

植物乳杆菌发酵培养基的优化

黄秀敏, 张宜靖, 李学优, 曹丁, 夏枫耿, 黄魁英, 林盛华 (广州市微生物研究所, 广东广州 510663)

摘要 [目的]在成功筛选出1株有强产酸能力的植物乳杆菌的基础上,优化其发酵培养基,以提高其生物量。[方法]使用单因素试验和正交试验法对培养基的成分进行优化。[结果]优化后的发酵培养基为:蔗糖30.00 g/L,酵母浸膏50.00 g/L,无水乙酸钠5.00 g/L,磷酸氢二钾2.00 g/L,柠檬酸氢二铵2.00 g/L,硫酸镁0.58 g/L,硫酸锰0.25 g/L,吐温-80 1 mL/L,碳酸钙2.00 g/L。经优化后植物乳杆菌发酵液的OD值从5.701增长到15.021,活菌数达 7.1×10^9 cfu/mL。[结论]优化后的植物乳杆菌发酵培养基降低了生产成本,为后续工业化生产的研究提供了参考。

关键词 植物乳杆菌;培养基优化;发酵

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)24-006-02

Optimization of Fermentation Medium for *Lactobacillus plantarum*

HUANG Xiu-min, ZHANG Yi-jing, LI Xue-you et al (Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663)

Abstract [Objective] To optimize the fermentation medium, and to enhance the biomass of *Lactobacillus plantarum* based on successful screening of a *L. plantarum* with strong acid production. [Method] The single factor test and orthogonal test were used to optimize the composition of the culture medium. [Result] The optimized fermentation medium was as follows: 30.00 g/L sucrose, 50.00 g/L yeast extract, 5.00 g/L anhydrous sodium acetate, 2.00 g/L dipotassium hydrogen phosphate, 2.00 g/L diammonium hydrogen citrate, 0.58 g/L magnesium sulfate, 0.25 g/L manganese sulfate, 1 mL/L Tween-80, and 2.00 g/L calcium carbonate. OD value of *L. plantarum* broth after optimization increased from 5.701 to 15.021, viable count reached 7.1×10^9 cfu/mL. [Conclusion] The production cost was reduced by the optimized fermentation medium, which provided reference for the study of the subsequent industrial production.

Key words *L. plantarum*; Optimization of culture medium; Fermentation

乳酸菌细胞为杆状或球状,革兰氏染色阳性,不产生过氧化氢酶,消耗葡萄糖且50%以上产生乳酸,不形成内生孢子,无运动性,或仅少数有运动性^[1]。乳酸菌在自然界分布广泛,种类繁多,是动物胃肠道的优势菌群,具有调节动物胃肠道菌群平衡、改善肠道内环境、增强免疫力和抵抗力等多种功能^[2-7]。而植物乳杆菌在酸奶、发酵香肠、面包、泡菜等发酵食品中常被用于改善食品分类,改进食品营养状况,延长制品的保藏时间。植物乳杆菌也被大量用于养殖业中,是最常见的青贮发酵乳酸菌,还被用作微生态饲料添加剂。此外,植物乳杆菌也被用作生物防腐剂^[8]。笔者对1株具有强产酸能力的植物乳杆菌的发酵培养基进行了优化,以期加快植物乳杆菌的工业化生产进程。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。植物乳杆菌由广州市微生物研究所提供。

1.1.2 主要试剂及培养基。活化和计数培养采用MRS培养基:葡萄糖20.00 g/L,胰蛋白胨10.00 g/L,牛肉浸膏10.00 g/L,酵母粉5.00 g/L,无水乙酸钠5.00 g/L,磷酸氢二钾2.00 g/L,柠檬酸氢二铵2.00 g/L,硫酸镁0.58 g/L,硫酸锰0.25 g/L,吐温-80 1 mL/L, pH6.8, 固体培养基加20.00 g/L的琼脂粉。胰蛋白胨:英国Oxoid公司;琼脂粉:广东广州环凯生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器。生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;752N型紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;pHS-25数显酸度计:上海雷磁仪器厂。

基金项目 广东省省级科技计划项目(2015B040403004);广东省广州市科技计划项目(201605040004)。

作者简介 黄秀敏(1990-),女,广东梅州人,助理工程师,从事微生物研究。

收稿日期 2016-06-30

1.2 方法

1.2.1 植物乳杆菌摇瓶发酵。从新鲜种子斜面挑取1环菌体接入种子摇瓶,于37℃静置培养24 h,然后以3%的接种量将活化好的种子液接入发酵摇瓶,37℃静置培养,培养18 h后取样测定OD值。

1.2.2 发酵过程参数测量。

1.2.2.1 菌体生物量测定。测量经适当稀释后的发酵液在600 nm波长处的OD值。

1.2.2.2 pH的测定。用pHS-25数显酸度计测定。

1.2.2.3 菌落计数。采用平板菌落计数法。

1.2.3 植物乳杆菌生长曲线的绘制。将活化好的植物乳杆菌接种于MRS发酵培养基中,每间隔2 h取样测定发酵液pH和OD值,以同一批次灭菌而未接入菌种的MRS液体培养基为参照,绘制菌体生长曲线。

1.2.4 最佳发酵培养基的确定。

1.2.4.1 最佳碳源的确定。分别用20.00 g/L的葡萄糖、蔗糖、果糖、可溶性淀粉、乳糖替代MRS培养基中的碳源,其余配方同MRS发酵培养基,进行摇瓶发酵试验。

1.2.4.2 最佳氮源的确定。在筛选出最佳碳源的基础上分别用25.00 g/L的酵母粉、酵母浸膏、蛋白胨、牛肉浸膏、脱脂奶粉、大豆蛋白胨、硫酸铵、胰蛋白胨替代MRS培养基中的氮源,其余配方同MRS发酵培养基,做摇瓶发酵试验。

1.2.4.3 不同无机盐、刺激因子对植物乳杆菌OD值的影响。在最佳碳源和氮源的基础上,分别将无水乙酸钠5.00 g/L、磷酸氢二钾2.00 g/L、柠檬酸氢二铵2.00 g/L、硫酸镁0.58 g/L、硫酸锰0.25 g/L、吐温-80 1 mL/L、碳酸钙2.00 g/L单一加入发酵培养基中,在摇瓶水平进行发酵试验。

1.2.4.4 正交试验。采用3因素3水平 $L_9(3^3)$ 正交表进行优化试验,对影响菌体生物量的主要因素蔗糖、酵母浸膏和

碳酸钙进行正交试验,以得到最佳配比。正交试验因素与水平见表 1。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	蔗糖(A) Sucrose//%	酵母浸膏 (B)Yeast extract//%	碳酸钙(C) Calcium carbonate//%
1	2.0	2.5	0.2
2	3.0	5.0	0.3
3	4.0	7.5	0.4

2 结果与分析

2.1 植物乳杆菌生长曲线 由图 1 可知,植物乳杆菌在 MRS 发酵培养基中培养 18 h 进入稳定期,此时 OD 值最高,生物量最大,之后略有下降,因此,18 h 为最佳发酵终点。由于植物乳杆菌在发酵过程中产生乳酸,所以随着培养时间的增加,pH 急剧下降,当培养到 18 h,pH 下降幅度减小,逐渐趋于稳定,pH 的变化和植物乳杆菌的生物量变化是相符合的。

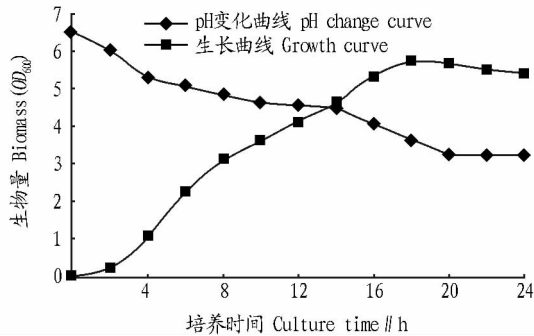
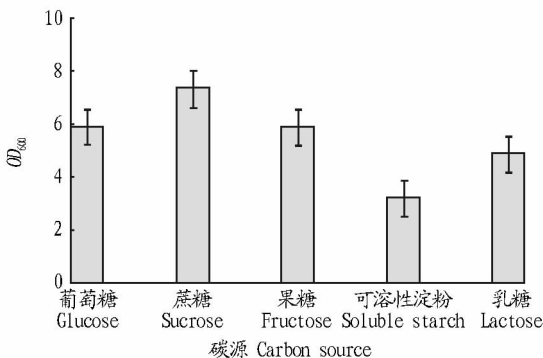


图 1 植物乳杆菌的生长曲线和 pH 变化曲线

Fig. 1 Change curves of pH value and growth curve of *L. plantarum*

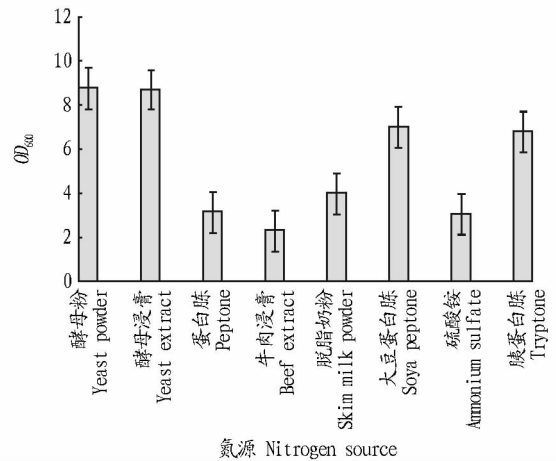
2.2 最佳发酵培养基的确定

2.2.1 最佳碳源。由图 2 可知,植物乳杆菌的最佳碳源为蔗糖,其次是葡萄糖,最差是可溶性淀粉。这可能跟可溶性淀粉是多糖,不易于被植物乳杆菌利用有关。因此,选用蔗糖为最佳碳源。

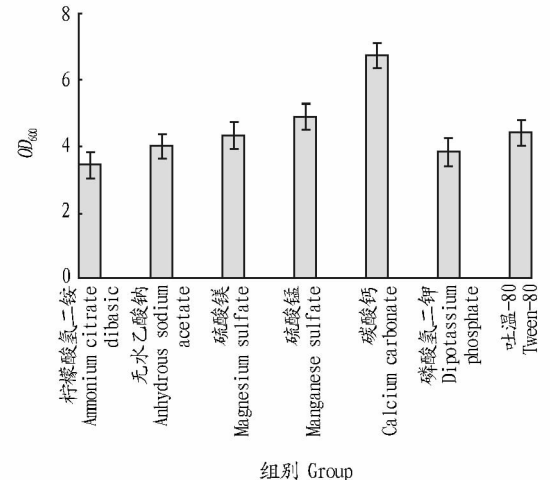
图 2 不同碳源对植物乳杆菌 OD 值的影响Fig. 2 Effects of carbon sources on the OD value of *L. plantarum*

2.2.2 最佳氮源。由图 3 可知,培养基中使用酵母粉和使

用酵母浸膏时植物乳杆菌的 OD 值最高,而且差异不显著。而使用牛肉浸膏和硫酸铵时,生物量显著低于其他组别。酵母浸膏和酵母粉都富含蛋白质,均衡的必需氨基酸以及 B 族维生素、核苷酸、微量元素等在发酵过程中给植物乳杆菌提供了充足的氮源之外,还提供大量的微量元素和氨基酸,促进发酵。但是由于市面上酵母浸膏的价格远低于酵母粉,考虑到成本问题,所以选择酵母浸膏作为最佳氮源。

图 3 不同氮源对植物乳杆菌 OD 值的影响Fig. 3 Effects of nitrogen source on the OD value of *L. plantarum*

2.2.3 不同无机盐、刺激因子对植物乳杆菌 OD 值的影响。无机盐也是细菌生长不可缺少的物质,无机盐的主要作用是维持菌体的渗透压,另一方面一些离子对细菌体内的酶有激活作用。乳酸菌在代谢过程中产生乳酸使 pH 下降,故培养基中需要加入一些缓冲盐来调节 pH,维持渗透压,从而使乳酸菌更好地生长。而笔者考虑到该株植物乳杆菌产酸能力很强,同时也使用碳酸钙作为对照。由图 4 可知,不同的无机盐对植物乳杆菌生物量的增值有不同的影响,其中碳酸钙最显著,这可能是由于碳酸钙在发酵中后期由于乳酸急剧增加而起到中和剂的作用,游离的碳酸根离子不稳定,在水中很容易水解产生碳酸氢根离子和氢氧根离子。这在一定程

图 4 不同无机盐对植物乳杆菌 OD 值的影响Fig. 4 Effects of inorganic salt on the OD value of *L. plantarum*

高、抗病力强等特点,适宜在广西地区大力推广种植。

表3 豇豆品种田间抗病性调查结果

Table 3 Investigation results of field disease resistance of cowpea variety

类型 Type	品种 Variety	锈病发病率 Incidence rate of rust disease//%	病情指数 Disease index		
			根腐病 Root rot	煤烟病 Sooty mold	病毒病 Virus disease
早造 The first season	桂豇一号	4.27 ± 0.41bB	2.33 ± 0.93bA	2.03 ± 0.84bA	2.09 ± 0.60cB
	胜利一号(CK ₁)	4.65 ± 0.54bB	3.60 ± 0.68abA	2.14 ± 0.39bA	3.38 ± 0.72bB
	农家自留种(CK ₂)	6.57 ± 0.80aA	5.01 ± 1.12aA	4.41 ± 1.19aA	6.63 ± 0.41aA
晚造 The second season	桂豇一号	3.92 ± 0.38bA	2.92 ± 0.54bA	2.32 ± 0.32bB	2.44 ± 0.31bB
	胜利一号(CK ₁)	4.12 ± 0.29bA	3.46 ± 0.57bA	2.20 ± 0.29bB	3.31 ± 0.55bB
	农家自留种(CK ₂)	5.58 ± 0.94aA	4.96 ± 0.81aA	4.42 ± 1.00aA	6.25 ± 0.44aA

注:同列不同小写字母表示处理间在0.05水平差异显著;不同大写字母表示处理间在0.01水平差异显著。

Note: Different lowercases in the same row indicated significant differences at 0.05 level; different capital letters indicated significant differences at 0.01 level.

参考文献

- [1] 黄晓峰,杨海峰,王征业,等.豇豆品种比较试验[J].现代农业科技,2008(8):16,18.
- [2] 孙家炎,张渭章.我国长豇豆新品种应用现状及良种繁育技术[J].长江蔬菜,2007(10):25-27.
- [3] 王连生,李小荣.长豇豆不同品种田间抗病性及产量比较[J].浙江农业科学,2006(1):82-83.
- [4] 祁建波,张永泰,李爱民,等.5个露地栽培豇豆品种比较试验[J].长江

蔬菜,2009(17):41-42.

- [5] 王英日,李团,贝近灵.合浦县优质高产豇豆品种比较试验[J].长江蔬菜,2016(2):48-50.
- [6] 李巍,刘雁彬,方波.豇豆新品种新豇3号的选育[J].新疆农业科技,2008(6):34.
- [7] 陆秀英,姚明华,邱正明,等.豇豆新品种鄂豇豆3号、鄂豇豆4号的选育[J].湖北农业科学,2006,45(6):761-763.

(上接第7页)

度上为植物乳杆菌菌体增值创造了较适宜的培养环境。

2.2.4 正交试验结果。由表2可知,最优培养基组合为A₂B₂C₁,即3%蔗糖、5%酵母浸膏、2%碳酸钙。根据极差大小可以得出对植物乳杆菌生物量影响的显著性顺序为酵母浸膏>蔗糖>碳酸钙,即培养基中初始的酵母浸膏含量对植物乳杆菌生物量的影响最大。

表2 正交试验设计与结果

Table 2 Design and result of orthogonal test

试验号 Test code	因素 Factor			生物量 (OD ₆₀₀) Biomass
	A	B	C	
1	1	1	1	13.468
2	1	2	2	14.799
3	1	3	3	12.553
4	2	1	2	12.967
5	2	2	3	14.798
6	2	3	1	15.045
7	3	1	3	13.497
8	3	2	1	14.035
9	3	3	2	14.007
K ₁	13.607	13.311	14.183	
K ₂	14.270	14.544	13.924	
K ₃	13.846	13.868	13.616	
R	0.663	1.233	0.567	

2.3 验证试验结果 在摇瓶中使用优化后的培养基进行验证试验,植物乳杆菌 OD 值达 15.021,活菌数达 7.1 × 10⁹ cfu/mL,与初始 OD 值 5.701、活菌数 1.4 × 10⁹ cfu/mL 相比,活菌数提高了 407%。

3 结论与讨论

试验以 1 株具有强产酸能力的植物乳杆菌为研究对象,通过单因素和正交试验设计确定了优化后的培养基为蔗糖 30.00 g/L,酵母浸膏 50.00 g/L,无水乙酸钠 5.00 g/L,磷酸氢二钾 2.00 g/L,柠檬酸氢二铵 2.00 g/L,硫酸镁 0.58 g/L,硫酸锰 0.25 g/L,吐温-80 1 mL/L,碳酸钙 2.00 g/L,优化后发酵摇瓶的 OD 值为 15.021,活菌数达 7.1 × 10⁹ cfu/mL,与初始 OD 值 5.701、活菌数 1.4 × 10⁹ cfu/mL 相比,发酵液活菌数是原来的 5 倍,显著增加了植物乳杆菌的菌体生物量。此外,优化后的培养基用廉价易得的国产组分代替昂贵的进口成分,生产成本为原配方的 2/3,大大降低了生产成本,为今后工业化生产植物乳杆菌奠定了基础,具有较好的经济效益、社会效益和发展前景。

参考文献

- [1] 金世琳.乳酸菌的科学与技术[J].中国乳品工业,1998,26(4):14-16.
- [2] 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):204-206.
- [3] 罗予,李金陵,蔡访勤.口服乳酸杆菌对大鼠粪便正常菌群的影响[J].微生物学报,1992,27(3):295-297.
- [4] 郭维烈.实用微生物技术[M].北京:科学技术文献出版社,1991:60-70.
- [5] HLEMING H P. Fermented vegetables[M]//ROSE A. Economic microbiology: Fermented food. New York: Academic Press,1982: 227.
- [6] DAESCHEL S A. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations[J]. Food microbiology, 1984,1:303-313.
- [7] 顾瑞霞,谢继志.乳酸菌与人体保健[M].北京:科学出版社,1995:1-5.
- [8] SENOK A C,LSMAEEL A Y,BOTTA G A. Probiotics: Facts and myths [J]. Clin Microbiol Infect,2005,11:958-966.