

孙传伯,曹佩佩,杨有兰,等. 乳酸球菌 RL-68 生产菌株工业培养基优化工艺研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):285-287.

乳酸球菌 RL-68 生产菌株工业培养基优化工艺研究

孙传伯,曹佩佩,杨有兰,黄 莉

(皖西学院生物与制药工程学院,安徽六安 237012)

摘要:将工业生产产生的副产品饼干渣加入发酵培养基中,通过单因素和正交试验对乳酸球菌 RL-68 生产菌株工业培养基进行优化,确定发酵优化条件为:饼干渣 105 g/L、番茄汁 3%、最适碳氮比 7,在培养温度 35 ℃、发酵初始 pH 值 6.5~6.8 条件下培养,这时乳酸球菌 RL-68 活菌数最高,可达 7.32×10^9 CFU/mL。

关键词:乳酸球菌;工业培养基;优化;配方;发酵工艺;正交试验

中图分类号: TQ920.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0285-03

乳酸菌是指发酵糖类主要产物为乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称,凡是能从葡萄糖或乳糖的发酵过程中产生乳酸的细菌统称为乳酸菌^[1-5]。乳酸菌是一群相当庞杂的细菌,目前至少可分为 18 个属,共有 200 多种,除极少数外,绝大部分都是人体内必不可少且具有重要生理功能的菌群,广泛存在于人体的肠道中。目前,已被国内外生物学家所证实,肠内乳酸菌与健康长寿有着非常密切的直接关系。乳酸球菌是乳酸菌的一种,是工业上尤其是食品工业上的常用菌种,存在于乳制品、发酵植物食品(如泡菜、酸菜)、青贮饲料及人的肠道尤其是乳儿肠道中,具有发酵温度高、产酸率

相对较高、对糖利用率高、发酵时不需通氧气等优点,在工业生产上具有非常广阔的应用前景。目前,世界上对于生产乳酸球菌的培养基有很多研究,但使用的多是实验室试剂,成本较大。本试验运用工业生产产生的副产品饼干渣和玉米浆来代替生产乳酸球菌的碳源和氮源,探索简单、低成本、高产量的适用于实际工业生产的发酵培养基^[6]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株与材料 乳酸球菌 RL-68,由皖西学院生物质炼制技术工程研究中心提供;饼干渣,由桐城双武食品厂提供;番茄、香蕉、白菜、橘子、苹果,均购自安徽省六安市南门外菜市场。

1.1.2 主要仪器 722 分光光度计,上海精密科学仪器有限公司生产;250B 恒温培养箱,江苏金坛精达仪器制造厂生产;PHS-3C pH 计,上海仪电科学仪器有限公司生产;SW-CJ-1D

收稿日期:2013-10-14

基金项目:国家级大学生创新创业计划(编号:201210376003、201310376006);皖西学院研究性学习项目(编号:wxyx2013062、wxyx2013074);安徽省高校自然科学基金(编号:KJ2011B216)。

作者简介:孙传伯(1978—),男,安徽桐城人,硕士,讲师,研究方向为生物质能工程。E-mail:scb19781979@126.com。

1~4 代菌发酵液中的钾含量逐渐上升,而 5、6 代菌钾含量比 4 代菌有所下降。说明 4 代菌发酵液中的钾含量最高,达到 134.26 mg/L。

3 结论与讨论

本试验采用木霉菌降解秸秆,秸秆在发酵 7 d 之后,量均有减少,说明木霉菌能有效降解秸秆。其中,3、4 代菌的降解率较高,比对照高 6.99%,通过一代一代的从发酵液中提取木霉菌,提高了秸秆降解能力,但也不是次数越多越好,当提取到第 5 代时,秸秆降解率略有下降,到第 6 代时下降更明显。从本试验结果可知木霉菌提取一定次数后,其降解能力会下降,这与杨小丽的试验结果^[6]类似,通过对菌种一直继代培养,淘汰培养过程中降解能力下降的菌株,选择降解能力强的菌株。卢松通过研究微生物对玉米秸秆的腐解,得出秸秆的发酵过程是有机质不断分解的过程的结论^[7],与本研究结果一致,即有机质含量变化与秸秆降解率变化基本一致。

通过具体分析各代菌发酵液中氮、磷、钾含量的变化趋势可以得出,整体养分含量通过对木霉菌的多次提取有所提高,提高的趋势虽不同,但是当提取到第 4 代时各养分含量都达到最大值,分别为 89.95、49.29、134.26 mg/L。与对照相比,

养分含量分别提高了 31.75、12.26、31.53 mg/L,但是当继续提取下去时,各养分含量均略有下降,与秸秆降解率的变化趋势相同。本研究结合各养分含量与秸秆降解率的变化趋势得出,4 代菌的降解率最高,且其各养分含量均达到最高。

参考文献:

- [1] 曹玉凤,李 英,刘荣昌,等. 生物技术在处理农作物秸秆饲料中的应用[J]. 饲料研究,1999,22(1):27-28.
- [2] 杨雪霞,陈洪章,李佐虎. 玉米秸秆氨化汽爆处理及其固态发酵[J]. 过程工程学报,2001,1(1):86-89.
- [3] 王淑军,扬从发,陈 静. 用于降解秸秆的纤维素酶产生菌的筛选研究[J]. 粮食与饲料工业,2001(12):21-23.
- [4] 姚 强,黄 琰,陈冠军. 哈茨木霉 SDU3.87 耐碱性纤维素酶液体发酵条件的研究[J]. 山东大学学报:理学版,2005,40(3):110-115.
- [5] 史 央,戴传超,吴耀春,等. 植物内生真菌强化还田秸秆降解的研究[J]. 环境科学学报,2004,24(1):144-149.
- [6] 杨小丽. 秸秆降解菌的选育及复配研究[D]. 郑州:郑州大学,2009.
- [7] 卢 松. 微生物处理玉米秸秆的腐解特征研究[D]. 重庆:西南大学,2010.

超净工作台,苏州净化设备有限公司生产。

1.1.3 培养基 活化培养基(g/L):酵母膏 5、蛋白胨 5、葡萄糖 40,pH 值 6.0~6.5,115℃灭菌 15 min;种子培养基(g/L):酵母膏 10、蛋白胨 10、葡萄糖 50、乙酸钠 0.5、MgSO₄·7H₂O 0.2、MnSO₄·4H₂O 0.01、FeSO₄·7H₂O 0.01、NaCl 0.01、ZnSO₄·7H₂O 0.2,初始 pH 值为 6.5~6.8,0.1 MPa 下灭菌 20 min^[7-10];发酵基础培养基(g/L):蛋白胨 15、葡萄糖 120、乙酸钠 0.5、MgSO₄·7H₂O 0.2、MnSO₄·4H₂O 0.01、FeSO₄·7H₂O 0.01、NaCl 0.01、ZnSO₄·7H₂O 0.2,初始 pH 值 6.5~6.8,0.1 MPa 下灭菌 20 min^[11-13];平板计数培养基(MC 培养基,g/L):大豆蛋白胨 5、牛肉膏粉 5、酵母膏粉 5、葡萄糖 20、乳糖 20、碳酸钙 10、琼脂 15、中性红 0.05,pH 值 6.0±0.2,0.1 MPa 下灭菌 20 min^[14-16]。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 种子培养:发酵培养前,经 2 次传代后,挑几环乳酸球菌 RL-68 菌体接种于装有 300 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中,用封口膜封口,37℃恒温静置培养;发酵培养:500 mL 锥形瓶中装入 300 mL 发酵基础培养基,取培养好的种子培养液,按体积分数 1% 接种量接种,恒温静置培养 30 h^[17-20]。

1.2.2 测定方法 活菌计数方法:平板涂布法,选择 3 个合适的稀释度,每个稀释度做 3 个平皿,菌落数为 3 个平皿的平均值;菌液吸光度测定方法:722 型分光光度计在 620 nm 条件下比色;pH 值测定方法:pH 计测定。

1.2.3 乳酸球菌的生长曲线 按体积分数 1% 的接种量将种子培养基接种于发酵培养基中,静置培养,分别于 10、12、14、16、18、20、24、26、30 h 取样测定培养基的吸光度(D 值)。

2 结果与分析

2.1 乳酸球菌生长曲线

在种子培养过程中,分别于 4、6、8、10、12、14、16、18、20、24、26、30 h 取样测定培养基的 D 值。由图 1 可见,在前 8 h,D 值没有明显的变化,此时乳酸球菌处于延迟期,细胞正合成分裂所需要的物质;在 8~12 h D 值有升高,在 12~18 h D 值有明显的升高,表明菌种生长进入对数期;18 h 后 D 值基本保持不变,即菌种进入稳定期。为缩短菌种转入发酵液中的延迟期,选择种子培养中对数期的培养液较好,故选择 18 h 作为接入发酵液的时间。

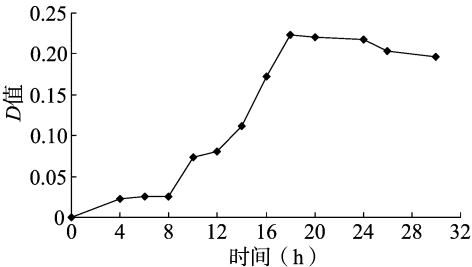


图1 乳酸球菌生长曲线

2.2 发酵培养基的单因素试验

2.2.1 发酵培养基中碳氮比的影响 试验采用工业生产副产品饼干渣作为碳源,改变发酵基础培养基中的碳氮比,基础培养基中其他组分不变,37℃静置培养 24 h 后测定活菌

数^[21-22]。由表 1 可见,当碳氮比小于 5 或者高于 8 时,培养基中活菌数数量级明显下降,这说明乳酸球菌 RL-68 对于碳氮源的利用有其自身的最适度,当碳氮比为 7 时,培养基中的活菌数最高,可达到 1.96×10⁸ CFU/mL,故选取碳氮比为 7 作为优化培养基的最适碳氮比。

表 1 发酵培养基中碳氮比对菌株数量的影响

序号	碳氮比	活菌数(CFU/mL)
1	4 : 1	6.24 × 10 ⁷
2	5 : 1	7.89 × 10 ⁷
3	6 : 1	8.67 × 10 ⁷
4	7 : 1	1.96 × 10 ⁸
5	8 : 1	1.72 × 10 ⁸
6	10 : 1	9.23 × 10 ⁷
7	12 : 1	8.64 × 10 ⁷

2.2.2 发酵培养基中生长因子的影响 一般情况下,发酵培养基中都会加入有益菌种生长的生长因子,大多数会选用酵母粉,但酵母粉的价格相对而言较高。本试验采用饼干渣为碳源和蛋白胨为氮源,最优碳氮比为 7,分别选取 1% 的番茄汁、香蕉汁、白菜汁、橘子汁、苹果汁 5 种不同的生长因子,研究不同生长因子对发酵培养基的影响。由表 2 可见,不同的生长因子对菌种数的影响较大,与未添加生长因子相比,生长因子对菌种的生长有强烈的促进作用,在所选的 5 种生长因子中,番茄汁对菌种生长的促进作用最大,因此,确定番茄汁为最优生长因子。

表 2 生长因子对菌株数量的影响

序号	生长因子	活菌数(CFU/mL)
1	番茄汁	1.92 × 10 ⁹
2	香蕉汁	5.60 × 10 ⁸
3	白菜汁	7.89 × 10 ⁸
4	橘子汁	1.02 × 10 ⁹
5	苹果汁	8.67 × 10 ⁸

2.3 发酵培养基正交优化试验

为确定最优发酵培养基,在单因素试验的基础上,以饼干渣为碳源、蛋白胨为氮源,碳氮比为 7,将碳源和氮源看作单一因素,与温度、生长因子番茄汁进行 3 因素 3 水平正交试验(表 3)。由表 4、表 5 可见,生长因子和碳氮源的量对发酵培养基中菌种数的影响都很显著;3 种单因子对乳酸球菌的产量影响显著性排序为:生长因子 > 碳氮源的量 > 培养温度^[23]。结合原料来源与价格因素,确定最佳发酵培养基为饼干渣 105 g/L、蛋白胨 15g/L、番茄汁 3%,培养温度 35℃。

表 3 发酵培养基优化的正交试验因素水平设计

水平	因素		
	A:饼干渣/蛋白胨 [(g/L)/(g/L)]	B:番茄汁 (%)	C:温度 (℃)
1	35/5	1	33
2	70/10	2	35
3	105/15	3	37

2.4 对优化培养基的验证试验

以 饼干渣105 g/L、蛋白胨15 g/L、番茄汁3%、培养温度

表 4 发酵培养基优化正交试验结果

序号	A	B	C	活菌数 (× 10 ⁹ CFU/mL)
1	1	1	1	0.68
2	1	2	2	1.87
3	1	3	3	2.05
4	2	1	2	0.85
5	2	2	3	3.41
6	2	3	1	3.46
7	3	1	3	1.21
8	3	2	1	2.87
9	3	3	2	5.84
<i>k</i> ₁₁	1.53	0.91	2.34	
<i>k</i> ₂₂	2.57	2.72	2.85	
<i>k</i> ₃₃	3.31	3.78	2.22	
<i>R</i>	1.78	2.87	0.63	

表 5 发酵培养基优化正交试验方差分析

方差来源	离差	自由度	均方离差	<i>F</i> 值	显著性
A	4.76	2	2.38	1.46	*
B	12.63	2	6.31	3.87	**
C	0.68	2	0.34	0.21	
误差	3.27	2	1.63		
总和	21.33	8			

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

35 ℃ 为条件对菌株进行发酵培养,得到培养基中所含活菌数为 7.32×10^9 CFU/mL,该确定的培养基最为合适。

3 小结与讨论

通过单因素和正交试验,确定最佳发酵培养基和培养条件为:饼干渣 105 g/L、蛋白胨 15 g/L、番茄汁 3%、最适碳氮比 7、培养温度 35 ℃、静置培养 18 h,产菌量可达最高,为 7.32×10^9 CFU/mL。本试验利用工业生产产生的副产品为主要原料,获得一个简单、低成本、高产量、适用于实际工业生产的发酵培养基。但是,本试验还有待进一步深入研究,如碳氮源固定比例问题是否可根据生产实际情况进一步调整。另外,利用番茄汁和橘子汁发酵得到的活菌数是在同一数量级的,但由于试验时不是橘子的成熟季节,故选取了番茄汁,在后续试验中,对生长因子的影响将进一步开展研究。

参考文献:

[1]金其荣,张继民,徐勤,等. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京:轻工业出版社,1989:338-345.
[2]洪安安,程可可,孙燕,等. 代谢甘油高产乳酸的菌种选育及培

养基优化[J]. 微生物学通报,2009,36(8):1195-1199.
[3]李元莉,吕欣,陈晓红,等. 功能性乳酸菌发酵剂在食品发酵工业中的应用[J]. 中国乳品工业,2006,34(1):35-38.
[4]张建友,徐静波,王军良,等. 冻干乳酸菌菌种增殖培养基增殖因子的优化[J]. 微生物学通报,2006,33(1):12-17.
[5]高年发,晋明芬,张健. 玉米粉细菌发酵生产 *L*-乳酸的研究[J]. 农业工程学报,2007,23(6):233-236.
[6]Sunhoon K W,Pyung C L,Eun G L, et al. 以鼠李糖和添加维生素的大豆蛋白水解物培养乳酸菌生产乳酸[J]. 酶与微生物技术,2000(26):209-215.
[7]诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994:23-24.
[8]张龙翔,张庭芳,李令媛,等. 生化实验方法和技术[M]. 北京:人民教育出版社,1981:1-3.
[9]李红,赵春燕. 乳酸链球菌素产生菌的筛选初报[J]. 中国酿造,2006(3):51-53.
[10]吕加平,梁占东,骆承庠,等. 乳酸菌增殖培养基的优化设计[J]. 中国乳品工业,1999,27(3):12-15.
[11]熊得鑫. 厌氧菌分离和鉴定方法[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1986:35-37.
[12]朱玮,潘玲,赵华宝. 一株鸡源乳酸菌的分离与初步鉴定[J]. 四川畜牧兽医,2006,33(10):29,31.
[13]郭云霞,郝庆红,朱宝成. 羊源芽孢益生菌的筛选与 Y5-39 菌株的鉴定及其耐受性试验[J]. 华北农学报,2010,25(5):206-210.
[14]杨洁彬,郭兴华,凌代文,等. 乳酸菌:生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.
[15]凌代文,凌代文,东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:67-69.
[16]焦瑞身. 微生物工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003:106-113.
[17]高年发,孙晓雯,许俊艳,等. 细菌 *L*-乳酸发酵培养基的优化[J]. 中国酿造,2008(4):30-32.
[18]黄谷亮,秦菊霞,李楠,等. 干酪乳杆菌产 *L*-乳酸发酵条件的研究[J]. 广西大学学报:自然科学版,2007,32(4):376-379.
[19]张兰威,鄂志强,万海峰,等. 乳酸菌增殖培养基筛选及干燥保护剂的选择[J]. 中国乳品工业,2000(2):7-10,18.
[20]叶勤. 发酵过程原理[M]. 北京:化学工业出版社,2005:84-85.
[21]丁绍峰,谭天伟. 豆粕水解液为氮源细菌厌氧流加发酵生产 *L*-乳酸[J]. 过程工程学报,2006,6(1):77-81.
[22]Hujanen M,Linko Y Y. 温度和各类氮源对乳酸菌发酵生产 *L*-乳酸的影响[J]. 应用微生物学,1996(45):307-313.
[23]吴有炜. 实验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002:103-105.