

唾液链球菌的培养工艺研究

朱鸣阳

(重庆医科大学附属第二医院,重庆 400010)

摘要:对唾液链球菌的固体和液体培养条件进行优化,通过单因素试验和参考已有文献资料设计了不同的培养条件,优化得到了唾液链球菌固体培养最优的条件是:MRS培养基,pH 7.2,温度37℃下在体积分数为5%的CO₂的培养箱中培养。液体培养条件是:按照乳糖7g,蔗糖3.5g,葡萄糖3.5g,胰蛋白胨14g,大豆蛋白胨7g,酵母提取物7g,磷酸氢二钾/磷酸二氢钾0.02 mol/L,硫酸镁200 mg/L,硫酸锰100 mg/L,氯化钙60 mg/L, VitB₁ 10 mg/L,蒸馏水1L的比例配制液体培养基,pH 7.2,温度37℃下在体积分数为5%的CO₂的培养箱中静置培养。进行放大培养后,最终得到的冻干好的菌粉共计10.9g,活菌数达到 4.9×10^{11} cfu/g。为工业生产提供了有效的信息。

关键词:唾液链球菌;固体培养;液体培养;活菌计数

中图分类号:R781.9; Q93-335 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2018)04-0011-03

Research on the Progress of *Streptococcus salivarius* in Culture Conditions Optimization

ZHU Ming-yang

(Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: The solid and liquid culture conditions of *Streptococcus salivarius* were optimized by single factor test and referring to existing literature. The optimum conditions for solid culture of *Streptococcus salivarius* were obtained as follows: MRS medium, pH7.2, temperature 37℃ in incubator containing 5% CO₂. The optimum conditions for liquid culture of *Streptococcus salivarius* were obtained as follows: according to the ratio 7 g of lactose, 3.5 g of sucrose, 3.5 g of glucose, 14 g of tryptone, 7 g of soybean peptone, 7 g of yeast extract, 0.02 mol/L of potassium dihydrogen phosphate, 200 mg/L of magnesium sulfate, 100 mg/L of manganese sulfate, 60 mg/L of calcium chloride, 10 mg/L of VitB₁, distilled water 1L to prepare the liquid culture medium, pH 7.2, temperature 37℃ in incubator containing 5% CO₂. After enlarged culture, the final lyophilized bacterial powder was 10.9 g, and the viable bacterial count was 4.9×10^{11} cfu/g. It provides effective information for industrial production.

Keywords: *Streptococcus salivarius*; solid culture; liquid culture; viable count

益生菌被世界卫生组织(WHO)定义为摄入适当的量对食用者健康有益的一类活的微生物的总称,普遍应用于生物工程、食品安全、生命健康以及畜牧业等领域。在国外已经研究出很多益生菌保健产品^[1]。唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*),原名嗜热链球菌,是用于酸奶发酵的两个重要菌株之一,属于口腔正常菌群^[2]。与正常人相比,口腔中的唾液链球菌数量较少者更容易口臭,这是由于口腔内一种革兰氏阴性厌氧菌代谢生成的一种挥发性硫化物是引起的^[3]。研究表明,唾液链球菌最先在婴幼儿的口腔中存在,能够产生一种可参与机体生物屏障的构成,维持机体口腔菌群生态稳定的细菌

素,抑制与口臭有关系的细菌^[4]。此外,发酵过程中添加唾液链球菌使得酸奶的黏度有所增加,增强了酸奶的风味。同时,唾液链球菌与保加利亚乳杆菌一起发酵还存在共生效应,唾液链球菌在生长可以生成甲酸,刺激保加利亚乳杆菌繁殖,而保加利亚乳杆菌可分解酪蛋白形成多种氨基酸以及多肽,促进唾液链球菌的新陈代谢^[5]。

本论文首先从美国Now foods公司生产的“诺奥清益口含片BLIS K12”中分离筛选得到唾液链球菌,并根据唾液链球菌对生长所需的六大营养物质不同需求设计了固体培养和液体培养条件,观察唾液链球菌的生长状况并对培养条件其进行优化。

进行放大培养后,用平板活菌计数法检测活菌数量,并进行冻干处理,得到唾液链球菌菌粉,并总结出一条完整的工艺生产路线。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌株从美国 Now foods 公司生产“诺奥清益口含片 BLIS K12”中分离筛选获得。

1.2 试验试剂

牛肉膏、胰蛋白胨、酪蛋白胨、淀粉、琼脂、酵母膏、葡萄糖、蔗糖、乙酸钠、柠檬酸二胺、氯化钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锰、氯化钙、VitB₁、脱脂乳、谷氨酸钠、吐温-80、甘油。均为化学纯。

1.3 仪器与设备

SPX-250-III 生化培养箱,上海跃进有限公司产品;MA240D 型电子天平,上海第二天平仪器厂产品;LS-35LD 高压灭菌锅,苏州江东精密仪器有限公司产品;DNM-9606 酶标分析仪,北京普朗医疗有限公司产品;LGJ-100F 冷冻干燥机,松源冻干有限公司产品。

1.4 试验设计

1.4.1 固体培养条件筛选

参考已有文献对唾液链球菌的理化特性设计了四种不同的固体培养基,分别为:

唾液链球菌培养基^[6]:牛肉膏 4 g,蛋白胨 2 g,淀粉 4 g,琼脂 3 g,蒸馏水 200 mL,pH7.2。

MRS 培养基^[6]:酪蛋白胨 2 g,牛肉膏 2 g,酵母膏 1 g,葡萄糖 1 g,乙酸钠 1 g,柠檬酸二胺 0.4 g,吐温-80 0.2 g,磷酸氢二钾 0.4 g,硫酸镁 0.04 g,硫酸锰 0.001 g,碳酸钙 4 g,琼脂 3 g,蒸馏水 200 mL,pH7.2。

乳酸菌培养基^[7]:酵母膏 1.5 g,胰蛋白胨 1.5 g,葡萄糖 2 g,磷酸二氢钾 0.4 g,西红柿汁 20 mL,吐温-80 0.2 g,蒸馏水 200 mL,pH7.2。

Eliker 琼脂培养基^[8]:胰蛋白胨 4 g,蔗糖 1 g,酵母膏 1 g,氯化钠 0.8 g,乙酸钠 0.3 g,葡萄糖 1 g,Vc0.01 g,乳糖 1 g,琼脂 3 g,蒸馏水 200 mL,pH7.2。

将配制好的培养基放入高压灭菌锅中进行 121℃ 灭菌 20 min,待其还未凝固前倾注入灭菌平板及斜面中备用。

随后 37℃ 下置于普通培养箱及 CO₂ 的体积分数为 5% 的培养箱中静置培养,记录此时为 0 h,分别于 12、24、48、72 h 观察菌落的生长情况。

1.4.2 液体培养条件筛选

参照唾液链球菌的理化性质以及之前用到的固体培养条件,设计两种液体培养条件^[9],分别为:乳糖 7 g,蔗糖 3.5 g,葡萄糖 3.5 g,胰蛋白胨 14 g,酪蛋白胨 7 g,酵母膏 7 g,磷酸氢二钾/磷酸二氢钾 0.02 mol/L,硫酸镁 200 mg/L,硫酸锰 100 mg/L,氯化钙 60 mg/L,VitB₁ 10 mg/L,蒸馏水 1 L 的比例配制 200 mL 的液体培养基,调节 pH 为 7.2;考察不含 VitB₁ 而其他条件与前述培养基一致的条件对唾液链球菌生长的影响。

将经过三次传代的单菌落接种到新的斜面中,静置培养 18 h,将处于对数生长期的唾液链球菌接种 3 环至 200 mL 的培养液中,摇匀后 37℃ 下置于体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中静置培养,记录此时为 0 h,分别于 2、4、8、12、24 h 取样,用酶标仪测量分光光度值。

1.4.3 放大培养及活菌计数

确定好液体培养条件后按照相应的比例进行放大培养,培养液总量为 5 L,分别装入 12 个锥形瓶中,12 h 后进行活菌计数,将待测样品取样稀释 104、105、106 倍,分别将三个稀释度的样品吸取 200 μL 倒入适量冷却到 45℃ 左右试验 1.4.1 中的唾液链球菌培养基和 MRS 培养基中,混匀,冷却。待凝固后,按照试验 1.4.1 的条件培养,此过程严格无菌操作。培养 24 h 之后进行平板活菌数计数,公式为: cfu/mL = 平板中单菌落的平均数 × 稀释倍数 × 5。

1.5 冻干

放大培养 12 h 后,在进行活菌计数的同时,收集菌液,此时的唾液链球菌应处于平台期。将菌液在无菌条件下转移到离心杯中,转速 3 500 rpm,20℃ 离心 15 min,弃掉上清,加入 3 倍体积的无菌生理盐水,再次 3 500 rpm,20℃ 离心 15 min,此过程重复 3 次,收集沉淀,转移到无菌平板中进行冻干处理。

按照 10% 的脱脂乳、1.5% 的谷氨酸钠、3% 的甘油^[10-13] 配制为冻干保护剂,将加入保护剂后的菌液放入 -60℃ 冰箱 2 h 进行预冻,之后再转移到冻干机里进行冻干,48 h 后收集产品,称重。

2 结果与讨论

2.1 固体培养条件筛选结果

本次试验中唾液链球菌固体培养采用了分别放入两种培养箱中培养,从表 1 和表 2 的对比可以看出,相同条件下放入 CO₂ 的体积分数为 5% 的培养箱中的平板上菌落生长的情况更好,这可能是因为唾液链球菌是一种兼性厌氧型细菌,所以加入 5%

表1 不同固体培养基上唾液链球菌生长情况(普通培养箱)

培养基	生长情况			
	12 h	24 h	48 h	72 h
唾液链球菌培养基	未出现菌落	未出现菌落	出现菌落	出现菌落
MRS培养基	未出现菌落	出现菌落	出现菌落	出现菌落
乳酸菌培养基	未出现菌落	未出现菌落	未出现菌落	未出现菌落
Eliker培养基	未出现菌落	未出现菌落	出现菌落	出现菌落

表2 不同固体培养基上唾液链球菌生长情况
(CO₂的体积分数为5%的培养箱)

培养基	生长情况			
	12 h	24 h	48 h	72 h
唾液链球菌培养基	未出现菌落	未出现菌落	出现菌落	出现菌落
MRS培养基	未出现菌落	出现菌落	出现菌落	出现菌落
乳酸菌培养基	未出现菌落	未出现菌落	未出现菌落	未出现菌落
Eliker培养基	未出现菌落	未出现菌落	出现菌落	出现菌落

的CO₂可以刺激唾液链球菌更好的生长。

对于四种不同的培养基:

第一种为普通唾液链球菌培养基,并未额外加入其他的无机盐离子,维生素等。在CO₂的体积分数为5%培养箱中培养24 h后,可观察到平板上有较小的单菌落出现,数量适中。培养48 h后可见较大单菌落。

第二种为MRS培养基,除了加入必要的碳源和氮源之外,还额外加入了无机盐离子乙酸钠、柠檬酸二胺、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、碳酸钙。在含有5%的CO₂的培养箱中培养12 h后,可观察到平板上有大量单菌落出现,24 h后可见较大的单菌落。

第三种为乳酸菌培养基,其中除了碳源氮源外,还额外加入了磷酸二氢钾和鲜榨的西红柿汁。但只有在含有CO₂的培养箱中培养72 h后出现了菌落。

第四种是Eliker琼脂培养基,其中将碳源更改为乳糖,并额外加入了无机盐离子氯化钠和乙酸钠,以及抗坏血酸。但从结果显示菌落生长的情况和普通唾液链球菌培养基似。

2.2 唾液链球菌液体培养结果

本次试验中对比了两种液体培养基,主要区别是1号瓶中加入了VitB₁作为唾液链球菌的促生长因子。

2.3 放大培养结果

放大培养后,培养液稀释10⁶倍和10⁷倍,采用普通唾液链球菌培养基进行活菌计数,试验结果如表

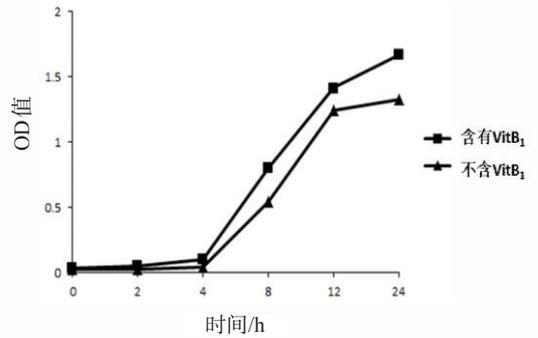


图1 不同液体培养基中唾液链球菌生长情况

表3 放大培养后活菌计数

稀释倍数	单菌落个数(个/平板)	总菌数(cfu/mL)
106倍	219.5	1.10×10 ⁹
107倍	20.5	1.03×10 ⁹

注:活菌数为四个平板的平均值。

3所示。

2.4 唾液链球菌的放大培养后冻干结果

最终得到的冻干好的菌粉共计10.9 g,活菌数达到4.9×10¹¹ cfu/g。

3 结论

经过筛选得出唾液链球菌固体培养最优的条件是:酪蛋白胨2 g,牛肉膏2 g,酵母膏1 g,葡萄糖1 g,乙酸钠1 g,柠檬酸二胺0.4 g,吐温-80 0.2 g,磷酸氢二钾0.4 g,硫酸镁0.04 g,硫酸锰0.001 g,碳酸钙4 g,琼脂3 g,蒸馏水200 mL, pH 7.2,温度37 °C下在CO₂的体积分数为5%培养箱中培养。但由于配制MRS培养基较为复杂,需要按顺序加入无机盐,在工业生产中,采用普通唾液链球菌培养基条件(牛肉膏4 g,蛋白胨2 g,淀粉4 g,琼脂3 g,蒸馏水200 mL, pH 7.2)是工业生产中较好的选择。

最优的液体培养条件为:乳糖7 g,蔗糖3.5 g,葡萄糖3.5 g,胰蛋白胨14 g,大豆蛋白胨7 g,酵母提取物7 g,磷酸氢二钾/磷酸二氢钾0.02 mol/L,硫酸镁200 mg/L,硫酸锰100 mg/L,氯化钙60 mg/L, VitB₁ 10 mg/L,蒸馏水1 L的比例配制液体培养基, pH 7.2,温度37 °C下在含有5%的CO₂的培养箱中静置培养。此外从图1中可以看出,唾液链球菌在培养4 h左右进入对数生长期,12 h左右进入平台期。要收集唾液链球菌可以选择在12 h左右进行收集,这为工业生产提供了有效的信息。

参考文献:

- [1] 高阳,王海岩,王佳江,等.益生菌的保健作用与研究综述[J].安徽农学通报,2009,15(19):56-56.
- [2] 王伟军,李廷华,张兰威,等.唾液链球菌嗜热亚种发酵乳风味成分分析[J].食品科学,2008,29(4):263-266.

术效率、纯技术效率和规模技术效率。利用经济学上的冗余率和产出不足率进行测度,分析网站的投入与产出情况。对购物网站提出以下优化建议:

(1)在12家购物网站中,网站有效率是50%,并且这12家购物网站中有25%的投入资源没有得到回报,说明购物网站效率还有提升的空间。

(2)1号店、美团、孔夫子旧书网纯技术效率和规模效率均 <1 ,输入指标的投入冗余率较高,需调整网站规模,如丰富网页的内容,调整网页的大小

和数量,提高发布信息的有效性。

(3)小红书、慧聪网、名鞋库需要精简网页链接,增加用户满意体验度。合理利用资源,加大宣传力度,推广网站,增加网站规模效率。

随着互联网移动技术的发展,购物App用户越来越多,下一步将以购物App为研究对象,以提高App效率为目标,运用融合多种计算模型为手段。从而更全面的分析购物平台,更好地为企业优化购物系统提供建议。

参考文献:

- [1] 中国互联网络信息中心.第41次《中国互联网络发展状况统计报告》[R/OL].(2018-03-05)[2018-05-01]. http://www.cnnic.cn/hlwfzyj/hlwxzbg/hlwtjbg/201803/t20180305_70249.htm.
- [2] 华巧招.基于顾客感知价值的购物网站评价体系研究[D].西安:西安电子科技大学,2011:5-10.
- [3] 闫会娟.基于网络营销视角的购物网站评价研究[J].应用研究,2014(6):48-49.
- [4] 陈关胜.基于灰色关联度分析法的电子商务[D].江西:江西财经大学,2013:1-47.
- [5] 胡剑锋,魏利军.农村教育对浙江省农业经济增长的贡献率分析:基于数据包络分析方法中CCR模型的应用[J].浙江理工大学学报,2007(6):670-677.
- [6] CHARNES A, COOPER W W, RHODES E. Measuring the Efficiency of Decision Making Units[J]. European Journal of Operational Research, 1978(2):429-444.
- [7] 张芬.基于DEA方法的中部地区普通高等教育资源配置效率分析[D].长沙:长沙理工大学,2012:1-84.
- [8] 王军.考虑决策单元异质性的DEA建模及其应用研究[D].合肥:中国科学技术大学,2015:1-113.
- [9] 张倩.基于DEA方法的跨境电商企业经营绩效评价[J].广西科技大学学报,2018(2):126-133.

(责任编辑:蒋召雪)

(上接第13页)

- [3] De BOEVER E H, LOESCHE W J. Assessing the Contribution of Anaerobic Microflora of the Tongue to Oral Malodor[J]. Journal of the American Dental Association, 1995,126(10):1384-1393.
- [4] 温艳丽,万呼春.唾液链球菌在口臭治疗中的研究进展[J].国际口腔医学杂志,2008,35(5):523-525.
- [5] 顾瑞霞,王亚威,骆承庠.发酵乳-最新研究动向[J].中国乳品工业,1999,27(3):44-45.
- [6] ML斯佩克.食品微生物检验方法提要[M].何晓青,孟昭赫,吴光先,译.北京:人民出版社,1982:75.
- [7] 陈芳,靳亚平.奶制品中有益菌的分离鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2007(3):102-103.
- [8] 王建芳,陈芳,靳亚平.嗜热链球菌适宜培养条件研究[J].西北农业学报,2008,17(2):56-58.
- [9] 张兴昌.嗜热链球菌高密度培养及冷冻保护的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.
- [10] Hub á lek Z. Protectants Used in the Cryopreservation of Microorganisms[J]. Cryobiology, 2003,46(3):205-229.
- [11] Smittle R B, Gilliland S E, Speck M L. Death of Lactobacillus Bulgaricus Resulting from Liquid Nitrogen Freezing[J]. Applied Microbiology, 1972,24(4):551.
- [12] Santarius K A. Freezing of Isolated Thylakoid Membranes in Complex Media. XI. the Cryoprotective Efficiency of Combinations of Bovine Serum Albumin with Low-molecular-weight Cryoprotectants[J]. Cryo Letters, 1996,17(1):15-24.
- [13] de Vald é z GF, de Giori GS, et al. Protective Effect of Adonitol on Lactic Acid Bacteria Subjected to Freeze-drying[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983,45(1):302-304.

(责任编辑:曲继鹏)