

文章编号:1673-1689(2005)04-0069-04

双歧杆菌增殖因子的筛选及培养基的优化

韩雪, 张兰威

(东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 研究了各种增殖因子对双歧杆菌的增殖效果, 选出几种增殖效果好、价格低的物质进行正交试验优化培养基。得出长双歧杆菌(PBA)增殖培养基: 在基础培养基基础上额外按体积分数添加平菇汁 20%、卷心菜汁 20%、豆浆 20%、胡萝卜汁 5%。在此培养基中, PBA 经 16 h 培养, 菌数可达 2.45×10^9 CFU/mL; 得出婴儿双歧杆菌(INF)增殖培养基: 在基础培养基基础上额外按体积分数添加平菇汁 10%、蕃茄汁 15%、肝浸汁 15%, 在此培养基中 INF 经 16 h 培养, 菌数可达 2.58×10^9 CFU/mL。

关键词: 双歧杆菌; 增殖因子; 培养基

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

The *Bifidobacteria*'s Growth-Promoting Factors Selection and the Basic Medium Optimization

HAN Xue, ZHAN Lan-wei

(School of Food Science & Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: *Bifidobacteria* are beneficial to human health. This bacteria require higher nutrition and the bifidus factors as the growth factor. The effect of different enrichment factors on *bifidobacteria* growth was studied. Several enrichment factors, good for *bifidobacteria* growth and with lower price, were selected to optimize the enrichment cultures. The resulting PBA medium was then obtained; adding the following substance into the basic medium 20% mushroom juice, 20% savoy juice, 20% soybean-milk and 5% carrot juice. Under this condition the viable cell amount in the PBA could reach 2.45×10^9 ; Another resulting medium INF was also obtained by: adding the following materials to basic medium; 10% mushroom juice, 15% tomato juice, and 15% liver infusion, under this condition viable cell amounts could reach 2.58×10^9 CFU/mL.

Key words: *Bifidobacteria*; growth-promoting factor; medium

双歧杆菌是人体肠道内主要的有益细菌。该菌营养要求高, 需要外源性生长因子即双歧杆菌增殖因子(bifidus factor, BF)才能很好地生长。双歧杆菌是消化道中的原生菌, 如何提高原生菌的活菌含

量、延长活菌保藏期是双歧杆菌及其制品的研制和开发的技术关键。由于双歧杆菌是专性厌氧菌, 对营养要求高, 使得市场上大多数产品活菌量低, 达不到保健功能的要求(活菌数 $> 10^6$ CFU/mL)^[1]。

收稿日期: 2004-08-11; 修回日期: 2005-02-21。

作者简介: 韩雪(1978-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 食品科学与工程博士研究生。

如果活菌数能提高一个数量级,则生产同样效果的制品,可使生产规模减少 10 倍.双歧杆菌通常采用的增殖培养基包括脱脂乳、乳清等在内的天然培养基和合成培养基,但由于用脱脂乳培养时,不易分离菌体,所以合成培养基就显得十分重要.如何优化价格低廉、培养效果好的培养基成为众多研究的热点问题.本试验的目的在于如何用简单而又低廉的双歧杆菌的增殖物质使双歧杆菌增殖.

1 材料与方 法

1.1 菌株

婴儿双歧杆菌(INF),长双歧杆菌(PBA);两株菌均为作者所在实验室分离鉴定.

1.2 培养基

改良 MRS 液体培养基^[2],牛乳清(WP)制备^[1],各种菜汁配制^[3,4],豆浆的制备^[6],肝浸液的配制^[6],大肠杆菌(*E. coli*)上清液的配制^[7].

基础培养基的配制(MRS-WP):向改良 MRS 培养基中加入 10%WP,pH 为 7.0.

1.3 PBA 和 INF 增殖物质的单因素试验

将海带汁、卷心菜汁、平菇汁、胡萝卜汁、肝浸液、豆浆汁等各增殖物质分别按体积分数 5%,15%,25%的添加量加到 MRS-WP 培养基中,37℃厌氧培养 16 h,计菌数.

1.4 PBA 和 INF 增殖物质的正交试验

针对双歧杆菌营养要求复杂的特点,根据单因素试验结果,选出增菌效果好,且价格便宜的物质进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以确定增殖培养基最佳配方.

2 结果与讨论

2.1 增菌培养基中增殖物质的单因素试验

向 MRS-WP 中加入各增殖物质,试验结果见表 1,2.

表 1 PBA 增殖物质单因素试验

Tab.1 The results of single enrichment factors on the counts of PBA

体积分 数/%	<i>E. coli</i> 上清液	海带汁	卷心菜汁	平菇汁	胡萝卜汁	豆浆	肝浸汁	蕃茄汁	对照
5	0.80±	0.85±	1.50±	1.30±	1.55±	1.41±	0.67±	0.62±	
	0.08 ^{ab}	0.06 ^{ab}	0.20 ^{cd}	0.21 ^c	0.11 ^{cd}	0.14 ^{cd}	0.01 ^{ab}	0.09 ^b	
15	1.76±	1.30±	1.95±	1.40±	1.40±	1.59±	0.78±	0.64±	0.89±
	0.11 ^{cd}	0.29 ^c	0.13 ^f	0.16 ^{cd}	0.15 ^{cd}	0.01 ^{de}	0.03 ^{ab}	0.05 ^b	0.02 ^a
25	1.60±	0.90±	1.60±	1.78±	1.45±	1.90±	0.71±	0.54±	
	0.17 ^{cd}	0.20 ^a	0.41 ^{cd}	0.10 ^d	0.03 ^c	0.12 ^d	0.11 ^{ab}	0.10 ^b	

注:在同一行字母中,a、b、c、d、e、f 相同则表示差异不显著,不同则表示差异显著($P<0.05$)

表 2 INF 增殖物质单因素试验

Tab.2 The results of single enrichment factors on the counts of INF

体积 分数/%	卷心菜汁	平菇汁	胡萝卜汁	豆浆	肝浸汁	蕃茄汁	对照
5	0.64±	1.33±	1.04±	0.86±	1.09±	1.59±	
	0.07 ^a	0.44 ^{cd}	0.16 ^{bc}	0.02 ^{ab}	0.09 ^{bc}	0.17 ^d	
15	0.89±	1.71±	1.12±	0.85±	1.79±	1.61±	8.88±
	0.03 ^a	0.21 ^b	0.11 ^a	0.04 ^a	0.64 ^b	0.10 ^b	0.10 ^a
25	0.91±	1.65±	1.01±	0.91±	1.09±	1.76±	
	0.05 ^a	0.06 ^b	0.29 ^a	0.04 ^a	0.09 ^a	0.10 ^b	

注:在同一行字母中,a、b、c、d 相同则表示差异不显著,不同则表示差异显著($P<0.05$)

从表 1 可以看出,对 PBA 有显著增菌作用的物质依次是豆浆、平菇汁、胡萝卜汁、卷心菜汁($P<0.05$),海带汁在体积分数为 15%时有显著增菌效果($P<0.05$),而大肠杆菌培养液的上清液在体积分数大于 15%时有显著增菌效果($P<0.05$).有报导新鲜的 *E. coli* 培养基上清液中含有的肽类物质对双歧杆菌具有增殖作用^[7].作者也得出大肠杆菌上清液有增菌效果,但没有相应的毒理学验证且制

备繁琐,因此应用性有待进一步研究.豆浆富含植物蛋白质和低聚糖类(水苏糖和棉子糖),是良好的生长促进剂,罗珍兰等(1997)得出以大豆为原料的发酵液中的双歧杆菌活菌数比以玉米和蕃茄汁为原料的发酵液中的双歧杆菌活菌数高一个数量级,证实了大豆低聚糖可以促进双歧杆菌的生长^[8].豆浆对 PBA 也有一定的促进作用,与报导结果一致.平菇汁与海带汁富含氨基酸、维生素和某些低聚糖

类以及一些无机盐类,具有很高的营养价值. 张桂兰(1999)等研究表明,海带对双歧杆菌增殖有稳定的促进作用^[9],而本试验中海带汁的增殖效果并不明显. 胡萝卜汁含泛酰巯基乙胺,对双歧杆菌的增殖作用在本试验中得到了验证. 而卷心菜汁则富含维生素和矿物质. 综合增殖菌数与价格因素,选取平菇汁、卷心菜汁、豆浆、胡萝卜汁为 PBA 的增殖物质.

从表 2 可以看出,对 INF 较为有效的增菌物质为:平菇汁、肝浸汁、蕃茄汁. 胡萝卜汁仅在体积分数为 5% 时有显著增菌效果($P<0.05$),这与表 1 中胡萝卜汁对 PBA 有明显促进作用的结果不一致,推测不同的菌株对胡萝卜汁的利用不同. 蕃茄汁是经典的乳酸菌生长促进剂,富含维生素,从表 2 可看出,对 INF 增菌效果显著($P<0.05$). 综合考虑选平菇汁、肝浸汁、蕃茄汁为 INF 的增殖物质.

2.2 增菌培养基中增殖物质的正交试验

根据增菌物质的单因素试验结果,采用正交试验设计($L_9(3^4)$)对 PBA 与 INF 做正交试验. 因素水平表和结果见表 3~6.

表 3 增殖物质优化正交试验因素水平表

Tab. 2 Orthogonal design in optimizing enrichment culture

水平	因 素			
	A(平菇汁) (%)	B(卷心菜汁) (%)	C(豆浆) (%)	D(胡萝卜汁) (%)
1	20	10	10	5
2	25	15	15	10
3	30	20	20	15

表 4 PBA 增殖物质优化正交试验结果

Tab. 4 The results on optimization of enrichment factors with PBA

试验号	因 素				菌数/ ($\times 10^9$ CFU/mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.34
2	1	2	2	2	1.18
3	1	3	3	3	3.78
4	2	1	2	3	1.89
5	2	2	3	1	1.27
6	2	3	1	2	2.24
7	3	1	3	2	2.39
8	3	2	1	3	1.31
9	3	3	2	1	3.63
k_1	2.43	2.21	1.96	2.41	
k_2	1.80	1.25	2.13	1.94	
k_3	2.45	3.22	2.48	2.33	
R	0.65	1.97	0.52	0.47	

由表 4 可看出,各因素对菌数的影响较优水平及主次顺序依次是 $B_3>A_3>C_3>D_1$. 因 A_3 与 A_1 结果相差无几,为节省 A(平菇汁)的用量,因此确定最优组合为 $A_1B_3C_3D_1$,即平菇汁 20%,卷心菜汁 20%,豆浆 20%,胡萝卜汁 5%. PBA 在这一配方的培养基中生长,37℃ 经 16 h 后菌数可达 2.45×10^9 CFU/mL. 这些增殖物质提供了 PBA 生长所需的营养物质,如蛋白质、无机盐、有机酸、维生素等,其中胡萝卜素和微量元素对双歧杆菌的新陈代谢有促进作用. 卷心菜主要提供了充足的微量元素,有报导铁、镁、锌、钙、锰等离子是双歧杆菌酶的激活剂,这些金属离子对双歧杆菌生长起关键作用,因此推测卷心菜对 PBA 生长的影响是由于其所富含的微量元素.

表 5 INF 增殖物质优化正交试验因素水平表

Tab. 5 Orthogonal design in optimizing enrichment culture

水平	体积分数/%		
	A(平菇汁)	B(蕃茄汁)	C(肝浸汁)
1	10	15	10
2	15	20	15
3	20	25	20

表 6 INF 增殖物质优化正交试验结果

Tab. 6 The results on optimization of enrichment factors with INF

试验号	因 素			菌数/ ($\times 10^9$ CFU/mL)
	A	B	C	
1	1	1	1	3.39
2	1	2	2	3.38
3	1	3	3	1.50
4	2	1	3	2.58
5	2	2	1	0.95
6	2	3	2	2.09
7	3	1	2	2.79
8	3	2	3	1.62
9	3	3	1	0.63
k_1	2.76	2.75	1.66	
k_2	1.70	1.98	2.75	
k_3	1.68	1.91	1.73	
R	1.08	0.84	1.09	

由表 6 得各因素对菌数的影响次序依次是 $C>A>B$; 而 A、C 对指标影响差别不大,确定较优组合为 $A_1B_1C_2$,即平菇 10%,蕃茄汁 15%,肝浸汁 15%. INF 在此培养基中经 16 h 培养,菌数可达

2.58×10^9 CFU/mL.

3 结 论

作者筛选出的双歧杆菌 PBA 增殖物质为:在 PBA 基础培养基基础上按体积分数添加平菇汁 20%,卷心菜汁 20%,豆浆 20%,胡萝卜汁 5%,在

这一配方的培养基中生长菌数可达 2.45×10^9 CFU/mL;INF 增殖物质为:在 INF 基础培养基上按体积分数添加平菇汁 10%,蕃茄汁 15%,肝浸汁 15%,在此培养基中生长菌数可达 2.58×10^9 CFU/mL. 这些增殖物质价格低廉、增菌效果好,具有一定的应用价值.

参考文献:

- [1] Sultana K, Godward G, Reynolds N, *et al.* Encapsulation of probiotic bacteria with alginate - starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 62: 47-55.
- [2] 汤丹剑, 卫莉. 培养方式对双歧杆菌检测结果的影响[J]. *中国乳品工业*, 2000, 28(1): 20-22.
- [3] Hye Young Kim, Min J H, Lee J H, *et al.* Growth of lactic acid bacteria and *bifidobacteria* in natural media using vegetables, seaweeds, grains and potatoes[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2000, (9): 322-324.
- [4] 张功, 王瑞君. 平菇浸汁促进嗜酸乳杆菌生长的研究[J]. *微生物学通报*, 2002, 4(29): 65-67.
- [5] Wang Yi-Chieh, Yu Roch-Chui, Chou Cheng-Chun. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks[J]. *Food Microbiology*, 2002, 19: 501-508.
- [6] 李妍. 益生菌的筛选及功能性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.
- [7] Salam A I, Anatoly B. Growth-promoting factors for bifidobacterium longum[J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(1): 189-191.
- [8] 罗珍兰, 谢继志, 王庆明, 等. 双歧杆菌和乳酸菌在不同基质中混合发酵的情况比较[J]. *食品工业科技*, 1997, 4: 50-53.
- [9] 张桂兰, 程薇莉, 何婧, 等. 海带对双歧杆菌促生长作用的研究[J]. *中国微生物学杂志*, 1999, 11(5): 264-265.

(责任编辑: 李春丽)

欢迎订阅 2005 年《冷饮与速冻食品工业》

《冷饮与速冻食品工业》杂志 是经国家新闻出版总署批准出版, 教育部主管, 江南大学(原无锡轻工大学)等单位主办, 面向国内外公开发行的国家级专业性技术指导类刊物, 是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、生产者、经营者研发新品、寻求商机、开拓市场的良师益友。

《冷饮与速冻食品工业》杂志 及时报道国内外冷饮与速冻食品领域及其相关行业的科研成果、生产技术及市场动态, 通过邮局在全国各地发行, 影响广泛, 同时竭诚为我国冷饮与速冻食品行业的广大企业提供广告服务。广告内容涉及冷饮与速冻食品行业的新产品, 各种速冻、冷藏机械设备, 食品添加剂及原辅料等。

地 址: 江苏省 无锡市惠河路 170 号, 江南大学 青山湾校区 51 号信箱《冷饮与速冻食品工业》杂志编辑部; 电 话: 0510-5814561, 5877448; 传 真: 0510-5814561; 邮 编: 214036; 电子邮件地址: csbfi@sytu.edu.cn。 联系人: 周佩琴, 秦和平。