

hs-3 乳酸菌发酵研究

魏淑珍¹,孙金旭¹,朱会霞¹,王 敏¹,王 倩¹,芦站根¹,李长文²

(1.衡水学院生物系,河北 衡水 053000 2.河北农业大学,河北 保定 071000)

摘 要: hs-3 菌摇瓶发酵培养过程中,适宜培养时间为 16 h。研究表明,接种量、摇瓶转速、装液量对培养后活菌数及胞外多糖产量都有影响。进一步正交实验得出,摇瓶转速为显著性影响因素,摇瓶培养的适宜工艺组合为:转速 60 r/min,接种量 3%,装液量 250 mL(500 mL 三角瓶),通过 10 L 发酵罐小试,hs-3 菌活菌数最大为 1.12×10^9 cfu/mL,胞外多糖最大产量 819 mg/L,和摇瓶培养基本一致。

关键词: 微生物; hs-3 乳酸菌; 摇瓶培养; 胞外多糖

中图分类号: Q93-3; TS252; TQ920 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2006)02-0021-04

The Fermentation Study of *Streptococcus thermophilus* hs-3 from The Hengshui Lake

WEI Shu-zhen¹, SUN Jin-xu¹, ZHU Hui-xia¹ and LI Chang-wen² et al.

(1. Department of Biology, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000 2. Agriculture University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract In the course of Shake-flask Ferment-cultivating of hs-3, the feasible cultivating were obtained, 16 h was feasible. The results indicated that the bacterium yield and exopolysaccharide were effected by rotate speed, inoculation amount and the quantity of culture medium. The conditions of Ferment-cultivating were obtained by the $L_9 3^3$ orthogonal experiment design and analyzing, rotate speed 60 r/min, inoculation 3%, the quantity of culture medium enclosing 250 mL(500 mL) were the optimum ferment conditions. The bacterium yield and exopolysaccharide were 1.12×10^9 cfu/mL and 819 mg/L in the course of 10 L Fermentation tank-cultivating.

Key words microbe; *Streptococcus thermophilus* hs-3; shake-flask fermentation; exopolysaccharide

近年来,我国乳制品生产发展非常迅速,尤其是各种酸乳的生产和消费更是突飞猛进。目前,稳定提高乳酸菌发酵的质量、研究高效直投式酸奶发酵剂已成为我国乳品生产面临的重大理论和实践问题^[1]。不仅对促进我国乳品科学的研究具有重要的学术意义,而且对解决酸乳生产实际问题也具有重要的应用价值^[2]。

乳酸菌胞外多糖是在乳酸菌发酵过程中由乳酸菌通过合成代谢形成并分泌到细胞壁外的粘液或荚膜多糖^[3]。研究表明,乳酸菌胞外多糖具有许多重要的生理学功能。有报道表明,乳酸菌胞外多糖具有抗肿瘤的作用^[4],它可以改善人体肠道环境,减少便秘,提高益生菌菌株对肠道表面的非特异性黏附,促进益生菌的生长,优化肠道微生态系统。乳酸菌胞外多糖可以促进 T 淋巴细胞的增殖,增强人体免疫力^[5],同时,乳酸菌胞外多糖

对人体细胞具有保护和降低血清胆固醇的作用^[6]。在工艺及市场发展方面,乳酸菌胞外多糖能够改善乳制品的粘度、质构,提高酸乳制品的润滑感^[7]。因此,通过优化发酵条件提高乳酸菌胞外多糖产量具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验主要材料

嗜热链球菌 hs-3(中国湿地保护区衡水湖分离纯化鉴定后于衡水学院生物系微生物实验室保藏)。

1.2 培养基

MRS 培养基制备:葡萄糖 10 g,胰蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母提取物 5 g,柠檬酸二铵 2 g,磷酸氢二钾 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.25 g,吐温 80 为 1 mL,蒸馏水 1 L,琼脂 20 g。用醋酸调节 pH 到 6.8,121

基金项目:河北省衡水市科技局 2005 资助课题(课题编号 05018)。

收稿日期:2005-09-13

作者简介:魏淑珍(1966-),女,河北省武邑县人,副教授,大学本科。

℃高压灭菌 20 min。

M17 培养基制备:胰蛋白胨 5 g;大豆蛋白胨 5 g;牛肉膏 5 g;酵母提取物 2.5 g;抗坏血酸 0.5 g;硫酸镁 0.25 g; β -甘油磷酸二钠 19 g;琼脂 20 g;蒸馏水 1 L。用醋酸调节 pH 到 6.9,121 ℃高压灭菌 15 min。

脱脂乳培养基制备:新鲜牛乳经脱脂,调整固形物含量 11%左右,108 ℃灭菌 15 min。

发酵培养基制备:新鲜牛乳经脱脂,调整固形物含量 11%左右,加蔗糖 6%左右,90~95 ℃处理 5 min。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化

实验前,首先将菌株接种到 12%的复原脱脂乳中,37 ℃厌氧培养 20 h,再以 2%接种量分别转接至 5 mL 的 M17 和 MRS 液体培养基中,37 ℃厌氧培养 16~18 h,最后以 2%接种量分别转接到 10 mL 的 M17 和 MRS 液体培养基中备用。

1.3.2 活菌数测定

贮藏试验期间,酸乳中的乳酸菌数用平板法进行计数,采用改良 TJA 培养基进行活菌计数,39 ℃厌氧培养 48 h,每次试验均取 3 个重复,取其均值作为计数结果,乳酸菌数被表达为 cfu/mL。

1.3.3 乳酸菌胞外多糖测定——苯酚-硫酸法^[38]

标准曲线的制作:准确吸取标准葡萄糖(或葡萄糖)20 mg,预先于 105 ℃烘至恒重,于 500 mL 容量瓶中,加水至刻度。

分别吸取 0.4 mL,0.6 mL,0.8 mL,1.0 mL,1.2 mL,1.4 mL,1.8 mL,各以水补至 2.0 mL,然后加入 6%苯酚溶液 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL,静止 10 min,摇匀,室温放置 20 min 以后于 490 nm 下测光密度,以 2.0 mL 水按同样显色操作空白,横坐标为多糖微克数,纵坐标为光密度值,得到标准曲线(图 1)。

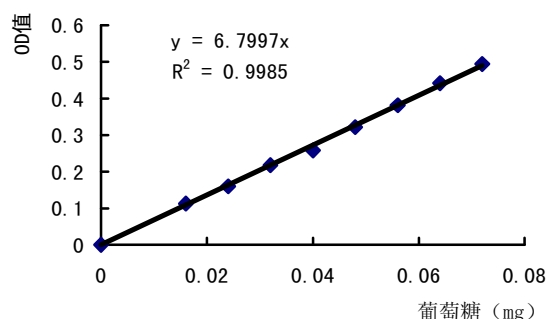


图 1 苯酚-硫酸标准曲线

将样品经一系列的处理去除蛋白及小分子糖类后得到上清液,吸取上清液 1.0 mL,按同样操作测光密度,以标准曲线计算多糖含量。

1.3.4 粗多糖的分离(工艺)

酸乳→蛋白酶水解→上清液离心→沉淀物乳化→离心回收上清液→合并上清液→浓缩→加入乙醇沉淀→沉淀物溶解→离心、醇沉 3 次→粗多糖液→冷冻干燥→粗制乳酸菌胞外多糖

1.3.5 小试实验(摇床实验)

通过在不同转速、装液量、接种量下,培养基中活菌数及胞外多糖含量的测定,确定最佳转速、接种量、装液量。

1.3.6 摇瓶正交实验设计(表 1)

表 1 L_33 正交实验设计因素水平表

因素水平	接种量 (%)	摇瓶转速 (r/min)	摇瓶装液量 (mL/500mL)
1	3	50	250
2	3.5	60	300
3	4	70	350

1.3.7 10 L 发酵实验

在 10 L 的发酵罐内,按 3%的接种量将扩培好的种子接入发酵罐中,控制初始 pH 为 6.0,温度在 39 ℃,搅拌转速为 60 r/min,发酵时间 20 h。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线的测定

为了确定嗜热链球菌 hs-3 在增殖培养基中的生长过程,从而掌握发酵最适收获期,进行了生长曲线的测定。在增殖培养基中,39 ℃恒温培养 24 h,每隔 2 h 取样,在 600 nm 下测定其吸光值,以培养时间为横坐标、吸光值为纵坐标,得到如图 2 所示的生长曲线。

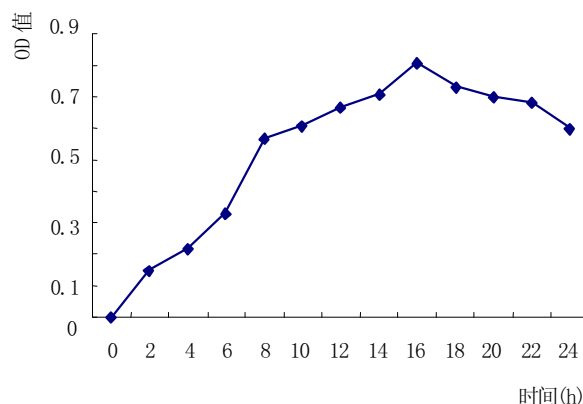


图 2 hs-3 乳酸菌摇瓶发酵曲线的测定

由图 2 可看出,hs-3 菌 OD 值从一开始急增,0~4 h 为菌株的延迟期,4~8 h 为菌株的对数生长期,在 16 h 活菌数达到最大,16 h 以后活菌数开始下降,进入衰亡期。考虑到在对数生长期末期、稳定期初期收获细胞,在此选择发酵培养 16 h 为其最佳收获期。

2.2 接种量对培养过程中活菌数及胞外多糖的影响

据相关报道,乳酸菌发酵后活菌数、乳酸菌胞外多糖产量与起始接种量呈一定的相关性。摇瓶发酵培养过

程中,起始接种量不同,活菌数及胞外多糖产量也会有所不同。因此,摇瓶发酵培养过程中分别研究了不同的接种量(0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%)对发酵培养结束后活菌数及胞外多糖产量的影响,培养温度 39℃,培养时间 16 h,摇瓶装液量 150 mL(500 mL 瓶),摇瓶转速 50 r/min,结果见图 3。

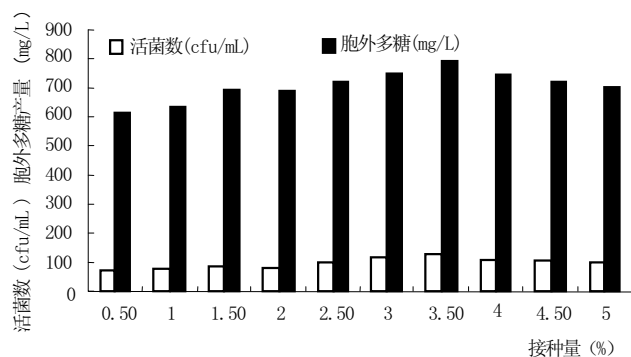


图3 不同接种量下,hs-3 乳酸菌摇瓶培养后,活菌数及胞外多糖的产量

由图 3 可得,摇瓶培养结束后,不同接种量条件下,活菌数及胞外多糖的产量不同。开始随着接种量不断增加,活菌数及胞外多糖产量不断增加;接种量为 3.5% 时,活菌数及胞外多糖产量同时达到最大,最大产量分别为 1.27×10^9 cfu/mL, 793 mg/L;之后,随着接种量的加大,活菌数及胞外多糖产量不断降低。因此,hs-3 乳酸菌摇瓶发酵培养的适接种量为 3.5%。

2.3 摇瓶转速对培养过程中活菌数及胞外多糖的影响

培养基的供氧情况影响氧化还原电位值,而不同的氧化还原电位值有可能使乳酸菌的代谢途径发生改变,因而影响菌体的生长与产物的形成。因此,在 hs-3 乳酸菌摇瓶发酵培养过程中,通过改变转速,研究不同转速条件下(20、30、40、50、60、70、80 r/min),培养 16 h 后,hs-3 菌活菌数及胞外多糖的变化如图 4 所示。摇瓶装液量 150 mL(500 mL 瓶),培养温度 39℃,接种量 3.5%。

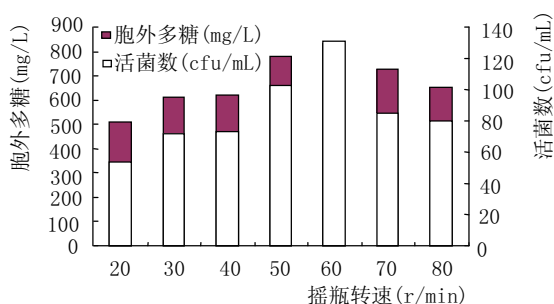


图4 不同摇瓶转速对 hs-3 菌发酵培养后活菌数及胞外多糖的影响

由图 4 可以看出,hs-3 菌在转速为 60 r/min 时活菌数最高,为 1.31×10^9 cfu/mL,同时在转速为 60 r/min 时,胞外多糖产量达到最大,为 833 mg/L。

不同转速下活菌数及胞外多糖产量差异较大。活菌数最大提高 142.60%,胞外多糖最大提高 63.01%。说明摇瓶发酵培养过程中,转速对 hs-3 菌的影响较大,适宜的摇瓶转速应为 60 r/min。

2.4 摇瓶装液量对 hs-3 菌培养过程中活菌数及胞外多糖的影响

摇瓶培养过程中,装液量不同,菌体的生长及其代谢产物也会有很大差异,有些菌体较适宜于浅层表面培养,有些菌体在深层培养的环境中生长旺盛,因此,研究了三角瓶不同装液量条件对 hs-3 菌的影响,结果见图 5。培养条件为:转速 60 r/min,培养温度 39℃,培养时间 16 h,接种量 3.5%,三角瓶装液量分别为 50 mL、100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mL、350 mL(500 mL 三角瓶)。

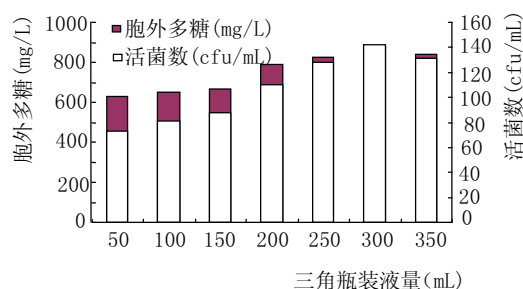


图5 摇瓶不同装液量对 hs-3 菌活菌数及胞外多糖产量的影响

由图 5 看出,不同装液量条件下,hs-3 菌培养 16 h 后,活菌数及胞外多糖产量不同。开始随装液量的不断增加,活菌数及胞外多糖产量也随之增加,且胞外多糖产量和发酵培养结束后发酵液中活菌数呈一定的正相关,装液量为 300 mL 时,活菌数和胞外多糖同时达到最大,最大活菌数为 1.42×10^9 cfu/mL,胞外多糖最大产量为 880 mg/L。之后装液量增加,活菌数及胞外多糖都有所降低,说明装液量 300 mL(500 mL 三角瓶)较为适宜。

2.5 摇瓶发酵培养 $L_4(3^3)$ 正交实验

根据以上实验结果,分别选择了接种量、摇瓶转速、装液量为影响摇瓶培养过程中活菌数及胞外多糖的影响因素,并相应地选择较为适宜的 3 个水平进行正交实验,以得出较适宜工艺组合为目的,结果见表 2、表 3。

表2 以活菌数为目的产物正交实验结果分析

方差来源	平方和	自由度	均方差	F 值	显著性
转速	6.63	2	3.32	165.75	**
接种量	2.94	2	1.47	73.5	*
装液量	0.66	2	0.33	16.5	
误差	0.04	2	0.02		

注:查 F 分布表得 $F_{0.95}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.99}(2, 2) = 99.01$ 。

由表 2 可以看出,hs-3 菌摇瓶培养过程中,影响活菌数产量高低的因素为:转速 > 接种量 > 装液量,其中

表3 以发酵后胞外多糖为目的产物正交实验结果分析

方差来源	平方和	自由度	均方差	F值	显著性
转速	70.0	2	35	21.2	*
接种量	0.75	2	0.38	2.27	
装液量	4.5	2	2.3	13.64	
误差	0.33	2	0.17		

注:查F分布表得 $F_{0.95}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.99}(2, 2) = 99.01$ 。

转速为较显著性因素,接种量为显著性因素。以发酵培养后活菌数为目的产物适宜工艺条件为:转速 60 r/min,接种量 3%,装液量 250 mL。

由表3可知,正交试验设计条件下,影响 hs-3 菌胞外多糖产量高低的因素为:转速 > 装液量 > 接种量,其中转速为显著性因素,以胞外多糖干重为目的产物的适宜工艺条件为:转速 60 r/min,接种量 3%,装液量 250 mL(500 mL 三角瓶)。

由摇瓶培养结束后活菌数、胞外多糖两次正交试验结果及分析可知,发酵培养过程中,胞外多糖产量和菌丝体产量呈一定正相关性,胞外多糖产量和菌丝体产量在同一条件下达到最高,因此,以菌丝体和胞外多糖产量为目的产物的适宜工艺条件为:转速 60 r/min,接种量 3%,装液量 250 mL(500 mL 三角瓶)。

2.6 hs-3 菌 10L 发酵罐发酵小试

依据摇床数据及经验值确定工艺参数的组合,在摇瓶实验的基础上,根据放大前后溶氧因子不变的原则,将 hs-3 菌于 10 L 发酵罐放大培养,培养条件为:培养时间 20 h,培养温度 39℃,转速 45 r/min,初始 pH 值 6.0,接种量 3%,装液量 7 L,结果见图 6。

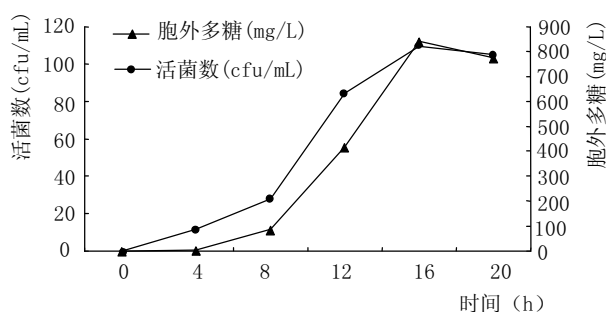


图6 hs-3 菌 10 L 发酵罐小试

由图6可以看出,hs-3 菌 10 L 发酵罐培养过程中,菌体生长的4个阶段:1~8 h为适应期,菌体生长速度缓慢,基本处于代谢调整期;8~16 h为对数生长期,菌体生长速度大大增加;16 h以后为稳定期和衰亡期,菌体量先达到最大值,随着营养物质的消耗,菌体的生长速度

与死亡速度处于平衡,活菌数变化不大,此时代谢产物大量分泌;之后菌体开始自溶,活菌数逐渐减少,菌体死亡率增加。活菌数的最大产量为 1.12×10^9 cfu/mL,和摇瓶培养相比,最大活菌数有所降低,这可能是发酵罐放大和摇瓶培养差异所致。

在发酵罐放大培养过程中,胞外多糖的产量和活菌数的变化呈一定的正相关性,培养至 16 h 时和活菌数同时达到最大,最大产量为 819 mg/L,这和摇瓶培养基基本一致。

3 结论

通过摇瓶发酵培养,测得 hs-3 菌适宜培养时间为 16 h。经研究得出,在其他条件一定时,接种量、摇瓶转速、装液量对发酵培养后活菌数及胞外多糖产量都有不同程度的影响,进一步正交实验得出,摇瓶转速为显著性影响因素。分析后可知,摇瓶培养的适宜工艺组合为:转速 60 r/min,接种量 3%,装液量 250 mL(500 mL 三角瓶)。通过 10 L 发酵罐小试可知,hs-3 菌活菌数最大为 1.12×10^9 cfu/mL,胞外多糖最大产量为 819 mg/L,和摇瓶培养基基本一致。

参考文献:

- [1] 谢继志,顾瑞霞.酸奶混合菌种连续继代培养对发酵剂稳定性的影响[J].中国乳品工业,1995,23(1):10-13.
- [2] 张以芳.乳酸菌发酵的意义及应用现状[J].微生物学研究与应用,1993,(3): 15-17.
- [3] De Vuyst,L.et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria [J].Int.Dairy J.,2001,(11):687-707.
- [4] Patricia Russ-Madiedo,Jeroen Hugenholtz,Pietermetia Zoon.An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J].International Dairy Journal, 2002,(12): 163-171.
- [5] Kitazawa H.,Yamaguchi T.,Itoh T. B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming encapsulated Lactococcus lactis subsp cremoris[J].Journal of Dairy Science,1992,(75):2946-2951.
- [6] Kitazawa H.,Yamaguchi T.,Miura M.,Saito T.and Itoh,H. B-cell mitogen produced by slime-forming encapsulated Lactococcus lactis ssp.Cremoris isolated from ropy sour milk,viii[J].J.Dairy Sci,1993,(76):1514-1519.
- [7] 骆承庠,等.乳与乳制品工艺学[M].北京:农业出版社,1999.

《酿酒科技》酒圃曲苑