

MLF 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 LH 16 (non- Mn^{2+}) and LH 18 (with Mn^{2+}) medium. By incubating the lactobacillus plantarum in the LH 16 and LH 18 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 10^9 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 10^7 , 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 10^7 , 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 $L_9(3^4)$ 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 10^7 , 在 25℃下恒温培养 24 h 后, 取样测定其活菌数。

表 1 均匀设计 $U_{11}(11^{10})$ 因素水平
Table 1 Factors and levels in $U_{11}(11^{10})$ 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)	磷酸二氢钾 (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 $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnSO}_4$ 的培养基 (LH18) 进行植物乳杆菌 R23 培养, 以 MRS 及去除 MnSO_4 成分的 MRS 培养基为对照, 接种后菌体生物量达 10^7 , 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 Mn^{2+} 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/T4789.35) 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)($g \cdot L^{-1}$)		
	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)。对数增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:

$$Y = 9.094 - 0.0002X_5 + 0.0013X_4^2 + 0.0768X_7^2 - 0.0017X_9^2 - 0.0005X_{11}: X_8 + 0.0002X_{11}: X_{10} + 0.0006X_3: X_5$$

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。

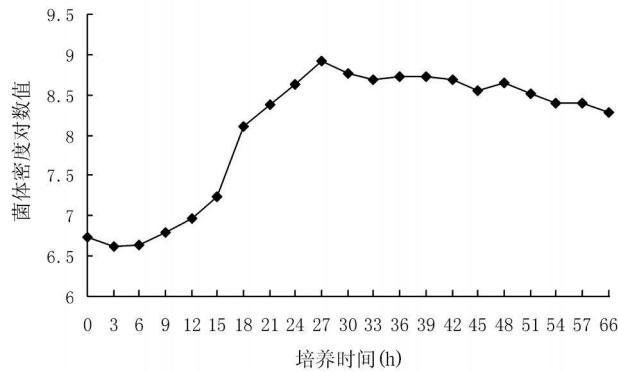


图 1 植物乳杆菌 R23 的生长曲线
Fig 1 Growth curve of R23 lactobacillus palantarum R23

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 ($cfu \cdot mL^{-1}$)	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	<i>t</i> 检验值	显著水平 <i>P</i>
$r(y, X_5) =$	- 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 增殖的主次因素为苹果酸钠、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 A₃ B₃ C₂, 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 L ₉ (3 ⁴) 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
LH18	6.67×10 ⁹	9.82±0.0252aA
去除 Mn ²⁺ 的 MRS	1.73×10 ⁹	9.24±0.0346cC
LH16	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 LH16 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 LH16 培养基中引入 0.05 g·L⁻¹ MnSO₄ 即 LH18 培养基，菌

量可达无锰培养基的 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]. 西北农业大学学报, 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. 乳酸菌增殖培养基的优化研究 [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)