

复合微生物制剂制备与发酵白首乌二级浆检测

方希修^{1,2*}, 王冬梅¹, 王奕男³, 周雪松⁴, 方圆², 齐富刚¹, 王凤平²

(1. 江苏农牧科技职业学院, 泰州 225300; 2. 江苏康诺农业科技有限公司, 滨海 224500; 3. 黑龙江齐齐哈尔中学, 齐齐哈尔 161000; 4. 江苏滨海县农业科技研究所, 滨海 224500)

摘要: **目的** 制备固态复合微生物制剂并进行发酵白首乌二级浆的成分检测。**方法** 选用枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、保加利亚乳杆菌和乳酸菌等作为发酵菌种制备固态复合微生物制剂, 然后利用其接种并进行白首乌二级浆发酵, 并测定固态复合微生物制剂的营养成分和菌体生物量, 同时分析发酵白首乌二级浆的氨基酸含量变化。**结果** 固态复合微生物制剂的有效活菌总数为 $3.09 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, 菌体生物量为 5.69 g/L , 菌体总蛋白得率为 0.194% 。发酵前白首乌二级浆粉氨基酸总量为 0.788 g/100 g , 发酵后白首乌二级浆粉氨基酸总量为 1.193 g/100 g , 其中脯氨酸与丙氨酸含量比较高, 分别达到 0.387 g/100 g 和 0.085 g/100 g 。**结论** 制备的固态复合微生物制剂活细菌数量能够保证白首乌二级浆的发酵, 发酵后白首乌二级浆粉的品质得到提高, 从而为白首乌二级浆发酵饮料的制备提供科学依据。

关键词: 复合微生物制剂; 白首乌; 白首乌二级浆

Compound microorganism preparation and detection of fermentation product in *Cynanchum bungei* secondary pulp

FANG Xi-Xiu^{1,2*}, WANG Dong-Mei¹, WANG Yi-Nan³, ZHOU Xue-Song⁴, FANG Yuan²,
QI Fu-Gang², WANG Feng-Ping²

(1. Jiangsu Agricultural and Husbandry College, Taizhou 225300, China; 2. Jiangsu Kangnuo Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Binhai 224500, China; 3. Heilongjiang Qiqihar Middle School, Qiqihar 161000, China; 4. Institute of Agricultural Science and Technology of Jiangsu Binhai County, Binhai, 224500, China)

ABSTRACT: Objective To prepare compound microorganism and detect the fermentation products in *Cynanchum bungei* secondary slurry. **Method** *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus* were selected as the optimal fermentative strains, then used for fermentation in *Cynanchum bungei* secondary pulp after expanding culture. Then the nutrients and amount of bacteria biomass were measured, and the amino acid content changes of the fermentation *Cynanchum bungei* secondary pulp were analyzed. **Results** The total effective viable solid-state compound microorganism preparation was $3.09 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, the microorganism biomass was 5.69 g/L , and total bacterial proteins percentage was 0.194 g/L . Total amino acids of *Cynanchum bungei* secondary pulp were 0.788 g/100 g and 1.193 g/100 g respectively before and after fermentation, in which the proline and phenylalanine content were relatively high, which reached to 0.387 g/100 g and 0.085 g/100 g respectively. **Conclusion** The solid compound microorganism preparation number of live bacteria can guarantee the fermentation of *Cynanchum bungei*

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(14)2139)

Fund: Supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Projects of Jiangsu Province (CX(14)2139)

*通讯作者: 方希修, 教授, 博士, 主要研究方向为分子免疫与分子营养代谢。E-mail: 381162855@qq.com

*Corresponding author: FANG Xi-Xiu, Professor, Doctor, Jiangsu Agricultural and Husbandry College, Taizhou 225300, China. E-mail: 381162855@qq.com

secondary pulp, and the quality of *Cynanchum bungei* secondary pulp has improved, which can provide scientific basis for the production of fermentation beverage of *Cynanchum bungei* secondary pulp.

KEY WORDS: compound microorganism preparation; *Cynanchum bungei*; *Cynanchum bungei* secondary pulp

1 引言

滨海白首乌是生长在中国的特有物种,是中国传统的食、药、美容兼用植物。白首乌味甘、苦,性微温,含有C₂₁甾苷等生物活性物质与多种营养成分,具有补肝肾、强筋骨、益精血、健脾消食和解毒疗疮等功效^[1]。白首乌具有清除自由基、提高特异和非特异性免疫、抑制肿瘤、降低胆固醇及降低心肌耗氧量等功效。白首乌粉加工过程中一次洗涤过滤后上清液和废渣合并的浆液,简称白首乌二级浆。白首乌二级浆为制备白首乌淀粉时,附在淀粉上面的部分,一般被单独隔离或废弃,但含有较多的C₂₁甾苷等生物活性物质。

复合微生物制剂由多种微生物复合组成,性质稳定且功能广泛^[2-6]。复合微生物制剂按合适比例共同培养,能充分发挥群体的联合作用优势^[7]。可用于发酵的微生物主要包括枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、地衣芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌等,其适宜生长温度是30~37℃,适宜pH为7.0~7.2。枯草芽孢杆菌能够产生蛋白酶、 α -淀粉酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶、植酸酶、果胶酶和木聚糖酶等十几种酶^[8]。蜡状芽孢杆菌通过产生各种酶类抑制、降解或水解其他病原体,蜡状芽孢杆菌产生的酶类主要包括溶菌酶^[9]、氨基酸转氨酶^[10]、酰胺酶^[11]和纤溶酶^[12]等。蜡状芽孢杆菌进入肠道后,主要消耗肠道内氧气,创造厌氧环境,促进厌氧菌生长,能够调整肠道菌群失调。乳酸菌对胃酸性环境有一定的耐受性,在动物体内可以通过生物拮抗、降低pH值来阻止和抑制致病菌的进入和定植,从而减少有害物质的产生。

本研究以白首乌二级浆为发酵的主原料,选用枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、保加利亚乳杆菌和乳酸菌等作为发酵菌种制备固态复合微生物制剂,然后利用制备的复合微生物制剂接种并进行白首乌二级浆发酵,以增加白首乌二级浆的营养成分,通过添加乳或其他成分可生产发酵型白首乌乳饮料。

2 材料与amp;方法

2.1 主要菌种及其来源

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜酸乳酸菌La-IM₂(*Lactobacillus acidophilus*, La-IM₂)等菌种由江苏康诺农业科技有限公司与江苏农牧科技职业学院营养研究所提供。

2.2 培养基

按照各菌种培养基配方进行自配,各菌种培养基配制如下:

枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌用牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏4.5g,蛋白胨9g,NaCl5g,H₂O1000mL,调pH至7.2~7.4,于121℃下灭菌20min。

保加利亚乳杆菌用培养基:牛肉膏4.8g,蛋白胨9.5g,乳糖4.9g,吐温80(Tween 80)1g,L-半胱氨酸0.11g,H₂O1000mL,调pH至7,于121℃下灭菌15min。

乳酸菌用培养基:蛋白胨9.5g,牛肉膏10.5g,酵母膏5.3g,K₂HPO₄·3H₂O2g,乙酸钠4.5g,葡萄糖19g,吐温800.8g,柠檬酸二铵2g,MgSO₄·7H₂O0.59g,MnSO₄·4H₂O0.28g,琼脂14g,加蒸馏水1000mL,调PH至6.2,于120℃下灭菌15min备用。

2.3 主要仪器设备

CRDX-28型高压蒸汽灭菌器(上海安亭科学仪器厂);GNP-9050型隔水式恒温培养箱(上海精宏试验设备有限公司生产);GZX-DH-2630A型恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂生产);LDZ5-2型离心机(杭州雷琪实验器材有限公司生产);ALC-110.4型电子分析天平(深圳市泰立仪器仪表有限公司生产);THZ-82A台式恒温振荡器(常州国华电器有限公司生产);HN-12A红外线电煮炉(上海勇规分析仪器有限公司生产);SP-7569C紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司生产);KJELTEC 8400全自动定氮仪(瑞典FOSS.TECATOR公司生产);SZF-06A脂肪测定仪(上海洪纪仪器设备有限公司生产)测定。

2.4 实验方法

2.4.1 固态复合微生物制剂的工艺流程

固态复合微生物制剂研制的工艺流程见图1。利用厌氧发酵,按发酵培养基4%的量将乳酸菌二级乳酸菌菌种接种到乳酸菌发酵培养基中混匀,密封发酵2.5d。利用好氧发酵,按发酵培养基4%的量将各二级芽孢杆菌菌种分别接种到发酵培养基中混匀,发酵2.5d。将白首乌二级浆浓缩、烘干,粉碎过40目筛,制成白首乌二级浆粉,灭菌,冷却,备用。

2.4.2 白首乌二级浆发酵饮料的制备

固体发酵条件为:发酵温度30℃,控制pH值为7.1,发酵时间为24h,得到发酵白首乌二级浆。发酵结束后,将发酵后的产物放入烘箱中,58℃烘干后粉碎过40目筛。产品烘干后的水分含量低于12.5%。

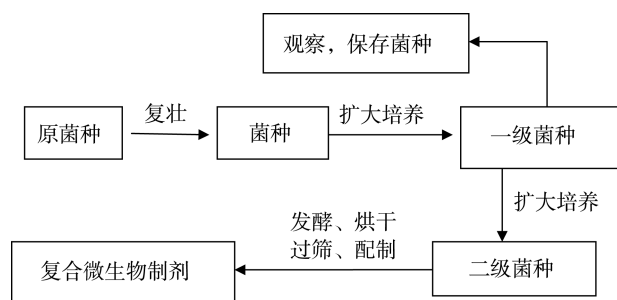


图 1 固态复合微生物制剂的工艺流程

Fig. 1 The technical process of solid compound microbial preparation

2.4.3 菌体测定指标

(1) 发酵后的活菌数测定

取 1 mL 发酵培养液, 以生理盐水稀释后用血球计数板测定活菌数。固态复合微生物制剂活细菌数计数采用平板计数法, 将含乳酸菌的菌液涂布在 MRS 平板上, 然后覆盖一层琼脂, 28 °C 恒温箱中培养 48 h 后计数^[13,14]。

(2) 菌体生物量测定^[15]

取发酵液, 以 4000 r/min 离心 10 min, 蒸馏水洗涤 3 次, 收集菌体, 冷冻干燥, 称重。

(3) 菌体粗蛋白质含量测定

菌体粗蛋白质含量测定采用国标 GB 5009.5-2010《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》^[16]进行测定。

(4) 总蛋白得率计算^[17]

菌体总蛋白得率(g/L)=菌体生物量(g/L)×菌体 CP 含量(%)。

2.4.4 固态复合微生物制剂营养成分分析

粗蛋白采用凯氏半微量定氮法测定; 粗脂肪采用 SZF-06A 脂肪测定仪测定; 粗纤维按 GB/T 6434-2006《饲料中粗纤维的含量测定 过滤法》^[18]测定。

2.4.5 氨基酸含量的测定方法

采用柱前衍生-高效液相色谱法^[19,20]进行测定。样品处理如下: 称取粉碎样品 25 mg 于水解管中, 加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl 混匀, 置液氮中冷冻, 然后抽真空至 7 Pa 后封口。将水解管放在(110±1) °C 恒温干燥箱中水解 22~24 h, 冷却, 混匀, 开管过滤, 取适量的滤液于 60 °C 蒸发至干加入 3~5 mL pH 2.2 的柠檬酸钠缓冲液, 摇匀, 离心, 取上清液测定。

3 结果与分析

3.1 固态复合微生物制剂中活细菌数的含量

通过微生物发酵培养复配制成固态复合微生物制剂, 测定其活细菌数量, 固态复合微生物制剂有效活菌总数为 $3.09 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, 复合微生物制剂中各种菌的比例如下: 枯草芽孢杆菌占 20%、蜡状芽孢杆菌占 18%、保加利亚乳杆菌占 23%、嗜酸乳酸菌占 39%, 其有效菌数分别为 0.62×10^9 、 0.55×10^9 、 0.71×10^9 和 $1.21 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$, 这表明在活细菌数量方面, 菌剂能保证在动物机体中发挥作用。

3.2 固态复合微生物制剂中各种营养成分的含量

由表 1 可以看出, 固态复合微生物制剂的营养成分均发生了明显变化。固态复合微生物制剂中的各种微生物利用原料营养物质进行发酵, 产生了蛋白质、酶和氨基酸等营养成分, 对样品重复测定 3 次, 取其平均值, 结果见表 1。

表 1 固态复合微生物制剂的营养成份测定结果(n=3)
Table 1 Nutrients measurement results of solid compound microbial preparation (n=3)

| 营养成份 | 固态复合微生物制剂 |
|-----------|-----------|
| 粗蛋白 g/L | 3.41 |
| 粗脂肪 g/L | 0.31 |
| 粗纤维 g/L | 1.26 |
| 菌体生物量 g/L | 5.69 |
| 菌体总蛋白得率/% | 0.194 |

3.3 氨基酸分析结果

取白首乌二级浆粉与发酵后的白首乌二级浆粉, 分别快速测定其水解氨基酸的含量, 测得未发酵白首乌二级浆粉氨基酸总量为 0.788 g/100 g, 其中脯氨酸与丙氨酸含量比较高, 分别达到 0.36 g/100 g、0.063 g/100 g; 测得发酵后白首乌二级浆粉氨基酸总量为 1.193 g/100 g, 其中脯氨酸与丙氨酸含量比较高, 分别达到 0.387 g/100 g、0.085 g/100 g。发酵后, 酪氨酸、精氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等含量增加 1~2 倍, 结果见表 2。

表 2 白首乌二级浆粉发酵前后氨基酸含量的结果(n=3)
Table 2 Amino acid content before and after fermentation of *Cynanchum bungei* secondary pulp (n=3)

| 氨基酸名称 | 发酵前含量 (g/100 g) | 发酵后含量 (g/100 g) | 含量变化(%) |
|-------|-----------------|-----------------|---------|
| 天门冬氨酸 | 0.043 | 0.081 | 88.37 |
| 谷氨酸 | 0.079 | 0.14 | 77.22 |
| 丝氨酸 | 0.009 | 0.019 | 111.11 |
| 组氨酸 | 0.024 | 0.041 | 1.70 |
| 甘氨酸 | 0.038 | 0.049 | 28.95 |
| 苏氨酸 | 0.02 | 0.041 | 105.00 |
| 精氨酸 | 0.026 | 0.067 | 157.69 |
| 丙氨酸 | 0.063 | 0.085 | 34.92 |
| 酪氨酸 | 0.008 | 0.03 | 275.00 |
| 胱氨酸 | 0.007 | 0.005 | -28.57 |
| 缬氨酸 | 0.025 | 0.054 | 116.00 |
| 蛋氨酸 | 0.005 | 0.008 | 60.00 |
| 苯丙氨酸 | 0.021 | 0.042 | 100.00 |
| 异亮氨酸 | 0.018 | 0.043 | 138.89 |
| 亮氨酸 | 0.024 | 0.06 | 150.00 |
| 赖氨酸 | 0.018 | 0.041 | 127.78 |
| 脯氨酸 | 0.36 | 0.387 | 7.50 |
| 总氨基酸 | 0.788 | 1.193 | |

4 讨论

目前微生物发酵技术常采用复合微生物制剂中的一种或几种的混合发酵工艺。本研究制备的固态复合微生物制剂主要菌种均为安全可食用的微生物菌种,包括纤枝草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)和乳酸菌(*Lactobacillus*)等。研究发现,固态复合微生物制剂的有效活菌总数为 $3.09 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$,菌体生物量为 5.69 g/L ,菌体总蛋白得率为0.194%。发酵前白首乌二级浆粉氨基酸总量为 0.788 g/100 g ,发酵后白首乌二级浆粉氨基酸总量为 1.193 g/100 g ,其中脯氨酸与丙氨酸含量比较高,分别达到 0.387 g/100 g 、 0.085 g/100 g 。发酵后,酪氨酸、精氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等含量增加1~2倍。制备的固态复合微生物制剂活细菌数量能够保证白首乌二级浆的发酵,发酵后白首乌二级浆粉部分氨基酸含量增加,提高了白首乌二级浆粉的品质。

参考文献

- [1] 方希修,王冬梅,顾海华,等.白首乌的繁殖技术与管理[J].农业开发与装备,2014,4:118.
Fang XX, Wang DM, Gu HH, et al. Reproductive technology and management of *Cynanchum bungei* [J]. Agric Dev Equip, 2014, 4: 118.
- [2] 穆晓峰. EM 生物技术在畜禽生产中的应用[J]. 西北民族学院学报(自然科学版), 2000, 21(3): 55-58.
Mu XF. EM application of biotechnology in animal production [J]. Northwest Univ Nation (Nat Sci Ed), 2000, 21(3): 55-58.
- [3] 安永义. 活菌制剂的作用及其研究应用[J]. 饲料研究, 1995, (8): 2-4.
An YY. Effect and application of viable preparations [J]. Feed Res, 1995, (8): 2-4.
- [4] 薛冬琳,殷若新,庄俊峰. 饲用芽孢杆菌在当前畜牧业中的应用[J]. 山东家禽, 2004, (12): 34-36.
Xue DL, Yin RX, Zhuang JF. Application of feeding bacillus in the current animal husbandry [J]. Shandong Poultry, 2004, (12): 34-36.
- [5] 谢玺文,张翠霞,陈丽媛,等. 饲用微生物的应用及研究现状[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(3): 47-53.
Xie XW, Zhang CX, Chen LY, et al. Application and research status of microbial feed [J] J Microbiol, 2001, 21(3): 47-53.
- [6] 王德培,管叙龙,丁友昉,等. 多菌株混合发酵豆粕的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2011, (4): 36-39.
WANG DP, Guan XL, Ding YF, et al. Research of Multi-strain mixed fermented soybean meal [J]. Food Feed Ind, 2011, (4): 36-39.
- [7] 杨艳红,王伯初,时兰春,等. 复合微生物制剂的综合利用研究进展[J]. 重庆大学学报, 2003, 26(6): 81-85.
YANG YH, WANG BC, SHI LC, et al. Research progress of the comprehensive utilization of compound microbial preparation [J]. J Chongqing Univ, 2003, 26(6): 81-85.
- [8] 袁小平,王静,姚惠源. 枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶的纯化与性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(8): 55-59.
YUAN XP, WANG J, YAO HY. Research on purification and properties of the *Bacillus subtilis* endo-xylanase [J]. Food Ferment Ind, 2004, 30(8): 55-59.
- [9] NAKAMURA N, NAKANO K, SUGIURA N, et al. A novel Cyanobacteriolytic bacterium, *Bacillus cereus*, isolated from a eutrophic lake [J]. J Biosci Bioeng, 2003, 95(2): 179-184.
- [10] 王晶,李江华,房峻. 转氨酶产生菌的筛选鉴定及其摇瓶发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1341-1347.
Wang J, Li JH, Fang J. Screening and identification of transaminase producing strains, and optimization of fermentation conditions [J]. J Microbiol, 2008, 35(9): 1341-1347.
- [11] 张俊伟,郑裕国,沈寅初. 蜡状芽孢杆菌 ZJB-07112 酰胺酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 化工学报, 2008, 39(3): 624-629.
Zhang JW, Zheng JG, Shen YC. Purification of *Bacillus cereus* ZJB-07112-lactamase and its characterization [J]. Chem Technol, 2008, 39(3): 624-629.
- [12] 袁洪水,张爱莲,辛欣,等. 蜡状芽孢杆菌菌株纤溶酶的酶学性质[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2008, 28(3): 305-311.
Yuan HS, Zhang AP, Xin X, et al. Characterization of *Bacillus cereus* strain fibrinolytic enzyme [J]. J Hebei Univ (Nat Sci Ed), 2008, 28(3): 305-311.
- [13] GB/T 4789.2-2003. 食品卫生微生物学检验菌落总数测定[S].
GB/T 4789.2-2003 Microbiological examination of food hygiene colony assay [S].
- [14] GB/T 4789.35-2008. 食品卫生微生物学检验 食品中乳酸菌检验[S].
GB/T 4789.35-2008 Microbiological examination of food hygiene colony assay *Lactic acid* bacteria inspection in food [S].
- [15] 马勇,樊永军. 用 OD 值监测产油酵母培养过程中的菌体生物量变化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(12): 7342-7343, 7346.
Ma Y, Fang YJ. Monitoring changes in biomass using OD in the culture process of the fermentation with the oleaginous yeast [J]. Anhui Agric Sci, 2011, 39(12): 7342-7343, 7346.
- [16] GB 50095-2010 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].
GB 50095-2010 National Food Safety Standard-Determination of protein in foods [S].
- [17] 何海燕,覃拥灵. 利用甘蔗糖蜜生产饲料酵母发酵条件的研究[J]. 中国饲料, 2007, (7): 38-41.
He HY, Tan YL. Fermentation conditions research of producing yeast fermentation using of sugar cane molasses [J]. Chin Feed, 2007, (7): 38-41.
- [18] GB/T6434-2006 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法[S].
GB/T6434-2006 Determination of feed crude fiber content Filtration [S].
- [19] 杜平,王新风,冯辉,等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定白刺果中氨基酸含量[J]. 化学分析计量, 2014, 23(1): 7-10.
Du P, Wang XF, Feng H, et al. Determination of amino acids in white thorn fruit by pre-column derivatization- HPLC [J]. Chem Anal Meas, 2014, 23(1): 7-10.
- [20] 宋志峰,王丽,纪锋,等. 高效液相色谱法测定饲料中氨基酸含量的改进[J]. 中国饲料, 2007, 6: 26-33.
Song ZF, Wang L, Ji F, et al. Improvement of amino acids feed determination using high performance liquid chromatography [J]. Chin Feed, 2007, 6: 26-33.

(责任编辑:姚菲)

作者简介



方希修,博士,教授,主要研究方向为分子免疫与分子营养代谢。
E-mail: 381162855@qq.com