

# 丁酸梭菌猪血粉固体培养基的设计与优化

## Design and optimization of solid fermentation of porcine blood powder medium for *Clostridium butyricum*

秦东方<sup>1</sup> 刘爱民<sup>2</sup> 李豪<sup>1</sup>

QIN Dong-fang<sup>1</sup> LIU Ai-min<sup>2</sup> LI Hao<sup>1</sup>

(1. 马鞍山师范高等专科学校, 安徽 马鞍山 243041; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241002)

(1. Ma'an Shan Teacher's College, Ma'anshan, Anhui 243041, China;

2. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241002, China)

**摘要:**为了达到猪血有效降解与丁酸梭菌微生物生态制剂偶联生产的目的,运用混料设计方法对丁酸梭菌的猪血粉固体培养基进行设计和优化,建立数学回归模型,探讨培养基各成分及其之间的交互作用对结果的影响,并将其发酵产物应用于饲料。结果表明:最优化配方为促生长因子 4.8%、玉米粉 46.3%、猪血粉 49.0%,在该条件下丁酸梭菌可以达到  $8.18 \times 10^7$  CFU/g,游离氨基酸态氮的含量由发酵前的 0.02 g/100 g 增加到 3.13 g/100 g。方差分析和验证实验都表明应用混料设计法建立的数学模型适用于丁酸梭菌的猪血粉固体培养基优化。

**关键词:**丁酸梭菌;混料设计;培养基配方;猪血粉;固体发酵

**Abstract:** For the purpose of joint production of hydrolysis of porcine blood and microbial ecology preparation of *Clostridium butyricum*, it was studied that the solid medium formulation suitable for the growth and reproduction of *C. butyricum* was made of porcine blood powder, and the fermentation products would be used in feed. The formulation of the solid medium formulation was designed and optimized by the mean of mixture design. Moreover, the mathematical regression model of three components of solid medium was established, and the various components and the interaction between them were also discussed. Furthermore, the results showed that the optimum formula was constituted by the growth promoting factor 4.8%, corn flour 46.3%, porcine blood powder 46.3%. On this condition, the number of *C. butyricum* was expected to reach  $8.18 \times 10^7$  CFU/g, and the content of free amino acid nitrogen increased

from 0.02 g/100 g to 3.13 g/100 g during the fermentation. Consequently, variance analysis and verification test both showed that the mathematical model established by mixture design method was suitable for optimizing the solid fermentation of porcine blood powder medium for *C. butyricum*.

**Keywords:** *Clostridium butyricum*; mixture design; substrate prescription; porcine blood powder; solid fermentation

丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)又名酪酸菌,是从健康人和动物肠道中分离出来的一种严格厌氧的革兰氏阳性芽孢杆菌<sup>[1-2]</sup>,具有产丁酸、叶酸等益生物质的特性<sup>[3]</sup>,可促进动物生长、调节动物肠道微生态平衡、提高机体免疫力,抑制肠道内致病菌生长繁殖,在畜牧养殖中具有广阔的应用前景<sup>[4-5]</sup>。同时,丁酸梭菌在生长过程中可以产生诸多酶系,如蛋白酶系<sup>[6-7]</sup>、淀粉酶系等<sup>[8]</sup>,这些酶可以将饲料中的大分子蛋白质和淀粉水解成为小分子物质,既有利于丁酸梭菌的增殖生长,又能提供动物可以消化吸收的小分子营养物质,提高了原料利用率。

猪血是一种价格低廉的畜产品加工副产物,在中国资源十分丰富。新鲜猪血中含有约 19% 的蛋白质,其氨基酸组成平衡,其中赖氨酸和色氨酸含量比较高,是一种优质的蛋白质和氨基酸资源<sup>[9]</sup>。另外,猪血中含有丰富的具有维生素和铁、钾、磷、镁、钙等矿物质,营养均衡,价值较高<sup>[10]</sup>。但由于血红蛋白易于褐变,适口性差等问题严重制约了猪血资源的开发和利用。为此,研究者从不同角度对猪血资源进行开发利用,万佳蓉等<sup>[11]</sup>利用多菌种进行混合发酵猪血,周毅等<sup>[12]</sup>筛选出水解猪血蛋白的优良菌株,李斌等<sup>[13]</sup>酶解猪血制备血红素。这些研究主要集中于水解猪血蛋白生成多肽或氨基酸以及相应的衍生物。而将猪血降解与微生物生态制剂偶联生产的研究却鲜有报道。本研究拟将猪血降解与益生菌丁酸梭菌生态制剂制备的偶联生产进行研究,以获得富含

**基金项目:**安徽省高等学校省级自然科学基金项目(重点)(编号:KJ2014A2461);安徽省高等学校自然科学基金项目(重点)(编号:KJ2016A692)

**作者简介:**秦东方,男,马鞍山师范高等专科学校副教授,硕士。

**通讯作者:**李豪(1978—),男,马鞍山师范高等专科学校副教授,硕士。E-mail:450685941@qq.com

**收稿日期:**2016-08-10

营养的猪血蛋白水解物和具有益生功能的丁酸梭菌微生物生态制剂,实现高品质多功能饲料的高效生产。基于此,本试验重点研究丁酸梭菌发酵猪血的首要问题,即培养基成份的配比,以期为后序研究和开发集营养与保健功能于一体的丁酸梭菌猪血产品提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与培养基

菌种:丁酸梭菌(*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588),从日本米雅利桑制药株式会社生产的口服酪酸梭菌活菌片中分离得到;

丁酸梭菌液体种子培养基:各物质按质量分数计为胰蛋白胨2%、牛肉膏1%、酵母膏0.6%、葡萄糖0.4%、磷酸二氢钾0.1%、硫酸镁0.04%、氯化钙0.02%;

高层半固体琼脂培养基:液体种子培养基添加0.3%的琼脂而制得;

猪血粉:蛋白质含量达90%,天津恩彼蛋白质公司;

玉米粉:购自安徽马鞍山安民菜市场的玉米经粉碎过30目筛后所得。

### 1.2 方法

1.2.1 活菌数测定 精确称取已发酵好的固体培养基10g,加入装有100mL无菌水的锥形瓶内,在振荡器中以100r/min的速度振荡20min,等微生物完全溶解于无菌水后过滤制备得丁酸梭菌菌悬液,准确吸取10.00mL菌悬液至90.00mL无菌水中稀释,经充分振荡后吸取1.00mL至装有9.00mL无菌水的试管中,重复此操作,稀释至合适的浓度后采用高层半固体琼脂试管计数法测定活菌数<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.2 丁酸梭菌固体发酵培养基制备

(1)培养基主要成分的设计:培养基以农副产品猪血粉为主要原料,添加一定量的玉米粉,由于蛋白质和淀粉都属于大分子物质,在发酵初期由于丁酸梭菌总数少,很难快速见效,需要加入一定的促生长因子如硫酸铵、葡萄糖和无机盐类等,本研究参考丁酸梭菌液体种子培养基成分确定促生产因子的成分为硫酸铵、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁和氯化钙,其质量配比为40:40:10:5:5。经上述分析将丁酸梭菌固体发酵培养基设计为3种成分,即猪血粉、玉米粉和促生长因子。

对于丁酸梭菌培养基的制备,有不少研究者<sup>[14-16]</sup>尝试了多种方法,而混料试验设计方法更侧重于研究各试验因子的不同比例来反映变量的关系,不必考虑配方的总量,是一种快捷高效的方法。考虑到推广应用成本,本研究采用限制成分上下界的混料设计,即对每种成分的比例都进行了适当的限制,其形式为: $X_1 + X_2 + X_3 = 100\%$ ,具体各成分的限制条件见表1。

借助试验设计软件Design Expert(Version 6.0.5, Stat-Ease Int. Co., Minneapolis, MN, USA),采用混料(Mixture)设计中的D-Optional方法<sup>[17]</sup>。以每克培养基中丁酸梭菌的数量为指标,对丁酸梭菌固态发酵培养基的配方进行优化。

(2)固体培养基的配制与灭菌:称取培养基100g,然后与100mL水混和均匀,装入三角瓶中,塞上瓶塞后,放入灭

表1 猪血粉培养基各成分限制条件表

Table 1 The Constraints of each component in the medium of porcine blood

条件	$X_1$ 促生长因子	$X_2$ 玉米粉	$X_3$ 猪血粉
下限	4.00	30.00	40.00
上限	20.00	50.00	60.00

菌锅中121℃灭菌30min,冷却至室温后即得固体培养基。

1.2.3 菌种活化与固态培养 从分离纯化得到的丁酸梭菌菌种斜面上挑取一环接种于种子培养液中,35℃静置厌氧培养24h后进行镜检,当90%以上的菌体形成芽孢时,即得到成熟的种子菌,将活化的种子菌悬液以体积质量比为8%的接种量接入装有固体发酵培养基的三角瓶中,35℃恒温培养箱中静置培养48h。

### 1.3 培养基氨态氮测定

参考文献[18]。

## 2 结果与分析

### 2.1 回归模型的建立

表2列出了利用猪血粉等原料发酵后丁酸梭菌生成量的试验结果和对应的预测值,运用Design Expert软件,对试验值进行二次多项式回归拟合,得回归方程:

$$R_1 = -189.933X_1 - 120.930X_2 - 106.033X_3 + 270.495X_1X_2 + 416.419X_1X_3 + 482.982X_2X_3, \quad (1)$$

其中限制条件见表1,且 $X_1 + X_2 + X_3 = 1$ ,回归方程的 $R^2 = 0.9943$ 。

利用Design Expert软件对试验方案进行设计,并对试验结果进行方差分析见表3。由表3可知,线性模型和3种

表2 培养基混料设计试验方案、试验结果及回归值

Table 2 The experimental scheme and the results by Mixture design

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	丁酸梭菌数 $R_1/$ ( $\times 10^7$ CFU/g)	回归值/ ( $\times 10^7$ CFU/g)	偏差
1	0.040	0.360	0.600	3.76	3.46	0.30
2	0.100	0.300	0.600	1.18	1.14	0.04
3	0.113	0.393	0.493	7.93	7.66	0.27
4	0.200	0.300	0.500	3.07	3.04	0.03
5	0.200	0.400	0.400	3.49	3.46	0.03
6	0.040	0.500	0.460	7.58	7.32	0.26
7	0.040	0.430	0.530	7.24	7.76	-0.52
8	0.100	0.500	0.400	4.91	4.91	0.00
9	0.107	0.447	0.447	7.56	7.45	0.11
10	0.107	0.347	0.547	5.51	5.67	-0.16
11	0.200	0.350	0.450	4.52	4.46	0.06
12	0.040	0.500	0.460	7.17	7.32	-0.15
13	0.100	0.300	0.600	0.87	1.14	-0.27
14	0.200	0.300	0.500	3.11	3.04	0.07
15	0.200	0.400	0.400	3.24	3.46	-0.22
16	0.040	0.360	0.600	3.60	3.46	0.14

成分间的交互作用的  $F$  值都比较大,  $P$  值都小于 0.05, 表明所考虑的这些因素以及三者间的交互作用对丁酸梭菌的生长繁殖都有显著影响, 是决定其生长的重要因素。从整个回归模型的  $F$  值 217.33 和  $P$  值  $< 0.000 1$  来看, 该模型能够很好地拟合实际情况, 失拟项影响不显著, 表明除模型中考虑的项目外, 再无对结果影响显著的项目, 进一步表明该模型与试验数据拟合得较好。从相关性分析结果来看,  $R$ -Squared=0.994 3 表明预测值与试验值之间有高度的相关性,  $Adj R$ -Squared=0.990 5 再次表明试验数据与二次回归模型间拟合程度好。

表 3 二次多项式模型方差分析表

差异源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	77.40	5	15.48	217.33	$< 0.000 1$
线性模型	43.53	2	21.76	305.58	$< 0.000 1$
$X_1 X_2$	6.13	1	6.14	86.14	$< 0.000 1$
$X_1 X_3$	14.55	1	14.56	204.37	$< 0.000 1$
$X_2 X_3$	30.21	1	30.21	424.08	$< 0.000 1$
剩余误差	0.71	10	0.07		
失拟项	0.54	5	0.11	3.03	0.124 9
纯误差	0.18	5	0.04		
总和	78.11	15			

## 2.2 培养基中各组分对丁酸梭菌生长量的影响

混料设计的等高线图和三维曲面图可以直观地表现出组分间变化对指标的影响。由图 1、2 可知, 同一等高线上的线条为曲线, 表明猪血粉、玉米粉和生长因子 3 种组分之间存在相互作用, 这与表 3 中方差分析的结果之一, 即三组分间交互作用都比较显著的结论是一致的。在培养基的 3 种成分中, 促生长因子由于分子量小、营养全面等特点, 在发酵前期极易被吸收利用, 使得丁酸梭菌得以快速生长, 而丁酸梭菌数量的倍增, 所产生的蛋白酶、淀粉酶等生物催化剂的量快速增加, 进而加速了对玉米粉和猪血粉大分子的分解, 其所生成的葡萄糖、氨基酸及矿物质更促进了丁酸梭菌的生长繁殖, 因此三成分间就产生了交互作用, 本试验对固体培

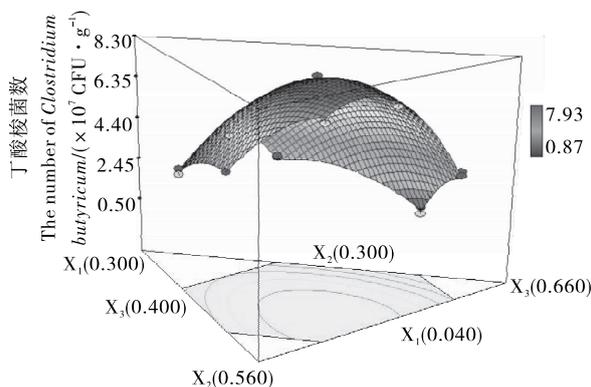


图 1 回归模型的三维表面图

Figure 1 3D-surface graph of Mixture quadratic polynomial model

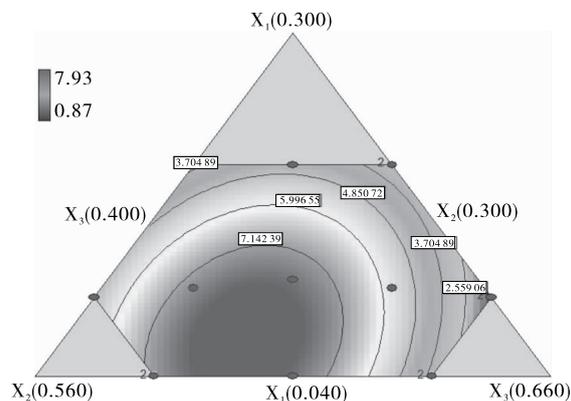


图 2 回归模型的等高线图

Figure 2 Contour graph of Mixture quadratic polynomial model

培养基进行研究的目的是要通过各种营养物对丁酸梭菌生长的协同增效作用, 来提高生产效率, 降低成本。

## 2.3 丁酸梭菌固体发酵剂配方成分优化

根据试验值的拟合情况及限制条件, 如果将限制条件  $X_1 + X_2 + X_3 = 1$  变化为  $X_3 = 1 - X_1 - X_2$ , 则拟合方程即为关于  $X_1$  和  $X_2$  的二元二次多项式回归方程, 并且二次系数都为负值, 说明单因素的抛物线有最大值, 结合三维曲面图和等高线图可知, 图形近似球形且开口向下, 表明各自变量在一定区间内有最大值。应用软件的最优化分析方法 (Optimization) 设定各组分的变化范围和响应值为最大值 (表 1), 运行软件后, 根据最陡爬坡预测并结合配方成本, 本研究确定最优化配方为促生长因子 4.7%, 玉米粉 46.3%, 猪血粉 49.0%, 预测回归值为  $8.18 \times 10^7$  CFU/g。按照优化后的配方比例将各种成分混合后进行验证实验, 4 次结果的平均值  $8.08 \times 10^7$  CFU/g, 标准差为  $0.065 \times 10^7$  CFU/g, 变异系数  $C.V = 0.8\%$ 。将回归值  $8.18 \times 10^7$  CFU/g 作为标准值, 应用  $t$  检验得  $t = -3.08$ , 根据显著水平  $\alpha = 0.05$ , 自由度  $df = 3$ , 查表可得  $t_{0.025} = 3.182$ ,  $t_{0.05} = 4.541$ , 由此可以判断回归值与实际值之间无显著差异, 说明回归方程得到的最优化回归值较好地反映了真实情况。并测得培养基中的游离氨基酸态氮的含量从发酵前的  $0.02 \text{ g}/100 \text{ g}$  增加为  $3.13 \text{ g}/100 \text{ g}$ , 说明丁酸梭菌在生长过程中猪血中的蛋白质得到有效的水解。

## 3 结论

混料设计方法是一种高效的设计培养基配方的方法, 不仅可以运用回归分析方法建立直观的数学模型, 还能够通过较少的试验次数对配方中的各成分及其交互作用进行评价<sup>[19-20]</sup>。本研究将猪血水解与丁酸梭菌微生物生态制剂进行偶联生产确定设计和优化后的培养基最佳配方为促生长因子 4.8%, 玉米粉 46.3%, 猪血粉 49.0%, 预测回归值为  $8.18 \times 10^7$  CFU/g, 该预测值与实际测定平均值  $8.08 \times 10^7$  CFU/g 之间差值较小, 经  $t$  检测二者间无显著差异, 进一步表明混料设计法优化的数学模型适用于本项目培养基的优化设计。与戚薇<sup>[14]</sup>、孔青<sup>[15]</sup> 等所得结果相差无几, 而本培养基配方成本更低, 更符合工业化生产的要求, 更具有技术

和经济优势。同时实现了猪血的水解,并使培养基中的游离氨基酸态氮的含量从发酵前的 0.02 g/100 g 增加为 3.13 g/100 g,说明丁酸梭菌在生长过程中猪血中的蛋白质得到有效的水解。

本项目创新性地利用猪血来实现益生菌丁酸梭菌和猪血高游离氨基酸饲料的偶联生产,开辟了动物血液利用的新途径,具有良好的经济社会效益和广阔的市场应用前景。

### 参考文献

- [1] 宋会仪, 吴天星. 酪酸梭状芽孢杆菌微生态制剂的生物学功能及在饲料中的应用[J]. 饲料工业, 2006, 27(12): 10-11.
- [2] KUROIWA T, IWANAGA M, KOBARI K. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy[J]. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 1990, 64: 1 425-1 432.
- [3] KANAI T, MIKAMI Y, HAYASHI A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease[J]. Journal of Gastroenterology, 2015, 50(9): 1-12.
- [4] LIU Ting-ting, ZHANG Shuai, DENG Fei-yue. Effects of glutamine and *Clostridium butyricum* on growth performance, immune function, small intestinal morphology and microflora in weanling piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(6): 998-1 005.
- [5] 赵熙, 冉陆, 杨玉兰, 等. 丁酸梭菌活菌制剂对肠道菌群影响的研究[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(6): 332-333.
- [6] MASAHIDE S, MANO H, TAKASHI Y, et al. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 shows antitumor effects by enhancing the release of TRAIL from neutrophils through MMP-8[J]. In-

- ternational Journal of Oncology, 2013, 42(3): 903-911.
- [7] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 新一代微生态制剂-酪酸梭状芽孢杆菌的研究和开发前景[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 297.
- [8] 张晓阳, 卢忆, 马艳莉, 等. 丁酸梭菌生理功能及应用研究进展[J]. 中国食物与营养, 2012(12): 3-5.
- [9] 王赞, 李爱彬, 陈湘来, 等. 猪血的开发和利用[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 272-274.
- [10] 李雨露, 吕长鑫. 猪血的功能特性及开发利用[J]. 肉品卫生, 2001(12): 26-27.
- [11] 万佳蓉, 马美湖, 周传云. 多菌种混合发酵猪血的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 50-53.
- [12] 周毅, 杨萍, 肖前程. 降解猪血蛋白的优良菌株筛选鉴定及产酶条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2015(3): 58-63.
- [13] 李斌, 章梁, 黄泽元. 酶解猪血制备血红素工艺的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 153-156.
- [14] 戚薇, 何玉慧, 李安东, 等. 酪酸梭状芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(2): 18-21.
- [15] 孔青, 陈琳, 周雯, 等. 丁酸梭菌淀粉培养基的优化研究[J]. 食品工业科技, 2009(12): 197-199.
- [16] ZHANG Chun-hui, MA Yu-jiu, YANG Fang-xiao, et al. Optimization of medium composition for butyric acid production by *Clostridium thermobutyricum* using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2009, 100 (18): 4 284-4 288.
- [17] 徐向宏, 何明珠. 试验设计与 Design-Expert、SPSS 应用[M]. 北京: 科学技术出版, 2010: 161-167.
- [18] 周光理. 食品分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 101.
- [19] 岳鹏, 王芃, 孙勇民. 混料设计优化复合酶解制备低聚木糖工艺[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 254-256.
- [20] 阎宝清, 夏立秋, 龙如花, 等. 利用混料设计优化多杀菌素发酵培养基[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 200-203.

(上接第 29 页)

品的生物碱含量可以反映在 2 个主成分上,其中第 1 主成分反映了原始变量 99.96% 的变异信息,第 2 主成分反映了原始变量 0.04% 的变异信息。在这两个主成分下,将 13 种茶叶的生物碱含量进行二维投射,获得可视化的样品分布情况图。其中 5 种肉桂样品和 5 种水仙样品距离较为接近,而与红茶、铁观音的距离较远,反映了不同茶叶种类间较为显著的生物碱含量差异。

### 3 结论

本试验采用高效液相色谱法对 5 种肉桂和 5 种水仙的茶叶及茶汤中的咖啡碱、可可碱和茶碱含量进行检测,并与绿茶、铁观音和红茶的茶叶及茶汤中的 3 种生物碱进行比较。经 HPLC 检测研究发现,武夷岩茶叶片中的咖啡碱、可可碱和茶碱含量分别约占茶叶干重的 2.341%, 0.065%, 0.011%, 低于绿茶、铁观音和红茶;茶叶经过 60 s 沸水冲泡后,约 46.56%, 46.36% 和 50.15% 的咖啡碱、可可碱和茶碱溶出。经 PCA 分析发现,武夷岩茶的 3 种生物碱含量与绿茶、铁观音和红茶的生物碱含量有显著差异。本试验的开展对深入了解武夷岩茶的感官品质和生理功效具有显著意义。

### 参考文献

- [1] 修明. 武夷岩茶品质特征及审评方法[J]. 中国茶叶加工, 2004 (1): 39-40.
- [2] 周燕波, 陈启荣. 茶叶成分及其医疗价值[J]. 中国中医药信息杂志, 1997, 4(11): 16-18.
- [3] 谭和平, 叶善蓉, 邹燕, 等. 茶叶中生物碱的分析方法概述[J]. 中国测试技术, 2008, 34(5): 5-9.
- [4] ZULLI A, SMITH R M, KUBATKAP, et al. Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research[J]. European Journal of Nutrition, 2016, 55(4): 1 331-1 343.
- [5] 凌育赵, 曾满枝. HPLC 法测定广东南昆山白毛茶中的嘌呤碱[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7): 155-157.
- [6] 许祯毅. 高效液相色谱法测定武夷岩茶中咖啡碱的条件探讨[J]. 广东化工, 2014, 41(24): 98-99.
- [7] 王尔茂, 阮志燕, 孙颖, 等. 轻重做青对凤凰单枞乌龙茶呈香物质的影响[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 23-26.
- [8] 廉明, 吕世懂, 吴远双, 等. 我国 4 种红茶的挥发性成分分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(3): 301-309.
- [9] 李远华, 李照莹. 铁观音等引种武夷山的植物学性状观察及主要生化成分分析[J]. 江西农业学报, 2014, 26(4): 23-25.