

# 屎肠球菌廉价培养基的研制

李英英, 陈 曦, 宋铁英\* (福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003)

**摘要** [目的]为了降低屎肠球菌微胶囊制剂的发酵成本,[方法]用自主分离的一株屎肠球菌作为发酵菌株,用玉米和豆粕替代 MRS 基础培养基中的碳源和氮源,设计不同替代比例的 MRS 廉价培养基,经过培养和计数,筛选出价格低廉又适合该菌株生长的廉价培养基。[结果]玉米和豆粕作为碳源和氮源制成的替代培养基适合该屎肠球菌生长;结合价格和培养效果,筛选出碳源 50% 替代、氮源 100% 替代的 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 替代培养基为适用于屎肠球菌工业化发酵的廉价培养基。[结论]MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 替代培养基既可以极大降低屎肠球菌的发酵成本,又可以使活菌数达到益生菌制剂要求的有效活菌量,可用于屎肠球菌微胶囊制剂的工业化生产。

**关键词** 屎肠球菌; MRS; 廉价培养基; 饲料原料

**中图分类号** S816.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)32-0080-02

## The Development of the Low-cost Medium Using for *Enterococcus faecium*

LI Ying-ying, CHEN Xi, SONG Tie-ying (Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou, Fujian 350003)

**Abstract** [Objective] In order to reduce the fermentation cost of microencapsulated *Enterococcus faecium*. [Method] The carbon and nitrogen source in MRS basic medium were instead of corn and soybean meal which were usually used as stuff. MRS low-cost medium with different replacement ratio was designed and a strain of *E. faecium* isolated by ourselves was used as fermentation strain. After incubation and counting, low-cost medium suitable for the growth of the strain was screened out. [Result] The result showed that the low-cost medium, in which corn and soybean meal were used as carbon and nitrogen source, were suitable for the growth of *E. faecium*. Considering the price and the effect of culture, the substituting medium MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> with 50% alternative carbon source and 100% alternative nitrogen source was selected as a low-cost medium and suitable for industrial fermentation of *E. faecium*. [Conclusion] MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> can greatly reduce the fermentation cost of *E. faecium*, and enable to reach the viable count required by probiotics. It can be used in industrial production of microencapsulated *E. faecium*.

**Key words** *Enterococcus faecium*; MRS; Low-cost medium; Stuff

乳酸菌是动物肠道内的主要益生菌,具有促进营养物质的消化和吸收<sup>[1]</sup>,维持肠道内微生态平衡<sup>[2]</sup>,增强机体免疫力<sup>[3]</sup>,提高生产性能<sup>[4]</sup>等作用。为解决畜牧行业中抗生素滥用引发的药残和耐药性问题,在动物日粮中添加乳酸菌制剂等抗生素替代物已经成为很多人的选择<sup>[5]</sup>。屎肠球菌是乳酸菌中抗逆性较强的一类菌<sup>[6]</sup>,培养和保存条件都较为容易,是制作乳酸菌微胶囊制剂时的首选菌种<sup>[7]</sup>。在前期研究中,我们已经筛选到一株抗逆性较强的猪源屎肠球菌,通过喷雾干燥工艺制备成屎肠球菌微胶囊制剂,并且对制成的屎肠球菌微胶囊制剂进行了高温耐受性、耐酸性、肠溶性、稳定性和动物田间小规模试验,证明该屎肠球菌微胶囊制剂对高温、胃液、肠液均有较好的耐受性,并且可显著提高断乳仔猪生产性能<sup>[4]</sup>。但是前期培养屎肠球菌使用的 MRS 培养基中氮源物质是蛋白胨、牛肉膏和酵母膏,价格昂贵,造成屎肠球菌微胶囊制剂生产成本过高,难以推广。

豆粕是动物饲料配方中最主要的氮源物质,与 MRS 培养基中的氮源物质(蛋白胨、酵母膏和牛肉膏)相比,豆粕价格低廉且易得<sup>[8]</sup>。若用豆粕替代 MRS 培养基中的蛋白胨、酵母膏和牛肉膏,可大幅度降低屎肠球菌微胶囊制剂的生产成本。而玉米是动物全价饲料中的碳源物质<sup>[9]</sup>,与培养基中原有的碳源(葡萄糖)相比,价格更低且来源稳定更易获得。

用豆粕和玉米作为培养基中的氮源和碳源,可以降低成本,有利于屎肠球菌微胶囊制剂的工业化生产。本研究拟用豆粕和玉米部分或者全部替代 MRS 基础培养基中的氮源和碳源成分,制成 MRS 替代培养基;再用前期分离得到的屎肠球菌作为菌株,进行培养计数,最后结合价格,筛选出高效、价廉的 MRS 廉价培养基,为屎肠球菌微胶囊制剂在饲料和养殖行业中的推广奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 试验菌株。**来自福建省某猪场周边土壤自主分离到的屎肠球菌(BBH201305001),已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),菌种保藏代号:CGMCC No.8296。

**1.1.2 试剂。**蛋白胨,牛肉膏,酵母膏,豆粕,葡萄糖,玉米,磷酸二氢钾,乙酸钠,硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O),硫酸锰(MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O),柠檬酸三胺,吐温-80,稀盐酸等。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 MRS 基础培养基配制。**蛋白胨 10‰,牛肉膏 10‰,酵母膏 4‰,葡萄糖 20‰,磷酸二氢钾 2‰,乙酸钠 5‰,硫酸镁 0.2‰,硫酸锰 0.05‰,柠檬酸三胺 2‰,吐温-80 1‰,pH 5.7, 121 ℃、15 min 灭菌。

**1.2.2 MRS 替代培养基配制及筛选。**利用与 MRS 基础培养基中氮源含量相当的豆粕替代原有的氮源物质(蛋白胨,牛肉膏和酵母膏)制成 MRS 替代培养基,替代比例为 50% 记作 MRS-N<sub>50</sub>,全部替代时记作 MRS-N<sub>100</sub>;同样,用玉米替代培养基中的碳源物质(葡萄糖),50% 替代时记作 MRS-C<sub>50</sub>,全部替代时记作 MRS-C<sub>100</sub>,以此类推。

配制替代培养基时先进行氮源或碳源单替代,设置 50%

**基金项目** 福建省科技计划项目(2017R1019-2, 2017R1019-7, 2018R1019-4);福建省农科院科技创新项目(A2017-23, PC2017-6);福建省特种水产配合饲料重点实验室开发课题(TMKJZ1705);鳢鲡现代产业技术教育部工程研究中心开放基金(RE201802)。

**作者简介** 李英英(1987—),女,河南浙川人,研究实习员,硕士,从事动物营养与免疫研究。\*通讯作者,研究员,从事动物营养和免疫研究。

**收稿日期** 2018-06-29;修回日期 2018-07-19

和 100% 两个梯度进行替代,即 MRS-C<sub>50</sub>、MRS-C<sub>100</sub>、MRS-N<sub>50</sub>、MRS-N<sub>100</sub> 4 个配方,接种菌株进行培养计数;根据单替代的结果设计氮源碳源双替代配方,同样接种菌株进行培养计数;结合双替代配方培养计数的结果以及培养基的价格,筛选出价格低廉又适合屎肠球菌生长的替代配方。

**1.2.3 培养计数。**取保藏的屎肠球菌接种于 MRS 培养基中,37 ℃、180 r/min 培养 16~20 h,制备成种子液。以基础培养基为对照组,替代培养基为实验组,每组设 3 个平行,接种

10% 的种子液后 37 ℃、180 rpm/min 培养 20~24 h,涂板计数。

2 结果与分析

**2.1 氮源和碳源单替代培养计数的结果** 用豆粕和玉米进行单替代制成廉价培养基,培养计数的结果如表 1 所示,替代培养基 MRS-C<sub>50</sub>、MRS-C<sub>100</sub> 和 MRS-N<sub>50</sub> 培养计数的结果均高于 MRS 基础培养基,仅 MRS-N<sub>100</sub> 的结果略低于基础培养基。但 4 种替代培养基中,MRS-N<sub>100</sub> 的价格最低。

表 1 氮源碳源单替代培养基培养计数结果及培养基价格比较

Table 1 Comparisons of the culture count result and price for substituting mediums with alternative nitrogen or carbon source

|                             | MRS       | MRS-C <sub>50</sub> | MRS-C <sub>100</sub> | MRS-N <sub>50</sub> | MRS-N <sub>100</sub> |
|-----------------------------|-----------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 活菌数 Viable count//lg cfu/mL | 9.39±0.22 | 9.70±0.24           | 10.03±0.08           | 9.44±0.22           | 8.90±0.13            |
| 价格百分比 Price percentage//%   | 100       | 99.86               | 99.72                | 53.09               | 6.18                 |

**2.2 氮源单替代及氮源碳源双替代培养基培养计数的结果** 表 2 为氮源单替代及氮源碳源双替代培养基培养计数的结果,MRS-N<sub>50</sub> 和 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub> 2 种氮源半替代培养基的培养计数结果高于 MRS 基础培养基,而 MRS-N<sub>100</sub> 和 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>

2 种氮源全替代培养基的结果略低于 MRS 基础培养基。同时,在氮源替代比例相同时,用玉米进行氮源替代培养计数的结果比不进行碳源替代的结果更高,即 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub> 高于 MRS-N<sub>50</sub>,MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 高于 MRS-N<sub>100</sub>。

表 2 氮源单替代及氮源碳源双替代培养基培养计数结果及培养基价格比较

Table 2 Comparisons of the culture count result and price for substituting mediums with alternative nitrogen source or alternative nitrogen and carbon source

|                             | MRS       | MRS-N <sub>50</sub> | MRS-N <sub>100</sub> | MRS-C <sub>50</sub> N <sub>50</sub> | MRS-C <sub>50</sub> N <sub>100</sub> |
|-----------------------------|-----------|---------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 活菌数 Viable count//lg cfu/mL | 9.46±0.13 | 9.51±0.17           | 9.00±0.08            | 9.72±0.07                           | 9.01±0.13                            |
| 价格百分比 Price percentage//%   | 100       | 53.09               | 6.18                 | 52.95                               | 6.04                                 |

**2.3 氮源碳源双替代培养基培养计数的结果** 表 3 为氮源碳源双替代培养基培养计数的结果,3 种替代培养基计数结果从高到低依次是 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub>、MRS-C<sub>50</sub>N<sub>75</sub>、MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>,其中 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub> 和 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>75</sub> 的培养计数结果比基础

MRS 培养基略高,而 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 的结果则略低。3 种双替代培养基中 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub> 最适合菌株生长,但 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 价格最低。

表 3 氮源碳源双替代培养基培养计数结果及培养基价格比较

Table 3 Comparisons of the culture count result and price for substituting mediums with alternative nitrogen and carbon source

|                             | MRS       | MRS-C <sub>50</sub> N <sub>50</sub> | MRS-C <sub>50</sub> N <sub>75</sub> | MRS-C <sub>50</sub> N <sub>100</sub> |
|-----------------------------|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 活菌数 Viable count//lg cfu/mL | 9.29±0.20 | 9.48±0.14                           | 9.32±0.25                           | 9.06±0.39                            |
| 价格百分比 Price percentage//%   | 100       | 52.95                               | 29.50                               | 6.04                                 |

3 讨论

**3.1 氮源和碳源单替代试验** 豆粕和玉米是配合饲料中主要的氮源和碳源,与 MRS 培养基中氮源和碳源物质相比,不仅价格低廉,而且来源更稳定。若用其替代 MRS 培养基中的氮源和碳源物质,可降低 MRS 培养基的制作成本,有利于屎肠球菌微胶囊制剂的工业化生产和其在养殖行业中的推广应用。用豆粕和玉米进行单替代制成廉价培养基培养计数的结果中,碳源半替代、全替代及氮源半替代后培养计数的结果均高于 MRS 基础培养基,仅氮源全替代的结果略低于基础培养基。因此,认为用豆粕和玉米作为氮源和碳源制成替代培养基适合该菌株生长。

4 种替代培养基 MRS-C<sub>50</sub>、MRS-C<sub>100</sub>、MRS-N<sub>50</sub> 和 MRS-N<sub>100</sub> 价格分别是 MRS 基础培养基的 99.86%、99.72%、53.09% 和 6.18%,可以看出,氮源替代对培养基的价格影响

远大于碳源替代对培养基价格的影响。同时,豆粕和玉米作为培养基原料的主要缺点是二者不溶于水,若将基础培养基中的氮源和碳源物质均用豆粕和玉米全替代,制成的培养基会过于黏稠,不利于菌株培养。因此,从价格方面考虑,在进一步设计替代配方时,优先考虑氮源替代,且将碳源替代比例设置为 50%。

**3.2 氮源单替代及氮源碳源双替代试验** 氮源单替代及氮源碳源双替代培养基培养计数的结果,MRS-N<sub>50</sub> 和 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub> 2 种氮源半替代培养基的培养计数结果高于 MRS 基础培养基,而 MRS-N<sub>100</sub> 和 MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 2 种氮源全替代培养基的结果略低于 MRS 基础培养基,说明氮源半替代后制成的培养基比全替代培养基更适合该屎肠球菌生长。试验结果还显示,MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub> 高于 MRS-N<sub>50</sub>,MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub> 高于 MRS-N<sub>100</sub>,  
(下转第 90 页)

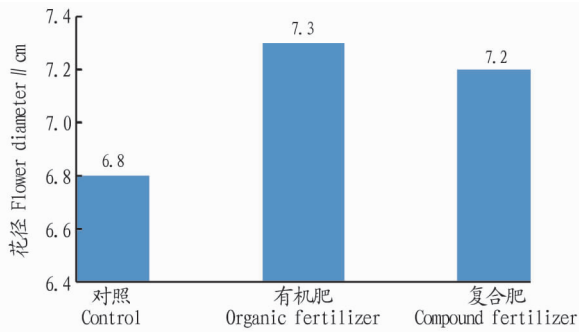


图6 不同肥料对大花萱草杂交品种0812花径的影响

Fig.6 Effects of different fertilizers on flower diameter of *H. hybrid* 0812

### 3 结论与讨论

通过干旱条件下观测分析得出,大花萱草杂交品种0812有一定的抗旱自我调节能力,14 d土壤干旱胁迫时,叶片底部出现枯黄但上部叶片保持绿色,稍萎蔫,不影响观赏,在14 d干旱复水后,恢复迅速;在干旱胁迫下,叶绿素含量均呈现下降趋势,前面7 d相对较为迅速,后面几天叶绿素含量下降率较之前平稳,复水后大花萱草杂交品种0812叶绿素含量能迅速回升;前面14 d在干旱条件下,含水量下降比较平缓,而14 d干旱复水后,含水量迅速提升,与干旱7 d时含水

(上接第81页)

说明当氮源替代量相同时,用玉米替代葡萄糖作为培养基的碳源更有利于该菌株生长。因此,我们认为:碳源替代方面,用玉米50%替代葡萄糖,既可以降低培养基的价格,又利于菌株生长,同时也不会使制成的替代培养基因过于黏稠而不利于菌株培养;而氮源替代方面,用豆粕50%替代原有氮源比100%替代更适合菌株生长,但100%替代可极大程度降低培养基价格。因此,在进一步实验时,采用碳源50%替代、氮源替代比例设置成50%、75%和100%三个梯度,进行廉价培养基的筛选。

**3.3 氮源碳源双替代试验** 氮源碳源双替代培养基培养计数的结果,3种替代培养基计数结果从高到低依次是MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub>、MRS-C<sub>50</sub>N<sub>75</sub>、MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>,其中MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub>和MRS-C<sub>50</sub>N<sub>75</sub>的培养计数结果比基础MRS培养基略高,而MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>的结果则略低,3种双替代培养基中MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub>最适合菌株生长。随着氮源替代比例增加,得到的活菌数略有下降,但活菌数仍可达到109 cfu/mL,仍高于益生菌制剂要求的有效活菌量<sup>[10]</sup>。

MRS-C<sub>50</sub>N<sub>50</sub>、MRS-C<sub>50</sub>N<sub>75</sub>、MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>3种双替代培养基的价格分别为基础培养基的53%、30%、7%。结合三者的计数结果可知,MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>可以极大降低培养基的成本,同时活菌得率可达到益生菌制剂要求的有效活菌量。因此,建议选择MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>替代培养基进行尿肠球菌工业化发酵,制备尿肠球菌微胶囊制剂。

### 4 结论

该研究用饲料原料中的玉米和豆粕替代MRS基础培养

量基本持平,这与植株形态、叶绿素含量表现一致<sup>[8]</sup>。同时干旱复水后MDA含量较干旱胁迫7 d的含量稍微高些,经过方差分析可知含量影响不显著。观测结果说明大花萱草杂交品种0812对持续干旱有一定的自我调节能力与自我恢复能力,在极度干旱条件下,大花萱草杂交品种0812更适合推广栽培。

通过耐瘠薄分析得出,肥料对于大花萱草杂交品种0812的花期无太大影响,其茎高、花色、花径稍受肥料影响,但影响不是特别明显,这说明大花萱草杂交品种0812比较耐瘠薄,适合贫瘠土壤种植,可以在贫瘠的环境条件下进行推广。

### 参考文献

- [1] 郭志海,金立敏,钱剑林.大花萱草新品种古彤的选育与应用[J].江苏农业科学,2012,40(7):105-106.
- [2] 金立敏,王文燕,钱剑林,等.苏州地区大花萱草新品种的筛选与评价[J].安徽农业科学,2012,40(4):1966-1967,1996.
- [3] 李合生.植物生理生化实验指导[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [4] 金立敏,张文婧,周玉珍.萱草属大花萱草形态性状描述标准和观测记载方法[J].安徽农业科学,2011,39(3):1292-1294.
- [5] 金立敏,李洁,林菁.不同品种大花萱草抗寒性比较[J].园艺与种苗,2015(10):20-22.
- [6] 陈丽飞,王克凤,金鹏,等.不同遮阴处理对大花萱草形态及生物量的影响[J].安徽农业科学,2011,39(29):17808-17810.
- [7] 张晓玮,龚雪梅,张源.皖北地区5种城市绿地地被植物抗旱性评价[J].韶关学院学报,2015,36(6):48-53.
- [8] 赵天荣,徐志豪,张晨辉,等.持续极端高温干旱天气对大花萱草生长的影响[J].草业科学,2015,32(2):196-202.

基中的碳源和氮源,经过培养和计数,证明二者作为氮源和碳源制成的替代培养基适合屎肠球菌生长。

进一步试验中,从营养和价格两个方面综合考虑,筛选适合进行工业化发酵屎肠球菌的MRS廉价培养基,最终确定了碳源替代比例为50%;而氮源方面,当替代量达到100%时培养基的价格可大幅度降低,而活菌得率仅会略有下降,仍可达到益生菌制剂要求的有效活菌量。因此,选择MRS-C<sub>50</sub>N<sub>100</sub>替代培养基进行尿肠球菌发酵,在保证活菌得率的情况下,可以极大降低乳酸菌制剂的制作成本,有利于尿肠球菌微胶囊制剂的工业化生产和其在养殖行业的推广应用。

### 参考文献

- [1] 王福强.牙鲈肠道益生菌的分离鉴定及其应用研究[D].北京:中国农业大学,2004.
- [2] 马治宇.乳酸菌及其培养液对肉鸡生产性能、肠道菌群及肠道结构的影响[D].杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [3] 于晨龙.传统乳制品中益生乳酸菌筛选及免疫调节功能的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.
- [4] 李英英,陈曦,宋铁英.屎肠球菌微胶囊制剂的稳定性及对断乳仔猪生产性能的影响[J].福建畜牧兽医,2016,38(2):14-17.
- [5] 王宗伟,陈飞.绿色饲料添加剂——乳酸菌在肉鸡生产中的研究进展[J].饲料博览,2011(8):38-41.
- [6] 葛龙,李波.屎肠球菌在饲用微生态制剂中的研究与应用[J].饲料与畜牧,2013(6):57-59.
- [7] 刘扬科,李希.日粮中添加屎肠球菌对断奶仔猪生产性能及腹泻率的影响[J].饲料与畜牧,2013(4):65-66.
- [8] CRESWELL D.We need an additional protein meal support soybean meal: What will it be? [J].Asian poultry magazine,2012(4):22-24.
- [9] 贾涛.猪用配合饲料的配制:猪用配合饲料的配制[J].猪业科学,2012,29(12):32-36.
- [10] 蔡辉益,霍启光.饲用微生物添加剂研究与应用进展[J].饲料工业,1993,14(4):7-12.