

文章编号:1673-1689(2006)06-0042-03

益生菌 *Lactobacillus salivarius* 的培养条件

王森^{1,2}, 张臻裕², 陈晓峰²

(1. 江南大学 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: *Lactobacillus salivarius* 是来自人体肠道的一株重要的益生菌。作者对其培养条件进行了研究。确定了最佳培养温度为 37 °C 和培养基起始 pH 值为 6.4。当在改良的 MRS 培养基中添加质量浓度为 10 g/L 碳酸钙, 并经过一次中间补糖(8 g/L)培养, 菌体干重达 7.12 g/L 活菌数为 3.89×10^8 cfu/mL。

关键词: 益生菌; *Lactobacillus salivarius*; 培养条件

中图分类号: Q 93.3

文献标识码: A

Study on Cultural Conditions of Probiotic *Lactobacillus salivarius*

WANG Miao^{1,2}, ZHANG Zhen-yu², CHEN Xiao-feng²

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Lactobacillus salivarius* is one of the most important bacterium having health-promoting effects in the human intestinal tract. In this study, the optimum conditions for *L. salivarius* growth were investigated. The optimum temperature and initial pH was 37 °C and 6.4, respectively. when 10 g/L Calcium carbonate was feed to the modified MRS cultural medium (20 g/L glucose, 5 g/L peptone, 20 g/L beef extract), and 8 g/L glucose was feed at 14 h, the biomass was achieved at 7.12 g/L. The living cell number was 3.89×10^8 cfu/mL.

Key words: *Lactobacillus salivarius*; probiotics; optimum conditions

益生菌是超过本身的基本营养而能够发挥积极健康作用的活的微生物组织, 普遍认为是原细菌, 它们能够改善肠道微生物平衡和这些固有的肠内菌群的特性, 这些菌丛通过代谢活动和自身的存在直接促进人体的健康。它们可以和医学意义上的病原体进行排外竞争, 可以刺激免疫系统, 可以治疗和减缓用抗生素治疗带来的副作用。益生菌菌株的另一个可利用的特性是能够产生像细菌菌素这样的抗菌物质。细菌菌素是由核糖体合成, 在

胞外释放的有生物活性的多肽或肽的混合物, 对其他物种(尤其是和自身关系密切的)有杀菌或抑菌作用^[1]。

Lactobacillus salivarius 菌是从人体肠道的盲肠区域分离出来的益生菌菌株。它有着许多重要的生理功能。并且在生长代谢过程中可产生细菌素^[2]。

作者研究了 *Lactobacillus salivarius* 的培养条件和方法, 以期获得最大菌体密度。为益生菌制剂

收稿日期: 2005-09-20; 修回日期: 2006-02-27.

作者简介: 王森(1962-), 江苏扬州人, 副教授, 工学博士.

的生产奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种及试剂

Lactobacillus salivarius 菌: 从婴儿粪便中分离获得; 所用药品和试剂均为常规市售的化学药品和生化试剂。

1.2 培养方法

将 37 °C 下厌氧培养 24 h 的菌种以体积分数 10% 的接种量转接到 250 mL 三角瓶的发酵培养基中, 37 °C 下静置培养。培养基采用改良的 MRS 培养基。厌氧培养是将培养物置于玻璃干燥器中, 然后点燃蜡烛, 使容器密闭, 利用蜡烛燃烧耗尽氧形成厌氧环境。

MRS 基本培养基的配方为(g/L): 葡萄糖 20, 酪蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母粉 5, 乙酸钠 5, 磷酸氢二钾 2, 柠檬酸铵 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05, Tween 80 1, pH 5.5。

改良的 MRS 培养基的配方为(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 5, 牛肉膏 20, 酵母粉 5, 乙酸钠 5, 磷酸氢二钾 2, 柠檬酸铵 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05, Tween 80 1, pH 5.5。

1.3 发酵过程分析

菌体浓度的测定: 采用光密度法^[3]; 活菌数的测定: 通过涂布法测得^[3]; 残糖的测定: 3,5-二硝基水杨酸法^[4]; 氨基氮的测定: 甲醛滴定法^[5]。

2 结果与讨论

2.1 菌体生长特性

Lactobacillus salivarius 在 MRS 基本培养基上的生长曲线测定见图 1。

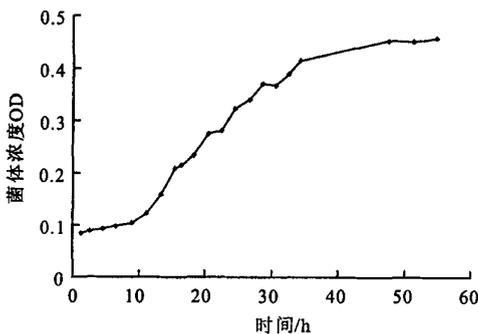


图 1 *L. salivarius* 在 MRS 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Time course of *L. salivarius* growth in the MRS medium

由图 1 可知: *L. salivarius* 菌生长较快, 在 MRS 基础培养基上 37 °C 培养 10 h 左右进入对数生长区, 大约在 36 h 开始进入生长平稳期。对数期的菌体活力最强, 生长最旺盛, 因此在该菌的培养过程中移种时间定为培养 24 h。

2.2 氧对菌体生长的影响

为了考察氧对菌体生长的影响, 研究采用烛光培养法将 *L. salivarius* 置于厌氧环境中进行培养, 并与在普通培养箱中进行培养对照。实验结果表明: 在无氧条件下, 收获时的菌体浓度的 OD 值比有氧条件下收获时的菌体 OD 值稍高一些, 前者为 0.71, 后者为 0.69, 但差距不大, 故判断该菌是一个兼性厌氧菌。

2.3 培养基最佳初始 pH 和最适培养温度的确定

虽然 *L. salivarius* 是来自人体肠道的一个乳酸菌, 但在体外培养时由于环境因素的变化, 它的最适生长条件可能会发生变化。

图 2 是培养基初始 pH 值对菌体生长的影响, 从图中可以看出, 收获时菌体密度最大的培养基起始 pH 值为 6.4 左右。由图 3 可知: 最佳培养温度为 37 °C, 与人体体温一致。

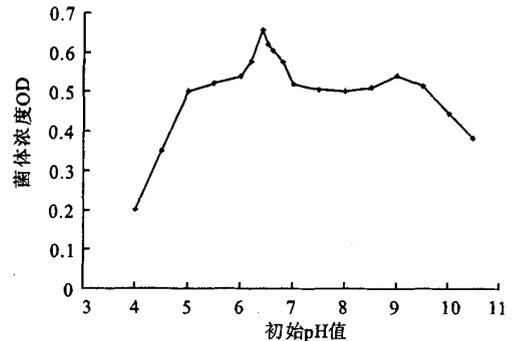


图 2 培养基初始 pH 值对菌体生长的影响

Fig. 2 Effect of the initial pH on cell growth

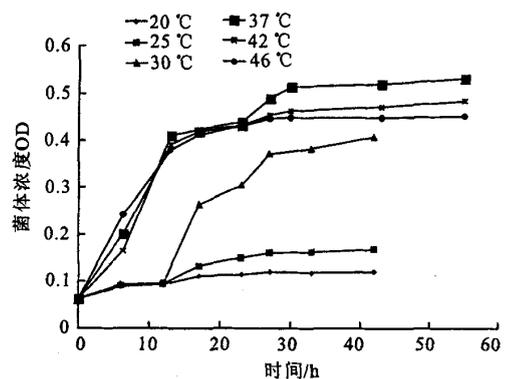


图 3 温度对菌体生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature on cell growth

2.4 培养基中碳酸钙的添加

Lactobacillus salivarius 在培养过程中由于代谢产生乳酸等其它有机酸,使体系 pH 下降较快,这有可能抑制菌体的进一步生长。故考虑在培养基中加入 pH 值的内源调节剂不溶性碳酸盐 CaCO_3 来减缓 pH 值的下降速度,提高最后收获时的菌体密度。

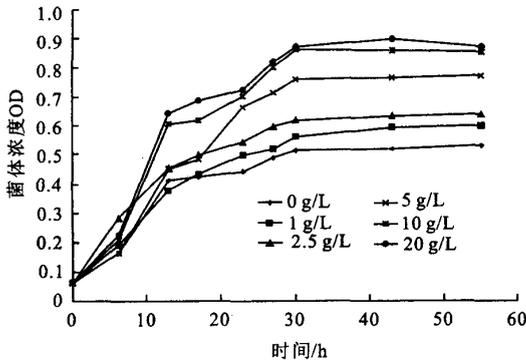


图4 不同质量浓度的碳酸钙加入量对菌体生长的影响
Fig. 4 Effect of the amount of calcium carbonate on cell growth

图4是碳酸钙加入量对菌体生长的影响,从图中可以看出:在培养基中添加 20 g/L 碳酸钙时,菌体密度最高,OD 值达 0.85 以上,与不添加碳酸钙相比几乎提高了一倍。此外,10 g/L 的加入量时最高菌体密度与 20 g/L 的加入量时的最高菌体密度相差不大,而且收获的时发酵液的 pH 值均能维持在 5.5 左右,这也表明发酵过程中 pH 的下降的确是导致菌体生长抑制的一个重要原因。故 *Lactobacillus salivarius* 的培养需要控制 pH,在无法自动控制的情况下,可选择在培养基中添加 10 g/L 碳酸钙来中和发酵过程中产生的酸。

2.5 培养基配方的改良及补料对发酵过程的影响

通过对 *L. salivarius* 培养条件和发酵培养基中的碳源及氮源的用量进行正交优化(具体数据略)。得出在 MRS 培养基其它成分不变的情况下,葡萄糖用量为 20 g/L,蛋白胨为 5 g/L,牛肉膏为 20 g/L 时,菌体浓度大大提高。菌体的收获时间也从原来的 30 h 左右缩短为 14 h 左右,培养 14 h 菌体密度可达 OD 值为 1.132 菌体干重为 6.08 g/L;通过涂布法测得活菌数为: 3.29×10^8 cfu/mL。

同时从图5的发酵曲线可以看出,当菌体浓度不再增加时,发酵液中残糖的含量也已经很低,这表明如果发酵过程中进行补料有可能进一步提高菌体密度。

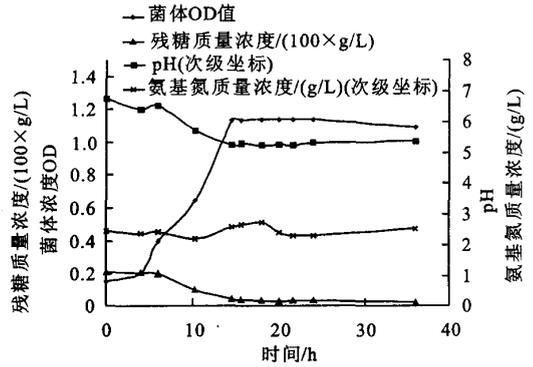


图5 *Lactobacillus salivarius* 的发酵曲线
Fig. 5 Time course of *L. salivarius* fermentation

- 补料0 mL时菌体OD值
- 补料1 mL时菌体OD值
- 补料2 mL时菌体OD值
- 补料3 mL时菌体OD值
- 补料4 mL时菌体OD值
- 补料5 mL时菌体OD值
- 补料0 mL时残糖质量浓度
- 补料1 mL时残糖质量浓度
- 补料2 mL时残糖质量浓度
- 补料3 mL时残糖质量浓度
- 补料4 mL时残糖质量浓度
- 补料5 mL时残糖质量浓度

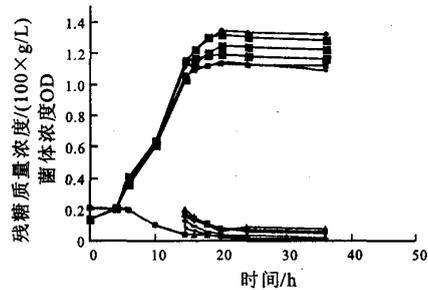


图6 补料对菌体生长的影响
Fig. 6 Effect of the amount of feed glucose on cell growth

图6是分别在 100 mL 发酵 14 h 左右的培养液中补充加入了不同量的葡萄糖后观察到的菌体密度的变化。加入的葡萄糖液的质量浓度为 400 g/L。从图6中可以看出中间补糖后菌体密度均有不同程度的继续增长,由原来的 OD 0.8~0.9 增长到 1.2~1.3 左右,最高有 20% 左右的增幅。其中一次补入 400 g/L 葡萄糖溶液 2 mL(相当于发酵液中 8 g/L)后再培养 5.5 h 左右,菌体密度 OD 值可达 1.314,菌体干重为 7.12 g/L;通过涂布法测得活菌数为 3.89×10^8 cfu/mL,菌体总量与不补料相比提高了 16.1%。

有关 *Lactobacillus salivarius* 的培养条件和方法的研究还未见专门报道。作者意在获得一些有关 *Lactobacillus salivarius* 培养基础数据, *Lactobacillus salivarius* 的培养研究更重要的意义在于其能分泌细菌素。这将在后续工作中进一步研究。

(下转第 82 页)

3 结 论

综上所述,通过对不同培养基发酵的杆菌肽产量的研究以及对影响杆菌肽测定中抑菌圈大小的因素研究,发现以豆芽汁培养基作发酵液效果较好,其加入蔗糖的量为2 g/dL时,达到最佳;管碟法

测定中,培养基的体积,酸碱度及指示菌浓度对抑菌圈的大小都有显著影响。其最佳条件是:培养基体积为下层10 mL,上层5~10 mL为宜;对于微量杆菌肽的测定,上层培养基用5 mL的薄层法最好;上层培养基的pH值为7.0;指示菌浓度为 10^8 cfu/mL。在上述条件下,发酵液抑菌圈的平均直径最大为2.52 cm。

参考文献:

- [1] Ravindran V, Thomas D. Performance and welfare of broilers as affected by stocking density and zinc bacitracin supplementation[J]. *Animal Science Journal*, 2006, 77(1):110—116.
- [2] 胡尚勤. 整肠生菌发酵中杆菌肽高产的代谢调控[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版, 2004, 21(4):46—48.
- [3] Jorgensen J H, Turnidge J D, Washington J A. Manual of Clinical Microbiology[M]. Washington D C: American Society for Microbiology, 1999.
- [4] Cotter G, Adley C. Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39:3753—3756.
- [5] Huys G, Haene K. Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method[J]. *J Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(6):402—406.
- [6] Gevers D, Huys G, Devlieghere F. Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23:279—284.
- [7] Okerman L, Croubels S. Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2001, 18(5):385—393.
- [8] Müjdat A, Nese K, Recep K. Effects of dietary supplementation with organic acids and Zinc bacitracin on ideal microflora, pH and performance in broilers[J]. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences*, 1999, 23:451—455.
- [9] Andrews J M. The BSAC working party on susceptibility testing BSAC standardized disc susceptibility testing method[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48:43—57.

(责任编辑:朱明)

(上接第44页)

参考文献:

- [1] 孔建, 马桂荣, 刘稳, 等. 益生菌生产菌——乳链球菌 SB900 的分离及生物特性研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(6):450—454.
- [2] Sarah Flynn, Douwe van Sinderen, Gerardine M, et al. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118[J]. *Microbiology* 2002, 148, 973—984.
- [3] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社, 2002. 5, 151—152.
- [4] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998.
- [5] 天津轻工业学院. 工业发酵分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1980.

(责任编辑:杨萌)