

文章编号: 1004-7271(2001)03-0234-05

益生菌 SFU-9 发酵工艺的确定

黄丽彬, 陈有容, 齐凤兰, 李柏林

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要: 益生菌具有促进动物生长、提高机体免疫能力等生理功能, 常用作微生态饲料添加剂。菌株 SFU-9 是一株蜡状芽孢杆菌, 该菌株在不利环境下能够以孢子形式存在, 具有耐高温、耐酸碱和耐挤压等优点, 较乳酸菌、酵母菌等益生菌更能保持活菌状态, 适合饲料加工工业的需要。该研究以菌株 SFU-9 进行实验, 研究发酵温度、接种量、培养基初始 pH 值、溶解氧等因素对菌株生长的影响, 确定出最佳培养条件为: 培养基初始 pH 值为 6.0~6.5, 接种量 5% (相对摇瓶装液量), 培养温度 30~32℃, 装液量 28~33 mL/250 mL。发酵液中的活菌数可达 10^{11} cfu/mL。在此基础上, 采用单因子和正交实验相结合的方法, 确定出最佳发酵培养基组成为: 玉米淀粉 2.0%, 啤酒酵母 1.5%, NaH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.2%, 玉米浆 2.0%。以最佳培养基配方给菌体提供营养, 在最佳培养条件下培养, 可以使发酵液中的活菌数高达 10^{12} cfu/mL。

关键词: 益生菌; 蜡状芽孢杆菌; 发酵; 生物量

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A

Fermentation technology for probiotics SFU-9

HUANG Li-bin, CHEN You-rong, QI Feng-lan, LI Bai-lin

(College of Food Science, SFU, Shanghai 200090, China)

Abstract: Probiotics have many advantages over other feed additives and have positive influence on the growth of animals. *Bacillus cereus* strain SFU-9 has growth-promoting effect on animals and can enhance the ability of immunity. SFU-9 can keep activity for a longer time than other organisms, such as yeast, lactic acid bacteria; etc. because it should form spores if under disadvantageous conditions. So this strain meets the demands of the processing in feed industry. The effects of culture condition and media on the growth of the strain SFU-9 were studied in the experiment. The optimized fermentation conditions are: temperature 30-32℃, pH value of media is 6.0-6.5, inoculum size is 2% and 28-33 mL media per flask (250 mL). The optimized fermentation culture medium for strain SFU-9 was obtained after analyzing the effects of single elements of the medium (carbon sources, nitrogen sources, mineral and growth factor) on the growth of strain and the relationship between each element. The optimal prescription for fermentation was composed of 2% corn starch, 1.5% brewer's yeast, 0.2% NaH_2PO_4 , 0.2% Na_2HPO_4 and 2.0% corn syrup. The highest biomass concentration obtained in the experiments was 10^{12} cfu/mL.

Key words: probiotics; *Bacillus cereus*; fermentation; biomass

由于抗生素等药物性饲料添加剂产生的药物残留、细菌耐药性等危害, 人们将目光投向了无毒、无公害的微生态饲料添加剂的研究和开发。我国农业部 1994 年公布的能够用于生产微生态制剂的菌种有: 乳酸杆菌、芽孢杆菌、粪链球菌、酵母菌和双歧杆菌^[1]。目前国内外用于生产微生态制剂的菌种可以

分为芽孢杆菌和非芽孢杆菌两大类,对非芽孢类益生菌的研究和应用较多,而对芽孢类益生菌的研究报道相对较少。芽孢杆菌具有耐高温、耐酸碱和耐挤压等优点,适合饲料加工业的需要,能够保持较高的活菌数^[2]。孢子进入肠道后,能够在肠道上部迅速复活而发挥生理生化作用,促进动物生长,提高机体免疫能力,该菌在饲料工业中的应用具有远大前景。所以,本实验选用了生产效率高、生产周期短的高密度深层液体发酵法培养菌株 SFU-9,在摇床培养的条件下确定了适合蜡状芽孢杆菌 SFU-9 生长的最佳生长参数,在确定的最佳生长参数的基础上进行培养基优化的研究,使发酵液的活菌含量进一步提高,达到 10^{12} cfu / mL,为该菌的工业化生产提供了理论依据和技术支持。

1 材料与方方法

1.1 菌种

SFU-9 菌株,本实验室提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面菌种培养基(W/V)(pH=7.0)

蔗糖 3.0%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 1.0%, Na_2HPO_4 0.2%, NaH_2PO_4 0.2%, 琼脂 2.0%。

1.2.2 液体菌种培养基(W/V)(pH=7.0)

蔗糖 3.0%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 1.0%, Na_2HPO_4 0.2%, NaH_2PO_4 0.2%。

1.2.3 摇瓶发酵培养基(W/V)(pH=7.0)

基本培养基:蔗糖 3.0%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 1.0%, Na_2HPO_4 0.2%, NaH_2PO_4 0.2%。

1.2.4 活菌计数培养基(W/V)(pH=7.0)

蔗糖 3.0%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 1.0%, Na_2HPO_4 0.2%, NaH_2PO_4 0.2%, 琼脂 2.0%。

1.3 培养条件

斜面菌种培养:30℃,恒温培养箱培养 24h。

液体菌种培养:用 $\Phi 1\text{mm}$ 的接种环取 3 环斜面菌种于液体培养基中,装液量 30 mL / 250 mL 三角瓶,八层纱布封口,30 ~ 31℃,160r/min 摇床培养 16 ~ 18h,镜检菌体形态正常且无杂菌后备用。

摇床发酵:基本条件:装液量 30 mL / 250 mL 三角瓶,接种量 2%(相对摇瓶装液量),八层纱布封口,30℃,160r/min,培养时间 16 ~ 18h。

活菌计数:30℃,恒温培养箱培养 24h。

1.4 分析方法

pH 值的测定:pH S-25 型 pH 测定仪。

生物量测定:血球计数法和平板涂布法活菌计数见文献[3]。

2 结果与讨论

2.1 菌株 SFU-9 生长曲线

采用血球计数方法,在发酵过程中每隔 3h 取一次样,直至 33h 时止。做出菌株的生长曲线如图 1 所示。

从图 1 可以看出,当培养时间达到 15 ~ 18h 左右时,菌种生长基本处于稳定期。在 20 ~ 25h 时,有芽孢形成并大量产生孢子。该实验以菌体为目的产物,又因孢子具有耐高温、耐挤压和耐酸碱等性能,

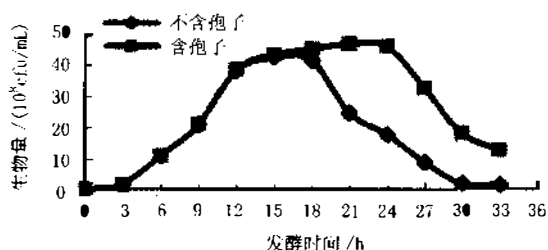


图 1 SFU-9 菌株生长曲线

Fig.1 The growth curve of strain SFU-9

能够长时期保持活力,故从图中可知,该菌株的种龄为 16~18h,发酵时间为 21~24h。

2.2 培养温度

温度的高低与发酵中的酶反应速率、氧在培养液中的溶解度和传递速率等密切相关,从而影响菌体生长和产物合成^[4]。本实验是在基本培养条件下,将培养温度由 30℃ 改为分别在 20, 25, 30, 35, 40, 45℃ 下培养,采用活菌计数的方法测定发酵液中的活菌含量。菌株 SFU-9 的生长与温度的关系如图 2 示。

从图 2 可以看出,该菌株的最佳生长温度是 30~32℃。

2.3 发酵液初始 pH 值

在基本培养基的组成不变的前提下,将培养基的初始 pH 值由 7.0 分别调为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 然后接种培养。采用活菌计数方法测定发酵液中的活菌含量。pH 值对菌株 SFU-9 的影响如图 3 示。

由此可知,当培养基的初始 pH 值为 5.5~6.8 时,发酵液中活菌含量超过 10^{11} cfu/mL, 该菌最适生长 pH 为 6.0~6.5。

2.4 接种量

在基本培养条件前提下,改变接种量,使接种量分别为 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 采用活菌计数方法测定发酵液中生物量。

接种量与发酵液中活菌总数的关系如图 4 所示,结果表明当接种量为 5% 时,发酵液中的活菌总数最大,可达 10^{11} cfu/mL。该研究的目的是取得最大菌体数,所以最佳接种量为 5%。

2.5 呼吸代谢对生长的影响

溶解氧是需氧菌发酵的必备条件,摇瓶装液量的多少直接影响氧的传递。本实验在基本培养条件前提下,改变装液量,使装液量分别为: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 mL, 然后接种培养。同样采用活菌计数方法测定发酵液中的活菌含量。菌株 SFU-9 对氧气的的需求情况如图 5 所示。

从图中可知,装液量为 28~33 mL/250 mL 时,发酵液中的活菌含量最高。

2.6 培养基优化

2.6.1 碳源的优化

将基础培养基的碳源蔗糖 3% 分别用表 1 中的碳源代替,制成培养基后接种培养,用活菌计数方法

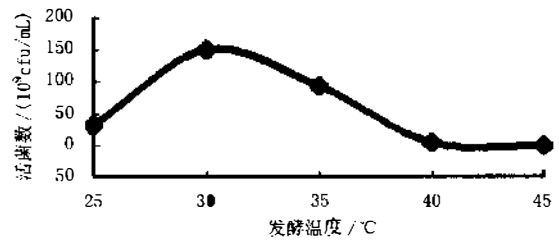


图 2 菌株 SFU-9 生长与温度的关系图

Fig.2 The effect of temperature on the growth of strain SFU-9

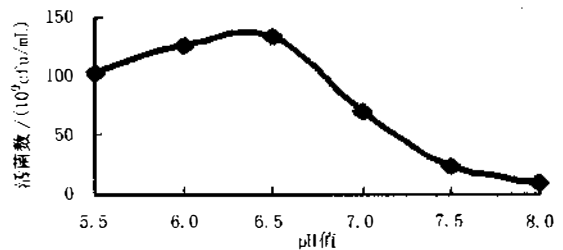


图 3 培养基 pH 值的确定

Fig.3 The effect of pH value on the growth of strain SFU-9

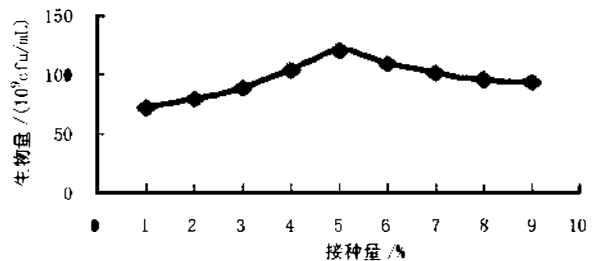


图 4 接种量对菌体生长的影响

Fig.4 The effect of inoculum size on the growth of strain SFU-9

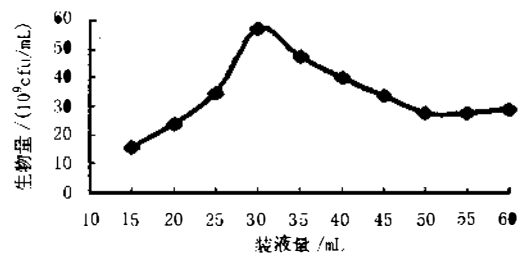


图 5 氧气对菌株生长的影响

Fig.5 The effect of oxygen on the growth of strain SFU-9

测定发酵液中的活菌含量, 结果见表 1。

表 1 碳源对菌体生长的影响

Tab.1 The effects of carbon sources on the growth of strain SFU-9

碳源	1	2	3	4	5	6	7
	蔗糖(对照)	葡萄糖	乳糖	可溶性淀粉	玉米淀粉	土豆淀粉	木薯淀粉
添加量(%)	3	3	3	3	3	3	3
生物量 10^8 cfu/mL	120	140	101	177	189	187	158

从表中可以看出, 最适合蜡状芽孢杆菌 SFU-9 生长的碳源是玉米淀粉, 其次为土豆淀粉和可溶性淀粉。

2.6.2 氮源的优化

将基础培养基中的蛋白胨和酵母膏用表 2 中的物质替代配制培养基, 用于发酵生产菌株 SFU-9。

表 2 氮源对菌体生长的影响

Tab.2 The effects of nitrogen sources on the growth of strain SFU-9

氮源	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	蛋白胨+酵母膏(对照)	酵母膏	蛋白胨	牛肉膏	啤酒酵母	豆粕粉	豆渣	NH_4Cl	尿素	NaNO_3
添加量(%)	0.5+1.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	固形物 2%	0.5	0.5	0.5
生物量 10^9 cfu/mL	123	310	136	120	580	520	261	12.7	11.5	10.8

从表 2 可以得知, 有机氮源较无机氮源更有利于蜡状芽孢杆菌 SFU-9 的生长, 其中以啤酒酵母为最佳, 豆粕粉、酵母膏效果次之。

2.6.3 无机盐的优化

将基础培养基中的 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 用表 3 中的无机盐代替配制培养基, 研究无机盐对菌株 SFU-9 生长的影响, 用活菌计数方法测定发酵液的活菌含量。

表 3 无机盐对菌体生长的影响

Tab.3 The effects of mineral on the growth of strain SFU-9

无机盐	1	2	3	4	5
	CaCl_2	KCl	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ (对照)
添加量(%)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2+0.2
生物量 10^8 cfu/mL	65	62	53	34	510

由此可知, 无机元素磷是蜡状芽孢杆菌 SFU-9 生长所必须的元素, 磷在菌体的核酸代谢、能量的贮存与传递方面起着重要的作用。同时, 磷酸盐也是重要的缓冲剂。

2.6.4 生长因子的影响

玉米浆富含生长因子, 本实验是在基础培养基的基础上添加玉米浆, 研究其对菌株 SFU-9 的生长促进作用。

从图 6 可知, 玉米浆对菌株的生长有促进作用, 添加量以 2~2.5% 为最佳。

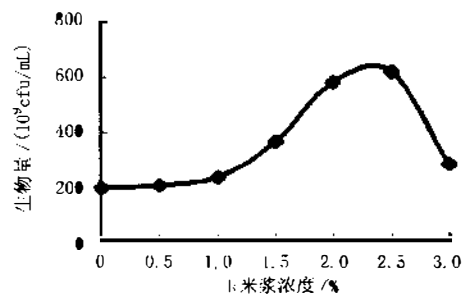


图 6 玉米浆浓度对发酵的影响
Fig.6 The effect of corn syrup on growth of strain SFU-9

2.6.5 正交实验

培养基中各组分之间有一定的内在关系,为寻找他们之间最恰当的配比,在研究了碳源、氮源、无机盐和生长因子等单因子对菌株 SFU-9 生长的影响以后,采用正交实验的方法研究这些因素对菌株生长的综合作用,以进一步完善培养基中各组分的功能,提高发酵液的生物量。

以啤酒酵母、玉米淀粉、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和玉米浆作为发酵因素,每个因素各选取三个水平,并按 $L_9(3^4)$ 正交表设计 9 组摇瓶发酵实验,每组做两个平行^[5]。正交实验的因素与水平和实验结果分析见表 4。

表 4 正交实验结果分析表

Tab.4 The results and statistic analysis table of orthogonal trial

实验 编号	A 啤酒酵母	B 玉米淀粉	C $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$	D 玉米浆	生物量 (10^{12} cfu / mL)		
					1	2	总和
1	1(1.0%)	1(1.0%)	1(0.1+0.1%)	1(1.5%)	2.40	1.99	4.39
2	1	2(2.0%)	2(0.2+0.2%)	2(2.0%)	2.60	2.54	5.14
3	1	3(3.0%)	3(0.3+0.3%)	3(2.5%)	0.91	1.94	2.85
4	2(1.5%)	2	2	3	2.46	2.33	4.79
5	2	3	3	1	1.71	1.72	3.43
6	2	1	1	2	2.00	2.34	4.34
7	3(2.0%)	3	3	2	1.08	1.89	2.97
8	3	1	1	3	2.20	1.83	4.03
9	3	2	2	1	1.83	2.34	4.17
K1	12.38	12.15	12.76	11.99			
K2	12.56	12.60	14.10	12.45			
K3	11.17	11.36	9.25	11.67			
k1	4.13	4.05	4.25	4.00			
k2	4.19	4.20	4.70	4.15			
k3	3.72	3.79	3.08	3.89			
极差 R	0.47	0.41	1.62	0.26			

注:()内为添加浓度(W/V)。

由极差可知,C的极差最大,D的极差最小。极差越大,反映该因素水平变动时,总指标变化越大,也就是该指标对综合指标的影响越大。因此,按极差大小顺序排列出因素的主要顺序为 $C > A > B > D$ 。据表 4 可知,菌株 SFU-9 最佳培养基配方为 $A_2B_2C_2D_2$ 。

3 结论

由实验可知,培养基的初始 pH 值、接种量、培养温度、培养时溶氧情况的培养条件和培养基的组成对菌株的生长有很大的影响。适合蜡状芽孢杆菌 SFU-9 菌株生长的最佳条件是:培养基初始 pH 值为 6.0~6.5,接种量 5%(相对摇瓶装液量),培养温度 30~32℃,装液量 28~33 mL/250 mL。通过单因子分析和正交实验,确定出蜡状芽孢杆菌 SFU-9 的最优化培养基组成为:玉米淀粉 2.0%,啤酒酵母 1.5%, NaH_2PO_4 0.2%, Na_2HPO_4 0.2%,玉米浆 2.0%。

参考文献:

- [1] 胡东兴,潘康成.微生态制剂及其作用机理[J].中国饲料,2001,3:14-16.
- [2] 王丽娟.益生菌的研究及其应用进展[J].饲料博览,1999,11(1):15-18.
- [3] 周得庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1983.78-84.
- [4] 熊宗贵.发酵工艺学原理[M].中国医药科技出版社,1995.110-125.
- [5] 上海市科学技术交流站编.正交实验设计法[M].上海:上海人民出版社,1975.45-54.