

冻干乳酸菌菌种增菌培养基增殖因子的优化

张建友¹ 徐静波¹ 王军良¹ 赵培城¹ 霍贵成²

(浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310032)¹ (东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)²

摘要: 发酵剂是影响整个酸奶生产的关键因素之一, 冷冻干燥乳酸菌发酵剂的使用提高了企业产品质量, 避免了因微生物力量不足而造成的菌种质量不佳等问题。在基础培养基的基础上确定了嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*, *S. t*) 和保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. b*) 的增菌配方分别为: *S. t* (平菇浸汁 14mL、胡萝卜汁 10mL、玉米浆 0.6mL、Vc 0.2g) 和 *L. b* (啤酒 10mL、番茄汁 10mL、胡萝卜汁 15mL、平菇浸汁 16mL), 同时测定了其最佳培养时间。

关键词: 冻干, 乳酸菌, 增菌培养基, 增殖因子

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0012-06

Optimization of Culture in Vacuum Freeze-drying Lactobacillus

ZHANG Jian-You¹ XU Jing-Bo¹ WANG Jun-Liang¹ ZHAO Pei-Cheng¹ HUO Gui-Cheng²

(The College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032)¹

(The College of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)²

Abstract: Starter is one of the most important factors in the yoghurt producing. The using of vacuum freeze-drying starter can greatly improve the quality of products and avoid some technical problems. The best combination of *S. t* and *L. b* were mushroom juice 14mL, carrot juice 10mL, maize liquid 0.6mL, Vc 0.2g and beer 10mL, tomato 10mL, carrot juice 15mL, mushroom juice 16mL respectively, the best cultivate time was also determined.

Key words: Freeze-drying, Lactobacillus, Optimal culture, Optimal ingredients

酸奶对人体有平衡肠道菌群和整肠、清除血清中胆固醇、抗衰老、延长寿命、防止和降低乳糖不耐症、提高人体对钙、磷、铁的吸收等作用^[1]。传统发酵剂含菌量低, 制作过程繁杂, 质量不易控制, 容易污染杂菌和噬菌体^[2]。冷冻干燥乳酸菌发酵剂可以使乳酸菌发酵剂的生产专业化、规范化和统一化, 从而使发酵乳制品的生产标准化, 提高发酵乳产品质量, 保障了消费者的利益和健康^[3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

胰蛋白胨、大豆蛋白胨、鱼肉蛋白胨、柠檬酸钠、磷酸氢二钾、乙酸钠、胡萝卜、啤酒、番茄、甲酸、卵磷脂、嗜热链球菌 (*S. t*)、保加利亚乳杆菌 (*L. b*)

1.2 仪器与设备

电子天平、电子显微镜、恒温培养箱、超净工作台、高压灭菌器、干燥箱、微波

通讯作者 Tel: 0571-88320796, E-mail: zhjianyou@zjut.edu.cn

收稿日期: 2005-03-17, 修回日期: 2005-05-08

炉、UV2401PC 紫外分光光度计、PHS-3C 型精密 pH 计。

1.3 方法

1.3.1 菌液测定: 菌液吸光值用 UV2401PC 紫外分光光度计在 600nm 比色测定; pH 值用 PHS-3C 型精密 pH 计室温测定; 菌液滴定酸度按 GB5409-89 方法进行^[4]。

1.3.2 平菇浸汁的制备方法: 取鲜菇 200g, 切碎后加 400mL 蒸馏水煮沸 5min 后, 移入组织捣碎机捣碎, 用 3 层纱布过滤, 滤液即为平菇浸汁, 备用^[5]。

1.3.3 玉米浆的制备: 鲜玉米→热烫(100℃ 60~90s)→打浆→调酸(加碳酸氢钠调 pH=5.8~6.4)→粗滤→胶体磨→灭菌(68℃~85℃ 5min)→冷却(42℃加入 0.1% 焦磷酸钠溶液)→混匀备用^[6]。

1.3.4 胡萝卜汁的制备: 取新鲜胡萝卜洗净后切碎, 沸水煮沸 30min 加等量水, 组织捣碎机捣碎, 过滤, 然后离心 0.5h^[7]。

1.3.5 生长曲线的测定: 菌种活化扩培后, 以 5% 接种量接种于优化出的增菌培养基中, 在适宜条件下培养, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24h 取样测定吸光值、pH 值和滴定酸度, 以培养时间为横坐标, 相应的吸光值、pH 值和滴定酸度为纵坐标, 绘制生长曲线^[8]。

2 结果与分析

2.1 培养条件的确定

低温培养可使菌体内不饱和脂肪酸含量增加, 从而提高冻干菌的存活率, 另一影响是低温培养产生的不溶性多糖升高。生长培养基的 pH 值对菌体的生长是一个限制因素, 在培养阶段调整培养基的 pH 值, 不仅可以提高活菌数, 还可以提高冷冻干燥的存活率, 培养方式对乳酸菌生长有较大影响。

在基础培养基中接入 5% 的菌悬液, 选择 37℃、39℃ 和 41℃ 分别培养嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌, 用无菌的乳酸溶液调节培养基为 5.6、5.8、6.0 3 个初始 pH 点, 培养方式选择普通生化培养箱和二氧化碳培养箱两种, 确定其最佳培养条件, 试验数据见表 1。

表 1 试验菌种培养条件的选择

条件	指标	pH		OD	
		<i>S. t</i>	<i>L. B</i>	<i>S. t</i>	<i>L. b</i>
培养温度	37℃	6.42	6.05	0.069	0.530
	39℃	6.40	6.10	0.083	0.241
	41℃	6.19	6.09	0.105	0.239
初始 pH	5.6	5.46	5.49	0.049	0.259
	5.8	5.46	5.49	0.049	0.259
	6.0	5.67	5.28	0.045	0.523
培养方式	普通生化培养箱	5.83	5.50	0.025	0.325
	二氧化碳培养箱	6.44	5.83	0.119	0.081
		6.47	5.75	0.028	0.116

表1证明 *S. t* 的最佳培养条件应为初始 pH 值 5.6, 于普通生化培养箱中 41℃ 培养, 而 *L. b* 应在 pH 值 5.8, CO₂ 培养箱中 37℃ 培养。

2.2 增殖因子的确定

根据 *S. t* 及 *L. b* 的营养需要, 其增殖因子分别有乳糖、胡萝卜汁、啤酒、番茄汁、玉米浆、平菇浸汁、Vc^[9] 和番茄汁、啤酒、甲酸、卵磷脂、胡萝卜汁、玉米浆、平菇浸汁^[10], 单因素试验结果见表2。

由表2 试验数据可以看出 *S. t* 较好的4种增殖因子依次为平菇浸汁、胡萝卜汁、Vc、玉米浆, 正交试验的浓度为: 平菇浸汁(10%、12%、14%)、胡萝卜汁(8%、10%、12%)、玉米浆(0.2%、0.4%、0.6%)、Vc(0.2%、0.4%、0.6%); *L. b* 的正交试验浓度为: 啤酒(7%、8.5%、10%)、番茄汁(5%、7.5%、10%)、胡萝卜汁(14%、15%、16%)、平菇浸汁(14%、16%、18%)。

表2 增殖因子单因素试验结果

浓度	增殖因子	嗜热链球菌 (<i>S. t</i>)		保加利亚乳杆菌 (<i>L. b</i>)		
		pH	OD	增殖因子	pH	OD
1	5.37	0.18		5.26	0.22	
2	胡萝卜汁	5.37	0.2140	甲酸	5.27	0.2238
3		5.38	0.1571		5.24	0.1955
1		5.42	0.1755		5.19	0.3066
2	玉米浆	5.44	0.1636	啤酒	5.04	0.5249
3		5.42	0.1621		5.00	0.4680
1		5.36	0.1699		5.00	0.3355
2	啤酒	5.38	0.1663	番茄汁	5.09	0.4303
3		5.39	0.1635		5.09	0.3803
1		5.36	0.1647		5.19	0.0520
2	乳糖	5.38	0.1711	卵磷脂	5.11	0.1020
3		5.40	0.1670		5.13	0.0710
1		5.41	0.1457		5.13	0.3205
2	番茄汁	4.41	0.1675	玉米浆	5.15	0.3543
3		5.38	0.1536		5.12	0.3489
1		5.39	0.1850		5.15	0.3138
2	维生素 C	5.42	0.1965	胡萝卜汁	5.14	0.2948
3		5.44	0.1808		4.97	0.5127
1		5.39	0.1398		5.03	0.4114
2	平菇浸汁	5.39	0.2636	平菇浸汁	5.03	0.4307
3		5.36	0.1469		5.02	0.4464

2.3 增殖因子的优化

本部分试验采用四因素三水平进行试验, 按最佳条件培养, 以 OD 值和 pH 值为观测指标, *S. t* 的试验及分析结果见表3、4, *L. b* 的试验及分析结果见表5、6。

表3 *S. t* 增殖因子优化的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	指标值 (<i>S. t</i>)	
	平菇浸汁	胡萝卜汁	玉米浆	Vc	OD_{600}	pH 值
1	10%	8%	0.2%	0.2%	0.1688	5.365
2	10%	10%	0.4%	0.4%	0.1785	5.375
3	10%	12%	0.6%	0.6%	0.1738	5.340
4	12%	8%	0.4%	0.6%	0.1855	5.335
5	12%	10%	0.6%	0.2%	0.1445	5.340
6	12%	12%	0.2%	0.4%	0.1741	5.360
7	14%	8%	0.6%	0.4%	0.1236	5.345
8	14%	10%	0.2%	0.6%	0.1274	5.320
9	14%	12%	0.4%	0.2%	0.1112	5.360

表4 *S. t* 增殖培养基优化指标的极差分析结果

指标值	OD_{600}			
	A	B	C	D
K_1	0.5211	0.4779	0.4703	0.4245
K_2	0.5041	0.4504	0.4752	0.4762
K_3	0.3622	0.4591	0.4419	0.4867
R	0.0530	0.0092	0.0111	0.0207
指标值	pH 值			
	A	B	C	D
K_1	16.08	16.16	16.05	16.05
K_2	16.14	16.02	16.19	16.08
K_3	16.03	16.06	16.01	16.11
R	0.037	0.047	0.058	0.020

表5 *L. b* 增殖因子优化的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	指标值 (<i>L. b</i>)	
	啤酒	番茄汁	胡萝卜汁	平菇浸汁	OD_{600}	pH 值
1	7.0%	5.0%	14%	14%	0.3470	5.295
2	7.0%	7.5%	15%	16%	0.2793	5.325
3	7.0%	10.0%	16%	18%	0.2412	5.300
4	8.5%	5.0%	15%	18%	0.3266	5.295
5	8.5%	7.5%	16%	14%	0.3850	5.285
6	8.5%	10.0%	14%	16%	0.2780	5.295
7	10.0%	5.0%	16%	16%	0.2813	5.275
8	10.0%	7.5%	14%	18%	0.2871	5.295
9	10.0%	10.0%	15%	14%	0.2629	5.235

表6 *L. b* 增殖培养基优化指标的极差分析结果

指标值	OD_{600}			
	A	B	C	D
K_1	0.8675	0.9549	0.9121	0.9949
K_2	0.9896	0.9514	0.8688	0.8386
K_3	0.8313	0.7821	0.9075	0.8549

续表6

R	0.0528	0.0576	0.0144	0.0521
	pH 值			
K ₁	15.92	15.87	15.89	15.85
K ₂	15.88	15.91	15.86	15.84
K ₃	15.81	15.83	15.86	15.89
R	0.115	0.075	0.030	0.055

结合以上试验数据及分析结果可得 *S. t* 的增殖因子配方为平菇浸汁 14%、胡萝卜汁 10%、玉米浆 0.6%、Vc0.2%，*L. b* 的增菌配方为啤酒 10%、番茄汁 10%、胡萝卜汁 15%、平菇浸汁 16%。

2.4 生长曲线的测定

为了解 *S. t* 和 *L. b* 在优化的增菌培养基中的生长过程从而掌握发酵最适收获期，进行了生长曲线测定。间隔 3h 测定菌液的吸光值、pH 值和滴定酸度，绘制生长曲线（图 1~图 4）（图中数据均进行统计处理，误差在允许范围内，篇幅所限，统计处理过程不予列出）。

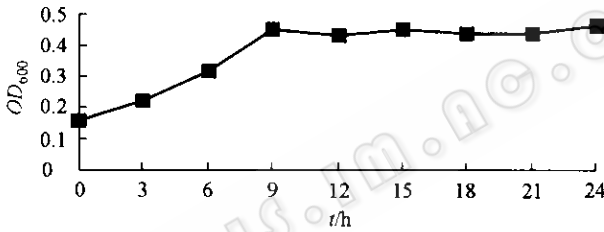


图 1 嗜热链球菌菌生长曲线

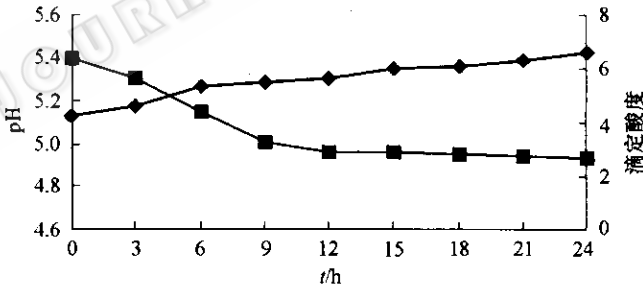


图 2 嗜热链球菌生长曲线测定中 pH 值和滴定酸度的变化

■ pH 值, ◆ 滴定酸度

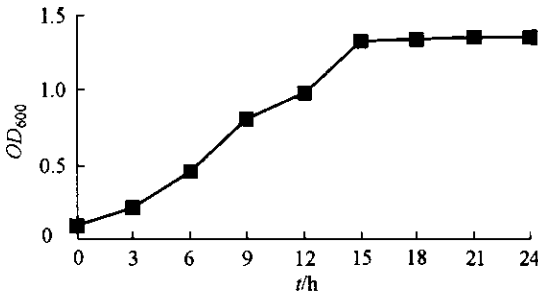


图 3 保加利亚乳杆菌生长曲线

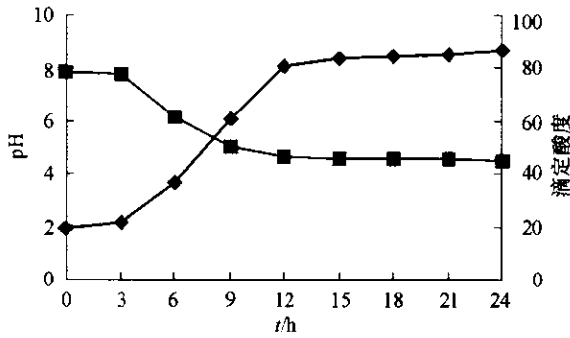


图4 保加利亚乳杆菌 pH 值和滴定酸度的变化

—■— pH 值, —◆— 滴定酸度

由图1~4可以看出, *S. t* 和 *L. b* 的 *OD* 值从一开始急增, 经过较短的延迟期后即进入对数生长期, 到9h和15h后达到高峰即基本保持不变, 表明此后菌数不再增加。这种情况意味着9h和15h以后已经明显不利于 *S. t* 和 *L. b* 的生长繁殖, 生长曲线亦呈下降趋势。因此, *S. t* 和 *L. b* 的最适收获期应为9~12h和12~16h。考虑到在对数生长期末、稳定期初收获可提高其在冷冻干燥过程中的存活率, 这里选择在9h和15h收获。

3 结论

本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 14mL、胡萝卜汁 10mL、玉米浆 0.6mL、Vc 0.2g 和啤酒 10mL、番茄汁 10mL、胡萝卜汁 15mL、平菇浸汁 16mL, 同时测定其最佳培养时间分别为9h和15h。

参考文献

- [1] 张兰威, 刘维等. 中国乳品工业, 1999, 27 (1): 7~9.
- [2] 骆承庠. 乳与乳制品工艺学. 哈尔滨: 东北农业大学出版社, 1996. 10~60.
- [3] 刘宇峰, 王金英. 中国乳品工业, 1995, 23 (6): 7~10.
- [4] 吕加平, 梁占东. 中国乳品工业, 1999, 27 (3): 12~15.
- [5] 张 功, 王瑞君. 微生物学通报, 2002, 29 (4): 65~67.
- [6] 彭 凌. 玉米酸奶的制作, 食品科技, 2002 (8): 54~56.
- [7] 刘 慧. 食品微生物学实验指导. 哈尔滨: 东北农业大学出版社, 1996. 10~80.
- [8] 黄良昌, 吕晓玲. 中国乳品工业, 2002, 30 (1): 12~15.
- [9] Mollet B. International Dairy Journal, 1999, 9 (1): 578~582.
- [10] Robinson R K. Journal of Dairy Research, 1996, 9 (1): 36~39.