

蔬菜发酵专用乳酸菌的菌体高密度培养

熊 涛, 徐立荣, 范 镭, 曾哲灵

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 菌体高密度培养是制备浓缩型蔬菜发酵专用菌粉的关键。采用缓冲盐法、化学中和法和补料培养法进行乳酸菌 NCU0101 的菌体高密度培养, 分析研究培养基配方、培养条件、补料培养方式对菌体活菌数的影响。结果表明: 菌体适宜培养基配方为葡萄糖 5%、蛋白胨 1%、磷酸氢二钾 0.5%、醋酸钠 0.3%, 适宜培养条件为培养液 pH 值 6.3~5.8、培养温度 30℃、振荡频率 40r/min、培养时间 20h, 适宜补料培养方式为培养 0、4 和 8h 时各补加 2.5% 的碳氮源(碳氮比为 5:1); 培养结束后, 培养液中乳酸菌菌体活菌数可达 7.83×10^9 CFU/ml。

关键词: 乳酸菌; 蔬菜发酵; 高密度培养

Investigation on Dense Cultivation of *Lactobacillus* Specific for Vegetable Fermentation

XIONG Tao, XU Li-rong, FAN Lei, ZENG Zhe-ling

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Dense cultivation is the key to prepare concentrated bacterial powder for vegetable fermentation. The study of high cell density culture of lactobacillus No. NCU0101 has shown that it is feasible to achieve the goal using buffer solution, chemical neutralization and feed batch culture. It is found that medium formula, culture conditions, and feed batch methods have great impacts on biomass growth. Suitable medium formulation is: 5% glucose, 1% peptone, 0.5% K_2HPO_4 , 0.3% sodium acetate. Optimal culture conditions are pH 6.3~5.8, temperature 30℃, oscillation frequency 40r/min, and culture time 20h. Appropriate feeding culture method is that 2.5% carbon and nitrogen sources (C/N ratio is 5:1) is added respectively after 0, 4 and 8 h. With the optimal culture conditions, the number of the bacteria cells is up to 7.83×10^9 CFU/ml.

Key words *Lactobacillus*; vegetable fermentation; high dense cultivation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0345-06

提高蔬菜发酵速率、缩短直投式泡菜发酵时间、减少甚至防止亚硝酸盐产生的关键是提高蔬菜发酵专用复合菌粉中的活菌数, 而制备蔬菜发酵专用复合菌粉的关键环节是菌体高密度培养^[1]。

乳酸菌在培养过程中能分解培养基中的糖类而产生以乳酸为主的有机酸。由于代谢产物的积累会抑制菌体生长, 采用常规方法培养时, 其培养液中的活菌数只能达到 $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml^[2]。实现微生物(益生菌)菌体高密度培养的核心是保证合理的营养供给、及时去除代谢产物、保持稳定的比生长速率。现有的乳酸菌高密度培养方法主要有缓冲盐法、化学中和法和渗析法^[3-6]。吕兵等^[7]综合运用缓冲盐法及化学中和法, 使培养液中乳酸菌的活菌数达到 5.89×10^9 CFU/ml, 贺稚非等^[8]综合运用缓冲盐法及补料培养法, 使培养液中乳酸菌的活菌数达到 7.24×10^9 CFU/ml。

影响高密度培养的因素非常多, 如菌体生长所需的营养物质、培养过程中生长抑制物的积累、溶解氧浓度、培养温度、培养液的 pH 值、补料方式及培养液流变学特性等^[8-9]。然而高密度培养的工艺是比较复杂的, 仅仅对营养源、溶氧浓度、pH 值、温度、接种量等影响高密度培养的因素单独地加以考虑是远远不够的, 因各种因素之间存在协同和(或)抵消作用, 需加以综合考虑并对培养条件进行全面的优化。本实验综合运用缓冲盐法、化学中和法和补料培养法, 进行蔬菜发酵专用乳酸菌的菌体高密度培养研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种(NCU0101) 南昌大学食品科学教育部重点实验室。

收稿日期: 2007-07-14

基金项目: 国家农业科技成果转化资金资助项目(05EFN213600147)

作者简介: 熊涛(1970-), 男, 教授, 研究方向为食品生物技术、食物资源开发与利用。

1.2 试剂

牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、硫酸铵、尿素、硝酸钠、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、琼脂、溴甲基酚紫、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、醋酸钠、柠檬酸铵、硫酸镁、Tween-80、盐酸、氢氧化钠、氯化钠、碳酸钠。

1.3 仪器

电热鼓风干燥箱 HG101-2 南京实验仪器厂；DSHZ-300型水浴恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂；雷磁 PHS-25 型数显 pH 计 上海精密科学仪器有限公司；生化培养箱 SPX-250B-Z 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.4 培养基

1.4.1 平板计数培养基

牛肉膏 1%、酵母膏 0.5%、蛋白胨 1%、葡萄糖 5%、琼脂 1.5%、磷酸氢二钾 0.2%、醋酸钠 0.5%、柠檬酸铵 0.2%、硫酸镁 0.02%、Tween-80 0.1%、pH6.6、121℃、30min 灭菌。

1.4.2 液体培养基

葡萄糖 5% MRS 液体培养基。

1.4.3 斜面培养基

葡萄糖 2% 的 MRS 固体培养基。

1.5 方法

1.5.1 测定方法

1.5.1.1 菌数的检测

采用菌落平板计数法测定。

1.5.1.2 pH 值的测定

采用雷磁 PHS-25 型数显 PH 计直接测定。

1.5.2 培养基配方的研究

菌株 NCU0101 进行培养基单因子试验研究。

1.5.2.1 不同碳源对乳酸菌培养的影响

在 MRS 液体培养基条件下，选择乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖四种碳源分别加入培养基中，含量都为 5%。在 250ml 三角瓶中分别装入 20ml 的 MRS 培养基，初始 pH 值 6.6，接种量 2.0%，培养温度 30℃，接种后静置培养 8h，测定培养液的菌落数及 pH 值。

1.5.2.2 不同氮源对乳酸菌培养的影响

在 MRS 液体培养基条件下，选择蛋白胨、硫酸铵、尿素和硝酸钠四种氮源分别加入培养基中，含量都为 2%。在 250ml 三角瓶中分别装入 20ml 的 MRS 培养基，初始 pH 值 6.6，接种量 2.0%，培养温度 30℃，接种后静置培养 8h，测定培养液的菌落数及 pH 值。

1.5.2.3 不同缓冲盐对乳酸菌培养的影响

在 MRS 液体培养基条件下，选择 K_2HPO_4 、

KH_2PO_4 、不加磷酸盐三种方式分别加入培养基中，含量都为 0.5%。在 250ml 三角瓶中分别装入 20ml 的 MRS 培养基，初始 pH 值 6.6，接种量 2.0%，培养温度 30℃，接种后静置培养 8h，测定培养液的菌落数及 pH 值。

1.5.2.4 正交试验优化培养基

通过上面单因子试验确定最佳碳源、氮源、作为缓冲盐作用的磷酸盐和醋酸钠，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法确定培养基。其装液量 20ml (250ml 三角瓶)，初始 pH 值 6.6，接种量 2.0%，培养温度 30℃，接种后静置培养 16h，测定培养液的菌落数。正交试验因子及水平如表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of ortnogonal test

水平	A 碳源 (%)	B 氮源 (%)	C 磷酸盐 (%)	D 醋酸钠 (%)
1	2.5	1	0.2	0.3
2	5	1.5	0.5	0.5
3	7.5	2	0.8	0.7

1.5.3 培养条件的研究

1.5.3.1 pH 值对乳酸菌培养的影响

用经灭菌的浓度 30% 碳酸钠溶液调节 pH 值在规定的范围内，试验确定 4 个 pH 值范围分别如下 6.8~6.3、6.3~5.8、5.8~5.3、5.3~4.8。在 250ml 三角瓶中分别装入 20ml pH 为以上 4 个规定范围内的 MRS 培养基，接种后 30℃ 条件下培养 24h，每隔 4h 取样一次测定培养液的菌落数。

1.5.3.2 培养温度对乳酸菌培养的影响

在 250ml 三角瓶中分别装入 20ml 的 MRS 培养基，接种后分别在 25、30、35、40、45℃ 条件下培养 24h，每隔 4h 取样一次测定培养液的菌落数，并由此确定最适温度。

1.5.3.3 振荡频率对乳酸菌培养的影响

在 250ml 三角瓶中分别装入 20ml 的 MRS 培养基，接种后分别在 0、20、40、60、80r/min 的恒温摇床上培养 24h，每隔 4h 取样一次测定培养液的菌落数，并由此确定最适振荡频率。

1.5.3.4 培养时间对乳酸菌培养的影响

在 250ml 三角瓶中装入 MRS 培养基，均采用以上试验所确定的最适条件进行培养，每隔 4h 取样一次测定培养液的菌落数，以此确定最适培养时间。

1.5.4 补料培养对乳酸菌培养的研究

1.5.4.1 补料碳源对乳酸菌培养的影响

通过前面确定的最佳培养条件，分别进行以下 5 个方案 a、b、c、d、e 的碳源补料方案培养：2.5%、5%、7.5% 的一次性投料；初始 2.5%，4h 后补料 2.5%；初始 2.5%，4h 和 8h 后各补料 2.5%。测定各培养液的

菌落数。

1.5.4.2 补料一定比例的碳源和氮源对乳酸菌培养的影响

通过前面确定的最佳培养条件,碳氮源以5:1比例混合均匀,然后分别进行以下5个方案A、B、C、D、E的补料培养:2.5%、5%、7.5%的一次性投料;初始2.5%,4h后补料2.5%;初始2.5%,4h和8h后各补料2.5%。测定各培养液的菌落数。

2 结果与分析

2.1 培养基的确定

2.1.1 碳源的确定

通过在培养基中加入不同的碳源:蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖四种碳源,研究了其对乳酸菌生长的影响。图1、2表明碳源对乳酸菌生长的影响情况可看出葡萄糖为最适碳源。

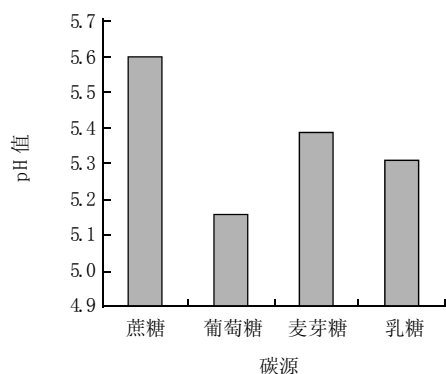


图1 碳源对培养过程 pH 值影响

Fig.1 Effects of carbon plain on pH in culture process

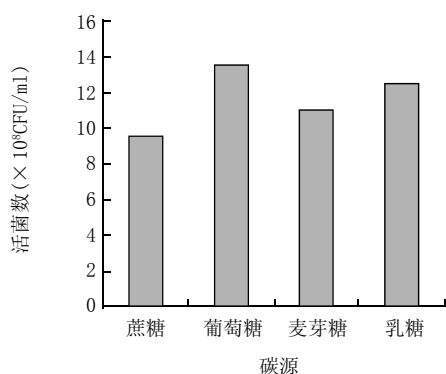


图2 碳源对培养过程菌数的影响

Fig.2 Effects of carbon plain over living bacterium number in culture process

2.1.2 氮源的确定

通过在培养基中加入不同的氮源:蛋白胨、硫酸铵、硝酸钠和尿素四种氮源,研究了其对乳酸菌生长

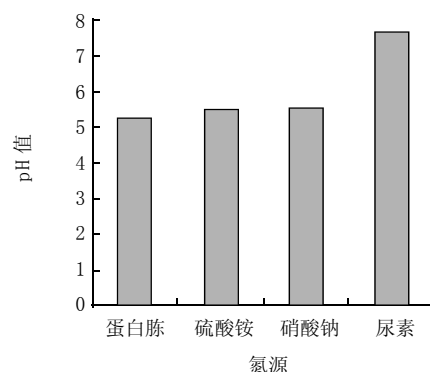


图3 氮源对培养过程 pH 值的影响

Fig.3 Effects of nitrogen plain on pH in culture process

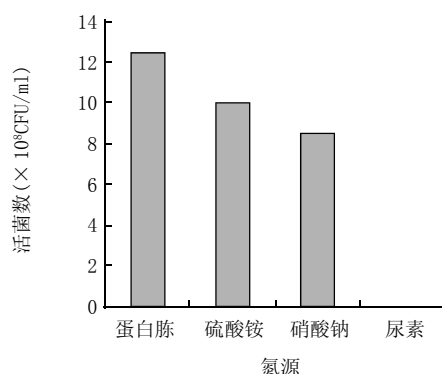


图4 氮源对培养过程活菌数的影响

Fig.4 Effects of nitrogen plain over living bacterium number in culture process

的影响。图3、4表明氮源对乳酸菌生长的影响情况,从图中可看出蛋白胨为最适氮源,尿素则不能作为氮源利用。

2.1.3 缓冲盐的选择

在确定碳源、氮源后,研究了缓冲盐中磷酸盐的选择对乳酸菌生长的影响。图5、6表明磷酸盐对乳酸菌生长的影响情况,从图中可看出在培养基中,加入缓冲盐比不加缓冲盐的乳酸菌活菌数要明显增多,其中

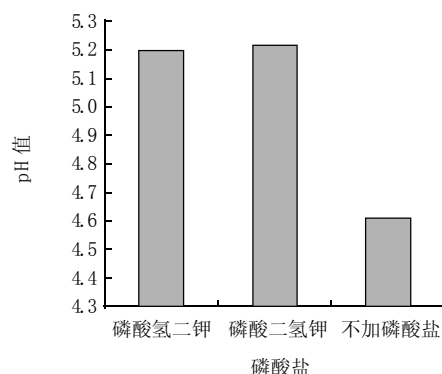


图5 磷酸盐对培养过程 pH 值的影响

Fig.5 Effects of phosphate on pH in culture process

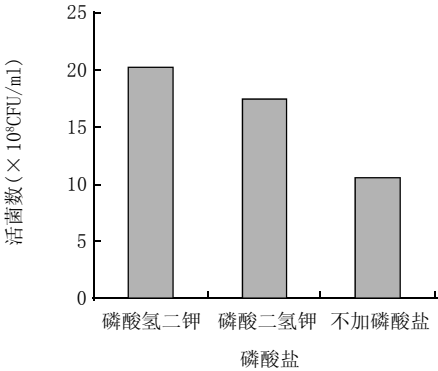


图6 磷酸盐对培养过程活菌数的影响
Fig.6 Effects of phosphate on living bacterium number in culture process

磷酸氢二钾为最适缓冲盐。

2.1.4 正交试验优化结果

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最适生长培养基配方。结果见表2可知,极差R值的大小分别为 $C > D > A > B$, 即对乳酸菌生长影响由大到小依次为磷酸氢二钾、醋酸钠、葡萄糖、蛋白胨。

表2 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	活菌数(× 10 ⁶ CFU/ml)
1	1	1	3	2	14.51
2	1	2	2	1	26.30
3	1	3	1	3	15.25
4	2	1	1	1	28.80
5	2	2	3	3	17.54
6	2	3	2	2	24.30
7	3	1	2	3	23.50
8	3	2	1	2	16.48
9	3	3	3	1	18.20
K_1	18.69	22.27	20.18	24.43	
K_2	23.55	20.12	24.70	18.43	
K_3	19.39	19.25	16.75	18.76	
R	4.86	3.02	7.95	6.00	
因素主→次	C	D	A	B	
优方案	A_2	B_1	C_2	D_1	

理论上是 $A_2B_1C_2D_1$ 的组合为最优条件,但在9个试验号中都没有出现,正交表中 $A_2B_1C_1D_1$ 的活菌数在9个试验中最高,其次是 $A_1B_2C_2D_1$ 。因此,在以 $A_2B_1C_2D_1$ 、 $A_2B_1C_1D_1$ 和 $A_1B_2C_2D_1$ 的组合,重复3次试验进行验证。结果见表3可知 $A_2B_1C_2D_1$ 的活菌数最高,既培养基最佳配方为:葡萄糖5%、蛋白胨1%、磷酸氢二钾0.5%、醋酸钠0.3%。

2.2 培养条件的确定

2.2.1 pH值的确定

由图7可知,pH值对乳酸菌生长情况影响非常大,

表3 验证实验
Table 3 Verification experiment

试验号 重复次数	$A_2B_1C_2D_1$ 活菌数 (× 10 ⁶ CFU/ml)	$A_2B_1C_1D_1$ 活菌数 (× 10 ⁶ CFU/ml)	$A_1B_2C_2D_1$ 活菌数 (× 10 ⁶ CFU/ml)
1	31.20	28.75	26.35
2	29.50	27.78	26.45
3	31.45	27.62	25.70
平均值	30.72	28.05	26.12

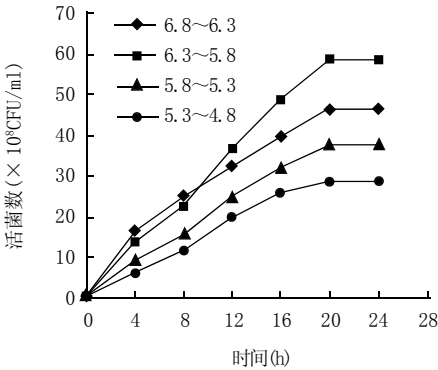


图7 pH值对培养过程活菌数的影响
Fig.7 Effects of pH over living bacterium number in culture process

培养过程中pH值控制在6.3~5.8之间,获得的活菌数最高。不在这个pH值范围内的乳酸菌生长的活菌数较低,特别是pH值控制在5.3~4.8内的最低。

2.2.2 培养温度的确定

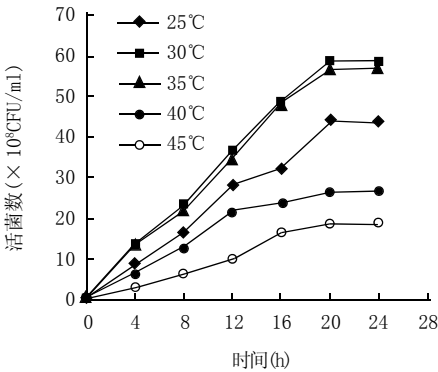


图8 温度对培养过程活菌数的影响
Fig.8 Effects of temperature over living bacterium number in culture process

由图8可知,温度对乳酸菌活菌数的影响较大,温度过高过低都不利于乳酸菌的生长。在30℃培养下,菌体浓度可达到 5.83×10^6 CFU/ml。因此,确定30℃为乳酸菌生长的最适温度。

2.2.3 振荡频率的确定

在培养过程中,采用水浴恒温振荡器将菌体悬浮,可有效防止菌体在培养器皿底沉积,从而进一步提高培

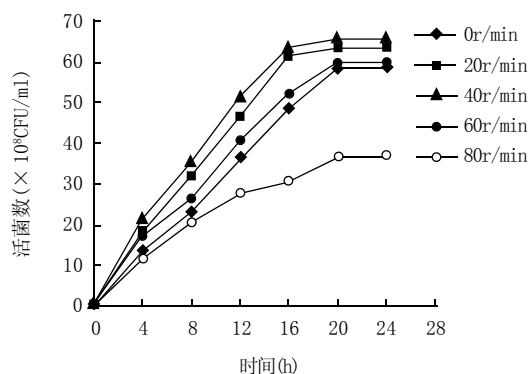


图9 振荡频率对培养过程活菌数的影响

Fig.9 Effects of oscillation frequency over living bacterium number in culture process

养菌体浓度,达到菌体高密度培养的目的。从图9可知,振荡频率在40r/min时活菌数最高,但是在80r/min时的活菌数比静置时的要低。所以转速太高或太低,都不利于乳酸菌的生长。并且和图8相比较,提前开始进入生长稳定期,活菌数基本保持不变。

2.2.4 培养时间的确定

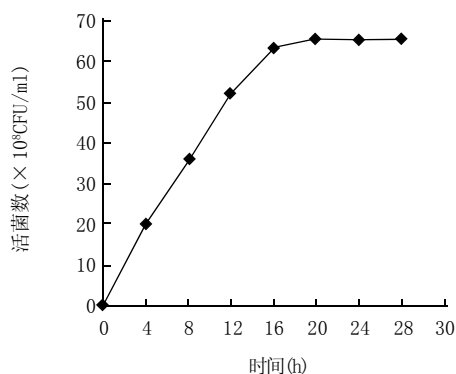


图10 乳酸菌生长曲线的测定

Fig.10 Measurement of *Lactobacillus* growth curve

由图10的乳酸菌生长曲线可看出,经过较短的延迟期后即进入对数生长期,到16h后生长速度基本到达高峰,到20h开始进入生长稳定期,活菌数基本保持不变,乳酸菌生长曲线渐趋平衡。测得20h活菌数达到 6.56×10^9 CFU/ml,所以乳酸菌的适宜培养时间为20h。

2.3 补料培养

2.3.1 补料碳源对乳酸菌培养的影响

乳酸菌菌体补料培养过程中培养液pH值6.3~5.8、培养温度30℃、振荡频率40r/min、培养时间20h。测得活菌数的结果如图11可知,一次性投料的a、b、c三个方案中,其中方案b的活菌数最高。另外d、e二种补料培养方案都比一次性投料方案要好,而且方案e测得活菌数达到 7.54×10^9 CFU/ml。

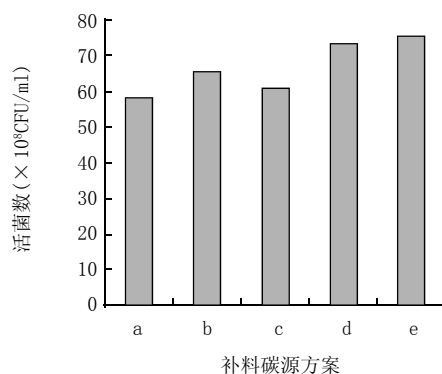


图11 补料碳源对培养过程活菌数的影响

Fig.11 Effects of feeding batch carbon plain over living bacterium number in culture process

2.3.2 补料一定比例的碳源和氮源对乳酸菌培养的影响

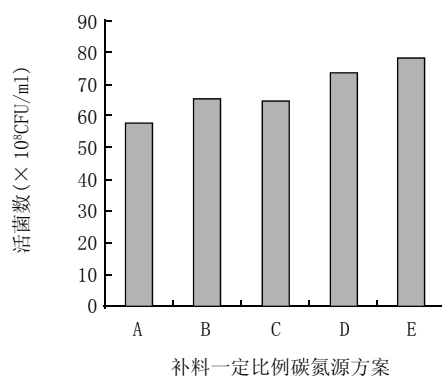


图12 补料一定比例碳氮源对培养过程活菌数的影响

Fig.12 Effects of feeding batch in specific C/N ratio over living bacterium number in culture process

乳酸菌菌体补料培养过程中培养液pH值6.3~5.8、培养温度30℃、振荡频率40r/min、培养时间20h。测得活菌数的结果如图11、12可知,一次性投料的A、B、C三个方案中,其中方案B的活菌数最高,但是和方案c的结果相差不大。另外D、E二种补料培养方案都比一次性投料方案要好,而且方案E测得活菌数比方案e要高 2.9×10^8 CFU/ml,即初始2.5%,4h和8h后各补料2.5%的混合补料培养菌体活菌数达到 7.83×10^9 CFU/ml。

3 结论

以乳酸菌NCU0101为出发菌株进行菌体高密度培养,其适宜培养基配方为葡萄糖5%、蛋白胨1%、磷酸氢二钾0.5%、醋酸钠0.3%,适宜培养条件为培养液pH值6.3~5.8、培养温度30℃、振荡频率40r/min、培养时间20h,适宜补料培养方式为培养0、4和8h时各补加2.5%的碳氮源(碳氮比为5:1)。培养结束后,培养液中乳酸菌菌体活菌数可达 7.83×10^9 CFU/ml。

pH 吸附法纯化戊糖乳杆菌素 31-1 的研究

张金兰¹, 程万鹏^{1,2}, 畅晓渊¹, 高岩¹, 李平兰^{1,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2. 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 戊糖乳杆菌素 31-1, 由分离自宣威火腿的戊糖乳杆菌 31-1 产生, 随 pH 的改变可以选择性的吸附于产生菌细胞表面, pH5.0 时吸附率达 75%, 而在 pH3.0 以下, 7.0 以上吸附率为 0。基于以上规律, 通过调整 pH 值, 戊糖乳杆菌素 31-1 在 pH5.0 吸附、pH7.0 释放于产生菌细胞, 达到了较好的分离纯化效果, 戊糖乳杆菌素 31-1 回收率为 45%, 纯化倍数为 33。经 Tricine-SDS-PAGE 进行分子量的估测及纯度鉴定, 证实戊糖乳杆菌素 31-1 的分子量在 6400~14000D 之间。该纯化方法简便、高效, 具有工业生产的潜力。

关键词: 细菌素; 吸附-解吸; 纯化; Tricine-SDS-PAGE

Study on Purification of Pentocin 31-1 by pH-adsorption

ZHANG Jin-lan¹, CHENG Wan-peng^{1,2}, CHANG Xiao-yuan¹, GAO Yan¹, LI Ping-lan^{1,*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Pentocin 31-1, produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from the traditional China fermented Xuan-Wei Ham, could be adsorbed selectively on its producer at different pH conditions. At pH5.0, the adsorption rate was 75%, while below pH3.0 or above pH7.0, Pentocin 31-1 wasn't adsorbed at all. On the basis of this property, by changing pH, Pentocin 31-1 was adsorbed at pH5.0 and released at pH7.0. The efficiency of isolation and purification was high. The specific activity of Pentocin 31-1 was increased 33 fold with a yield of 45%. The active extract was further subjected to Tricine-SDS-PAGE. The result showed that two bands appeared, where most of the activity corresponded to the band with molecular weight between 6400~14000 D. It is simple and effective, could be used as commercial preparations for food industry.

Key words bacteriocin; adsorption-desorption; purification; Tricine-SDS-PAGE

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0350-05

收稿日期: 2007-10-31

*通讯作者

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2006AA10Z343); 国家自然科学基金资助项目(30671482);

“十一五”科技支撑低温肉制品项目(2006BAD05A15)

作者简介: 张金兰(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与食品生物技术。

参考文献:

- [1] 靳志强, 李平兰. 补料分批法高密度培养德氏乳杆菌保加利亚种 s-1[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(1): 4-9.
- [2] 梁勇, 杜敏, 南庆贤. 浓缩型乳酸菌发酵剂的制备[J]. 中国乳品工业, 1995, 23(2): 132-133.
- [3] 山丽杰, 田洪涛, 贾英民. 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.
- [4] SPECKMAN C A. Lyophilized lactic acid starter culture concentrates: Preparation and use in inoculation of vat milk for cheddar and cottage cheese[J]. J Dairy Sci, 1973, 57(2): 165.
- [5] OSBORNE R J W. Production of frozen concentrated cheese starters by diffusion culture[J]. Journal of the Society of Dairy Technology, 1977, 30(1): 40.
- [6] 刘振民. 采用微滤膜浓缩乳酸菌发酵液的工艺条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 73-76.
- [7] 吕兵, 张国农, 杨瑞欢. 嗜酸乳杆菌生物学特性及其发酵乳的研究[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 37-39.
- [8] 贺稚非, 向瑞玺, 李洪军, 等. 泡菜活性直投式乳酸菌发酵剂的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 191-197.
- [9] 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): 20-25.