

异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度与光密度值的关系研究

江月¹, 何松贵², 周世水^{1*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006; 2. 广东省九江酒厂有限公司, 广东佛山 528205)

摘要 [目的]探索一种快速测定异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度的方法。[方法]采用分光光度法测定菌液的光密度值(OD值), 平板菌落计数法测定异常汉逊酵母和植物乳杆菌的菌液浓度, 并研究两者的相关关系。[结果]异常汉逊酵母在 YEPD 培养基中指数期的菌液浓度与光密度值呈现极显著的线性相关关系, 菌液浓度(y)与光密度值(x)线性回归方程: $y = 2.246x - 0.030$ ($R^2 = 0.9986$)。植物乳杆菌在 MRS 肉汤培养基中指数期菌液浓度的对数值与光密度值呈现极显著的线性相关关系, 菌液浓度的对数值(y)与光密度值(x)线性回归方程: $y = 0.1724x + 8.4321$ ($R^2 = 0.9966$)。[结论]分光光度法可用于快速测定异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度。

关键词 异常汉逊酵母; 植物乳杆菌; 菌液浓度; 光密度值; 回归方程

中图分类号 TS201.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)19-0099-02

Research on the Relationship between Bacteria Concentration and Optical Density of *Hansenula anomala* and *Lactobacillus plantarum*
JIANG Yue¹, HE Song-gui², ZHOU Shi-shui^{1*} (1. College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006; 2. Guangdong Jiujiang Distillery Co. Ltd., Foshan, Guangdong 528205)

Abstract [Objective] To explore a rapid measurement of bacteria concentration of *Hansenula anomala* and *Lactobacillus plantarum*. [Method] Spectrophotometry and plate counting were used to determine the optical density (OD) and bacteria fluid concentration respectively, investigate the correlations between them. [Result] The correlations of the optical density with bacteria concentration were well. Bacterial concentration(y) and optical density (x) linear regression equation was established of *Hansenula anomala* YEPD medium in logarithmic phase: $y = 2.246x - 0.030$ ($R^2 = 0.9986$). The logarithm of bacterial concentration (y) and optical density (x) linear regression equation was established of *Lactobacillus plantarum* MRS medium in logarithmic phase: $y = 0.1724x + 8.4321$ ($R^2 = 0.9966$). [Conclusion] Spectrophotometric method can be used for rapid determination of *Hansenula anomala* and *Lactobacillus plantarum* bacteria fluid concentration.

Key words *Hansenula anomala*; *Lactobacillus plantarum*; Bacteria fluid concentration; Optical density; Regression equation

酵母菌和乳酸菌是发酵饮料酿造过程中的重要菌种, 对产品的风味和质量的稳定性具有重要影响。因此, 发酵工艺中酵母菌和乳酸菌菌液的接种量对终产品的品质具有重要意义。一般意义上理解, 接种量是指接入种子液的体积占接种后培养液体积的百分比。但是标准工艺中或科研中, 需要对工艺进行精确控制, 此时接种量一般是指所使用菌种浓度^[1]。

菌液浓度一般采用 2 种测定方法^[2-3]。一为平板菌落计数法, 这种方法可以比较准确地测定菌液浓度, 但是时间上有明显的滞后性。二为比浊法, 该方法可以迅速地判断菌液浓度, 但是误差较大, 准确性不高。

本研究拟采用分光光度法测定菌液的光密度值(OD 值), 平板菌落计数法测定异常汉逊酵母和植物乳杆菌的菌液浓度, 并研究两者的相关关系, 探索一种快速测定异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度的方法, 为发酵饮料确定菌种浓度提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。异常汉逊酵母(*Hansenula anomala*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)均为华南理工大学生物科学与工程学院实验室保藏菌种。

1.1.2 培养基。YEPD 培养基: 酵母浸膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.0, 115 °C 高压灭菌

20 min。YPD 培养基: 在 YEPD 培养基中加入 20 g/L 琼脂粉, 115 °C 灭菌 20 min。

MRS 肉汤培养基: 称取本品 52.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, 115 °C 高压灭菌 20 min。配制固体培养基则再加入 20 g/L 琼脂粉, 115 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要仪器。摇床, 太仓市华利达实验设备有限公司; 生化培养箱, 重庆市永生实验仪器厂; 752 型紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备。酵母菌种子液的培养: 接种一环斜面酵母菌于 100 mL YEPD 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 13 h, 经 2~3 次传代与扩大培养后制成酵母菌种子液, 冷藏备用。

乳酸菌种子液的培养: 接种一环活化后的斜面植物乳杆菌于 100 mL MRS 培养基中, 35 °C、180 r/min 振荡培养 13 h, 经 2~3 次传代与扩大培养后制成乳酸菌种子液, 冷藏备用。

1.2.2 培养液收集。向装有 100 mL YEPD 培养基的三角瓶中接入 2 mL 酵母种子液, 混匀后摇床培养(30 °C, 180 r/min), 每隔 2 h 取样。

向装有 100 mL MRS 液体培养基的三角瓶中接入 2 mL 乳酸菌种子液, 混匀后摇床培养(35 °C, 180 r/min), 前期每 2 h 取样, 后期每 1 h 取样。

1.2.3 光密度值测定。以未接种的培养基为空白对照, 采用分光光度计($\lambda = 600$ nm)测定培养期间菌液的光密度值(OD₆₀₀值), 每份样品做 3 个平行。若菌悬液太浓, 应用未接种的培养基适度稀释, 使 OD₆₀₀值在 0.2~0.8 范围内。

1.2.4 平板菌落计数法测菌液浓度。无菌操作把培养液样

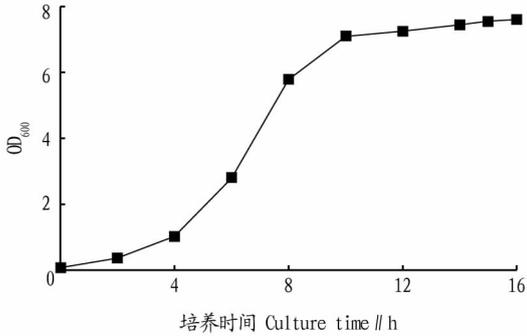
作者简介 江月(1992—), 女, 湖北随州人, 硕士研究生, 研究方向: 麦芽饮料发酵工艺。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事发酵工程方面的研究。

收稿日期 2017-04-28

品摇匀后进行10倍梯度稀释(稀释度一般为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}),分别吸取100 μL 稀释液涂平板(3个平行),恒温(30 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养24~36 h后进行菌落计数。

2 结果与分析

2.1 酵母菌和乳酸菌生长曲线的测定 该试验得出异常汉逊酵母和植物乳杆菌培养期间培养液的 OD_{600} 值,并以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标,分别绘制酵母菌和乳酸菌的生长曲线,结果见图1和图2。

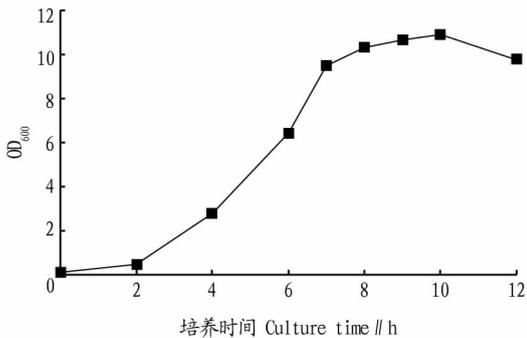


注:培养时间0,2,4,6,8,10,12,14,15,16 h的稀释倍数依次为1、1,2,8,10,10,11,11,11,11倍

Note: Dilution times of culture time 0,2,4,6,8,10,12,14,15,16 h are 1,1,2,8,10,10,11,11,11,11, respectively

图1 异常汉逊酵母的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Hansenula anomala*



注:培养时间0,2,4,6,7,8,9,10,12 h的稀释倍数依次为1、1,4、10,20,20,20,20,20倍

Note: Dilution times of culture time 0,2,4,6,7,8,9,10,12 h are 1,1,4,10,20,20,20,20,20, respectively

图2 植物乳杆菌的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Lactobacillus plantarum*

2.2 异常汉逊酵母指数期菌液浓度与光密度值的关系 以 OD_{600} 值为横坐标,菌液浓度为纵坐标,运用Stata13软件,绘制XY散点图,线性拟合得出两者的回归曲线(图3)。回归方程为 $y = 2.246x - 0.030$ ($R^2 = 0.9986$),显著性检验结果($F = 8356.11, P = 0 < 0.01$)表明两者之间呈现极显著的线性相关关系,这与马勇等^[4-5]的研究发现一致。

2.3 植物乳杆菌指数期菌液浓度与光密度值的关系 以 OD_{600} 值为横坐标,菌液浓度的对数值为纵坐标,运用Stata13软件绘制XY散点图,线性拟合得出两者的回归曲线(图4)。回归方程为 $y = 0.1724x + 8.4321$ ($R^2 = 0.9966$),显著性检验结果($F = 281.83, P = 0 < 0.01$)表明两者之间呈现极显著

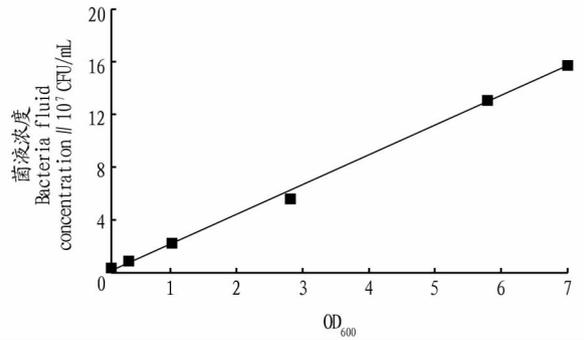


图3 异常汉逊酵母在指数期 OD_{600} 值与菌液浓度的关系

Fig.3 Relationship between *Hansenula anomala* OD_{600} values of logarithmic phase and bacteria fluid concentration

的线性相关关系。同时研究发现,以 OD_{600} 值为横坐标,对数期的菌液浓度为纵坐标,回归方程不显著,这与严佩峰等^[6]的研究结果有所不同。

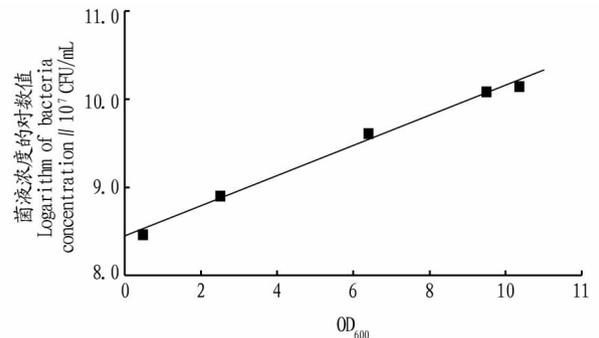


图4 植物乳杆菌在指数期 OD_{600} 值与菌液浓度对数值的关系

Fig.4 Relationship between *Lactobacillus plantarum* OD_{600} values of logarithmic phase and the logarithm of bacteria concentration

3 结论与讨论

该试验探索了一种快速测定异常汉逊酵母和植物乳杆菌菌液浓度的方法。通过对异常汉逊酵母和植物乳杆菌培养过程中光密度值(OD_{600} 值)的测定,结合平板菌落计数得到菌液浓度,建立了两者的相关关系:异常汉逊酵母指数期菌液浓度(y)与光密度值(x)的回归方程 $y = 2.246x - 0.030$ ($R^2 = 0.9986$),植物乳杆菌指数期菌液浓度的对数值(y)与光密度值(x)的回归方程 $y = 0.1724x + 8.4321$ ($R^2 = 0.9966$)。通过分光光度法测定菌液的 OD_{600} 值可以判断菌体是否进入指数期,同时可以实时准确地掌握菌液浓度。

参考文献

- [1] 段梦奇,杨勇,徐恒,等. 光密度测定法在百日咳杆菌培养菌液浓度测定中的应用[J]. 生物技术世界,2014(7):121-122.
- [2] 董自艳,戴翠,马仕洪,等. 紫外-可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度[J]. 中国药品标准,2014,15(2):120-121.
- [3] 王改玲,宋云杰,高竞铎,等. 畜牧业中4种常用有益菌浓度与吸光度的关系[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):274-276.
- [4] 马勇,樊永军. 用 OD 值监测产油酵母培养过程中的菌体生物量变化[J]. 安徽农业科学,2011,39(12):7342-7343.
- [5] 马勇,季祥,蔡祿. 2种测定产油酵母菌生长曲线方法的比较[J]. 安徽农业科学,2011,39(14):8202-8203,8233.
- [6] 严佩峰,张孔海,李建芳. 乳酸菌培养液中活菌数与吸光度的关系研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报,2012,22(1):110-112.