

# 鸡源双歧杆菌与鸡源乳酸杆菌混合发酵工艺的研究

廖晓寰, 杨汝德

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 本文对两株应用于动物微生态制剂生产的鸡源双歧杆菌 B171 和鸡源乳酸杆菌 M16 的混合发酵工艺进行了研究。研究表明, B171 和 M16 混合发酵的最适培养温度为 40 ℃, 初始发酵 pH 为 7.0, 最佳接种比例为 5%:5%; 发酵流程为先接种 B171, 发酵 6 h 后再接种 M16, 混合发酵 11 h 后终止。

**关键词:** 双歧杆菌; 乳酸杆菌; 混合发酵

中图分类号: TS201.3; 文献标识码: A; 文章篇号:1673-9078(2007)06-0020-03

## Research on the mixed culture fermentation of *Bifidobacterium Pullorum* and *Lactobacillus Acidophilus*

LIAO Xiao-huan, YANG Ru-de

(College of Bioscience and Bioengineering, SCUT, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The mixed culture fermentation properties of *Bifidobacterium Pullorum* B171 and *Lactobacillus Acidophilus* M16 were studied. The major result was follows: The optimized mix culture fermentation conditions of B171 and M16 were: pH value of media was 7.0, temperature was 40 ℃. The process of mix culture fermentation was inoculating B171 first and inoculating M16 6 hours later. The terminal time was 11 h after mixed culture fermentation.

**Key words:** *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; Mixed culture fermentation

在目前的动物饲养中, 由于饲养者与动物频繁接触, 若动物唾液、粪便、皮毛中含有致病病原体, 则饲养者将容易感染上相应的人禽共患疾病<sup>[1]</sup>。国外的资料统计表明, 仅在美国, 每年由于食用受人畜共患致病菌污染的肉类而导致死亡的就有数千例, 导致的患病人数更是高达数百万<sup>[2]</sup>。为了防止家禽患病并感染人类造成人畜共患病, 抗生素作为饲料添加剂目前被广泛应用于动物饲养, 这引发了动物胃肠道正常菌群失调, 产生耐药性、药物残留和降低畜产品品质等种种弊端<sup>[3]</sup>。

动物益生菌作为可改变肠道菌群而对动物施加有益影响的一类微生物, 可以帮助动物建立、维持正常肠道的优势种群和菌群平衡, 具有广谱的、非特异性抗菌、抑菌和杀菌作用, 因此, 作为微生物饲料添加剂被越来越广泛地应用。

传统的多菌种微生态制剂常常采用各个菌种单独发酵, 在制剂前再将菌体按比例混合的发酵方法。大规模工业生产时若采用这种方法, 则必须使用多个发酵罐和使用菌体混合设备, 设备成本和操作成本较高。本文研究的两种鸡源益生菌将用于制备微生态制剂,

收稿日期: 2007-03-08

为降低工业生产成本, 提高单位成本产率, 本文对其进行了混合发酵的工艺研究。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌种

鸡源双歧杆菌 (B171), 鸡源乳杆菌 (M16), 从鸡中肠道中分离出, 由华南理工大学生物科学与工程学院微生物菌种室提供。

##### 1.1.2 培养基

##### 1.1.2.1 B171, M16 活化与培养用培养基 (PTYG 培养基)<sup>[4]</sup>

胰蛋白胨 0.5 g; 大豆蛋白胨 0.5 g; 酵母浸出粉 1.0 g; 葡萄糖 1.0 g; 吐温-80 0.1 mL; 蒸馏水; 盐溶液 4 mL, pH 6.8~7.0, 113 ℃ 灭菌 30 min (盐溶液成分和制备: 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.48 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, NaHCO<sub>3</sub> 10.0 g, NaCl 2.0 g, 在 300 mL 蒸馏水中混合 CaCl<sub>2</sub> 和 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 直至溶解。加 500 mL 水, 边搅拌边缓慢加入其他盐类, 继续搅拌直到溶解。加入 200 mL 蒸馏水, 混合后贮存于 4 ℃ 备用)。

1.1.2.2 培养基(改良 MRS 组分培养基)<sup>[5]</sup>

胰蛋白胨 0.5 g, 大豆蛋白胨 0.5 g, 细菌蛋白胨 0.5 g, 酵母浸出粉 0.5 g, 葡萄糖 1.5 g, 乳糖 0.5 g, 5% 半胱氨酸 1.0 mL, 吐温-80 0.1 mL, 氯化镁 0.05 g, 柠檬酸三铵 0.2 g, 硫酸锰 0.005 g, 乙酸钠 0.5 g, 无水磷酸氢二钠 0.2 g, X-gal 6 mg (培养基灭菌后在无菌室中添加), 琼脂 2.0 g, 蒸馏水 100 mL, pH 6.4±0.2, 121 °C 灭菌 20 min。

## 1.2 B171, M16 单菌发酵生长特性研究

## 1.2.1 B171 最适培养初始 pH 值和温度测定方法

在 PTYG 培养基中, 调培养基的初始 pH 值分别至 5.0、5.5、6.0、7.0 和 7.5, 然后按 5% 接种量接种, 于 38 °C 下厌氧培养 24 h, 测定发酵液的 OD<sub>600</sub> 值, 确定最适初始 pH 值。

在 PTYG 培养基中, 在初始 pH 7.0 的条件下, 分别调培养温度至 32 °C、37 °C、38 °C、40 °C 和 43 °C, 培养 24 h 后测定发酵液 OD<sub>600</sub> 值, 确定最适培养温度。

1.2.2 B171, M16 单菌种发酵生长曲线测定<sup>[6]</sup>

按 5% 的接种量把已活化的 B171 接种于装有 150 mL PTYG 液体培养基的三角瓶中(培养基 pH 为 7.0), 分别在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h、26 h、29 h 和 32 h 下测定菌数和发酵液 pH 值。以培养时间为横坐标, 相应的活菌数与 pH 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

对于 M16, 测定方法同上, 取样时间点为 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、11 h、14 h、17 h、20 h、23 h 和 26 h。

## 1.3 混合发酵工艺研究

## 1.3.1 混合发酵后活菌数测定方法

将混合发酵液稀释到合适倍数, 分别吸取 1 mL 稀释液涂布 PTYG 培养基和改良 MRS 培养基, 40 °C 恒温培养 36 h 后, 由于 B171 与 M16 在普通 PTYG 均能正常生长, 而在改良 MRS 上, 只有 M16 能正常生长, 根据减法原理即可推算出 B171 和 M16 各自的活菌数。结果以 10<sup>7</sup> 个 cfu/ml 报告菌体浓度。

## 1.3.2 发酵流程的设计

发酵流程选择首先要根据 B171, M16 的生长曲线确定接种顺序和接种间隔时间。然后按 5%:5% 的接种量把已活化的 B171 和 M16 按初步设计的流程接种于 PTYG 发酵培养基, 进行混合生长曲线测定。然后根据生长曲线、生产上对活菌量和活菌量比例的要求, 确定发酵结束最适时间。

## 1.3.3 混合发酵生长曲线测定

将 B171 和 M16 按初步设计的接种顺序和接种间

隔时间进行接种, 于 150 mL PTYG 液体培养基的三角瓶中(培养基 pH 为 7.0)发酵, 分别在 0 h、3 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、25 h、28 h 和 31 h 测定活菌数和发酵液 pH 值。以培养时间为横坐标, B171 和 M16 相应的活菌量与 pH 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

## 1.3.4 接种量优化

不同菌种混合培养后, 各自的最终菌量受其接种量以及接种比例的影响。将 B17 和 M16 按 5%:5%, 5%:4%, 5%:3% 在 PTYG 培养基中按发酵流程进行混合发酵, 发酵结束后测定不同比例混合发酵后 B171 和 M16 的菌数。

## 2 结果与分析

## 2.1 B171, M16 单菌生长特性

## 2.1.1 B171 最适初始 pH 和最适温度

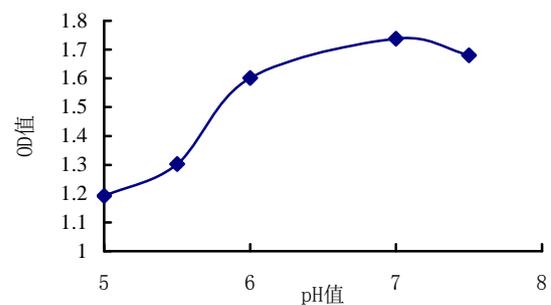


图 1 不同初始 pH 对 B17 生长的影响

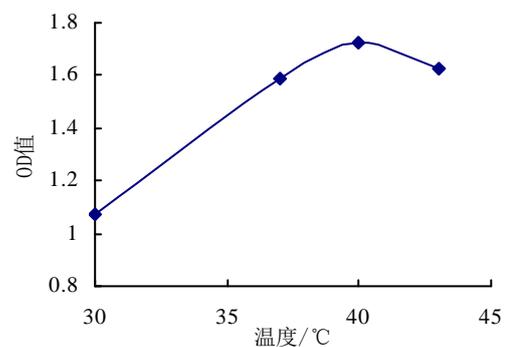


图 2 不同培养温度对 B17 生长的影响

由图 1、图 2 可以看出, B171 的最适初始 pH 为 7.0, 最适培养温度为 40 °C。

## 2.1.2 B171、M16 生长曲线和发酵过程 pH 变化

在初始 pH 为 7.0 和 40 °C 下进行 B171 以及 M16 的生长曲线测定和发酵过程 pH 变化测定, 所得结果如图 3、图 4 所示。

由图 3、图 4 可知, B171 与 M16 的生长特性有较大差异。B171 属于生长慢的菌种; M16 则属于生长较快的菌种, 故不能同时接种到培养基中混合发酵。

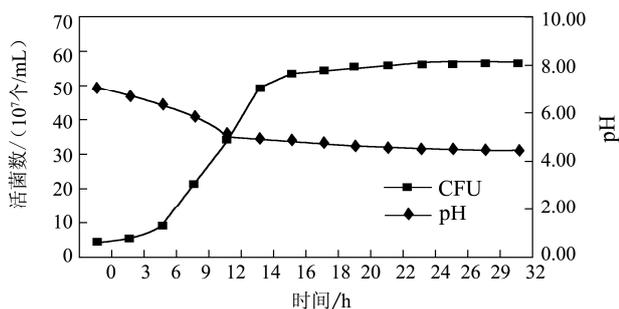


图3 B171 的生长曲线和 pH 变化

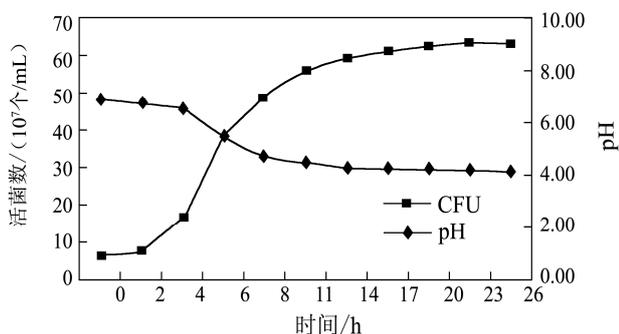


图4 M16 生长曲线和 pH 变化

## 2.2 B171 与 M16 混合发酵结果分析

### 2.2.1 混合发酵方案的确定

根据图 3、图 4 的生长曲线，设计在混合发酵时先接种 B171，待生长 6 h 进入生长旺盛的对数期后再接种较为粗生的 M16，使 B171 的生长少受 M16 加入的影响。从而测定发酵生长曲线及确定发酵结束时间。

在初始 pH 7.0 和培养温度 40 °C 的培养条件下，用上述流程和方法进行混合发酵生长曲线测定，所得结果如图 5 所示。其与单菌发酵生长特性的对比如表 1 所示。

由图 5 和表 1 可知，混合发酵使得 B171 与 M16 的对数期均变短，两菌发酵的稳定期也变短，使整个发酵周期变短。

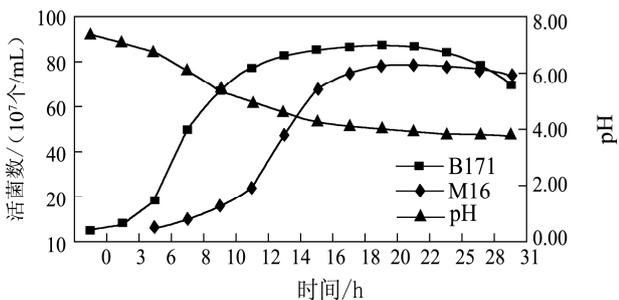


图5 B171, M16 混合生长曲线和 pH 变化

表 1 混合发酵与单菌发酵生长特性对比

时间点	混合发酵		单菌发酵	
	B171	M16	B171	M16
进入对数期	6h	6h	6h	4h
进入稳定期	12h	10h	14h	11h
进入衰亡期	21h	19h	24h	23h

### 2.2.2 接种量的优化

将 B171, M16 分别以表 2 的接种量，按确定的混合发酵流程进行发酵，发酵中止后利用稀释涂布平板方法，减法原理进行活菌计数，结果如表 2 所示。

表 2 不同接种量配比培养后活菌计数 单位:  $\times 10^7$  个/mL

菌种	活菌数 (接种比 B:M)		
B171	47 (5:5)	95(5:4)	135(5:3)
M16	54 (5:5)	42(5:4)	23(5:3)

根据表 2 可知，接种量比例不同，活菌总数以及不同菌种的活菌数量有明显差别。随着 B:M 比例的增加，活菌总数增加，但是 M16 的数量减少很快，B171 的数量增加很快。考虑混合发酵之后制成活菌制剂，要保证一定数量的活菌，而且双歧杆菌和乳杆菌比例接近 1:1 最适合，因此确定接种比例确定为 B:M=5%:5%。

## 3 结论

B171 和 M16 菌种生长特性差异较大，B171 生长慢，而 M16 生长较快，故结合其各自生长特性设计了接种顺序和时间差，使 B171 的生长少受 M16 加入的影响。其混合发酵工艺为：先将 5% B171 在 40 °C、初始 pH 为 7.0 条件下发酵 6 h 后接入 5% M16，混合发酵 11 h 后终止。

## 参考文献

- [1] 王素珍,周丽春.浅谈人禽共患疾病禽流感的防护[J].西南军医,2006,4:14
- [2] Report of U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service on 2004
- [3] 郝生宏,杨荣芳.国内外益生菌生产应用现状[J].饲料研究,2004,6
- [4] 凌代文.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].中国轻工业出版社,1999:107-108
- [5] 居建华,徐万军,王敏.一种双歧杆菌鉴别计数培养基的研制[J].中国微生态学杂志,2000,12(5):291-294
- [6] 顾淑萍,刘正,宋培智.乳杆菌的生长曲线和世代时间测定[J].上海口腔医学,1998,7(4):226-232