

M LF 植物乳杆菌 R23 培养基优化

梁璋成^{1,2}, 何志刚¹, 任香芸¹, 李维新¹, 林晓姿¹, 陈江华³

(1. 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002; 3. 福建省福清市出入境检验检疫局, 福建 福清 350300)

摘要: 根据乳酸菌的营养需求, 采用均匀设计优选具有苹果酸乳酸发酵能力植物乳杆菌 R23 生长的培养基组分, 并对培养基进行正交优化, 筛选出无 Mn^{2+} 及含 Mn^{2+} 培养基 LH16、LH18 组合。采用 LH16、LH18 培养基培养植物乳杆菌 R23, 在 25℃恒温培养 24 h, 菌量分别达到 3.40×10^9 cfu·mL⁻¹ 和 6.67×10^9 cfu·mL⁻¹。

关键词: 苹果酸乳酸发酵; 植物乳杆菌; 培养基

中图分类号: S 201

文献标识码: A

Optimization of culture medium for *Lactobacillus plantarum* R23 for malolactic fermentation

LIANG Zhang cheng^{1,2}, HE Zhi gang¹, REN Xiang yun¹, LI Wei xin¹, LIN Xiao zi¹, CHEN Jiang hua³

(1. Institute of agricultural engineering technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Food science college, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Fuqing Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P. R. China Fuqing, Fujian 350300, China)

Abstract: Based on the nutritional requirements of lactic acid bacteria, the uniform design was used to optimize the formulation of culture medium suitable for the growth of the *Lactobacillus plantarum* for the malolactic fermentation. Orthogonal optimization was further applied for the selection of the LH16 (non- Mn^{2+}) and LH18 (with Mn^{2+}) medium. By incubating the *Lactobacillus plantarum* in the LH16 and LH18 medium at 25℃ for 24h, the cell densities were 3.40×10^9 and 6.67×10^9 cfu per mL, respectively. They were twice as high as the MRS medium could produce.

Key words: malolactic fermentation; *Lactobacillus plantarum*; culture medium

乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB)是人体的益生菌, 具有调节人体胃肠道正常菌群、保持微生态平衡, 提高食物消化率和生物价, 降低血清胆固醇, 抑制肠道内腐败菌的生长繁殖和腐败产物的产生等作用^[1-3]。近年来乳酸菌的特殊生理活性和保健功能, 正日益引起各国学者和研究人员的浓厚兴趣。乳酸菌在食品工业的应用, 不仅可提高食品的营养价值, 改善食品风味, 还可提高食品保藏性和附加值。在果酒酿造中, 利用具有苹果酸-乳酸发酵能力的乳酸菌进行果酒的生物降酸, 把 L- 苹果酸转化成 L- 乳酸^[4-5], 达到降酸增柔的效果, 同时增加酒体的生物稳定性, 并起到风味修饰作用^[6-7]。应用于果蔬汁的乳酸饮料中, 则可实现果蔬全汁无奶

的直接发酵。

乳酸菌属于化能异养型微生物, 缺乏对许多有机物的合成能力, 其能否在特定环境下生长, 很大程度取决于营养物质的供给情况。因而无论是采用单一或混合的菌种, 都需要对培养基进行改良, 使其获得最大的生长速率^[8]。在实验室分离、纯化时通常使用 MRS 培养基^[9], 但在 MRS 培养基中具有促进乳酸菌生长的 Mn^{2+} , 若应用于果酒生物降酸与全汁果汁的发酵, 易致产品中引入 Mn^{2+} 。锰是一种对人体有害的微量元素, 过量摄入可引起急慢性中毒^[10]。试验根据植物乳杆菌 R23 的特性及生长的营养需求, 筛选出最适合植物乳杆菌 R23 生长的无 Mn^{2+} 培养基, 为植物乳杆菌 R23 的扩大发酵、工业

收稿日期: 2009-10-13 初稿; 2010-01-06 修改稿

作者简介: 梁璋成 (1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事农产品贮藏与加工研究 (E-mail: njgzx@163.com)

通讯作者: 何志刚 (1964-), 男, 研究员, 主要从事农产品贮藏与加工研究 (njgzx@163.com)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2008J0056); 福建省科技计划项目 (2008N0021); 福建省公益类科研院所基本科研专项 (2009R10033-3); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设基金 (STIF-Y05)

化生产及生产直投式乳酸菌发酵剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 植物乳杆菌 R23 (*Lactobacillus plantarum* R23) 由福建省农业科学院农产品加工研究中心从枇杷酒中分离、鉴定并保存。

1.1.2 果汁 番茄汁、解放钟枇杷汁, 由福建省农业科学院农产品加工研究中心提供。

1.1.3 培养基

TJA 培养基: 番茄汁 50 mL, 酵母抽提液 5 g, 牛肉膏 10 g, 乳糖 20 g, 葡萄糖 2 g, 磷酸氢二钾 2 g, 吐温 80 1 g, 乙酸钠 5 g, 加蒸馏水至 1 L, pH 调至 6.8±0.2, 121℃下灭菌 20 min。用于活菌的平板计数。

MRS 培养基: 番茄汁 100 mL, 酵母膏 5 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 0.2 g, 吐温 80 1 g, 乙酸钠 5 g, 胰蛋白胨 15 g, 柠檬酸铵 2 g, 硫酸锰 0.05 g, 加蒸馏水补足 1 L, pH 调至 4.8±0.2, 121℃下灭菌 20 min。用于活化、测定生长曲线及作对比参照用。

本试验所使用化学试剂均为国产 AR 级以上。

1.1.4 主要仪器设备 BIOTECH-5BG 自动玻璃发酵罐 (上海保兴生物设备有限公司), SPX-250BS-II 生化培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司), HZP-250 型全温振荡培养箱 (上海精

宏实验设备有限公司), YXQ-CS-50S II 全自动立式压力蒸汽灭菌器 (上海博达实业有限公司医疗设备厂), DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司), SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 将保藏的菌种接入 MRS 液体培养基, 25℃恒温培养 1 d, 菌体生物量达 10⁹ 后, 备用。

1.2.2 植物乳杆菌 R23 的生长曲线 将活化后的菌种, 接入 MRS 液体培养基, 使菌体生物量达 10⁷, 在 25℃下恒温培养, 每隔 3 h 取样, 测定活菌数并绘制其生长曲线。

1.2.3 培养基的初选 按表 1 均匀设计的试验方案配制培养基, 调节 pH 值到 4.8±0.2, 121℃下灭菌 20 min。接入活化好的菌种, 使菌体生物量达 10⁷, 在 25℃下恒温培养 24 h 后, 取样测定其活菌数。

1.2.4 培养基的优化 在初选培养基的基础上, 根据植物乳杆菌 R23 的营养需求进行碳、氮源的优化, 以苹果酸钠、胰蛋白胨和柠檬酸铵为促进因子进行 L₉(3⁴) 正交试验。按表 2 试验方案配制培养基, 调节 pH 值到 4.8±0.2, 121℃下灭菌 20 min。接入活化好的菌种, 使菌体生物量达 10⁷, 在 25℃下恒温培养 24 h 后, 取样测定其活菌数。

表 1 均匀设计 U₁₁(11¹⁰) 因素水平
Table 1 Factors and levels in U₁₁(11¹⁰) uniform design

水平	番茄汁 (mL·L ⁻¹)	枇杷汁 (mL·L ⁻¹)	酵母膏 (g·L ⁻¹)	牛肉膏 (g·L ⁻¹)	葡萄糖 (g·L ⁻¹)	磷酸氢二钾 (g·L ⁻¹)	硫酸镁 (g·L ⁻¹)	乙酸钠 (g·L ⁻¹)	酵母浸出粉 (g·L ⁻¹)	苹果酸钠 (g·L ⁻¹)
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10	5	0.75	1	3	0.4	0.04	1	0.5	1
3	20	10	1.50	2	6	0.8	0.08	2	1.0	2
4	30	15	2.25	3	9	1.2	0.12	3	1.5	3
5	40	20	3.00	4	12	1.6	0.16	4	2.0	4
6	50	25	3.75	5	15	2.0	0.20	5	2.5	5
7	60	30	4.50	6	18	2.4	0.24	6	3.0	6
8	70	35	5.25	7	21	2.8	0.28	7	3.5	7
9	80	40	6.00	8	24	3.2	0.32	8	4.0	8
10	90	45	6.75	9	27	3.6	0.36	9	4.5	9
11	100	50	7.50	10	30	4.0	0.40	10	5.0	10

1.2.5 对比试验 分别以 1.2.4 优选的 LH16 培养基及在 LH16 的基础上引入 0.05 g·L⁻¹ MnSO₄ 的培养基 (LH18) 进行植物乳杆菌 R23 培养, 以 MRS 及去除 MnSO₄ 成分的 MRS 培养基为对照, 接种后菌体生物量达 10⁷, 在 25℃下恒温培养 24

h, 取样测定其活菌数, 考察 LH16 培养基的增殖水平及 Mn²⁺ 对植物乳杆菌 R23 的促进作用。

1.2.6 测定方法 乳酸菌菌量 (GB/T 4789.35) 采用平板菌落计数法测定; 利用 DPS 软件进行数据分析^[11]。

表 2 培养基进一步优选正交试验 $L_9(3^4)$ 因素水平Table 2 Factors and levels in $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

因素	水平(添加量)($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	1	2	3
苹果酸钠	10	15	20
胰蛋白胨	5	10	15
柠檬酸铵	1	2	3

2 结果和分析

2.1 植物乳杆菌 R23 的菌种最佳收获期的确定

从 MLF 植物乳杆菌 R23 的生长曲线可以看出, 其生长分为 4 个时期, 即延滞期、对数增长期、稳定期及衰减期。在 9 h 内, 菌体生物量先降后升, 并保持在 10^7 水平, 为延滞期。9~24 h, 菌量迅速增长, 为对数生长期, 尤其在 15~24 h, 为快速增长期。24~42 h 后进入稳定期, 随即进入衰减期, 而在衰减期的衰减速率较小, (图 1)。对数生长期的后期菌体细胞的存活率和活性最强^[12], 所以植物乳杆菌 R23 以培养 21~24 h 为收获的最佳时期。

2.2 培养剂的均匀设计法初选试验

用均匀设计法考察培养基各成分番茄汁(X_1)、枇杷汁(X_2)、酵母膏(X_3)、牛肉膏(X_4)、葡萄糖(X_5)、磷酸二氢钾(X_6)、硫酸镁(X_7)、乙酸钠(X_8)、酵母浸出粉(X_9)、苹果酸钠(X_{10}) 对植物乳杆菌 R23 菌体密度的影响(表 3)。以菌体密度的对数值(Y)为目标值进行二次多项式逐步回归分析, 剔除不显著项及因子系数小于 10^{-4} 的因子, 得到回归方程为:

$$Y = 9.094 - 0.0002X_5 + 0.0013X_4^2 + 0.0768X_7^2 - 0.0017X_9^2 - 0.0005X_1: X_8 + 0.0002X_1: X_{10} + 0.0006X_3: X_5$$

回归方程系数 $R = 1$, 其显著水平达 $P = 0.0033$, 各偏相关检验均达极显著水平, 方程检验结果可靠程度高(表 4)。植物乳杆菌 R23 的增长与硫酸镁、牛肉膏的平方项、番茄汁及苹果酸钠、葡萄糖及酵母膏的互作项呈正相关, 与葡萄糖、番茄汁及乙酸钠的互作项、酵母浸粉平方项呈负相关, 且葡萄糖及酵母浸膏互作项的影响大于葡萄糖单因子。试验结果表明, 苹果酸钠为植物乳杆菌 R23 的促进因子, 而解放钟枇杷汁、磷酸二氢钾、乙酸钠和酵母浸粉具抑制作用, 预测植物乳杆菌 R23 培养的最高密度对数值为 9.53, 去除呈负相关作用因子, 初步优选后的培养基组合见表 5。按初步优选后的培养剂进行植物乳杆菌 R23 的验证培养, 其菌体密度对数值可达 9.41。

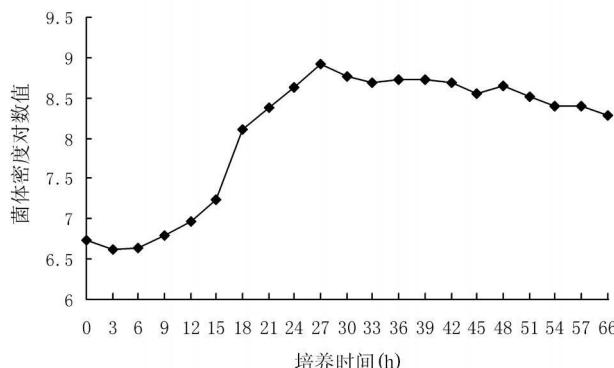


图 1 植物乳杆菌 R23 的生长曲线

Fig 1 Growth curve of *R23 lactobacillus palantarum R23*表 3 $U_{11}(11^{10})$ 均匀试验结果Table 3 Designs and results of $U_{11}(11^{10})$ uniform design experiment

试验号	番茄汁 X_1	枇杷汁 X_2	酵母膏 X_3	牛肉膏 X_4	葡萄糖 X_5	磷酸二氢钾 X_6	硫酸镁 X_7	乙酸钠 X_8	酵母浸出粉 X_9	苹果酸钠 X_{10}	菌量密度 ($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)	菌体密度 对数值
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1.239×10^9	9.093 ± 0.0424
2	2	4	6	8	10	1	3	5	7	9	1.578×10^9	9.198 ± 0.0257
3	3	6	9	1	4	7	10	2	5	8	1.381×10^9	9.140 ± 0.1224
4	4	8	1	5	9	2	6	10	3	7	1.012×10^9	9.005 ± 0.0484
5	5	10	4	9	3	8	2	7	1	6	1.237×10^9	9.092 ± 0.0738
6	6	1	7	2	8	3	9	4	10	5	1.220×10^9	9.086 ± 0.0316
7	7	3	10	6	2	9	5	1	8	4	1.400×10^9	9.146 ± 0.0435
8	8	5	2	10	7	4	1	9	6	3	0.873×10^9	8.941 ± 0.076
9	9	7	5	3	1	10	8	6	4	2	0.808×10^9	8.907 ± 0.0533
10	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	1.211×10^9	9.083 ± 0.0603
11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0.963×10^9	8.984 ± 0.0475

表 4 均匀设计回归方程检验

Table 4 Regression analysis of uniform design experiment

	偏相关	t 检验值	显著水平 P
$r(y, X_5) =$	-1	1039.840	0
$r(y, X_4 * X_4) =$	1	23331.600	0
$r(y, X_7 * X_7) =$	1	2229.549	0
$r(y, X_9 * X_9) =$	-1	11540.450	0
$r(y, X_1 * X_8) =$	-1	70817.330	0
$r(y, X_1 * X_{10}) =$	1	21752.250	0
$r(y, X_3 * X_5) =$	1	19472.430	0

2.3 培养基的正交优化

植物乳杆菌 R23 能以苹果酸为优先碳源利用, 苹果酸钠对该菌的生长有促进作用。试验加大碳源苹果酸钠的使用量, 并引入氮源胰蛋白胨和柠檬酸

铵对初选培养基进行优化, 结果见表 6、7。影响植物乳杆菌 R23 增殖的主要因素为苹果酸钠、胰蛋白胨、柠檬酸铵, 在试验范围内, 苹果酸钠和胰蛋白胨的添加对植物乳杆菌 R23 增殖的影响达显著水平, 而柠檬酸铵的影响未达显著水平。最优组合为 A₃B₃C₂, 即苹果酸钠添加量为 20 g·L⁻¹, 胰蛋白胨添加量为 15 g·L⁻¹, 柠檬酸铵添加量为 2 g·L⁻¹。

优化后的培养基组合 LH 16: 番茄汁 100 mL, 酵母膏 7.4 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 30 g, 硫酸镁 0.36 g, 苹果酸钠 20 g, 吐温 1 g, 胰蛋白胨 15 g, 柠檬酸铵 2 g, 加水补足 1 L, 调节 pH 为 4.8±0.2。植物乳杆菌 R23 在 LH 16 培养基培养 24 h, 其菌体生物量对数值为 9.65, 比优化前增加了 0.24 个点。

表 5 初步优选后的培养基组合

Table 5 Primary optimization of medium formulation

成分	番茄汁 (mL·L ⁻¹)	酵母膏 (g·L ⁻¹)	牛肉膏 (g·L ⁻¹)	葡萄糖 (g·L ⁻¹)	硫酸镁 (g·L ⁻¹)	苹果酸钠 (g·L ⁻¹)	吐温 80 (g·L ⁻¹)	菌体密度 对数值
浓度	100	7.4	10	30	0.36	10	1	9.41

表 6 正交试验 L₉(3⁴) 结果Table 6 Results and analysis of L₉(3⁴) orthogonal experiment

试验号	苹果酸钠	胰蛋白胨	柠檬酸铵	菌体密度 (cfu·mL ⁻¹)	菌体密度对数值
1	1	1	1	1.92×10 ⁹	9.283±0.0133
2	1	2	2	2.52×10 ⁹	9.401±0.0440
3	1	3	3	2.92×10 ⁹	9.465±0.0432
4	2	1	2	2.77×10 ⁹	9.442±0.0639
5	2	2	3	3.2×10 ⁹	9.505±0
6	2	3	1	3.25×10 ⁹	9.512±0.0335
7	3	1	3	2.87×10 ⁹	9.458±0.0863
8	3	2	1	3.17×10 ⁹	9.501±0.0469
9	3	3	2	4.48×10 ⁹	9.651±0.0243
K ₁	9.383	9.394	9.432		
K ₂	9.486	9.469	9.498		
K ₃	9.537	9.543	9.476		
R	0.154	0.148	0.066		
优水平	A ₃	B ₃	C ₂		
主次顺序		A [→] B [→] C			

2.4 对比试验

分别以 LH 16 培养基、LH 16 培养基引入 0.05 g·L⁻¹ MnSO₄ 组成的 LH 18 培养基、MRS 培养基及去除 Mn²⁺ 的 MRS 培养基进行培养, 结果含锰培养基的生物量是无锰培养基的 2 倍左右, 优选的

LH 16 及 LH 18 培养基的生物量是去除 Mn²⁺ 的 MRS 及 MRS 培养基的 2 倍左右, 且差异均达显著水平(表 8)。说明 Mn²⁺ 对植物乳杆菌 R23 的生长也有明显的促进作用, 同时优选后的培养基有明显的增殖效果。

表 7 正交试验方差分析
Table 7 Variance analysis of orthogonal experiment

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平	显著性
x(1)	0.03682	2	0.01841	47.65919	0.02055	*
x(2)	0.033	2	0.0165	42.71527	0.02288	*
x(3)	0.00678	2	0.00339	8.76963	0.10236	
误差	0.00077	2	0.00039			
总和	0.07738					

表 8 培养基增殖对比试验结果

Table 8 Comparison of *Lactobacillus* proliferation on culture media

培养基	菌体密度 (cfu·mL ⁻¹)	菌体密度对数值
MRS	3.50×10 ⁹	9.54±0.0115bB
LH 18	6.67×10 ⁹	9.82±0.0252aA
去除 Mn ²⁺ 的 MRS	1.73×10 ⁹	9.24±0.0346cC
LH 16	3.40×10 ⁹	9.53±0.0361bB

3 结论与讨论

3.1 菌种的营养需求存在差异, 影响乳酸菌增殖的主要因素为碳源、氮源及矿物质、维生素等, 本试验使用的植物乳杆菌 R23 是从枇杷酒中分离出的, 具有代谢苹果酸产生乳酸及耐受二氧化硫的能力, 可用于枇杷酒生物降酸及果蔬全汁乳酸发酵的优良菌株。植物乳杆菌 R23 能以苹果酸为优先碳源利用, 本试验在培养基中引入苹果酸钠, 对植物乳杆菌 R23 的增殖起到了明显的促进作用, 进一步说明了苹果酸对该菌的生长有促进作用。而同为碳源的乙酸钠却呈负相关作用, 这可能是乳酸菌对还原糖的代谢会产生乙酸^[13], 加入含有乙酸根离子的乙酸钠, 会对植物乳杆菌 R23 的增殖起到抑制作用。

3.2 最终确定的培养基最优组合 LH 16 为: 番茄汁 100 mL, 酵母膏 7.4 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 30 g, 硫酸镁 0.36 g, 苹果酸钠 20 g, 吐温 1 g, 胰蛋白胨 15 g, 柠檬酸铵 2 g, 加水补足 1 L。此无 Mn²⁺ 培养基用于植物乳杆菌 R23 的培养增殖效果好, 可用于植物乳杆菌 R23 的扩大发酵、工业化生产及生产直投式乳酸菌发酵剂。在 LH 16 培养基中引入 0.05 g·L⁻¹ MnSO₄ 即 LH 18 培养基, 菌

量可达无 Mn²⁺ 培养基的 2 倍左右, 可用于 MLF 植物乳杆菌 R23 的分离、纯化和发酵。

参考文献:

- [1] 刘扬, 吕霞, 张占雄, 等. 乳酸菌及其发酵产品的降血压作用与机理 [J]. 内蒙古科技与经济, 2008, (6): 71–72.
- [2] 张红梅. 乳酸菌知识漫谈 [J]. 生物学教学, 2008, 33 (10): 63–64.
- [3] DEVINE D A, HANCOCK R E. Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance [J]. Current pharmaceutical design, 2002, 8 (9): 703–714.
- [4] CANRANES C, MANGAS J J, BLANCO D, et al. Controlled production of cider by induction of alcoholic fermentation and malolactic conversion [J]. Journal of the institute of brewing, 1996, 102: 103–109.
- [5] NELSEN J C, PRAHL C, LONVAND- FUNEL, et al. A Malolactic Fermentation in Wine by Direct Induction with Freeze-dried *Leuconostoc oenos* Culture [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1996: 42–48.
- [6] 王华, 张春晖, 李华, 等. 乳酸菌在葡萄酒酿造中的应用 [J]. 西北农大学报, 1996, 24 (6): 92–97.
- [7] 田永峰, 吴天祥, 胡晓瑜, 等. 乳酸菌在酿造和食品工业上的应用 [J]. 酿酒科技, 2007 (4): 90–93.
- [8] 杨洁彬, 彭倍勤. 乳酸菌—生物学基础及应用 [M]. 中国轻工业出版社, 1999.
- [9] WIBOWO D, FLEET G H, LEE T H, et al. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Oenonostoc oeni* [J]. Appl Bacteriol, 1988, 64: 421–428.
- [10] 张志红, 张兆, 徐明. 慢性锰中毒的神经毒性机制 [J]. 职业与健康, 2003, 19 (1): 6–7.
- [11] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 V7.05 版 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] 姜晔. 乳酸菌增菌培养基的优化研究 [J]. 科学技术与工程, 2008, 8 (12): 5–8.
- [13] 潘海燕. 苹果酒苹果酸乳酸发酵的研究 [D]. 江南大学, 2004: 49–50.

(责任编辑: 柯文辉)