

两歧双歧杆菌菌株制剂的研究 I. 两歧双歧杆菌的发酵条件

钱旭初* 黄月琴** 陈彬华**

张旭帆*** 丁东新* 张克艰*

摘要 本文就两歧双歧杆菌以脱脂牛奶为培养基的厌氧发酵条件进行了探索。试验了导致双歧杆菌增殖的几种生长促进剂。并获得产菌量较高的发酵培养基,同时对双歧杆菌发酵条件作了讨论。

关键词 乳酸菌;两歧双歧杆菌;厌氧发酵

用牛乳作为培养基发酵乳酸菌已有较长历史并广为应用。但是,近年来由于各国学者对双歧杆菌的大量研究表明,其对人体的生理作用远远超过其他乳酸菌。它具有整肠作用、能促进肠道蠕动、增加营养物质的吸收、改善便秘、减少胺类酚类等有害物质的产生;在肠内合成B族维生素和改善对人乳蛋白的消化作用;能防止病原菌入侵和抑止肠道内有害菌增殖;提高机体免疫能力、促使体内免疫细胞活化等功能。因此目前人们更关注双歧杆菌的培养和发酵技术。但该菌不同于乳酸菌^[1],是属有氧化存在时不能增殖的专性厌氧菌。如果按乳酸菌的发酵条件则难于在牛乳培养液中增殖。本研究就双歧杆菌的发酵条件进行了摸索,现将结果报告如下。

材料和方法

1. 菌种: 双歧杆菌由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所分离并鉴定为两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)。

2. 培养基^[2]

(1) 庖肉汤培养基: 牛肉浸液 5ml (pH 7.6), 牛肉渣 1g, 分装试管, 1kg/cm² 高压灭菌 30 分钟, 用于菌种培养。

(2) 发酵培养基: 10% 脱脂牛乳中加入 0.03% 酵母浸液, 调 pH 至 6.5—7.0, 0.55kg/cm² 灭菌 10 分钟, 用于各级发酵培养。

(3) GAM 琼脂(%): 蛋白胨 1.0, 豚蛋白胨 1.0, 酵母浸膏 0.5, 磷酸二氢钾 0.25, 可溶性淀粉 0.25, 大豆蛋白胨 0.3, 牛肉膏粉 0.22, 氯化钠 0.3, 肝浸膏粉 0.12, 琼脂 1.5, 调 pH 7.3, 1kg/cm² 灭菌 30 分钟。用前再加葡萄糖 0.3%, L-盐 酸半胱氨酸 0.03%, 硫乙醇酸钠 0.03%, 一并加热融化, 待冷却至 50℃ 左右时加 5% 无菌兔血, 立即摇匀制成平板, 用于细菌定量检测。

(4) BL 琼脂 (%): 氯化钠 0.5, 蛋白胨 1.0, 琼脂 2.0, 调 pH 7.3—7.5, 1kg/cm² 灭菌 20

* 江苏省微生物研究所。

** 上海信谊药厂。

*** 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所。
本工作承刘秉阳教授指导, 特此致谢。

分钟。制成基础培养基,然后向每 100ml 基础培养基中加葡萄糖 1g、50% 蛋白胨水 4ml、1% 苯胺蓝 3ml。0.55kg/cm² 灭菌 20 分钟,冷却至 50℃ 左右再加 5% 无菌兔血制成平板。用于细菌定量检测。

(5) 磷酸盐缓冲液 (PBS): 磷酸氢二钠 0.15%、磷酸二氢钾 0.02%、氯化钠 0.8%、氯化钾 0.02%。调 pH 7.2, 1kg/cm² 灭菌 30 分钟。用于细菌定量检测时稀释液。

3. 发酵条件: 由于双歧杆菌属专性厌氧菌,因此从种子液培养开始到大批量发酵都必须在厌氧条件下进行。菌种接种肉肉汤试管,厌氧培养 48 小时后转接装有牛乳培养基三角烧瓶内。在试管和三角烧瓶小批量培养时采用钢丝绒厌氧法^[2],在玻璃干燥缸中培养。也可在厌氧培养箱中培养。大批量发酵时系用日本 L. K. Marubaishi 公司生产的 7 立升玻璃发酵罐,无菌接种种子液后密封所有管道,向牛乳培养液中通入 N₂:CO₂ = 90:10 混合气,使罐内残留空气排出。38℃ 恒温培养,定时通入混合气以保证罐内培养液始终处于无氧状态。定时搅拌,使种子液和培养基充分接触。16—24 小时发酵基本完成。

4. 接种量: 种液量可视细菌活力强弱而定,一般接种 5—10%,进行三级发酵。低于 5% 浓度时则发酵延缓或不发酵。

5. 发酵终点测定

(1) 活菌数测定: 采用平板计数法。以 PBS 将发酵液 10 倍连续稀释,取 0.1ml 稀释液用 L 形接种棒均匀涂布于 GAM 琼脂或 BL 琼脂表面,38℃ 厌氧培养。培养方法与种子液小批量培养时所用钢丝绒法相同。48 小时后观察结果,计数平板上长出菌落,再乘以稀释倍数。

(2) 酸度测定: 采用直接中和法,取 0.1 mol/L 氢氧化钠微量滴定 20ml 发酵液所耗氢氧化钠 ml 数进行计算,以 °T 表示。

(3) pH 值测定: 在 PHS-2C 型酸度计上直接读数。

结果和讨论

(一) 双歧杆菌在发酵液中生长曲线和酸度变化的测定

为了解双歧杆菌在发酵液中的生长过程和制备最高菌量的发酵液,从而掌握发酵最佳时间作了生长曲线测定和酸度变化测定。从接种开始时取样,以后每隔 4 小时取样一次分别测定含菌量、酸度和 pH 值,其结果见表 1。从表 1 中可看出:

表 1 双歧杆菌在发酵液中生长曲线和酸度变化

取样时间 (h)	活菌数/ml	酸度 (°T)	pH
0	>10 ⁶	16.8	5.952
4	>10 ⁷	20.0	5.701
8	1.1×10 ⁸	35.1	4.951
12	4.6×10 ⁷	64.9	4.286
16	4.2×10 ¹⁰	84.9	4.050
20	4.7×10 ¹⁰	96.6	3.939
24	1.9×10 ⁹	105.5	3.839
30	1.0×10 ⁹	113.6	3.800

(1) 双歧杆菌接种 12 小时以后菌量显著上升,16—20 小时达最高峰,即进入对数生长后稳定初期,此结果和一般细菌生长规律相符。

(2) 发酵液酸度在 20 小时以内随着细菌迅速增殖而升高,二者呈平行关系。24 小时后细菌不再继续增多而酸度仍缓慢上升。pH 值继续下降到 4.0 以下,此环境已不利于双歧杆菌生长,相反能导致细菌死亡。因此生长曲线呈下降趋向。

(3) 本曲线的实际意义在于当大批量生产时,必须抓住有效发酵时间,取用细菌处在对数生长后的稳定初期的发酵液,此时细胞活力最强,菌数最高。

(二) 影响发酵液中细菌产量的因素

1. 使用优质菌种: 发酵液中细菌产量的高低首先与菌种质量有关。必须使用细胞活力高、耐氧能力较强、繁殖速度快和产酸能力高的菌种。其次是控制接种菌量,接种量多时则发酵速度快,使培养液一开始就处于较高的氧化

还原电位,有利于细菌增殖。

2. 合适的生长环境: 必须采用厌氧培养法,用通入 N_2 和 CO_2 混合气体去除罐内残余氧,使培养液中氧分压降低至最低限度。其次是调整适宜的 pH,经多次试验结果证明发酵初期 pH 在 6.5—7.0 为最佳。

3. 添加双歧杆菌生长促进剂: 为了尽可能提高发酵液中产菌量和加快发酵速度,国内外都在寻找刺激双歧杆菌增殖物质。日本马田三夫认为^[3]在牛乳发酵液中添加少量天冬氨酸和含硫氨基酸以弥补此类氨基酸在牛乳中的不足,从而使发酵液产酸量显著提高;也有人认为^[4],加入还原剂维生素 C 能增加抗氧化能力和刺激双歧杆菌生长。我们在脱脂乳中加入 0.04% 天冬氨酸和 0.01% 半胱氨酸或脱脂乳中加入 0.5% 维生素 C 进行试验,其结果见表 2。

表 2 氨基酸和 pH 对细菌产量的影响

	发酵前 pH	发酵后 pH	菌量(活菌数/ml)
脱脂乳+氨基酸	6.0	4.0	2.25×10^{12} /ml
脱脂乳+氨基酸	7.0	4.0	3.84×10^{11} /ml
脱脂乳+维生素 C	5.5	3.8	7.40×10^9 /ml
脱脂乳对照	6.0	4.0	4.25×10^9 /ml

表 2 提示脱脂牛乳加入适量氨基酸,调 pH 至 7.0,在 38℃ 培养效果最佳。此结果和马氏结果基本相似,用此法培养能使菌量增殖至较高水平。而在加入 0.5% 维生素 C 时未见明显效果。

苏联资料报导^[5,6],在消毒牛乳中添加 0.25—1.0% 玉米浸液可使双歧杆菌产量增加几十倍到几百倍,每毫升达 10^7-10^8 菌数,同时酸度也大大提高。我们在脱脂乳中添加 0.03% 酵母浸液,也能促进双歧杆菌的增殖,使发酵速度大大加快,产酸量和产菌量均明显提高,使每毫升发酵液中活菌数达 10^{10-12} 。比苏联报道的结果明显增高。

4. 不同浓度脱脂乳对细菌产量的影响: 目前双歧杆菌酸乳饮料采用不同浓度脱脂乳发酵制成。我们了解不同浓度脱脂乳对细菌产量

表 3 不同浓度脱脂乳对细菌产量的影响*

脱脂牛乳浓度 (%)	发酵液 pH 值	发酵液菌量(活菌数/ml)
100	3.8—4.1	10^{9-11}
50	3.7—4.0	10^{10-12}
25	3.7—4.0	10^{10-12}
10	3.7—3.9	10^{11-12}

* 添加 0.03% 酵母浸液

的影响,用蒸馏水将脱脂牛乳稀释成 50%、25% 和 10% 不同浓度进行发酵,并同时检测其菌量。其结果见表 3。表 3 表明牛乳浓度的高低并不影响双歧杆菌的产菌量,10% 浓度牛乳的营养成份足以使双歧杆菌得到充份发育和生长。

(三) 发酵液中菌量检测方法

双歧杆菌制剂在国际上迄今尚未有一个定量标准,在检测方法上也无统一的培养基和标准方法。我们采用传统平板法,但操作繁琐,需厌氧培养,48 小时才出结果。曾试图用血球计数板直接读数,此法优点是快速简单,但与平板法相比较结果不尽一致,前者高于后者,因此目前仍以平板法为主。

小 结

1. 以脱脂消毒牛乳为培养基,对双歧杆菌厌氧发酵条件进行摸索,获得产菌量较高的发酵液,每毫升可达 10^{10-12} 菌数,略高于国外水平。

2. 发酵速度的快慢和细菌产量的高低除与菌种活力、培养环境、厌氧程度及 pH 值等条件有关外,还和添加生长促进剂有明显关系。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, B. E. et al.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed., 253—254, 1977.
- [2] 李忠元等; *中华流行病学杂志*, 4(3): 181—184, 1983.
- [3] 马田三夫; *新食品工业(日本)*, 24(1): 63—70, 1982.
- [4] 金世琳; *食品与发酵工业*, 3: 39—45, 1983.
- [5] 李春起; *乳品工业(苏联)*, 3: 3—34, 1980.
- [6] 李春起; *乳品工业(苏联)*, 6: 17—20, 1982.