

乳酸菌菌粉定量计数方法研究

严涛, 陈珂可, 程文, 夏九学, 徐建忠, 朱建国

Study on Quantitative Counting Method of Lactic Acid Bacteria Powder

YAN Tao, CHEN Keke, CHENG Wen, XIA Jiuxue, XU Jianzhong, and ZHU Jianguo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050219>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

食品中乳酸菌定量检测方法研究进展

Research Progress on Enumeration Methods of Lactic Acid Bacteria in Food

食品工业科技. 2020, 41(12): 358-365 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.059>

乳酸菌破壁方法的比较研究

Comparision research on the cell wall-breaking methods of lactic acid bacteria

食品工业科技. 2017(12): 34-38 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.12.007>

凝结芽孢杆菌中与乳酸生产相关的乳酸脱氢酶基因的研究

Lactic Dehydrogenase Gene Related to Lactic Acid Production in *Bacillus coagulans*

食品工业科技. 2018, 39(24): 109-113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.020>

乳酸菌氧化锆珠破壁方法的优化及适用性研究

Optimization of zirconia beads wall-breaking method for lactic acid bacteria and study on its effect of the applicability

食品工业科技. 2017(11): 140-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.11.018>

海藻乳酸菌发酵的研究进展

Research Progress of Seaweed Fermentation with Lactic Acid Bacteria

食品工业科技. 2021, 42(16): 381-387 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080144>

喷雾干燥条件对荔枝酸奶粉乳酸菌存活率及粉体特性的影响

Effect of spray drying parameters on survival rate of lactic acid bacteria and physical properties of lychee yogurt powder

食品工业科技. 2017(09): 216-220 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.09.033>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

严涛, 陈珂可, 程文, 等. 乳酸菌菌粉定量计数方法研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 148–153. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050219

YAN Tao, CHEN Keke, CHENG Wen, et al. Study on Quantitative Counting Method of Lactic Acid Bacteria Powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(3): 148–153. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050219

· 生物工程 ·

乳酸菌菌粉定量计数方法研究

严 涛, 陈珂可, 程 文, 夏九学, 徐建忠, 朱建国*
(微康益生菌(苏州)股份有限公司, 江苏苏州 215200)

摘 要:目的: 以 9 株乳杆菌、6 株双歧杆菌、3 株球菌、1 株凝结芽孢杆菌菌粉为研究对象, 在国标 GB 4789.35-2016 的基础上, 对稀释倍数、稀释液成分、培养基成分进行比较研究, 考察对乳酸菌菌粉计数活菌数的影响。方法: 采用稀释平板计数的方法, 对不同的乳酸菌菌粉进行活菌计数。结果: 初始乳酸菌菌粉样品稀释倍数对最终计数活菌数无明显影响, ISO 稀释液对部分乳杆菌、双歧杆菌菌粉的活菌计数结果有显著提高 ($P<0.05$); 双歧杆菌菌粉采用 TOS 琼脂培养基的计数结果显著优于国标培养基 ($P<0.05$); 凝结芽孢杆菌菌粉采用改良芽孢计数培养基计数结果优于 PCA 和 NA 计数培养基。结论: 平板计数方法中, 稀释液中含有酪蛋白胨能提升双歧杆菌菌粉的活菌计数数量; TOS 琼脂培养基更有利于双歧杆菌的增殖培养; 改良芽孢计数培养基更有利于凝结芽孢杆菌的芽孢萌发增殖。

关键词: 乳酸菌, 计数方法, 双歧杆菌, 凝结芽孢杆菌, 酪蛋白胨

中图分类号: Q939.92

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)03-0148-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050219

本文网刊:



Study on Quantitative Counting Method of Lactic Acid Bacteria Powder

YAN Tao, CHEN Keke, CHENG Wen, XIA Jiuxue, XU Jianzhong, ZHU Jianguo*

(Wecare Probiotics Co., Ltd., Suzhou 215200, China)

Abstract: Objective: On the basis of national standard GB 4789.35-2016, a comparative study was conducted on dilution ratio, diluent components and medium components to investigate the influence on the number of viable bacteria when counting lactic acid bacteria powder. Nine strains of *Lactobacillus*, six strains of *Bifidobacterium*, three strains of coccus and one strain of *Bacillus coagulans* were used as research objects. Methods: The method of dilution plate count was used to count the viable bacteria of different lactic acid bacteria powders. Results: According to research findings, the dilution ratio of the initial lactic acid bacteria powder sample had no significant effect on the final count of viable bacteria, and the ISO dilution had significant effects on the viable count results of some *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* powders ($P<0.05$); The counting result of *Bifidobacterium* powder using TOS agar medium was better than that of national standard medium ($P<0.05$); The counting result of *Bacillus coagulans* powder using modified spore counting medium was better than PCA and NA counting culture base. Conclusion: The diluent containing casein peptone could increase the number of viable counts of *Bifidobacterium* powder when plate counting method was used; TOS agar medium was more conducive to the proliferation and culture of *Bifidobacterium*; The improved spore counting medium was more conducive to the spore germination and proliferation of *Bacillus coagulans*.

Key words: lactic acid bacteria; counting method; *Bifidobacterium*; *Bacillus coagulans*; casein peptone

乳酸菌作为益生菌微生态制剂的主要成分, 可以调节肠道菌群平衡、提升机体的免疫力, 已被广泛应用于普通食品、保健食品、医药、农用等领域。而

乳酸菌的活菌数水平直接关系到这些产品的质量, 影响到乳酸菌的益生作用^[1], 因此, 食品中乳酸菌的活菌数是该类食品检验的核心内容。目前我国产品标

收稿日期: 2022-05-19

基金项目: 乳酸菌发酵剂关键生产技术规范及应用 (No. 2019YFF0217602)。

作者简介: 严涛 (1987-), 男, 硕士, 中级工程师, 研究方向: 益生菌工艺, E-mail: tao.yan@wecare-bio.com。

* 通信作者: 朱建国 (1983-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 益生菌方面, E-mail: cai.zhu@wecare-bio.com。

准规定发酵乳制品及活菌型乳酸菌饮料中乳酸菌活菌数不得少于 1×10^6 CFU/g(mL)^[2], 其检测方法标准为 GB 4789.35-2016^[3]。

据报道^[4], 乳酸菌计数的方法目前有平板菌落计数法、流式细胞术、荧光定量 PCR 法等, 但设备成本低、操作简便、结果直观, 易于推广^[5]的方法, 仍然是平板菌落计数法, 目前国内乳酸菌常用的平板计数方法是 GB 4789.35-2016, 随着科研人员对乳酸菌研究的进一步深入, 发现不同的乳酸菌有生化特征的差异性^[6], 用于计数的培养基成分对不同菌群的计数有一定的差异。双歧杆菌类菌株对生长所需要的营养条件要求较高, 计数培养基中需要含有丰富的碳氮源、生长因子及缓冲盐类等物质, 某些双歧杆菌(如两歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌)的生长需要添加促生长的双歧增殖因子^[7], 除双歧杆菌外, 乳酸杆菌和球菌虽然相比于双歧杆菌, 易于生长, 但是不同的计数方法所涉及的不同培养基营养成分仍然会对最终的活菌数结果产生一定的影响, 不同的计数培养基成分及培养条件, 会对活的但非可培养(viable but non-culturable, VBNC)^[8]的菌体数量造成影响。有生理活性的细菌数, 包括可培养的活菌数和 VBNC 状态的菌体数。VBNC 生理状态广泛存在于已培养和未可培养的微生物中^[9]。乳酸菌在一定的条件下(不同温度^[10]、不同营养物质影响^[11]、底物浓度影响^[12]、渗透压变化^[13]等), 也可以形成 VBNC 的生理状态, 这种状态下的乳酸菌, 仍具有其生理活性, 但是在一些培养基上很难生长出来, 因此会影响最终乳酸菌在活菌计数平板(GB 4789.35-2016)上的检测结果, 进而影响最终可培养的菌体数量。一些在食品名单目录当中的芽孢杆菌, 如凝结芽孢杆菌^[14], 没有国标和行标的计数检测方法, 目前都是企业标准, 常用的是营养琼脂培养基进行检测^[15], 但不同的培养环境、培养基成分, 对芽孢的萌发有一定的影响^[16]。

本研究以国标 GB 4789.35-2016 的检测方法为基础, 对乳酸菌(双歧杆菌、乳杆菌、球菌、凝结芽孢杆菌)菌粉活菌数计数方法进行研究, 并结合国际上的乳酸菌检测方法 ISO 29981-2010, 从稀释倍数、稀释液、培养基成分上进行比较研究, 考察对不同乳酸菌菌粉的计数结果差异性, 为益生菌厂家产品标准的制定、保健食品检验人员和标准制定者提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳杆菌类(嗜酸乳杆菌 LA85、植物乳杆菌 Lp90、鼠李糖乳杆菌 LRa05、干酪乳杆菌 LC89、副干酪乳杆菌 LC86、唾液乳杆菌 LS97、罗伊氏乳杆菌 LR08、保加利亚乳杆菌 LB42、格氏乳杆菌 LG08 菌粉)、双歧杆菌类(乳双歧杆菌 BLa80、长双歧杆菌 BL21、短双歧杆菌 BBr60、青春双歧杆菌 BAC30、婴儿双歧杆菌 BI45、两歧双歧杆菌 BBi32 菌粉)、球菌类(嗜热链球菌 ST81、乳酸片球菌 PA53、戊糖片

球菌 PP06 菌粉)、芽孢杆菌(凝结芽孢杆菌 BC99 菌粉) 微康益生菌(苏州)股份有限公司; 厌氧盒和厌氧产气袋 日本三菱瓦斯化学株式会社; MRS 琼脂培养基、MC 琼脂培养基、酸化 MRS Agar 培养基、M17 琼脂培养基、NA 营养琼脂培养基、PCA 培养基 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; TOS 琼脂培养基 德国 Merck 公司。

CP114 电子分析天平 奥豪斯仪器上海有限公司; SW-CJ-IF 无菌超净工作台 苏州净化设备有限公司; DNP-9022 恒温培养箱 上海精宏; PHS-3E pH 计 上海雷池仪器厂; BCD-176SQMK 冰箱 美的集团股份有限公司; LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 上海中安医疗器械厂; XW-80A 旋涡混合器 上海驰唐电子有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 稀释倍数的选择

1.2.1.1 乳杆菌、双歧杆菌和球菌 分别称量样品(乳杆菌、双歧杆菌或球菌)2、10、25 g 于 38、90、225 mL 的无菌的生理盐水稀释液中, 参照国标 GB 4789.35-2016 的乳酸菌计数方法, 添加玻璃珠进行混合均匀并进行稀释计数及培养, 考察不同的称量样品稀释倍数对计数活菌数的影响。

1.2.1.2 凝结芽孢杆菌 以营养琼脂培养基检测方法^[15]为基础, 分别称量凝结芽孢杆菌菌粉样品 2、10、25 g 于 38、90、225 mL 的无菌的生理盐水稀释液中, 采用拍击式均质器拍打 1~2 min 制成相应稀释液, 进行 80 ℃ 水浴 10 min, 再进行稀释计数芽孢数, 采用 NA 营养琼脂培养基进行培养, 培养条件: 37 ℃ 有氧培养 48~72 h。考察不同称量样品稀释倍数对计数活菌数的影响。

1.2.2 计数稀释液的选择 国标稀释液: 生理盐水按照 GB 4789.35-2016 中的规定配制及灭菌。

ISO 稀释液(ISO 29981-2010 中的稀释液方法): 在国标稀释液成分基础上, 额外添加酪蛋白胨 0.1%(m:v), 其它参照国标 GB 4789.35-2016。

改良稀释液一: 在国标稀释液成分基础上, 额外添加磷酸氢二钠 0.6%(m:v), 磷酸氢二钾 0.45%(m:v), 吐温-80 0.06%(m:v), 其它参照国标 GB 4789.35-2016。

改良稀释液二: 在国标稀释液成分基础上, 额外添加氯化钾 0.02%(m:v), 磷酸氢二钠 0.115%, 磷酸二氢钾 0.02%, 其它参照国标 GB 4789.35-2016。

改良稀释液三: 在国标稀释液成分基础上, 额外添加吐温-80 0.5%(m:v), 其它参照国标 GB 4789.35-2016。

采用五种不同的稀释液(国标稀释液、ISO 稀释液、改良稀释液一、改良稀释液二、改良稀释液三)对乳杆菌、双歧杆菌、球菌及凝结芽孢杆菌进行检测, 除稀释液不同外, 乳杆菌、双歧杆菌、球菌参照 GB 4789.35-2016 的检测方法; 凝结芽孢杆菌采用

表 1 梯度稀释液研究
Table 1 Research on serial dilutions

	10 ⁻¹ 试管	10 ⁻² 试管	10 ⁻³ 试管	10 ⁻⁴ 试管	10 ⁻⁵ 试管	10 ⁻⁶ 试管	10 ⁻⁷ 试管	10 ⁻⁸ 试管	10 ⁻⁹ 试管
测试1	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液
测试2	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液
测试3	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	国标稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液
测试4	国标稀释液	国标稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液
测试5	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液	ISO稀释液

NA 营养琼脂培养基进行培养,培养条件:37 ℃ 有氧培养 48~72 h。

针对 ISO 稀释液进一步研究,与国标稀释液进行对比,不同稀释梯度采用不同的稀释液,其它计数条件相同,如表 1 所示,进一步考察两种稀释液中的成分对计数结果的影响。

1.2.3 计数培养基的选择 乳杆菌分别采用 MRS 琼脂培养基、酸化 MRS Agar 培养基;双歧杆菌分别采用 MRS 琼脂培养基+锂盐、TOS 琼脂培养基;球菌分别采用 MC 琼脂培养基、M17 琼脂培养基;其它参照 GB 4789.35-2016 的计数方法,考察不同的计数培养基对计数结果的影响。

以营养琼脂培养基检测方法^[15]为基础,称量凝结芽孢杆菌菌粉样品 25 g 于 225 mL 的无菌的生理盐水稀释液中,采用拍击式均质器拍打 1~2 min 制成相应稀释液,进行 80 ℃ 水浴 10 min,再进行稀释计数芽孢数,分别采用 NA 营养琼脂培养基、PCA 培养基、改良芽孢培养基(酵母提取物 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 5.0 g,葡萄糖 5.0 g,氯化钠 250 mg,氯化钙 150 mg,硫酸镁 200 mg,一水硫酸锰 100 mg,L-半胱氨酸盐酸盐 500 mg,琼脂 15 g,加水至1000 mL)进行培养,

培养条件:37 ℃ 有氧培养 48~72 h。考察不同的计数培养基对计数结果的影响。

1.3 数据处理

以上菌粉样品,每种菌粉分成三等份,采用相同的方法、同一人员进行检测,每种样品重复检测三次。采用 SPSS 18.0 软件对数据进行处理及分析,并进行 *t* 检验。数据结果采用“平均值±标准误差”来表示。

2 结果与分析

2.1 菌粉样品稀释倍数对活菌数计数结果的影响

以国标 GB 4789.35-2016 方法为对照,由表 2 结果可知,称量不同样品进行稀释计数,采用三种稀释倍数,其计数结果差异不明显。说明不同的稀释倍数方式,对菌粉样品的计数结果影响不大。

2.2 不同计数稀释液对活菌数计数结果的影响

以国标 GB 4789.35-2016 方法为对照,由表 3 结果可知,改良稀释液对球菌、凝结芽孢杆菌的活菌数影响不显著($P>0.05$),ISO 稀释液可以显著提高嗜酸乳杆菌 LA85、唾液乳杆菌 LS97、乳双歧杆菌 BLa80、长双歧杆菌 BL21、短双歧杆菌 BBr60、青春双歧杆菌 BAC30、婴儿双歧杆菌 BI45、两歧双歧杆菌 BBi32 的计数结果($P<0.05$)。

表 2 不同益生菌菌粉稀释倍数计数结果(×10¹¹ CFU/g)
Table 2 Counting results of dilution times of different probiotic bacteria powder (×10¹¹ CFU/g)

分类	菌株	2 g→38 mL	10 g→90 mL	25 g→225 mL(国标)
乳杆菌	嗜酸乳杆菌LA85	2.4±0.1	2.3±0.2	2.4±0.1
	植物乳杆菌Lp90	5.4±0.1	5.3±0.1	5.4±0.1
	鼠李糖乳杆菌LRa05	4.4±0.2	4.5±0.1	4.5±0.1
	干酪乳杆菌LC89	5.4±0.1	5.5±0.2	5.5±0.2
	副干酪乳杆菌LC86	5.3±0.1	5.4±0.1	5.4±0.1
	唾液乳杆菌LS97	2.3±0.1	2.2±0.1	2.3±0.2
	罗伊氏乳杆菌LR08	2.3±0.2	2.2±0.1	2.3±0.1
	保加利亚乳杆菌LB42	1.1±0.2	1.2±0.1	1.2±0.2
	格氏乳杆菌LG08	3.4±0.1	3.4±0.1	3.3±0.1
	乳双歧杆菌BLa80	5.4±0.2	5.6±0.1	5.5±0.1
双歧杆菌	长双歧杆菌BL21	3.4±0.1	3.5±0.2	3.4±0.2
	短双歧杆菌BBr60	5.4±0.1	5.6±0.1	5.5±0.1
	青春双歧杆菌BAC30	1.3±0.2	1.2±0.2	1.2±0.2
	婴儿双歧杆菌BI45	1.4±0.2	1.4±0.2	1.3±0.1
	两歧双歧杆菌BBi32	5.4±0.1	5.5±0.2	5.4±0.2
球菌	嗜热链球菌ST81	1.2±0.1	1.3±0.2	1.2±0.1
	乳酸片球菌PA53	4.6±0.1	4.7±0.2	4.6±0.1
	戊糖片球菌PP06	3.5±0.1	3.5±0.1	3.4±0.2
芽孢杆菌	凝结芽孢杆菌BC99	1.2±0.1	1.3±0.2	1.2±0.1

表 3 不同稀释液计数对活菌数的影响 (×10¹¹ CFU/g)

Table 3 Effect of different diluent counts on the number of viable bacteria (×10¹¹ CFU/g)

分类	菌株	国标稀释液	ISO稀释液	改良稀释液一	改良稀释液二	改良稀释液三
乳杆菌	嗜酸乳杆菌LA85	2.3±0.2	3.2±0.1*	2.4±0.2	2.5±0.2	2.2±0.2
	植物乳杆菌Lp90	5.3±0.1	5.8±0.2	5.4±0.2	5.4±0.2	5.5±0.2
	鼠李糖乳杆菌LRa05	4.3±0.2	4.6±0.1	4.5±0.2	4.4±0.2	4.3±0.1
	干酪乳杆菌LC89	5.4±0.2	5.7±0.2	5.5±0.2	5.4±0.1	5.7±0.1
	副干酪乳杆菌LC86	5.3±0.2	5.5±0.1	5.4±0.2	5.3±0.2	5.5±0.1
	唾液乳杆菌LS97	2.3±0.2	3.5±0.2*	2.8±0.1	2.7±0.1	2.4±0.2
	罗伊氏乳杆菌LR08	2.1±0.2	2.5±0.2	2.3±0.1	2.3±0.2	2.4±0.2
	保加利亚乳杆菌LB42	1.1±0.2	1.3±0.2	1.2±0.1	1.2±0.1	1.1±0.2
	格氏乳杆菌LG08	3.2±0.1	3.5±0.2	3.3±0.2	3.4±0.1	3.3±0.2
双歧杆菌	乳双歧杆菌BLa80	5.3±0.2	6.7±0.1*	5.6±0.2	5.7±0.2	5.4±0.1
	长双歧杆菌BL21	3.2±0.2	4.1±0.2*	3.5±0.1	3.5±0.1	3.2±0.2
	短双歧杆菌BBr60	5.4±0.1	6.7±0.2*	5.8±0.2	5.8±0.1	5.3±0.1
	青春双歧杆菌BAC30	1.3±0.2	1.9±0.1*	1.2±0.2	1.3±0.2	1.3±0.2
	婴儿双歧杆菌BI45	1.2±0.2	1.9±0.1*	1.2±0.1	1.3±0.1	1.2±0.1
	两歧双歧杆菌BBi32	5.3±0.2	6.9±0.2*	5.8±0.1	5.5±0.2	5.2±0.1
	嗜热链球菌ST81	1.1±0.1	1.3±0.1	1.2±0.2	1.2±0.1	1.2±0.2
球菌	乳酸片球菌PA53	4.6±0.1	4.5±0.1	4.8±0.2	4.6±0.1	4.8±0.2
	戊糖片球菌PP06	3.5±0.2	3.4±0.2	3.6±0.1	3.5±0.2	3.6±0.1
芽孢杆菌	凝结芽孢杆菌BC99	1.1±0.1	1.3±0.1	1.2±0.2	1.2±0.1	1.1±0.1

注: “*”表示与国标方法比较有显著性差异($P<0.05$); “**”表示与国标方法比较有极显著性差异($P<0.01$); 表4、表6同。

进一步对 ISO 稀释液与国标稀释液进行研究, 结果如表 4 所示, 随着国标稀释液逐步被 ISO 稀释液所替换, 其菌粉的计数活菌数越来越高, 全部替换成 ISO 稀释液时, 其活菌数显著性($P<0.05$)提升。这可能是由于乳酸菌在生产过程中, 生产工艺使菌体细胞以活的可培养状态和活的非可培养状态(VBNC)存在^[17], ISO 稀释液中含有的酪蛋白胨, 能够快速将细胞进行复苏, 增加可培养细胞数量^[18], 从而提升最终的活菌数量。

表 4 不同稀释液计数结果 (×10¹¹ CFU/g)

Table 4 Counting results of different dilutions (×10¹¹ CFU/g)

菌株	测试1	测试2	测试3	测试4	测试5
嗜酸乳杆菌LA85	2.3±0.2	2.4±0.2	2.6±0.2	2.8±0.2*	3.2±0.1*
唾液乳杆菌LS97	2.3±0.2	2.5±0.2	2.7±0.3	3.0±0.2*	3.5±0.2*
乳双歧杆菌BLa80	5.3±0.2	5.4±0.2	5.6±0.2	5.8±0.3	6.7±0.1*
长双歧杆菌BL21	3.1±0.2	3.3±0.1	3.4±0.2	3.6±0.2	4.1±0.2*
短双歧杆菌BBr60	5.5±0.1	5.6±0.2	5.8±0.2	6.1±0.1	6.7±0.2*
青春双歧杆菌BAC30	1.2±0.2	1.3±0.1	1.4±0.2	1.5±0.2	1.8±0.1*
婴儿双歧杆菌BI45	1.1±0.2	1.2±0.1	1.3±0.3	1.4±0.2	1.6±0.3*
两歧双歧杆菌BBi32	5.4±0.2	5.5±0.2	5.8±0.2	6.0±0.2*	6.8±0.3*

2.3 不同计数培养基对活菌数计数结果的影响

酸化 MRS Agar 培养基、TOS 琼脂培养基、M17 培养基是 ISO 29981-2010 中分别用来计数乳杆菌、双歧杆菌、球菌的培养基, 其计数方法是国际上使用较普遍的计数方法, 以国标 GB 4789.35-2016 方法为对照, 由表 5、表 6、表 7 结果可知, 不同的培养基对乳杆菌、球菌无明显影响, 而 TOS 琼脂培养基对双歧杆菌的活菌数, 相比于国标有显著的提升作用($P<0.05$), 该培养基是一种通过 β -半乳糖苷酶水解

得到的混合物, 含有双歧杆菌促生长因子, 该混合物能够有效的促进双歧杆菌的生长^[19], 使其在相同培养时间、条件下, 更利于双歧杆菌的增殖。

表 5 不同培养基对乳杆菌计数活菌数的影响 (×10¹¹ CFU/g)

Table 5 Effects of different mediums on *Lactobacillus* counting viable count (×10¹¹ CFU/g)

菌株	MRS琼脂培养基(国标)	酸化MRS Agar培养基
嗜酸乳杆菌LA85	2.3±0.2	2.3±0.1
植物乳杆菌Lp90	5.3±0.1	5.4±0.1
鼠李糖乳杆菌LRa05	4.3±0.2	4.4±0.1
干酪乳杆菌LC89	5.4±0.2	5.5±0.1
副干酪乳杆菌LC86	5.3±0.2	5.4±0.1
唾液乳杆菌LS97	2.3±0.2	2.4±0.1
罗伊氏乳杆菌LR08	2.2±0.1	2.1±0.2
保加利亚乳杆菌LB42	1.1±0.2	1.2±0.1
格氏乳杆菌LG08	3.2±0.2	3.3±0.1

表 6 不同培养基对双歧杆菌计数活菌数的影响 (×10¹¹ CFU/g)

Table 6 Effects of different mediums on *Bifidobacterium* counting viable count (×10¹¹ CFU/g)

菌株	MRS琼脂培养基+锂盐(国标)	TOS琼脂培养基
乳双歧杆菌BLa80	5.2±0.1	5.9±0.1*
长双歧杆菌BL21	3.1±0.2	5.5±0.1*
短双歧杆菌BBr60	5.4±0.1	7.5±0.2*
青春双歧杆菌BAC30	1.4±0.2	2.6±0.1*
婴儿双歧杆菌BI45	1.2±0.1	2.1±0.2*
两歧双歧杆菌BBi32	5.3±0.1	7.5±0.1*

不同计数培养基对凝结芽孢杆菌计数活菌数结果(表 8)可知, NA 营养琼脂培养基和 PCA 培养基对凝结芽孢杆菌计数活菌数无显著影响($P>0.05$), 而

表7 不同培养基对球菌计数活菌数的影响($\times 10^{11}$ CFU/g)
Table 7 Effects of different mediums on the counting of viable cocci ($\times 10^{11}$ CFU/g)

菌株	MC琼脂培养基(国标)	M17培养基
嗜热链球菌ST81	1.2 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2
乳酸片球菌PA53	4.8 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.2
戊糖片球菌PP06	3.6 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1

表8 不同培养基对凝结芽孢杆菌 BC99 计数活菌数的影响
($\times 10^{11}$ CFU/g)

Table 8 Effects of different mediums on counting viable cells of *Bacillus coagulans* BC99 ($\times 10^{11}$ CFU/g)

菌株	NA营养琼脂培养基	PCA培养基	改良芽孢计数培养基
凝结芽孢杆菌BC99	1.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1*

注: “*”表示有显著性差异($P<0.05$)。

改良芽孢计数培养基计数结果显著($P<0.05$)高于NA、PCA培养基。NA和PCA适用于菌落总数的计数,其只有最基本的培养基成分,营养较为贫乏;改良芽孢计数培养基营养成分较为丰富^[20],含有相应微量元素,更有利于芽孢的萌发^[21],最终使计数活菌数明显提升。

3 讨论与结论

本文以乳杆菌(双歧杆菌、乳杆菌、球菌)、芽孢杆菌(凝结芽孢杆菌)不同类型的乳酸菌菌粉为研究对象,在国标GB 4789.35-2016的基础上,进行活菌平板计数检测方法的比较研究。稀释倍数对最终平板计数结果影响不显著,而特定的稀释液、培养基对乳酸菌,特别是双歧杆菌有较大的影响。可能是双歧杆菌本身在生长、营养需求方面要求比较苛刻,专性厌氧,不同的双歧杆菌需要特定的碳氮源、生长因子及培养条件^[22-23],否则很容易出现VBNC的状态^[24],从而降低活的可培养的菌体数,影响最终的活菌计数的结果。乳杆菌可以在兼性厌氧的条件进行生长,能产生更多的酶来将营养大分子分解成小分子^[25],更好的利用碳水化合物及营养成分^[26-27],计数培养基的变化对乳杆菌无明显影响。酪蛋白胨中含有许多的多肽分子,微生物生长因子等,具有抑制生物大分子过氧化、清除氧自由基的功能,同时其对乳酸菌的增殖有明著的促进作用^[28]。

凝结芽孢杆菌为兼性厌氧菌,生长条件、营养需求不高^[29-30],在不同的条件都能生长,通过对目前常用的计数方法进行比较研究,结果显示其不同的培养基成分仍会对检测结果造成差异影响。有报道指出^[31-32]碳源、微量元素能促进芽孢杆菌的萌发及生长,本文结果应证了此报道的观点。

综上所述,稀释液中含有酪蛋白胨能提升双歧杆菌菌粉的活菌计数数量;TOS琼脂培养基更有利于双歧杆菌的增殖培养,从而提升最终的活菌计数结果;改良芽孢计数培养基更有利于凝结芽孢杆菌的芽

孢萌发增殖,提升计数活菌数量。为益生菌厂家产品企业标准的制定、保健食品检验人员和标准制定者提供参考。

参考文献

- [1] 王似锦,江志杰,牛振东,等.保健食品双歧杆菌和乳酸菌计数方法的优化[J].中国微生态学杂志,2015,27(2):227-229. [WANG S J, JIANG Z J, NIU Z D, et al. Optimization of enumeration method on *Bifidobacteria* and lactic bacteria in health food[J]. Chinese Journal of Microecology, 2015, 27(2): 227-229.]
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 4789.2 Microbiological inspection of food Determination of total bacterial count[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.35-2016 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 4789.35-2016 Food microbiological inspection Lactic acid bacteria inspection[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]
- [4] 刘艳容,舒永红,杨佳玮,等.食品中乳酸菌定量检测方法研究进展[J].食品工业科技,2020,41(12):358-365. [LIU Y R, SHU Y H, YANG J W, et al. Research progress on enumeration methods of lactic acid bacteria in food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 358-365.]
- [5] 谢九艳,赵婷,高逸,等.发酵乳中乳酸菌的选择性计数及分离鉴定[J].食品与发酵工业,2022,48(10):35-41. [XIE J Y, ZHAO T, GAO Y, et al. Selective enumeration, isolation and identification of lactic acid bacteria in fermented milk[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(10): 35-41.]
- [6] 徐云凤,张欣,褚泽军,等.一株具有高效抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及生长特性研究[J].食品与机械,2021,37(3):12-14, 21. [XU Y F, ZHANG X, CHU Z J, et al. Isolation, identification and growth characteristics of a strain of lactic acid bacteria with efficient antimicrobial activity[J]. Food & Machinery, 2021, 37(3): 12-14, 21.]
- [7] HERZOG T, CHROMIK A M, UHL W. Treatment of complicated intra-abdominal infections in the era of multi-drug resistant bacteria[J]. Europ J Med Res, 2010, 15(12): 525-532.
- [8] 邱聪聪,胡平,胡章立,等.细菌活的非可培养(VBNC)状态及其机理研究进展[J].应用与环境生物学报,2014,20(6):1124-1131. [DI C C, HU P, HU Z L, et al. Research progress of viable but non-culturable state of aquatic bacteria[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2014, 20(6): 1124-1131.]
- [9] PASZYŃSKA-WESOOWSKA I, BARTOSZCZ M. Bacteria in the state of VBNC-A threat to human health[J]. Medycyna Weterynaryjna, 2009, 65(4): 228-231.
- [10] 郭慧玲,邵玉宇,高姝冉,等.细菌活的非可培养状态研究[J].中国乳品工业,2014,42(1):31-36. [GUO H L, SHAO Y Y, GAO S R, et al. Research on the viable but non-culturable (VBNC) state of bacteria[J]. China Dairy Industry, 2014, 42(1): 31-36.]
- [11] SKORLUPKINA N, BLINKOVA L, PAKHOMOV Y, et al. Formation and reversion of VBNC cells of salmonella typhimurium preincubated in different substrates[J]. International Journal of Cur-

rent Research and Review, 2017, 9(9): 20–25.

[12] 李晓丹, 屈建航, 张璐洁, 等. 环境微生物可培养性影响因素及培养方法研究进展[J]. 生命科学研究, 2017, 21(2): 154–158.

[LI X D, QU J H, ZHANG L J, et al. Progresses on the influence factors of culturability and cultivation strategies of environmental microorganisms[J]. Life Science Research, 2017, 21(2): 154–158.]

[13] 沈菊, 胡章立, 黎双飞. 肺炎克雷伯氏菌 VBNC 状态转化突变株的筛选与特性研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 28–33.

[SHEN J, HU Z L, LI S F. Studies on the screening for *Klebsiella pneumoniae* VBNC mutants and its transformation characteristics[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(1): 28–33.]

[14] GUO Q F, CHEN L, JING W M A. Research advances in the probiotics mechanism and application of *Bacillus coagulans*[J]. Food Research and Development, 2018, 39(18): 208–213.

[15] 单春乔, 刘秋晨, 李娟, 等. 凝结芽孢杆菌检测方法的建立[J]. 饲料研究, 2020, 43(12): 84–87. [SHAN C Q, LIU Q C, LI J, et al. Establishment of method about detecting *Bacillus coagulans*[J]. Feed Research, 2020, 43(12): 84–87.]

[16] 韦嘉璐, 艾思洁, 张芯, 等. 葡萄糖和 L-丙氨酸对藻菌共生系统处理养殖废水的影响研究[J]. 环境污染与防治, 2022, 44(2): 1–7. [WEI J L, AI S J, ZHANG X, et al. The effect of glucose and L-alanine in the microalgal-bacterial consortia on culture wastewater treatment[J]. Environmental Pollution and Prevention, 2022, 44(2): 1–7.]

[17] HAMABATA T, SENO H, IWAKI M, et al. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Corynebacterium diphtheriae*[J]. Microorganisms, 2021, 9(5): 1–5.

[18] BODOR A, BOUNEDJOUM N, VINCZE G E, et al. Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives[J]. Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 2020, 19(1): 1–22.

[19] 姜陈波, 杭锋. 双歧杆菌和乳酸菌 β -半乳糖苷酶转糖基作用的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 335–341. [JIANG C B, HANG F. Advances in our understanding of the transgalactosylation activity of β -galactosidase from *Bifidobacteria* and lactic acid bacteria[J]. Food Science, 2019, 40(7): 335–341.]

[20] 李素, 曲超, 张顺亮, 等. 中温乳杆菌中凝结芽孢杆菌芽孢萌发及热致死规律[J]. 肉类研究, 2017, 31(4): 10–16. [LI S, QU C, ZHANG S L, et al. Spore germination and thermal inactivation of a *Bacillus coagulans* strain isolated from medium-temperature sterilized emulsified sausage[J]. Meat Research, 2017, 31(4): 10–16.]

[21] HUANG Z, GUO N, PAN Z, et al. Optimization of spore germination conditions of *Clostridium sporogenes*[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(2): 49–55.

[22] NIKOLAEVA L I. Properties of *Bifidobacteria* and their use for scientific and practical purposes[J]. Biotekhnologiya, 2021, 37(3): 3–10.

[23] LI W, LI H, ZHANG Y, et al. Different effects of soybean protein and its derived peptides on the growth and metabolism of *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* JCM 1190[J]. Food & Function, 2021, 12(13): 5731–5744.

[24] LIU J, LIN L, BING L, et al. Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 110: 257–261.

[25] AKINKUGBE A O, ONILUDE A A. Selective comparability and physiological studies of lactic acid bacteria protease and *Calotropis procera* (linn) extracts[J]. Peerj, 2015.

[26] 田露露, 华旭, 韩迪. 乳杆菌和双歧杆菌对碳水化合物体外利用的比较研究[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45(1): 7–14. [TIAN L L, HUA X, HAN D. Comparison of *in vitro* carbohydrate utilization by Lactobacilli and Bifidobacteria[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(1): 7–14.]

[27] TA C L, BANG Y C, CHUN Y C, et al. Comparative analysis of spray-drying microencapsulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Lactobacillus acidophilus* cultivated in different growth media[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(7): 13258.

[28] 李珂, 杨秀华, 扈麟, 等. 猪骨蛋白酶解物对乳酸菌增殖作用研究[J]. 中国酿造, 2009(10): 12–14. [LI K, YANG X H, HU L, et al. Proliferative effect of swine bone protein hydrolysate on *Lactobacillus*[J]. China Brewing, 2009(10): 12–14.]

[29] 董惠钧, 姜俊云, 郑立军, 等. 新型微生态益生菌凝结芽孢杆菌研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 292–294. [DONG H J, ZHANG J Y, ZHENG L J, et al. Research advances of novel microecologic probiotics *Bacillus coagulans*[J]. Food Science, 2010, 31(1): 292–294.]

[30] CAO J, YU Z, LIU W, et al. Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 64: 103643.

[31] 严涛, 朱建国, 姜甜, 等. 一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及产孢条件优化[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 238–249. [YAN T, ZHU J G, JIANG T, et al. Isolation and optimization on spore-forming conditions of *Bacillus coagulans*[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 238–249.]

[32] BOIX E, COUVERT O, ANDRE S, et al. The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) provides new possibilities for optimizing processes to manage risk of *C. sporogenes* spoilage[J]. Food Microbiology, 2021, 100: 103832.