

德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基及培养条件的优化

姜庆玲^{1,2}, 丛美楠^{1,2}, 陈海生^{1,2}, 黄颖婷^{1,2}, 鄢庆枇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了降低德氏乳杆菌保加利亚亚种的工业生产成本和提高发酵液的菌浓度, 通过单因素试验和旋转中心组合设计(central composite design, CCD)相结合的方法优化培养基的组分和培养条件。优化后的培养基成分为: 葡萄糖 30 g/L、豆粕 28 g/L、玉米粉 14 g/L、乳清粉 28 g/L、 K_2HPO_4 3.0 g/L、柠檬酸三铵 2.5 g/L、乙酸钠 5 g/L、吐温-80 1.25 mL/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.0625 g/L; 培养条件为: 初始 pH 值 7.1, 温度 37 ℃, 接种量 4% (体积分数), 静置培养。经优化后活菌数达到 6.07×10^9 CFU/mL, 明显高于原 MRS 培养基 (5.8×10^8 CFU/mL), 且其成本较原 MRS 培养基的成本降低了 4000 元/t。

[关键词] 德氏乳杆菌保加利亚亚种; 培养基; 培养条件; 优化; 响应面法

[中图分类号] S 963.73

Optimization of Medium Constituents and Fermentation Conditions for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*

JIANG Qing-ling^{1,2}, CONG Mei-nan^{1,2}, CHEN Hai-sheng^{1,2}, HUANG Ying-ting^{1,2}, YAN Qing-pi^{1,2}

(1. Fisheries College, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea of Ministry of Agriculture, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To reduce the costs of *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* industrial production and increase the CFU number in the fermentation broth, the medium constituents and fermentation conditions were optimized. The culture medium ingredients were optimized by single-factor test and central composite design (CCD) experiment, and the culture conditions were also optimized by single-factor test based on the above experiment. The ingredients of culture medium were obtained as glucose 30 g/L, bean pulp 28 g/L, corn flour 14 g/L, whey mist 28 g/L, K_2HPO_4 3.0 g/L, triammonium citrate 2.5 g/L, sodium acetate 5 g/L, Tween-80 1.25 mL/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.0625 g/L, and the culture conditions were initial pH 7.1 of fermentation liquid, temperature of 37 ℃, inoculation amount of 4% (V/V) and stationary culture. After optimizing the number of CFU number was 6.07×10^9 CFU/mL, significantly higher than the CFU number in the original MRS culture medium (5.8×10^8 CFU/mL), and the cost was reduced by 4000 yuan/t compared to the original MRS culture medium.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*; culture medium optimization; fermentation conditions; optimization; response surface methodology

[收稿日期] 2016-03-18

[修回日期] 2016-05-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31272699); 海洋经济区域发展示范项目(14PYY050SF03, 12PYY001SF08); 厦门南方中心科技项目(14CZP032HJ06); 福建省科技重大专项专题(2016NZ0001-3)

[作者简介] 姜庆玲(1990—), 女, 硕士生, 从事水产微生物学研究。通信作者: 鄢庆枇(1971—), 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

0 引言

乳酸菌是目前水产养殖上使用最为广泛的一种益生菌。美国在 FDA (1989) 中规定的饲用微生物有 42 种, 其中乳酸菌接近 30 种^[1], 乳酸杆菌在 1994 年就被我国农业部批准使用。适当使用乳酸菌, 可以促进动物生长能力、维持微生态平衡、增强机体免疫力、改善水体环境等^[2]。包括德氏乳杆菌保加利亚亚种在内的乳酸菌无污染、无残留、不产生抗药性, 可以代替抗生素应用到养殖业中, 协调人与自然关系, 促进养殖业安全有效地发展。目前有关德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基的研究多集中于发酵乳的生产, 但由于生产成本较高, 不利于其在水产上的广泛应用。

旋转中心组合设计 (central composite design, CCD) 是通过有限的试验次数建立多元二次回归方程来拟合各因素与响应值之间的函数关系, 可以通过岭脊分析快速有效地确定因素的最佳条件, 并对影响试验指标的各因素水平及其交互作用进行优化^[3-4]。旋转中心组合试验次数少、周期短、精度高, 已经广泛应用于微生物培养基及培养条件的优化^[5-7]。本研究以 MRS 培养基为基础培养基, 对德氏乳杆菌保加利亚亚种的培养基成分及培养条件进行优化, 旨在降低乳酸菌的生产成本, 提高发酵液菌浓度, 促进其在水产养殖上的推广利用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株及培养基

德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 1.2902), 由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供。

种子培养基及基础发酵培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、酵母粉 4 g、磷酸氢二钾 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸三铵 2 g、吐温-80 1 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、蒸馏水 1000 mL、pH (6.2 ± 0.2)、121 °C 高压灭菌 15 min。

活菌计数培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、酵母粉 4 g、磷酸氢二钾 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸三铵 2 g、吐温-80 1 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1000 mL、pH (6.2 ± 0.2)、121 °C 高压灭菌 15 min。

1.1.2 实验试剂及器材

葡萄糖和磷酸氢二钾, 分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 乙酸钠、柠檬酸三铵和硫酸锰, 分析纯, 购自上海源叶生物科技有限公司; 硫酸镁和吐温-80, 分析纯, 购自北京索莱宝生物科技有限公司。牛肉浸膏, 生物试剂, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 酵母提取物、蛋白胨, 生物试剂, 购自英国 OXOID 公司。糖蜜, 工业级, 含糖量 570 g/L, 购自哈尔滨英瑞斯饲料有限公司; 可溶性淀粉, 工业级, 购自生工生物工程股份有限公司; 麸皮、豆粕、玉米粉、乳清粉、米糠均为市售, 粉碎后过 80 目筛网, 保证颗粒大小均匀, 其粗蛋白的质量分数分别为 15.7%、44.2%、19.3%、12.0%、12.8%。

全自动高压蒸汽灭菌锅购自施都凯仪器设备 (上海) 有限公司; 多功能酶标仪 BIO-TEK 购自美国 Synergy HT 公司; 电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司; 立式双层恒温培养摇床购自上海世平实验设备有限公司; 移液枪购自 Eppendorf (中国) 有限公司; 电子天平购自奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; 生化培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司; 超净工作台购自天津市泰斯特仪器有限公司; 漩涡混匀器 (TZL-5009) 购自苏州珀西瓦尔实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物量的测定

用酶标仪 (BIO-TEK) 在 600nm 波长下测定吸光度值 (即 OD₆₀₀ 值) 来衡量培养液的生物量, 以灭菌后刚接种的培养液的 OD₆₀₀ 值作空白对照。

1.2.2 活菌数的测定

采用梯度稀释平板计数法,37℃恒温培养48 h后,计算保加利亚乳杆菌的菌落数。

1.3 发酵培养基的优化

1.3.1 碳源及氮源的筛选

采用单因素试验方法,将MRS肉汤培养基中的碳源(葡萄糖)分别以20 g/L的葡萄糖、糖蜜、可溶性淀粉、麸皮等量替换,将MRS肉汤培养基中的氮源(蛋白胨、牛肉膏粉、酵母膏粉)分别以20 g/L的豆粕、玉米粉、乳清粉和米糠等量替换,设置摇床温度37℃、转数100 r/min,摇瓶试验接种量2.5% (体积分数),装液量100 mL (250 mL),培养36 h后测定其活菌数及OD₆₀₀值,每个试验平行3次。

1.3.2 Plackett – Burman 实验设计筛选重要因子

PB实验设计选择优化好的碳源、氮源以及MRS中的其他6个物质的含量合8个试验因素(A葡萄糖、B氮源、C K₂HPO₄、D 乙酸钠、E 柠檬酸三铵、F 吐温-80、G MgSO₄·7H₂O、H MnSO₄·4H₂O),另设3个用于估计误差的空白因素^[8],共11个因素。试验因素低(-)水平按MRS培养基原始培养条件,高(+)水平约取低水平的1.25倍^[9],平行试验3次,最终的活菌数取3次试验的平均值。

1.3.3 最陡爬坡实验研究最大响应值的响应区域

根据PB实验结果选择对活菌数影响较大,即P值较小的3个因素进行最陡爬坡试验,按其回归系数的符号确定爬坡方向,按各因素效应值的大小确定变化步长,平行试验3次,最终活菌数取3次试验的平均值。

1.3.4 旋转中心组合设计确定显著因素的最优水平

根据最陡爬坡实验结果,选择对活菌数影响较大的实验条件作为旋转中心组合设计实验因素水平的中心点,每个试验平行3次,最终活菌数取3次试验的平均值。

1.3.5 验证实验

在以上优化条件下对旋转中心组合实验优化结果确定的各因素最佳取值及预测结果进行验证,共进行3批次500 mL摇瓶试验,最终活菌数取3次试验的平均值。

1.4 发酵条件的优化

采用优化好的培养基配方,在其他培养条件不变的情况下,对培养基的初始pH值、温度、接种量和转数进行单因素试验逐一优化,初始pH值分别设为6.5、6.8、7.1、7.4;温度分别设为35、37、39、41℃;接种量(体积分数)分别设为2%、4%、6%、8%;转数分别设为0、100、200、300 r/min;每个试验均平行3次,试验结果取3次的平均值。

1.5 数据分析与处理

使用SPSS Statistics 17.0软件进行正交设计及分析;使用Design – Expert 8.0软件进行旋转中心组合设计及分析。*P* < 0.05表示显著性差异,*P* < 0.01表示极显著性差异。

2 结果

2.1 发酵培养基的优化

2.1.1 碳源及氮源种类的影响

由图1可知,碳源及氮源对德氏乳杆菌保加利亚亚种的生长有重要影响。德氏乳杆菌保加利亚亚种在以糖蜜为主要碳源的培养基中的生长情况要显著(*P* < 0.05)好于以淀粉和麸皮为主要碳源的培养基,而在以葡萄糖为主要碳源的培养基中生长良好,无论是OD₆₀₀值还是活菌数都极显著(*P* < 0.01)高于以糖蜜、淀粉和麸皮为主要碳源的培养基,因此选择葡萄糖为最适碳源应用于后续实验中。德氏乳杆菌保加利亚亚种在以米糠作为主要氮源的培养基中菌体生长情况最差;而以豆粕为主要

氮源的培养基中生长良好，无论是 OD₆₀₀ 值还是活菌数都极显著 ($P < 0.01$) 高于其他实验组。

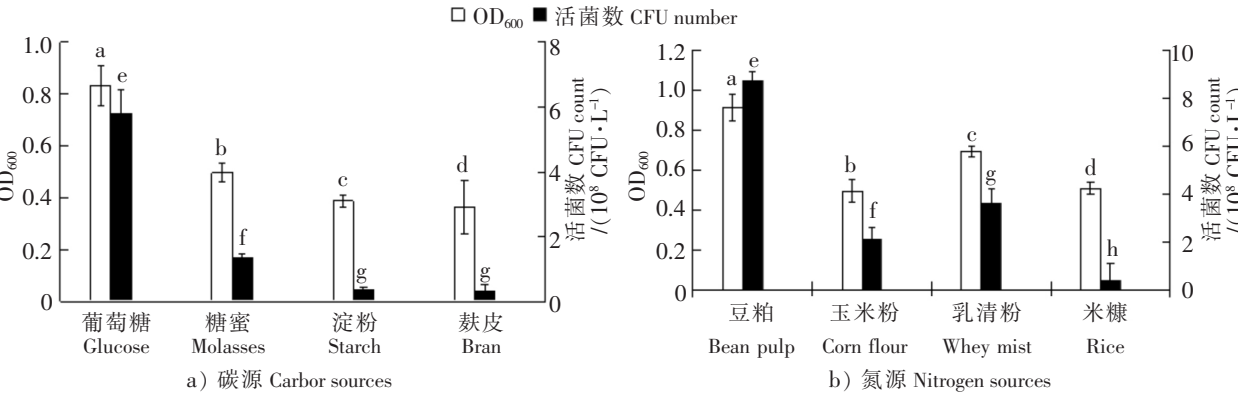


图 1 碳源和氮源对 OD₆₀₀ 值和活菌数的影响
Fig.1 Effects of carbon and nitrogen sources on OD₆₀₀ value and CFU number

由于德氏乳杆菌保加利亚亚种对氮源的要求较高，并且 Terrade 与 Nicolas 曾证明由于交互作用添加不同的氮源会比添加单一氮源的效果要好^[10]。因此在单因素试验的基础上，选择对菌体生长较好的豆粕、玉米粉和乳清粉进行正交试验，确定氮源各组分的最优配比。正交试验设计及分析见表 1。

表 1 氮源 L₉ (3⁴) 的正交试验
Tab. 1 The orthogonal test of nitrogen sources L₉ (3⁴)

序号 Number	B ₁ :w(豆粕 Bean pulp)/%	B ₂ :w(玉米粉 Corn flour)/%	B ₃ :w(乳清粉 Whey mist)/%	活菌数 CFU number /(10 ⁷ CFU · mL ⁻¹)
1	1	1	1	2.10
2	1	2	2	21.70
3	1	3	3	0.10
4	2	1	2	28.70
5	2	2	3	20.30
6	2	3	1	15.70
7	3	1	3	1.30
8	3	2	1	2.70
9	3	3	2	8.00
k ₁	7.97 ^a	10.70 ^c	6.83 ^d	
k ₂	21.57 ^b	14.90 ^e	19.47 ^e	
k ₃	4.00 ^a	7.93 ^c	7.23 ^d	
R	17.57	6.97	12.64	

注：同列中角标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Values with a different supesscript in the same column are significantly different ($P < 0.05$)。

由表 1 中各因素的极差值的大小顺序 $R_{B_1} > R_{B_3} > R_{B_2}$ 可以看出，3 种氮源对菌体生长情况影响的主次关系为：豆粕 > 乳清粉 > 玉米粉，从 k 值可知，豆粕用量对活菌数的影响关系为：2% > 1% > 3%，玉米粉用量对活菌数的影响关系为：2% > 1% > 3%，乳清粉用量对活菌数的影响关系为：2% > 3% > 1%。在方差分析的基础上，进一步对豆粕、玉米粉、乳清粉 3 个因素进行多重比较，从表 1 中的角标字母可知：豆粕用量 1%、3% 与 2% 之间有显著性差异，玉米粉用量 1%、2% 和 3% 之间无显著性差异，乳清粉用量 1%、3% 与 2% 之间有显著性差异，因此，氮源的理论最佳组合为：豆粕 2%、玉米粉 1%、乳清粉 2%，即豆粕 20 g/L，玉米粉 10 g/L，乳清粉 20 g/L。

2.1.2 Plackett – Burman 实验设计结果分析

运用 Design Expert 8.0 软件设计实验并进行数据处理,表2 为 Plackett – Burman 实验设计及响应值,表3 为对各个因素的回归分析。由表3 可知,8 个因素对活菌数的影响顺序依次为 A 葡萄糖 > B 氮源 > C 磷酸氢二钾 > F 吐温 – 80 > G 硫酸镁 > D 乙酸钠 > E 柠檬酸三铵 > H 硫酸锰。根据 P 值选择葡萄糖、氮源和磷酸氢二钾为重要因素。柠檬酸三铵、吐温 – 80 和硫酸锰 3 个因素对响应值有正效应,因此选择它们的高水平应用到后续实验中;乙酸钠和硫酸镁对响应值有负效应,因此选择它们的低水平应用到后续试验中。该模型的 F 值为 12.17,表示模型显著;相关系数 $R^2 = 0.970\ 1$,表明模型与实际情况拟合较好。

表2 N=12 的 Plackett – Burman 实验设计及响应值
Tab.2 Experimental design and response values of Plackett – Burman(N=12)

(g · L ⁻¹)									
实验号 Number	A: ρ(葡萄糖 Glucose)	B: ρ(氮源 Nitrogen)	C: ρ (K ₂ HPO ₄)	D: ρ(乙酸钠 Sodium acetate)	E: ρ(柠檬酸 三铵 Ammonium citrate tribasic)	F: ρ(吐温 -80 Twain -80)	G: ρ(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	H: ρ (MnSO ₄ · 4H ₂ O)	活菌数 CFU number /(10 ⁸ CFU · mL ⁻¹)
1	25	62.5	2.5	5.00	2.5	1.25	0.20	0.050 0	4.75
2	20	62.5	2.0	6.25	2.5	1.25	0.25	0.050 0	1.80
3	25	50.0	2.5	6.25	2.0	1.25	0.25	0.062 5	3.40
4	20	62.5	2.5	5.00	2.5	1.00	0.25	0.062 5	2.40
5	20	50.0	2.0	6.25	2.5	1.25	0.20	0.062 5	1.32
6	20	50.0	2.5	5.00	2.0	1.25	0.25	0.050 0	1.60
7	25	50.0	2.0	5.00	2.5	1.00	0.25	0.062 5	2.80
8	25	62.5	2.0	5.00	2.0	1.25	0.20	0.062 5	3.60
9	25	62.5	2.0	6.25	2.0	1.00	0.25	0.050 0	3.85
10	20	62.5	2.5	6.25	2.0	1.00	0.20	0.062 5	2.54
11	25	50.0	2.5	6.25	2.5	1.00	0.20	0.050 0	3.00
12	20	50.0	2.0	5.00	2.0	1.00	0.20	0.050 0	1.02

表3 Plackett – Burman 设计的回归分析
Tab.3 Regression analysis of Plackett – Burman design

来源 Source	系数 Coefficient	平方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值(Prob>F) P value
模型 Model	2.67	13.37	8	1.67	12.17	0.032 1
A	0.89	9.58	1	9.58	69.77	0.003 6
B	0.48	2.80	1	2.80	20.42	0.020 3
C	0.28	0.91	1	0.91	6.61	0.082 4
D	–0.022 0	0.005 6	1	0.005 6	0.041 0	0.852 4
E	0.005 0	0.000 3	1	0.000 3	0.002 2	0.965 6
F	0.072 0	0.062 0	1	0.062 0	0.450 0	0.550 8
G	–0.032 0	0.012 0	1	0.012 0	0.088 0	0.786 5
H	0.003 3	0.000 1	1	0.000 1	0.001 0	0.977 1
残差 Residual		0.41	3	0.14		
校正总和 Cor total		13.78	11			
R ²	0.970 1					
R ² _{Adj}	0.890 4					
C. V. %	13.86					

2. 1. 3 最陡爬坡实验结果

根据 Plackett – Burman 实验的结果选取葡萄糖、氮源、磷酸氢二钾 3 个因素进行最陡爬坡实验，3 个因素的估计系数均为正，因此应依次增大。表 4 的结果表明，最大活菌数在第 4 次实验附近，因此以第 4 次实验的条件作为响应面实验因素水平的中心点。

表 4 最陡爬坡实验设计与结果
Tab. 4 Experimental design and results of steepest ascent

实验号 Number	A:ρ(葡萄糖 Glucose)/(g · L ⁻¹)	B:ρ(氮源 Nitrogen)/(g · L ⁻¹)	C:ρ(K ₂ HPO ₄) /(g · L ⁻¹)	活菌数 CFU number /(10 ⁹ CFU · mL ⁻¹)
1	20	50	2.0	0.68
2	25	60	2.5	2.03
3	30	70	3.0	5.46
4	35	80	3.5	5.68
5	40	90	4.0	3.93
6	45	100	4.5	2.75

2. 1. 4 旋转中心组合设计结果与分析

运用 Design Expert 8.0 软件设计实验并进行数据处理，表 5 为旋转中心组合实验设计及实验结果，表 6 为对各个因素的显著性分析。由表 6 可知，模型的不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)，即自变量与响应值之间的线性关系显著，说明实验方法可靠。失拟项 $P = 0.1577 > 0.05$ ，即失拟项差异不显著，说明该方程对实验拟合情况好，实验误差小。 $R^2 = 0.827\ 2$ 说明模型可以很好地预测活菌数的实际情况。

表 5 中心组合设计及结果
Tab. 5 Central composite design and results

实验号 Number	A:ρ(葡萄糖 Glucose)/(g · L ⁻¹)	B:ρ(氮源 Nitrogen)/(g · L ⁻¹)	C:ρ(K ₂ HPO ₄) /(g · L ⁻¹)	活菌数 CFU number /(10 ⁹ CFU · mL ⁻¹)
1	30.00	70.00	3.00	5.70
2	40.00	70.00	3.00	2.65
3	30.00	90.00	3.00	3.90
4	40.00	90.00	3.00	4.95
5	30.00	70.00	4.00	5.50
6	40.00	70.00	4.00	2.45
7	30.00	90.00	4.00	3.55
8	40.00	90.00	4.00	4.65
9	26.59	80.00	3.50	4.55
10	43.41	80.00	3.50	3.37
11	35.00	63.18	3.50	3.40
12	35.00	96.82	3.50	3.15
13	35.00	80.00	2.66	2.75
14	35.00	80.00	4.34	2.10
15	35.00	80.00	3.50	2.15
16	35.00	80.00	3.50	2.30
17	35.00	80.00	3.50	3.35
18	35.00	80.00	3.50	2.80
19	35.00	80.00	3.50	3.10
20	35.00	80.00	3.50	2.50

表 6 中心组合实验的回归分析
Tab.6 Regression analysis of central composite design

来源 Source	均方和 Sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值(Prob>F) P value	显著性 Significance
模型 Model	18.940 0	9	2.100 0	5.320 0	0.007 7	显著 Yes
A	2.580 0	1	2.580 0	6.520 0	0.028 7	
B	0.007 9	1	0.007 9	0.020 0	0.890 1	
C	0.340 0	1	0.340 0	0.850 0	0.378 2	
AB	8.510 0	1	8.510 0	21.510 0	0.000 9	
AC	0.000 3	1	0.000 3	0.000 8	0.978 1	
BC	0.007 8	1	0.007 8	0.020 0	0.891 0	
A ²	5.880 0	1	5.880 0	14.880 0	0.003 2	
B ²	2.270 0	1	2.270 0	5.740 0	0.037 6	
C ²	0.130 0	1	0.130 0	0.340 0	0.573 9	
残差 Residual	3.96	10	0.40			
失拟项 Lack of fit	2.86	5	0.57	2.61	0.157 7	不显著 No
纯误差 Pure positive error	1.10	5	0.22			
校正总和 Cor total	22.90	19				
R ²	0.827 2					
R ² _{Adj}	0.671 7					
C. V. %	18.27					

经回归拟合后, 实验因子对响应值的影响可用回归方程表示为:

$$Y = 2.67 - 0.43A + 0.024B - 0.16C + 1.03AB + 0.00625AC - 0.031BC + 0.64A^2 + 0.40B^2 + 0.096C^2$$

其中, A、B、C 分别是葡萄糖、氮源、磷酸氢二钾的编码值, Y 为活菌数的预测值。根据回归方程绘制出响应面分析图及等高线图, 以确认葡萄糖、氮源、磷酸氢二钾 3 个因素对活菌数的影响。由图 2 可见, AB 交互作用显著, AC、BC 交互作用不显著。为确定各因素的最佳取值, 可以使用 Goal Maximize (求最小值是用 Goal Minimize) 命令进行岭脊分析, 得出回归模型存在的最大值点: 活菌数最大值为 5.376×10^9 CFU/mL, 与其对应的是葡萄糖 30 g/L、氮源 70 g/L、磷酸氢二钾 3 g/L。

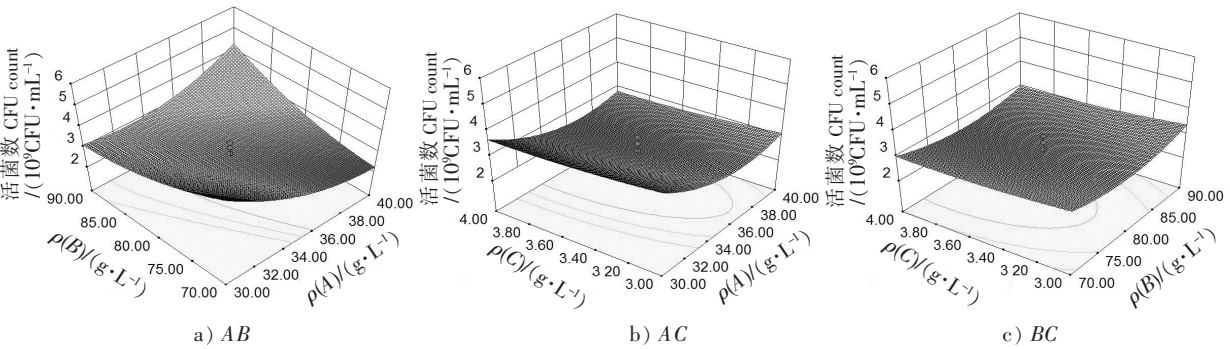


图 2 葡萄糖(A)、氮源(B)及磷酸氢二钾(C)的响应曲面图

Fig.2 Response surface plot of glucose (A), nitrogen source (B) and K₂HPO₄ (C)

2.1.5 验证试验

在以上优化条件下进行验证试验, 共进行 3 批次 200 mL 摇瓶试验, 试验平均值为 5.265, 与预测值 5.376 非常接近, 说明该模型可以很好地预测实际表达情况。

2.2 培养条件的优化

采用上述优化好的培养基配方, 通过单因素试验分别对培养基的初始 pH 值、培养温度、接种量及转数进行优化, 实验结果如表 7 所示。初始 pH 值为 7.1 时菌体各个时期的 OD₆₀₀ 值均高于其他组,

因此初始 pH 值为 7.1 时比较适合菌体的生长；培养条件为 37 ℃ 时菌体生长的优势较大；接种量为 4% 时对菌体生长较为有利；转数为 0 r/min 即静止培养时，菌体生长的优势较大。

表 7 不同培养条件对 OD₆₀₀ 值的影响
Tab.7 Effects of different culture conditions on OD₆₀₀ value

初始 pH Initial pH	OD ₆₀₀	温度 Temperature /℃	OD ₆₀₀	接种量 Inoculum amount/%	OD ₆₀₀	转数 Revolution/ (r · min ⁻¹)	OD ₆₀₀
6.5	0.709 ± 0.027 ^d	35	0.858 ± 0.042 ^b	2	0.982 ± 0.037 ^b	0	1.078 ± 0.053 ^a
6.8	0.799 ± 0.033 ^c	37	1.006 ± 0.029 ^a	4	1.052 ± 0.041 ^a	100	1.034 ± 0.035 ^{ab}
7.1	1.060 ± 0.019 ^a	39	0.743 ± 0.036 ^c	6	0.957 ± 0.025 ^b	200	0.964 ± 0.046 ^b
7.4	0.869 ± 0.026 ^b	41	0.677 ± 0.034 ^c	8	0.878 ± 0.028 ^c	300	0.875 ± 0.038 ^c

注：同列中角标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Values with a different supesscript in the same column are significantly different ($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验利用 Design - Expert 8.0 软件，通过单因素实验与响应面设计（旋转中心组合设计）相结合的方法对德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基成分及培养条件进行优化。用统计学方法对该模型进行显著性检验，采用多元二次回归方程来拟合各因素与响应值之间的函数关系，用响应面图和等高线图反映各因素间的交互作用，并通过岭脊分析对实验结果进行精准预测，快速有效地确定了多因子系统的最佳条件。

碳源的代谢速度对初级和次级产物的生成及细胞的形成有重要影响^[11]。与葡萄糖和糖蜜相比，以淀粉和麸皮作为碳源时，该菌株发酵液的活菌数及 OD₆₀₀ 值较低，这说明保加利亚乳杆菌不能很好地利用淀粉和麸皮中的碳源，加入糖蜜后发酵液的活菌数及 OD₆₀₀ 值也较低，这是因为糖蜜的主要成分是蔗糖，而德氏乳杆菌保加利亚亚种对蔗糖的利用能力较差。以乳清粉、玉米粉作为氮源时，菌体生长情况较好。而高海燕^[12]用乳清粉代替 MRS 培养基中的蛋白胨培养保加利亚乳杆菌，其结果明显优于市售合成 MRS 培养基；刘晓峰^[13]等用乳酸菌对玉米粉进行改性处理，可以改善玉米粉的加工性能。这些与本研究结果一致。豆粕作为氮源时，菌体生长情况最好，这是因为乳酸菌发酵豆粕可以降低豆粕中抗营养因子的含量，使大分子的蛋白质、脂肪和糖类物质分解成机体更易吸收的小分子物质，增加钙、磷、铁和某些 B 族维生素的含量^[14]。

pH 值过高或过低都不适合菌体的生长，会影响细菌表面通透性和酶活性等。乳酸杆菌的最适生长温度与培养基中吐温 -80 的含量相互影响^[15]。接种量的多少与菌株生长周期的长短密切相关，接种量过高或过低均会对活菌数造成影响。接种量低，培养周期长，易污染；接种量过高易造成培养基营养失衡从而抑制菌体增殖甚至死亡^[16]。保加利亚乳杆菌喜厌氧环境，只有在发酵培养基含氧量较低的情况下才能快速生长。

MRS 中氮源成本约占总成本的 90%。经试验优化后培养基氮源是豆粕、玉米粉和乳清粉。相对于 MRS 培养基中的氮源牛肉膏、蛋白胨和酵母提取物，以及陈合等^[17]在保加利亚乳杆菌发酵培养基中筛选出的氮源新生牛血清、酵母粉和酪蛋白水解物，本试验优化后的培养基成本更低，来源更广。在此基础上，对培养条件进行优化后，保加利亚乳杆菌的活菌数可以达到 6.07×10^9 CFU/mL，明显高于实验室常用的液体 MRS 培养基 (5.8×10^8 CFU/mL)，且经优化后的培养基成本较实验室常用的液体 MRS 培养基的成本降低了 4000 元/t。李冲等^[18]通过对保加利亚乳杆菌菊芋复合汁增菌培养基进行优化筛选，其活菌数为 1.50×10^9 CFU/mL，其成本较实验室常用的液体 MRS 培养基的成本降低了 2400 元/t。与之相比，本研究所得培养基成本更低，活菌数更高，具有较好的经济效益和广泛的应用前景。

经优化后德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基的成分为:葡萄糖 30 g/L、豆粕 28 g/L、玉米粉 14 g/L、乳清粉 28 g/L、 K_2HPO_4 3.0 g/L、柠檬酸三铵 2.5 g/L、乙酸钠 5 g/L、吐温-80 1.25 mL/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.0625 g/L;培养条件为初始 pH 值 7.1、温度 37℃、接种量 4%、静置培养。本文的研究降低了德氏乳杆菌保加利亚亚种培养基成本,并且显著提高了发酵液的菌浓度,有利于德氏乳杆菌保加利亚亚种在水产养殖中的推广应用。

[参 考 文 献]

- [1] 张喜红. 乳酸菌制剂的作用机理研究. 科学养鱼, 2009(8): 84.
- [2] 刘倩, 陈莹. 乳酸菌对病原菌定植的拮抗作用及其在水产养殖中的应用. 中国水产, 2006(11): 63-64.
- [3] AMBATI P, AYYANNA C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17(4): 331-335.
- [4] RATNAM B V V, RAO M N, RAO M D, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003, 19(5): 523-526.
- [5] AZAOLA A, BUSTAMANTE P, HUERTA S, et al. Use of surface response methodology to describe biomass production of *Bifidobacterium infantis* in complex media. Biotechnology Techniques, 1999, 13(2): 93-95.
- [6] QIAO Y Z, WEN W Z, YU Z, et al. Response surface methodology to design a selective co-enrichment broth of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* for simultaneous detection by multiplex PCR. Microbiological Research, 2012, 167(7): 405-412.
- [7] HUJANEN M, LINKO S, LINKO Y Y, et al. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. Applied Microbiology & Biotechnology, 2001, 56(1/2): 126-130.
- [8] STOWE R A, MAYER R P. Efficient screening of process variables. Industrial & Engineering Chemistry, 1966, 58(2): 36-40.
- [9] PLACKEET R L, BURMAN J P. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, 1946, 33(4): 305-325.
- [10] LIU S Q, DAVIS C R, BROOKS J D. Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. American Journal of Ecology & Viticulture, 1995, 46(2): 166-174.
- [11] 吴渊. 乳酸菌发酵应用于水产防腐. 浙江: 浙江大学, 2014: 25-27.
- [12] 高海燕. 乳清蛋白水解物在乳酸菌培养基中的应用研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012: 42-43.
- [13] 刘晓峰, 刘亚伟, 宁希焯. 乳酸菌发酵对玉米粉特性的影响研究. 粮食加工, 2011, 36(5): 60-63.
- [14] 刘海燕. 乳酸菌发酵豆粕及其功效研究. 长春: 吉林农业大学, 2012: 1-9.
- [15] PINTODA J, GUYOT J P, RAIMBAULT M. Lactic acid production from mussel processing wastes with an amylolytic bacterial strain. Enzyme & Microbial Technology, 1999, 24(8): 590-598.
- [16] 张媛媛, 赵敏, 张宁. 复合益生菌芽孢杆菌发酵培养基及条件的优化. 东北林业大学学报, 2012, 40(3): 93-97. DOI:10.13759/j.cnki.lidxb.2012.03.006.
- [17] 陈合, 李串娜, 舒国伟. Plackett-Burman 法筛选保加利亚乳杆菌发酵培养基氮源. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2012, 06: 71-74.
- [18] 李冲, 谷新晰, 田晶晶, 等. 保加利亚乳杆菌菊芋复合汁增菌培养基的优化筛选. 中国食品学报, 2012, 12(5): 82-87. DOI:10.16429/j.1009-7848.2012.05.019.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)