

文章编号 1000-5013(2003) 04-0411-04

# 乳球菌 *L529* 的生长条件试验

许文江 林丽仙 陈移亮

(福建省亚热带植物研究所, 福建 厦门 361006)

**摘要** 研究乳球菌 *L529* (乳酸乳球菌乳脂亚种 *L529*) 的最佳生长条件, 取得该菌生长的 C/N 最佳值为 4.5~5.0, 及其所需维生素的量. 同时, 提出合理的生长培养基配方. 经发酵中试, 该菌在 pH 为 7.0, 温度为 36 °C 的条件下, 活菌数提高 5 倍, 达到工业发酵剂的菌量要求.

**关键词** 乳球菌, 生长条件, 发酵, 发酵剂, 酸奶

中图分类号 Q 93-335 Q 939.11<sup>+</sup>7

文献标识码 A

乳酸乳球菌乳脂亚种 (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), 是嗜温发酵菌, 与其它菌配合可用于各种类型干酪的生产<sup>[1]</sup>. 为了满足厂家开发乳品新产品的需要, 我们从闽南佛学院学员自制的“西藏灵菇”酸奶中提取了乳球菌 *L529*. 本文将对该菌进行了生理生化与营养需要的研究, 以确定该菌最佳的培养条件. 同时制取发酵剂, 便于工业化生产, 降低成本.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

1.1.1 菌种 乳酸乳球菌乳脂亚种 *L529* (以下简称乳球菌 *L529*), 菌株为福建省亚热带植物研究所收集保藏.

1.1.2 培养基 (1) 25 g 麦芽汁, 5 g 蛋白胨, 4 g 肉汁, 3 g 氯化钠, 碳酸钙适量, 20 g 琼脂和 1.0 L 水, pH 值为 6.5, 于  $1.0 \times 10^5$  Pa 下灭菌 30 min<sup>[2]</sup>. 该培养基用作斜面菌种培养基, 去掉琼脂, 配制成的液体作为本研究发酵对照培养基. (2) 1.0 g 蛋白胨, 2 mg VC, 2.0 mg VB<sub>1</sub>, 2.0 mg VB<sub>2</sub>, 1.0 L 纯牛奶 (伊利公司产), CaCO<sub>3</sub> 适量, pH 值为 7.0. 该培养基作为本研究发酵培养基.

1.1.3 仪器设备 GY-70 液体发酵罐, WDP 微生物多用培养箱, 721 分光光度计, 细菌计数器 and 菌落计数器等.

### 1.2 方法

1.2.1 最佳生长温度和 pH 值的确定 用培养基 (1) 配成的液体培养基, 分别取 200 mL,

收稿日期 2003-01-28

作者简介 许文江 (1967-), 男, 助理研究员, E-mail: tszls@public.xm.fj.cn

基金项目 福建省亚热带植物研究所科研基金资助项目 (R0103)

pH 值为 4.5, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 的培养液装入 300 mL 三角瓶(下同). 灭菌后, 分别接种, 活化培养 10 h 后的乳球菌 *L529* 菌液, 每 100 mL 培养基的接种量为  $8 \times 10^7$  个. 将其分别放置在温度( )为 25, 30, 33, 36, 38, 40, 43 和 45 下, 静置培养 20 h. 每个处理进行 6 次重复, 分别在培养时间(h)为 5, 10, 13, 16, 20 和 24 下准确吸取培养液. 用显微镜直接计数法和平板菌落计数器计数法测定其总菌数, 根据活菌数确定其最佳温度和 pH 值<sup>[6]</sup>.

1.2.2 最佳生长的 C/N 值测定 用半合成培养基, 以牛肉膏为碳源, 蛋白胨为氮源, C/N 值分别取为 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 和 6.5. 加入  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ ,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 配成 pH 为 6.5 的液体培养基. 灭菌后, 分别接种, 活化培养 10 h 后的乳球菌 *L529* 菌液, 每 100 mL 培养基接种量为  $8 \times 10^7$  个. 每个处理进行 6 个重复, 于 36 下静置培养 20 h. 检测方法同前, 以此确定最佳 C/N 值.

1.2.3 最佳生长的维生素需要测定 用合成培养基, 以葡萄糖为碳源, 以谷氨酸、赖氨酸、D-苯丙氨酸、DL-天门冬酰氨、甘氨酸、丝氨酸等比例混合氨基酸为氮源, 按 C/N 值为 4.5, 加入  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ ,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 加入 VC, VB<sub>1</sub>, VB<sub>2</sub>, VB<sub>3</sub>, VB<sub>5</sub>, VB<sub>11</sub> 各分别( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为 1, 2, 3, 4, 5. 另一组加入混合  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{VC}$ ,  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{VB}_1$ ,  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{VB}_2$  的液体培养基. 灭菌后, 分别接种, 活化培养 10 h 后的乳球菌 *L529* 菌液, 每 100 mL 培养基的接种量为  $8 \times 10^7$  个. 每组 6 个重复, 于 36 下静置培养 20 h. 用前法测定活菌数, 并依此确定维生素的需要情况.

## 2 结果与分析

### 2.1 乳球菌 *L529* 最适生长温度与 pH 值

按材料和方法所述, 对乳球菌 *L529* 的增殖生长与温度(*t*)和 pH 值进行测定, 结果如图 1, 2 所示. 图 1 数据表明, 乳球菌 *L529* 在液体培养基中培养时, 于 33~38 之间的菌体增殖都较快, 每毫升菌数(个)分别为  $2.9 \times 10^8$ ,  $5.3 \times 10^8$  和  $3.0 \times 10^8$ . 由此可确定, 该菌的最适生长温度是 36. 图 2 数据表明, 乳球菌 *L529* 在 pH 值为 5.0~9.0 之间均可生长. 在 pH 值为 7.0 时菌数最多, 每毫升达到  $5.7 \times 10^8$  个. pH 值为 9.0 以上或 pH 值为 5.0 以下时, 该菌生长较差, 菌数(*n*)明显较少, 每毫升菌数(个)分别为  $7.4 \times 10^7$  和  $6.3 \times 10^7$ .

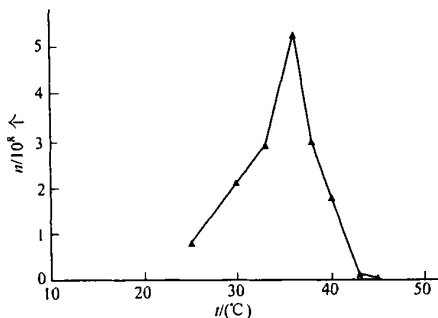


图1 乳球菌 *L529* 生长与温度的关系

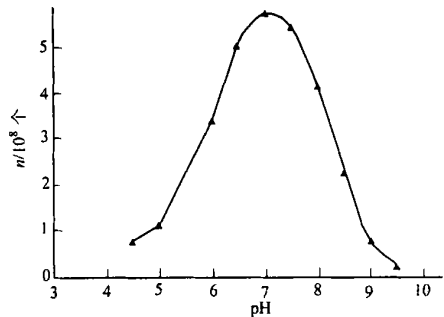


图2 乳球菌 *L529* 生长与 pH 的关系

### 2.2 乳球菌 *L529* 最适 C/N 值

不同 C/N 值对乳球菌生长的影响, 如图 3 所示. 由图 3 结果可确定, 乳球菌 *L529* 生长的

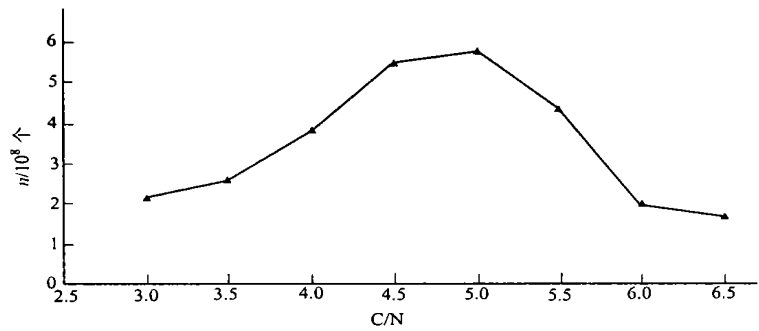


图 3 乳球菌 *L*529 生长与 C/N 值的关系

最适 C/N 值为 4.5 和 5.0. 此时, 菌体增殖最多, 每毫升菌数(个) 分别为  $5.5 \times 10^8$ ,  $5.8 \times 10^8$ . 与此同时, 发酵终点 pH 值均为 3.0, 产酸力较高, 其它 C/N 值的发酵终点 pH 值为 3.5~4.0, 产酸积累较少.

2.3 乳球菌 *L*529 生长对维生素营养的需求

不同维生素对乳球菌 *L*529 生长的影响, 结果如表 1 所示. 表中数据表明, 当 VC, VB<sub>1</sub>, VB<sub>2</sub>, VB<sub>3</sub>, VB<sub>5</sub> 和 VB<sub>11</sub>用量(*C*) 为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 有利于该菌生长, 每毫升菌数(个) 分别为  $3.1 \times 10^7$ ,  $3.3 \times 10^7$ ,  $2.9 \times 10^7$ ,  $2.1 \times 10^7$ ,  $1.6 \times 10^7$ ,  $1.9 \times 10^7$  和  $2.0 \times 10^7$ . 但整体水平较低, 反映了该菌对维生素的需求较重要. 对照为  $1.0 \times 10^7$  个, 混合为  $1.7 \times 10^8$  个.

表 1 乳球菌 *L*529 生长与维生素的关系

维生素	<i>C</i> /mg · L <sup>-1</sup>	<i>n</i> /10 <sup>7</sup> 个	维生素	<i>C</i> /mg · L <sup>-1</sup>	<i>n</i> /10 <sup>7</sup> 个
VB <sub>1</sub>	1	2.9	VB <sub>6</sub>	1	1.2
	2	3.1		2	1.7
	3	3.3		3	1.9
	4	3.0		4	1.8
	5	2.6		5	1.3
VB <sub>2</sub>	1	2.0	VB <sub>11</sub>	1	1.2
	2	2.6		2	1.7
	3	2.9		3	2.0
	4	2.7		4	2.0
	5	2.5		5	1.6
VB <sub>3</sub>	1	1.5	VC	1	2.0
	2	1.9		2	2.6
	3	2.1		3	3.1
	4	2.0		4	3.0
	5	1.6		5	2.7
VB <sub>5</sub>	1	1.0	VC, VB <sub>1</sub> 和 VB <sub>2</sub> 等比例混合	3	8.0
	2	1.5		6	13.0
	3	1.6		9	17.0
	4	1.6		12	15.0
	5	1.4		15	12.0

将以培养基(2)置于在 10 L 和 40 L 发酵罐中,进行 15 批中试发酵比较试验,结果如表 2 所示.发酵工艺的流程为斜面菌种活化培养 菌悬液制备 30 mL 三角瓶一级种子静置培养 1.0 L 种子瓶种子静置培养 10 L 和 40 L 发酵罐静置培养.培养液装量均为 70%.表 2 数据表明,用培养基(2)进行发酵罐试验时,平均活菌数是原配方(1)号培养基的 5 倍以上,达到工业发酵剂的菌量要求.

表 2 乳球菌 *L* 529 在 10 L 和 40 L 发酵试验结果

发酵规模	每毫升原配方(1)号 活菌数/ $10^8$ 个	每毫升伊利纯牛奶 活菌数/ $10^8$ 个	每毫升新配方(2)号 活菌数/ $10^9$ 个
10 L	5.6	3.6	3.3
40 L	5.3	3.2	3.1

3 结 束 语

乳球菌 *L* 529 最适生长温度是 36 ℃,pH 值 7.0,而生长最佳 C/N 值为 4.5 和 5.0.维生素对该菌的营养需求比较重要,特别是 VC、VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>2</sub>.采用培养基(2),其中试发酵结果表明,以纯牛奶为基质并添加适量 VC、VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>2</sub> 的培养基,可以大幅度提高该菌的活菌数.实验表明,乳球菌 *L* 529 的营养需求比较复杂.它是从位于亚热带气候的厦门地区中筛选得到的,与一般的乳酸乳球菌乳脂亚种不同.它是最适生长温度较高的嗜温乳球菌,多年来一直被教学、卫生工作者等群体自制饮用,因而在酸奶开发上有着良好的前景.

本试验得到厦门大学生命科学院胡志钰博士和厦门卫生防疫站黄建炜同志的支持,特此致谢.

参 考 文 献

1 郭本恒,吴正钧,龚广预等. 乳品微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001. 43~44  
2 无锡轻工业学院, 华南工学院, 天津轻工业学院等编. 微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1987. 539~540  
3 胡尚勤. 整肠生菌的生长条件和罐上发酵试验[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 54~58

A Test on the Growth Conditions for *Lactococcus L529*

Xu Wenjiang Lin Lixian Chen Yiliang

(Fujian Inst. of Subtropical Plants, 361006, Xiamen, China)

**Abstract** A study was made on the optimal growth conditions for the *Lactococcus subsp. cremoris L529*. A optimal C/ N of 4.5~5.0 and the necessary vitamins were found; and based on which, a reasonabe prescrip-tion of culture medium was posed. As discovered by pilot test in fermentation, the number of living bacteria increased up to 5 times under the conditions including a pH of 7.0 and a temperature of 36 ℃.

**Keywords** *Lactococcus*, growth condition, yogurt