

一种特异性的乳酸菌培养基及其培养方法和应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种特异性的乳酸菌培养基及其培养方法和应用。

背景技术

研究发现自然界中尚存在 90%以上未有合适培养方法的微生物，使用传统的细菌培养方法仅能培养其中的一小部分细菌。应用传统方法培养出的微生物都是已知微生物，对新的微生物物种的培养基成分、分离、培养方法的研究和报道较少。微生物培养困难是与抵制培养的特殊原因，包括温度、pH、氧气、营养等众多因素有关，微生物新种的培养具有众多的技术挑战。

乳酸菌泛指一大类能够发酵糖类产生大量乳酸的细菌，在自然界分布极为广泛，具有丰富的物种多样性，目前约有 200 余种。乳酸菌具有调节胃肠道菌群、改善胃肠道功能、提高食物消化率和生物效价、降低血清胆固醇、控制内毒素、抑制肠道内腐败菌生长、提高机体免疫力等多种生理功能。

传统酿造食醋采用开放式发酵、原辅料不经过灭菌处理，酿造过程中微生物种类及其丰富，许正宏等学者对镇江香醋醋醅中微生物群落结构进行解析发现该过程中有上百种微生物参与发酵。乳酸菌普遍存在于食醋发酵过程中，尤其是传统固态酿造食醋，乳酸菌占比可达到 60%以上，对产品品质具有重要影响。深入研究不同类型乳酸菌培养基、分离和培养方法及其应用对食醋酿造行业具有重要意义。因此，创新培养基配方和培养方法，更好的培养乳酸菌具有重要意义。

目前，许多不同的乳酸菌对培养基和培养方法具有独特的需求，即使同一种乳酸菌的不同菌株之间，在培养基和培养方法上也具有较大的差异。如专利 CN 202010877453.8 公开了一种乳酸菌分离培养基配方及培养方法，虽然其所培养目的乳酸菌与新种乳酸菌 HSLZ-75^T 的 16S rRNA 序列具有 100%的一致性，但其目的乳酸菌在论文 (*Lactobacillus jinshani* sp. nov., isolated from solid-state vinegar culture of Zhenjiang aromatic vinegar. Antonie van Leeuwenhoek) 公开的乳酸菌 HSLZ-75^T 的培养基配方上无法生长。且专利 CN 202010877453.8 中目的乳酸菌在其固体平板上需培养 7-14 天，培养时间较长；培养基配方极其复杂、操作不便、成本高，液体培养中需要添加 30 余种物质，其中仅维生素就有 9 种；含有酒醅浸出液且用量大，易导致培养基的稳定性差，酒醅浸出液一般人员难以获得，整体应用性不强。专利 CN 202011227512.3 公开了一种乳酸菌 Z-1 的培养基配方和分离方法，但其培养时间较长，固体平板上需要 7 天后形成肉眼可见菌落；

培养基成分复杂，液体培养中需要添加近 20 种物质；操作复杂，需要单独配制含有大量复合维生素 B 的溶液，使用前需过膜除菌，且需要乳酸和乙酸 2 种酸调节 pH 值；需要自制麸皮浸出液，培养基稳定性差。

发明内容

发明目的：针对现有技术存在的问题，本发明提供一种新型特异性的乳酸菌培养基，本发明的培养基主要针对新型乳酸菌，是一种专一、高效、稳定、方便的新型乳酸菌培养基配方，可以快速高效培养乳酸菌。

本发明还提供了一种新型乳酸菌的培养基的培养方法 and 应用。

技术方案：为了实现上述目的，本发明所述的特异性的乳酸菌液体培养基，所述培养基中包括以下原料：每 1L 自来水中加入胰蛋白胨 8~12 g、牛肉膏 10~15 g、酵母提取物 8~12 g、麦芽提取物 30~60 g、葡萄糖 10~15 g、柠檬酸氢二铵 1.5~2.5 g、磷酸氢二钾 1.5~2.5 g、一水硫酸锰 0.1~0.2 g、七水硫酸镁 0.5~0.7 g、吐温 80 1~2 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1~2 g、维生素 B₂ 1~3 mg，最后加入乙酸调节至总酸 4~6 g/100mL。

其中，所述乳酸菌为乳酸菌 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073。

本发明所述特异性的乳酸菌固体培养基，所述培养基中包括以下原料：每 1L 自来水中加入胰蛋白胨 8~12 g、牛肉膏 10~15 g、酵母提取物 8~12 g、麦芽提取物 30~60 g、葡萄糖 10~15 g、柠檬酸氢二铵 1.5~2.5 g、磷酸氢二钾 1.5~2.5 g、一水硫酸锰 0.1~0.2 g、七水硫酸镁 0.5~0.7 g、吐温 80 1~2 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1~2 g、维生素 B₂ 1~3 mg，加入琼脂粉 20~25 g，最后加入乙酸调节至总酸 4~6 g/100mL。

其中，所述乳酸菌为乳酸菌 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073。

本发明所述的特异性的乳酸菌液体培养基的培养方法，包括如下步骤：

在培养基中接种菌株后，在培养基的液面上方残留空气的高度 < 0.5 cm，且培养基的装液量 > 90%，密封不漏气，培养温度 30~35℃。

本发明所述的特异性的乳酸菌固体培养基的培养方法，包括如下步骤：

在培养基中接种菌株后，置于厌氧培养箱中培养，厌氧培养箱中氧气含量 < 10 ppm，培养湿度 75~85%，培养温度 30~35℃。

本发明所述的特异性的乳酸菌液体培养基或者所述的乳酸菌的固体培养基在快速大量培养乳酸菌中的应用。

本发明中乳酸菌 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 为商业菌株（CICC

6269), 是一株乳酸菌新种 (*Lactobacillus jinshani* sp. nov., isolated from solid-state vinegar culture of Zhenjiang aromatic vinegar. Antonie van Leeuwenhoek)。

乳酸菌 *Lactobacillus* sp. HSCY 2073 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏地点为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所, 保藏登记入册的编号为 CGMCC NO. 18982, 保藏日期为 2019 年 11 月 21 日。其是一株乙酸和乙醇耐受性强、产不挥发酸效果优、产乙醛、乙酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸异戊酯、3-甲基戊酸乙酯等 5 种果香类香气物质含量高的乳酸菌, 可以适应食醋酿造的高酸、高醇、寡营养等恶劣环境, 耐高酸的能力强, 即能产不挥发酸以提高食醋滋味的柔和性, 同时又能提高具有良好香气的醛类、酯类等香气物质, 并且最终使食醋产品的整体风味品质大幅度。最高可耐受的总酸为 8.0 g/100mL; 可耐受 13%乙醇, 能够在 15℃的低温条件下代谢, 最适生长温度为 30。菌株 HSCY 2073 在食醋酿造的产业化应用效果显著, 操作方便, 成本低廉, 能够显著提高食醋中不挥发酸和香气物质的含量。通过该菌株在镇江香醋酿造中的使用, 可使醋卤中总酸含量提高 4.71%, 不挥发酸含量提高 24.86%, 产品出率提 5.14%, 具有果香味的 5 种风味物质乙醛含量提高 9.05%、乙酸乙酯含量提高 25.83%、乙酸异丁酯含量提高 1.51%、乙酸异戊酯含量提高 7.39%、3-甲基戊酸乙酯含量提高 34.27%, 显著提高了产品的滋味和香气, 整体风味品质较高。同时在山西老陈醋造中的使用也可以有效强化山西老陈醋的风味品质。其 16S rRNA 基因序列, 如 SEQ ID NO.1 所示。

目前, *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus* sp. HSCY 2073 暂没有专一性强、培养效率高、培养效果稳定、成分简单、使用方便、成本低廉的培养基配方和培养方法。*Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 作为一个特殊的、新发现的乳酸菌新种, 开发可商业化应用, 专一、高效、稳定、方便的培养基配方和培养方法, 是本领域亟待解决的技术难题。目前常见的乳酸菌分离和培养基多采用 MRS 或常规改良的 MRS 为主, 但一般均不能对 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus* sp. HSCY 2073 进行分离或培养, 这也是该乳酸菌作为新种迟迟未被发现的原因。同时现行的 MRS 或改良的 MRS 培养基可对常规的乳酸菌进行分离, 但培养效果和选择性较差, 分离效果易受其他乳酸菌、芽孢杆菌、酵母菌等微生物的干扰。

而本发明特定的培养基对于特定的菌株 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus* sp. HSCY 2073, 可以快速高效培养, 具有专一、高效、稳定、方便的有益效果。

本发明中由于特定的菌株 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和

Lactobacillus sp. HSCY 2073 需要特定的培养基, 本发明设定的特定的培养基, 发现常规的乳酸菌在上面是不生长的, 其中维生素 B₂ 的添加及其添加量十分重要。此外, 与改良 MRS 培养基相比, 本发明特定增加了微量的维生素, 有效减少麦芽提取物的使用量, 并调整酸度, 培养效果明显更好。本发明的培养基针对新型乳酸菌, 是一种专一、高效、稳定、方便的新型乳酸菌培养基配方, 可以快速高效培养乳酸菌。

有益效果: 由现有技术相比较, 本发明具有以下优点:

(1) 本发明的培养基配方和培养方法可较好的满足 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073 的分离和培养需求;

(2) 本发明的培养基配方和培养方法在 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073 培养上具有专一性强、培养效率高、培养效果稳定、成分简单、使用方便、成本低廉、易于商业化的有益效果。

(3) 本发明从多维度的综合比较实验证明, 本发明的培养基配方和培养方法, 具有良好的专一性、高效性和稳定性。

附图说明

图 1 为本发明的 HSCY 2073 的菌体形态照片。

图 2 为 HSLZ-75^T 在本发明培养基的固体平板上的菌落形态。

具体实施方式

以下结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

本发明中的原料和试剂如无特殊说明, 均为商业化市售。

本发明中的模式菌以及常规乳酸菌均由相应菌种库购买或者市售可得。

改良 MRS 培养基: 胰蛋白胨 10g、牛肉膏 10g、酵母提取物 5g、麦芽提取物 150g、葡萄糖 20g、柠檬酸氢二铵 2g、乙酸钠 5g、磷酸氢二钾 2g、一水硫酸锰 0.19g、七水硫酸镁 0.58g、吐温 80 1.0mL、L-半胱氨酸 1g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1L, 115℃, 25min 灭菌, 然后加入终浓度 2% (v/v) 乙酸。

MRS 培养基配方 1: 酪蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母提取物 5 g, 葡萄糖 5 g, 乙酸钠 5 g, 柠檬酸二铵 2 g, 磷酸氢二钾 2 g, 七水硫酸镁 0.2g, 一水硫酸锰 0.05g, 吐温 80 1 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 L, pH6.8, 115℃, 25min 灭菌。

MRS 培养基配方 2: 酪蛋白胨 10 g, 牛肉粉 8 g, 酵母提取物 4 g, 葡萄糖 20 g, 硫酸镁 0.2 g, 乙酸钠 5 g, 柠檬酸三铵 2 g, 磷酸氢二钾 2 g, 硫酸锰 0.05 g, 吐温 80 1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 5.0, 115℃, 25min 灭菌。

MRS 培养基配方 3: 西红柿汁 400mL, 葡萄糖 10g, 盐溶液 A 5ml, 盐溶液

B 5ml, 酵母膏 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 600 mL, pH 6.9, 115°C, 25min 灭菌。
盐溶液 A 配方: 磷酸氢二钾 2.5g, 磷酸二氢钾 2.5g, 蒸馏水 250 mL; 盐溶液 B
溶液配方: 七水硫酸镁 10 g, 硫酸铁 5 g, 氯化钠 5 g, 四水硫酸锰 5 g, 蒸馏水
250 mL。

LB 培养基配方: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 15g,
水 1 L, 115°C 灭菌 25min。

牛肉膏琼脂培养基配方: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15g,
水 1 L, 115°C 灭菌 25min。

培养基配方 100239: 胰蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母提取物 5g, 葡萄糖
20g, 吐温 80 1g, 磷酸氢二钾 2g, 乙酸钠 5g, 柠檬酸三铵 2g, 七水硫酸镁 0.2g,
一水硫酸锰 0.05g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1L, pH6.2-6.5, 115°C, 20min 灭菌。

培养基配方 20203: 胰蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母提取物 5g, 葡萄糖 20g,
吐温 80 1g, 磷酸氢二钾 2g, 乙酸钠 5g, 柠檬酸三铵 2g, 七水硫酸镁 0.2g, 一
水硫酸锰 0.05g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1L, pH6.2-6.5, 115°C, 20min 灭菌。

培养基配方 15814: 胰蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母提取物 15g, 葡萄糖
20g, 麦芽糖 10g, 吐温 80 1g, 磷酸氢二钾 2g, 乙酸钠 5g, 柠檬酸三铵 2g, 七
水硫酸镁 0.2g, 一水硫酸锰 0.05g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1L, pH5.6, 115°C, 20min
灭菌。

培养基配方 20331: 胰蛋白胨 10g, 牛肉膏 10g, 酵母提取物 5g, 葡萄糖 20g,
吐温 80 1g, 磷酸氢二钾 2g, 乙酸钠 5g, 柠檬酸三铵 2g, 七水硫酸镁 0.2g, 一
水硫酸锰 0.05g, 半胱氨酸盐酸盐 0.5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1L, pH5.2, 115°C,
20min 灭菌。

上述所有培养基中不加入琼脂为对应的液体培养基。

1、菌株的活化培养

(1) 菌株 *Acetivibrio jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus* sp. HSCY
2073 的活化培养。

将通过下述液体培养基将生长至对数期的 HSLZ-75^T 和 HSCY 2073 按照 10%
(v/v) 的接种量, 分别接入含有本发明液体培养基的可密封容器中, 液体培养
基配方如下: 胰蛋白胨 10 g、牛肉膏 12 g、酵母提取物 10 g、麦芽提取物 50 g、
葡萄糖 13 g、柠檬酸氢二铵 2 g、磷酸氢二钾 2 g、一水硫酸锰 0.15 g、七水硫酸
镁 0.5 g、吐温 80 1.5 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1.5 g、维生素 B₂ 2 mg, 自来水 1L,
115°C, 25min 灭菌, 然后加入乙酸调节至总酸 5 g/100mL。

可密封容器中培养基的液面上方残留空气的高度约 0.3cm, 培养基的装液量

约 95%，密封不漏气，置于 30℃ 条件下培养 5 d。

重复上述方式，将菌株活化 3 次，其中最后一次培养时间为 5 d，备用。HSCY 2073 菌体形态如图 1。

(2) 4 株 16S rRNA 与 HSLZ-75^T 相近的模式菌种的活化培养

选择相应的不添加琼脂的液体培养基进行活化 3 次，备用。

Lactobacillus caviae DSM 100239^T，采用培养基 100239 培养基配方，37℃，普通培养箱培养 2 天。

Lactobacillus fructivorans DSM 20203^T，采用培养基 20203 培养基配方，30℃，普通培养箱培养 2 天。

Lactobacillus rossiae DSM 15814^T，采用培养基 15814 培养基配方，30℃，普通培养箱培养 2 天。

Pediococcus damnosus DSM 20331^T，采用培养基 20331 培养基配方，26℃，普通培养箱培养 2 天。

(3) 4 株常规乳酸菌的活化培养

选择相应的不添加琼脂的液体培养基进行活化 3 次，备用。

Lactobacillus helveticus CICC 20243 和 *Lactobacillus acidipiscis* CICC 10822，用 MRS 培养基配方 1，37℃，普通培养箱培养 1 天。

Lactobacillus acetotolerans CICC10774，用 MRS 培养基配方 2，37℃，普通培养箱培养 1 天。

Lactobacillus fermentum CICC 20176，用 MRS 培养基配方 3，37℃，普通培养箱培养 1 天。

2、菌株的涂布

取上述步骤中活化 3 次的各个菌株的培养液，采用无菌生理盐水进行梯度稀释，选取活菌数在 1000~2000 CFU/mL 的稀释液 0.1mL 涂布于下述实施例 1 中相应的固体平板上。

实施例 1

固体培养基配方：胰蛋白胨 10 g、牛肉膏 12 g、酵母提取物 10 g、麦芽提取物 50 g、葡萄糖 13 g、柠檬酸氢二铵 2 g、磷酸氢二钾 2 g、一水硫酸锰 0.15 g、七水硫酸镁 0.5 g、吐温 80 1.5 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1.5 g、维生素 B₂ 2 mg，琼脂粉 22 g，自来水 1L，115℃，25min 灭菌，冷却至 50~55℃，然后加入乙酸调节至总酸 5 g/100mL。

将上述培养基 15mL 倾注于直径 9cm 的培养皿中，待冷却后涂布上述相应稀释后的菌株菌液（1000~2000 CFU/mL）0.1 mL，置于厌氧培养箱中培养，厌

氧培养箱中氧气含量约 8ppm，培养湿度 75%，培养温度 33℃，培养时间 15 天，每天观察平板上菌落的生长情况。

其中，涂布 HSLZ-75^T 组为实施例 1-1，菌落形态如图 2，涂布 HSCY 2073 为实施例 1-2，涂布 DSM 100239^T 组为实施例 1-3，涂布 DSM 20203^T 组为实施例 1-4，涂布 DSM 15814^T 组为实施例 1-5，涂布 DSM 20331^T 组为实施例 1-6，涂布 CICC 20243 组为实施例 1-7，涂布 CICC 10822 组为实施例 1-8，涂布 CICC10774 组为实施例 1-9，涂布 CICC 20176 组为实施例 1-10。

实施例 2

培养基配方：胰蛋白胨 8 g、牛肉膏 10 g、酵母提取物 8 g、麦芽提取物 60 g、葡萄糖 10 g、柠檬酸氢二铵 1.5 g、磷酸氢二钾 2.5 g、一水硫酸锰 0.1g、七水硫酸镁 0.5 g、吐温 80 1mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1 g、维生素 B₂ 1 mg，琼脂粉 20 g，自来水 1L，115℃，25min 灭菌，冷却至 50~55℃，然后加入乙酸调节至总酸 4 g/100mL。

将上述培养基 15mL 倾注于直径 9cm 的培养皿中，待冷却后涂布上述相应稀释后的菌株菌液 0.1 mL，置于厌氧培养箱中培养，厌氧培养箱中氧气含量约 8ppm，培养湿度 85%，培养温度 30℃，培养时间 15 天，每天观察平板上菌落的生长情况。

其中，涂布 HSLZ-75^T 组为实施例 2-1，涂布 HSCY 2073 为实施例 2-2，涂布 DSM 100239^T 组为实施例 2-3，涂布 DSM 20203^T 组为实施例 2-4，涂布 DSM 15814^T 组为实施例 2-5，涂布 DSM 20331^T 组为实施例 2-6，涂布 CICC 20243 组为实施例 2-7，涂布 CICC 10822 组为实施例 2-8，涂布 CICC10774 组为实施例 2-9，涂布 CICC 20176 组为实施例 2-10。

实施例 3

培养基配方：胰蛋白胨 12 g、牛肉膏 15 g、酵母提取物 12 g、麦芽提取物 30 g、葡萄糖 15 g、柠檬酸氢二铵 2.5 g、磷酸氢二钾 1.5 g、一水硫酸锰 0.2 g、七水硫酸镁 0.7 g、吐温 80 2 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 2 g，维生素 B₂ 3 mg，琼脂粉 25 g，自来水 1L，115℃，25min 灭菌，冷却至 50~55℃，然后加入乙酸调节至总酸 6 g/100mL。

将上述培养基 15mL 倾注于直径 9cm 的培养皿中，待冷却后涂布上述相应稀释后的菌株菌液 0.1 mL，置于厌氧培养箱中培养，厌氧培养箱中氧气含量约 8 ppm，培养湿度 80%，培养温度 35℃，培养时间 15 天，每天观察平板上菌落的生长情况。

其中，涂布 HSLZ-75^T 组为实施例 3-1，涂布 HSCY 2073 为实施例 3-2，涂

布 DSM 100239^T 组为实施例 3-3, 涂布 DSM 20203^T 组为实施例 3-4, 涂布 DSM 15814^T 组为实施例 3-5, 涂布 DSM 20331^T 组为实施例 3-6, 涂布 CICC 20243 组为实施例 3-7, 涂布 CICC 10822 组为实施例 3-8, 涂布 CICC10774 组为实施例 3-9, 涂布 CICC 20176 组为实施例 3-10。

对比例 1

在下列培养基固体平板上, 涂布 HSLZ-75^T, 其中改良 MRS 培养基为对比例 4-1、MRS 培养基配方 1 为对比例 4-2、MRS 培养基配方 2 为对比例 4-3、MRS 培养基配方 3 为对比例 4-4、LB 培养基配方为对比例 4-5、牛肉膏琼脂培养基配方为对比例 4-6、培养基 100239 为对比例 4-7、培养基 20203 为对比例 4-8、培养基 15814 为对比例 4-9、培养基 20331 为对比例 4-10。

在下列培养基固体平板上, 涂布 HSCY 2073, 其中改良 MRS 培养基为对比例 5-1、MRS 培养基配方 1 为对比例 5-2、MRS 培养基配方 2 为对比例 5-3、MRS 培养基配方 3 为对比例 5-4、LB 培养基配方为对比例 5-5、牛肉膏琼脂培养基配方为对比例 5-6、培养基 100239 为对比例 5-7、培养基 20203 为对比例 5-8、培养基 15814 为对比例 5-9、培养基 20331 为对比例 5-10。

将上述培养基 15mL 倾注于直径 9cm 的培养皿中, 待冷却后涂布上述相应稀释后的菌株菌液 0.1 mL, 置于厌氧培养箱中培养, 厌氧培养箱中氧气含量约 8ppm, 培养湿度 75%, 培养温度 33℃, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。

对比例 2

选择实施例 1 中的本发明培养基配方, 但培养时放置于普通培养箱 (非厌氧), 33℃ 培养, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。其中涂布 HSLZ-75^T 组为对比例 6-1, 涂布 HSCY 2073 为对比例 6-2。

选择实施例 2 中的本发明培养基配方, 但培养时放置于普通培养箱, 33℃ 培养, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。其中涂布 HSLZ-75^T 组为对比例 6-3, 涂布 HSCY 2073 为对比例 6-4。

选择实施例 3 中的本发明培养基配方, 但培养时放置于普通培养箱, 33℃ 培养, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。其中涂布 HSLZ-75^T 组为对比例 6-5, 涂布 HSCY 2073 为对比例 6-6。

其中涂布方式同对比例 1。

对比例 3

选择实施例 1 中的本发明培养基配方, 但培养时培养箱中氧气含量约 20ppm, 33℃ 培养, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。其中涂

布 HSLZ-75^T 组为对比例 7-1, 涂布 HSCY 2073 为对比例 7-2。

选择实施例 2 中的本发明培养基配方, 但培养时培养箱中氧气含量约 20ppm, 30℃ 培养, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。其中涂布 HSLZ-75^T 组为对比例 7-3, 涂布 HSCY 2073 为对比例 7-4。

选择实施例 3 中的本发明培养基配方, 但培养时培养箱中氧气含量约 20ppm, 35℃ 培养, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况。其中涂布 HSLZ-75^T 组为对比例 7-5, 涂布 HSCY 2073 为对比例 7-6。

其中涂布方式同对比例 1。

对比例 4

选择上述改良 MRS 培养基, 即源于参考文献中乳酸菌菌株所用培养基和培养方法, 参考文献如下: YuYJ ,LiX ,Zhang JH ,Chai LJ ,Lu ZM ,Xu ZH(2019)*Lactobacillus jinshami sp .nov .*, isolated from solid-state vinegar culture of Zhenjiang aromatic vinegar .113(1):43-54。参照上述文献条件, 培养时间 15 天, 每天观察平板上菌落的生长情况, 其中涂布 HSLZ-75^T 组为对比例 8-1, 涂布 HSCY 2073 为对比例 8-2。

其中涂布方式同对比例 1。

对比例 5

固体培养基配方: 胰蛋白胨 10 g、牛肉膏 12 g、酵母提取物 10 g、麦芽提取物 50 g、葡萄糖 13 g、柠檬酸氢二铵 2 g、磷酸氢二钾 2 g、一水硫酸锰 0.15 g、七水硫酸镁 0.5 g、吐温 80 1.5 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1.5 g、琼脂粉 22 g, 自来水 1L, 115℃, 25min 灭菌, 冷却至 50~55℃, 然后加入乙酸调节至总酸 5 g/100mL。

其中, 涂布 HSLZ-75^T 组为实施例 9-1, 涂布 HSCY 2073 为实施例 9-2。

其中涂布方式同对比例 1。

实施例 4

选择实施例 1 中培养基配方, 制备成不添加琼脂的液体培养, 将培养至对数期的菌株 HSLZ-75^T 按照 10% (v/v) 的接种量, 接入含有液体培养基的可密封容器中。其中, 可密封容器中培养基的液面上方残留空气的高度 0.3 cm, 培养基的装液量 95%, 密封不漏气, 置于 33℃ 条件下培养, 培养 3 天, 为实施例 10-1。培养基的液面上方残留空气的高度 1.0 cm, 且培养基的装液量 80%, 密封不漏气, 培养温度 33℃, 培养 3 天, 为对比例 10-2。

选择实施例 1 中培养基配方, 制备成不添加琼脂的液体培养, 将培养至对数期的菌株 HSCY 2073 按照 10% (v/v) 的接种量, 接入含有液体培养基的可密封容器中。其中, 可密封容器中培养基的液面上方残留空气的高度 0.3 cm, 培养基

的装液量 95%，密封不漏气，置于 33℃条件下培养，培养 3 天，为实施例 10-3。培养基的液面上方残留空气的高度 1.0 cm，且培养基的装液量 80%，密封不漏气，培养温度 33℃，培养 3 天，为对比例 10-4。

待培养结束后，摇匀，并采用梯度稀释法，梯度稀释后采用实施例 1-1 的培养基和培养方法培养后进行梯度稀释后计数。

实施例 5

实施例 5 选择实施例 2 中培养基配方，制备成不添加琼脂的液体培养，将培养至对数期的菌株 HSLZ-75^T或者菌株 HSCY 2073 按照 10%（v/v）的接种量，接入含有液体培养基的可密封容器中。其中，可密封容器中培养基的液面上方残留空气的高度 0.3 cm，培养基的装液量 95%，密封不漏气，置于 30℃条件下培养，培养 3 天。

实施例 6

实施例 6 选择实施例 3 中培养基配方，制备成不添加琼脂的液体培养，将培养至对数期的菌株 HSLZ-75^T或者菌株 HSCY 2073 按照 10%（v/v）的接种量，接入含有液体培养基的可密封容器中。其中，可密封容器中培养基的液面上方残留空气的高度 0.3cm，培养基的装液量 95%，密封不漏气，置于 35℃条件下培养，培养 3 天。

将上述本发明中培养基配方和培养方法的效果比较，结果如表 1 和 2 所示。

表 1 固体平板培养效果对比表

序号	菌落生长至 肉眼可见时间	15 天时 是否有菌落生长	平板上的 菌落总数
实施例 1-1	第 3 天	是	138 个
实施例 1-2	第 3 天	是	107 个
实施例 1-3 ~ 实施例 1-10	/	否	0 个
实施例 2-1	第 4 天	是	134 个
实施例 2-2	第 4 天	是	104 个
实施例 2-3 ~ 实施例 2-10	/	否	0 个
实施例 3-1	第 4 天	是	129 个
实施例 3-2	第 4 天	是	104 个
实施例 3-3 ~ 实施例 3-10	/	否	0 个
对比例 4-1	第 7 天	是	93 个

对比例 4-2 ~ 对比例 4-10	/	否	0 个
对比例 5-1	第 7 天	是	79 个
对比例 5-2 ~ 对比例 5-10	/	否	0 个
对比例 6-1 ~ 对比例 6-6	/	否	0 个
对比例 7-1	第 7 天	是	121 个
对比例 7-2	第 7 天	是	91 个
对比例 7-3	第 8 天	是	120 个
对比例 7-4	第 8 天	是	92 个
对比例 7-5	第 8 天	是	119 个
对比例 7-6	第 8 天	是	87 个
对比例 8-1	第 7 天	是	75 个
对比例 8-2	第 7 天	是	56 个
对比例 9-1	第 9 天	是	73 个
对比例 9-2	第 9 天	是	55 个

通过实施例 1-1~1-10、实施例 2-1~2-10、实施例 3-1~3-10 可以看出，其他常规乳酸菌无法在本发明的培养基上生长，说明本发明培养基配方具有良好的专一性和稳定性。

通过对比例 4-1~4-10、对比例 5-1~5-10 可以看出，本发明的目标乳酸菌 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073 无法在上述常规培养基上生长，说明目标乳酸菌具有较强的特殊性。虽然目标乳酸菌可在改良 MRS 培养基上生长，但生长速度慢，第 7 天才能肉眼可见，生长菌落数偏少，说明本发明的培养基配方具有良好的高效性。

通过对比例 6-1~6-6 可以看出，本发明的目标乳酸菌无法在上述常规培养方法下生长；通过对比例 7-1~7-6 可以看出，本发明目标乳酸菌虽然可以在上述氧含量 20ppm 培养方法下生长，但其生长速度慢，第 7-8 天才能肉眼可见，同时生长菌落数偏少；结合对比例 8-1~8-2、对比例 9-1~9-2 可以看出，本发明的培养基和培养方法，具有良好的高效性，此外对比例 9-1~9-2 可以看出，维生素 B₂ 在本发明培养基中对于菌株的生长速度和菌落数也有较大的影响，而维生素 B₂ 在一般的乳酸菌培养基中不额外添加，其他物质带入的含量低，额外添加与

否不会影响常规菌株生长，同时本发明中微量维生素的添加，还可以大量减少麦芽提取物的使用量，并且培养效果明显更好。

因此，由上述表 1 多维度的综合比较可以看出，本发明的特异性的乳酸菌的培养基配方和培养方法，具有良好的专一性、高效性和稳定性。

表 2 液体培养效果对比表

序号	活菌数 CFU/mL
实施例 10-1	6.3×10^8
对比例 10-2	1.5×10^7
实施例 10-3	7.8×10^8
对比例 10-4	2.4×10^7

由上述表 2 可以看出，本发明的特异性的乳酸菌培养基的培养方法，具有更好的生长适宜性。

实施例 7

本发明培养基成分稳定，可将培养基中的物质混合，待使用时再加水制备成液体或固体培养基，应用更方便。

将胰蛋白胨 100 g、牛肉膏 120 g、酵母提取物 100 g、麦芽提取物 500 g、葡萄糖 130 g、柠檬酸氢二铵 20 g、磷酸氢二钾 20 g、一水硫酸锰 1.5 g、七水硫酸镁 5 g、吐温 80 15 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 15 g、维生素 B₂ 20 mg 混合均匀，至于-20℃冰箱中。当需要使用时，取 125g 上述混合物，加入 1L 自来水中，溶解后，115℃，25min 灭菌，待冷却至 50~55℃，然后加入乙酸调节至总酸 5g/100mL，即快速的得到液体培养基。

将胰蛋白胨 100 g、牛肉膏 120 g、酵母提取物 100 g、麦芽提取物 500 g、葡萄糖 130 g、柠檬酸氢二铵 20 g、磷酸氢二钾 20 g、一水硫酸锰 1.5 g、七水硫酸镁 5 g、吐温 80 15 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 15 g、维生素 B₂ 20 mg，琼脂粉 220 g，混合均匀，至于-20℃冰箱中。当需要使用时，取 125g 上述混合物，加入 1L 自来水中，溶解后，115℃，25min 灭菌，待冷却至 50~55℃，然后加入乙酸调节至总酸 5 g/100mL，即快速的得到固体平板培养基。

采集麸醋样品，参照专利 CN 202011227512.3 中实施例 1 的麸醋样品、培养基和方法，长出肉眼可见菌落的时间为 7 天，而采用本发明的培养基和培养方法

(其中涉及的培养基和培养方法,固体和液体培养基分别采用实施例 1 固体培养基和液体培养基,培养方法采用实施例 1 的固体培养和实施例 4 的液体培养),采用相似麸醋样品时长出肉眼可见菌落的时间为 3 天,且检出活菌数的总数量提高了 8.3%,说明本发明的培养基和方法生长速度更快。

因此,本发明的培养基和培养方法具有良好的商业化应用可行性。

以上的实例仅仅是对本发明的实施方式进行描述,而并非对本发明的范围进行限定,对于本领域的技术人员来说,可以对上述说明进行改进,但所有的这些改进均应落入本发明的权利要求确定的保护范围。

1、一种特异性的乳酸菌液体培养基，其特征在于，所述培养基中包括以下原料：每 1L 自来水中加入胰蛋白胨 8~12 g、牛肉膏 10~15 g、酵母提取物 8~12 g、麦芽提取物 30~60 g、葡萄糖 10~15 g、柠檬酸氢二铵 1.5~2.5 g、磷酸氢二钾 1.5~2.5 g、一水硫酸锰 0.1~0.2 g、七水硫酸镁 0.5~0.7 g、吐温 80 1~2 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1~2 g、维生素 B₂ 1~3 mg，最后加入乙酸至 4~6 g/100mL。

2、根据权利要求 1 所述的特异性的乳酸菌液体培养基，其特征在于，所述乳酸菌优选为乳酸菌 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073。

3、一种特异性的乳酸菌固体培养基，其特征在于，所述培养基中包括以下原料：每 1L 自来水中加入胰蛋白胨 8~12 g、牛肉膏 10~15 g、酵母提取物 8~12 g、麦芽提取物 30~60 g、葡萄糖 10~15 g、柠檬酸氢二铵 1.5~2.5 g、磷酸氢二钾 1.5~2.5 g、一水硫酸锰 0.1~0.2 g、七水硫酸镁 0.5~0.7 g、吐温 80 1~2 mL、L-半胱氨酸盐酸盐 1~2 g、维生素 B₂ 1~3 mg，加入琼脂粉 20~25 g，最后加入乙酸至 4~6 g/100mL。

4、根据权利要求 3 所述的特异性的乳酸菌固体培养基，其特征在于，所述乳酸菌为乳酸菌 *Acetilactobacillus jinshanensis* HSLZ-75^T 和 *Lactobacillus sp.* HSCY 2073。

5、一种利用权利要求 1 所述的特异性的乳酸菌液体培养基的培养方法，其特征在于，包括如下步骤：

在培养基中接种菌株后，在培养基的液面上方残留空气的高度<0.5 cm，且培养基的装液量>90%，密封不漏气，培养温度 30~35℃。

6、一种利用权利要求 3 所述的特异性的乳酸菌固体培养基的培养方法，其特征在于，包括如下步骤：

在培养基中接种菌株后，置于厌氧培养箱中培养，厌氧培养箱中氧气含量<10 ppm，培养湿度 75~85%，培养温度 30~35℃。

7、一种权利要求 1 所述的特异性的乳酸菌液体培养基或者权利要求 3 所述的乳酸菌固体培养基在快速大量培养乳酸菌中的应用。