

优良乳酸球菌的筛选及增殖研究

王哲¹, 孟宪志², 赵伟¹

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110161) (2. 辽宁省微生物科学研究所, 辽宁 朝阳 122000)

摘要: 对本实验室保存的几种能用于酸奶发酵的菌种进行比较, 并对其中发酵效果最好的菌种的培养基进行优化。结果表明乳酸球菌 Q₂₆ 的发酵效果最好, 其最佳培养基组成为: 0.5% 蔗糖, 1% 酪蛋白胨, 1% 牛肉膏, 0.5% 酵母膏, 2.5% 碳酸钙, 1% 抗坏血酸, 5.5% 甘薯汁, 2.5% 番茄汁。用此培养基培养进行增殖, Q₂₆ 的最高菌数达 2.36×10⁹ 个/mL, 比基础培养基的 2.74×10⁸ 个/mL 提高约 9 倍。另生长因子的组成对菌种的增殖有一定的影响。

关键词: 乳酸球菌; 培养基; 增殖

中图分类号: TS252.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)11-0061-03

Studies on Selection and Enumeration of Favorable *Lactococcus*

WANG Zhe¹, MENG Xian-zhi², ZHAO Wei¹

(1. School of land and environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

(2. Liaoning Academy of Microbiology, Chaoyang 122000, China)

Abstract: The selection and enumeration of *Lactococcus* Q₂₆ was studied. The results showed that the sucrose, N-sources, the ratio of Peptone and Beef extract and Yeast extract, Yam extract, CaCO₃, Vc, and Tomato extract of culture medium is 0.5%, 2.5%, 2:2:1(m/m/m), 5%, 0.3%, 0.3% and 2.5%, respectively. The highest number of *Lactococcus* can reach 2.36×10⁹ /mL.

Key words: *Lactococcus*; selection; enumeration

酸奶是乳品工业的支柱产业之一^[1-2]。发酵剂在酸奶生产过程中的作用非常重要, 直接影响着酸奶质量的好坏。良好的酸奶发酵剂要求菌种活力强、产酸快、发酵性能稳定。本文对一些用于酸奶发酵的乳酸球菌进行筛选和增殖研究, 希望能为乳品行业提供参考。

乳酸菌发酵剂制备过程主要包括菌体增殖、浓缩培养、离心分离、深度冷藏或冷冻干燥。其中菌体增殖为最基本的环节, 筛选最适及效果最佳培养基, 能够充分利用培养基营养基质, 从而最大限度的提高活菌数, 降低发酵剂制备成本。

本文通过对优良乳酸球菌的筛选和增殖研究, 希望为进一步发酵剂制备打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

菌种: 乳酸球菌 Q₅、Q₂₆、Q₃₄、Q₃₇、Q₄₀, 本实验室提供, 从国内外优良酸奶中分离筛选所得。

MRS 培养基^[1]: 酪蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、酵母膏 5 g、葡萄糖 5 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸三铵 2 g、Tween 801 g、磷酸氢二钾 2 g、水合硫酸镁 0.2 g、水合硫酸锰 0.05 g、蒸馏水 1000 mL、pH 自然实验仪器:

收稿日期: 2007-06-06

NDJ-99 型旋转粘度计(上海虹益仪器仪表有限公司); pHS-3C 精密酸度计(成都仪器厂)。

1.2 实验方法

菌种活化: 将保存菌种以 3% 接种量接至 NFM 试管中(13% 脱脂乳试管), 充分振荡, 在 37 °C 培养至凝乳, 活化 2~3 次后, 置 4 °C 冰箱冷藏备用。

酸奶制作: 以 1% 接种量将菌种接种至含 7% 蔗糖的巴氏杀菌牛奶中, 在 42 °C 下发酵至凝乳, 于 4 °C 冷藏 12 h 以上。

pH 值测定: 酸度计直接测定。

酸度值测定: 采用酸度滴定法。吸取 5 mL 样液, 加入 20 mL 蒸馏水, 加 3 滴酚酞指示剂, 用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定至微红色。

粘度值测定: 旋转粘度计直接测定。

菌数测定: 显微镜直接计数^[3]。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

乳酸菌发酵剂要求菌种活力高, 发酵性能稳定。近年来, 对产粘度高的菌株筛选也是热点之一。粘度大小直接决定着酸奶质地的好坏, 粘度小的酸奶凝块较软, 组织状态差, 感官接受性差, 直接影响到产品

的销售。

测其指标, 结果见表 1。

按 1.2 的方法将每种菌种接入牛奶进行发酵并检

表 1 乳球菌筛选结果

菌种类型	凝乳时间/h	乳清析出/mL	表面平整度	滋气味	乳酸度/°T	pH 值	粘度/(MPa·s)
Q ₅	4.5	4.3	较光滑细腻	无酸,无香,有凝块	45.3	5.09	2025
Q ₂₆	4.0	3.7	细腻、有弹性	酸度适中,粘稠,产香	69.9	4.25	3529
Q ₃₄	4.5	3.5	较光滑	过酸,粘稠,无香	72.9	4.24	3531
Q ₃₇	6.0	5.6	不细腻	无酸,无香	70.9	5.17	2802
Q ₄₀	5.5	3.5	较细腻	粘度大,稍酸无香	65.0	4.84	3685

良好的酸奶一般应该有少量乳清析出, 表面光滑细腻, 无明显凝块和空洞, 色泽均一、一致, 具有酸奶应有的滋味和气味, 酸度应大于 70%^[3]。由表 1 看出, 以 Q₂₆ 作为菌种制作的酸奶凝乳时间较短, 乳清析出较少, 酸度适中, 粘度适中, 组织状态和口感优良。综合感官和指标评价, 确定以 Q₂₆ 作为试验菌株。

2.2 基础培养基优化

MRS 液体培养基只适用于大多数乳酸菌分离和生长, 并不适用所有菌种的增殖和浓缩。鉴于碳氮源是影响微生物生长的主要因素, 本实验调整 MRS 液体培养基中碳源种类、不同氮源比例以及碳氮比, 筛选出最佳增殖效果培养基配方, 结果见表 2~4。

表 2 0.5%碳源对 Q₂₆ 增殖影响

碳源	活菌数/(10 ⁸ cfu/mL)	终点 pH 值
葡萄糖	2.74	5.5
蔗糖	8.65	5.0
乳糖	4.85	5.0
m 葡萄糖:m 乳糖=1:1	4.09	5.2
m 蔗糖:m 乳糖=1:1	5.30	5.1
m 蔗糖:m 葡萄糖=1:1	4.1	5.2

表 3 2.5%氮源对 Q₂₆ 增殖影响

编号	m 酪蛋白胨:m 牛肉膏:m 酵母膏	活菌数/(10 ⁸ cfu/mL)	终点 pH 值
A	1:1:3	1.06	6.0
B	1:2:2	2.82	5.0
C	1:3:1	2.29	5.5
D	2:1:2	1.85	5.7
E	2:2:1	2.41	5.0
F	3:1:1	1.66	5.7

表 4 碳氮比对 Q₂₆ 增殖影响

C/N	活菌数/(10 ⁸ cfu/mL)	终点 pH 值
1:10	1.33	5.8
1:8	4.63	5.0
1:5	9.31	4.5
2:5	8.1	4.8

由表 2、3、4 可得出结论, 以蔗糖作为单一碳源效果明显好于其他糖类及其组合碳源, 其活菌数可达到 8.65×10⁸ cfu/mL, 是原始 MRS 培养基的 3 倍多, 说明蔗糖更有利于产粘球菌 Q₂₆ 的生长, 其原因可能是一方面作为碳源被球菌吸收利用, 另一方面可能与产粘作用相关, 具体机制尚不清楚; 氮源方面酪蛋白胨、牛肉膏、酵母膏的比值为 1:2:2 (m/m/m) 时对 Q₂₆ 的增殖效果最好, 实验表明酪蛋白胨减半, 酵母膏加倍能够更有利于菌体增殖, 这是由于酵母膏提供了更丰富的氨基酸类物质, 更有利于球菌的吸收利用; 在优化碳氮源的基础上, 进一步优化碳氮比, 结果表明 C/N 为 1:5 时, Q₂₆ 的活菌数最高, 此结果与原始配方一致。

2.3 生长因子确定

生长因子是促进乳酸菌生长繁殖的一类结构性质的物质^[5], 能为乳酸菌提供生长必需的氨基酸、维生素或优化培养基 pH 值, 改善乳酸菌在碳氮源匮乏情况下的生存状况, 并且能够提高菌体抗性, 如抗酸性, 抗冷冻性和抗干燥性^[4]。因此各种生长促进剂在发酵乳生产中得到了广泛的应用。

选择生长因子应从增殖效果、取材途径以及应用成本等多方面综合考虑, 目前国内所使用的生长因子包括低聚糖(海藻糖、果糖等), 维生素(Vb、Vc 等), 氨基酸及其衍生物(甜菜碱), 但不适用于大规模乳酸菌发酵生产, 因此应广泛选择既廉价又取材方便的生长因子替代物, 如果蔬菜中含有丰富的维生素类、氨基酸类、以及微量元素类物质, 可以作为复合生长因子添加到增殖培养液中。

实验选择五水平作为单因子效果检验(表5)。图1为不同浓度水平的生长因子单因素实验结果。

从图1可以看出, 对于复合生长因子来说, 随着浓度的增大, 增殖效果逐渐增加, 其中番茄汁和甘薯汁的增殖作用最明显, 番茄汁多年来已经成为改良 MRS 培养基中必不可少的添加剂, 但对于甘薯汁还是首次应用于增殖乳酸菌, 甘薯中含有丰富的低聚糖是促使

菌体大量繁殖的主要因素；对于单一生长因子抗坏血酸和碳酸钙的增殖效果明显大于甘油和吐温80，使乳酸菌增殖的最佳浓度为3%，当浓度大于3%时，反而抑制菌体增殖，原因可能是引起维生素中毒和渗透压不适。

表5 生长因子水平设计

类型		添加量/%				
复合生长因子	番茄汁	2	4	6	8	10
	甘薯汁	2	4	6	8	10
	平菇汁	2	4	6	8	10
	胡萝卜汁	2	4	6	8	10
	啤酒液	2	4	6	8	10
单一生长因子	抗坏血酸	1	2	3	4	5
	碳酸钙	1	2	3	4	5
	甘油	1	2	3	4	5
	吐温-80	1	2	3	4	5
CK		0				

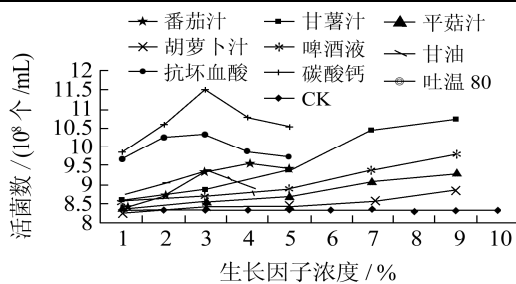


图1 生长因子的增殖效果

由图1知，对球菌起到最大增殖作用的是碳酸钙，最大增殖浓度为3%。另外，番茄汁、甘薯汁和抗坏血酸对球菌的增殖效果也比较明显。各种生长因子的混合使用时可能会起到相互促进的作用。由于条件所限，本实验仅考察它们的混合物是否对球菌的增殖产生影响。实验设计和结果见表6。

由表6知，不同浓度组合的混合生长因子均对Q26有明显的增殖效果，其中以碳酸钙（2.5%）抗坏血酸（1%）番茄汁（2.5%）甘薯汁（5.5%）为最佳增殖配方，其增殖效果是对照组的近三倍，最高菌数可达 2.36×10^9 个/mL。

表6 混合生长因子对Q26增殖的影响

序号	碳酸钙	抗坏血酸	番茄汁	甘薯汁	菌数(10^8 个/mL)
1	1(1%)	1(1%)	1(1%)	1(1%)	14.13
2	1	2(2.5%)	2(2.5%)	2(2.5%)	17.40
3	1	3(5.5%)	3(5.5%)	3(5.5%)	9.11
4	2	1	2	3	23.55
5	2(2.5%)	2	3	1	5.76
6	2	3	1	2	9.39
7	3(5.5%)	1	3	2	19.14
8	3	2	1	3	15.42
9	3	3	2	1	13.98
10	0	0	0	8%	8.7

3 结论

(1) 本实验的5种球菌中，Q26最适合作酸奶菌种，其增殖的最佳培养基为：0.5%蔗糖，1%酪蛋白胨，1%牛肉膏，0.5%酵母膏，2.5%碳酸钙，1%抗坏血酸，5.5%甘薯汁，2.5%番茄汁。用此培养基培养Q26，最高菌数可达 2.36×10^9 个/mL，是基础培养基MRS的近9倍。

(2) 在培养基中添加生长因子会对菌种起到很好的增殖作用，复合生长因子的增殖效果相对比单一生长因子的效果好，混合生长因子的增殖效果又比复合生长因子的增殖效果要好。

参考文献

- [1] 吕兵,张国农.乳酸菌发酵剂浓缩培养的研究[J].中国乳品工业,2001,29(6):7-9
- [2] 张兰威,鄂志强,等.乳酸菌增殖培养基筛选及干燥保护剂的选择[J].中国乳品工业,2000,28(2):8-9
- [3] 蒋明利.酸奶和发酵乳饮料生产工艺与配方[M].中国轻工业出版社,2005:193
- [4] M.M Brashears and S.E Gilliland, Survival during frozen and refrigerated storage of storage of lactobacillus as influenced by growth phase, J.D.S 1995,78: 2326-2335

日本研制出土豆制醋反应器

日本长崎三浦工业所开发出应用生物反应器的土豆制醋设备，其工艺是将土豆液化和糖化，经离心分离机制成原料液，将酵母和醋酸菌固定在粒状包囊内形成固相，充填在醋酸发酵槽内；当原料液源源不断流进反应槽并进行反应，连续流出香醋，采用这种设备，其酶和醋酸菌可长时连续使用，质量稳定，造醋时间减少3/4，与米醋相比，土豆含有更多的钙和人体必需的氨基酸。

(新闻来源：中国包装网)