acid production.

Key words: lactic acid bacteria; enrichment; medium