

对虾养殖环境中乳酸菌的筛选及其发酵工艺的研究

陈蕾蕾¹, 邓淑怡¹, 刘唤明^{1*}, 邓楚津¹, 操玉涛², 洪鹏志¹ (1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省现代农业科技创新中心, 广东湛江 524088; 2. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的] 对虾养殖环境中乳酸菌进行筛选并对其发酵工艺进行研究。[方法] 首先利用含碳酸钙的 MRS 固体培养基从虾养殖环境中的海水和底泥中筛选出有溶钙圈的菌株 M5; 接着根据 16S rDNA 基因序列系统发育树分析对菌株 M5 进行鉴定, 最后在单因子实验的基础上, 通过正交试验对发酵工艺进行优化。[结果] 初步鉴定菌株 M5 为粪肠球菌, 该菌株的最佳发酵工艺为: 甘蔗糖蜜浓度为 5%, 蛋白胨浓度为 0.75%, 硫酸铵 0.5%, 磷酸氢二钾的浓度为 0.5%, 发酵温度为 30 °C, 发酵时间为 48 h。在以上工艺下, 发酵液中乳酸菌的活菌数高达 4.97×10^8 CFU/mL。[结论] 本研究对对虾养殖所用乳酸菌的发酵生产具有一定的参考价值。

关键词 对虾养殖环境; 乳酸菌; 筛选; 发酵工艺

中图分类号 S968.22 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)01-0087-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.01.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Screening of Lactic Acid Bacteria in Shrimp Culture Environment and Study on Its Fermentation Technology

CHEN Lei-lei, DENG Shu-yi, LIU Huan-ming et al (College of Food Science and Technology, Aquatic Product Processing and Safety Key Lab of Guangdong Province, Guangdong Modern Agricultural Science and Technology Innovation Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] Lactic Acid Bacteria (LAB) were screened in shrimp culture environment and study on its fermentation technology. [Method] Firstly, strain M5 with calcium dissolving ring was screened out from seawater and sediment in shrimp culture environment using MRS solid medium containing calcium carbonate. Secondly, identification of strain M5 based on phylogenetic tree analysis of 16S rDNA gene sequence. Finally, the fermentation technology was optimized by orthogonal experiments on the basis of single factor experiments. [Result] The strain M5 was preliminarily identified as *Enterococcus faecalis*. The optimum fermentation conditions of the strain were as follow: sugarcane molasses 5%, peptone 0.75%, ammonium sulfate 0.5%, dipotassium hydrogenphosphate concentration 0.5%, fermentation temperature 30 °C and fermentation time 48 H. Under the above conditions, the number of LAB in the fermentation broth was as high as 4.97×10^8 CFU/mL. [Conclusion] The study has certain reference value for the fermentation production of LAB used in shrimp culture.

Key words Shrimp culture environment; Lactic acid bacteria; Screening; Fermentation technology

在水产养殖中, 抗生素由于具有高效、快速和廉价等优点而被广泛使用。在对虾的养殖中, 常用的抗生素有恩诺沙星、土霉素、头孢、呋喃烯酮酸等。研究表明, 传统的抗生素等抗菌化学药物的大量使用甚至滥用不仅扰乱了对虾肠道正常的菌群, 引起耐药菌株的产生, 而且造成环境中药物的残留, 最终威胁着人类的健康和安全, 这些问题已引起了人们广泛的关注与焦虑^[3], 因此, 寻找抗生素类化学药物的替代品成为对虾养殖业可持续发展的关键和热点^[4]。

乳酸菌可代替抗生素在水质改良、治疗水产动物疾病以及水产动物免疫等方面的应用^[5]。有研究表明采用乳酸菌拌料投喂凡纳滨对虾 6 周后, 对虾的免疫力增强, 成活率以及弧菌的抵抗力均增强^[6]; 乳酸菌可以抑制对虾养殖过程中副溶血性弧菌的生长^[7]; 张玲等^[8] 研究结果表明, 通过口服与浸浴的方式对中国明对虾和日本囊对虾施用乳酸菌, 能有效调节肠道微生物菌群组成, 改善养殖水质, 提高对虾的成活率, 提高对白斑综合症和副溶血弧菌病的抗病力。因此科学施用益生菌是替代当前对虾养殖中的化学药物疗法、构建环境友好型对虾养殖模式的必由之路^[9]。

另外从对虾养殖环境中筛选乳酸菌报道较少, 且从对虾

养殖环境中筛选的乳酸菌应用于对虾养殖有更好的适应性。本研究将对虾养殖环境筛选乳酸菌, 对其发酵工艺进行优化, 为对虾养殖中乳酸菌的应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验原料。 菌株筛选样品: 对虾养殖环境中的海水和底泥。

1.1.2 培养基。 乳酸菌初筛培养基: 蛋白胨 15 g, 牛肉膏 5 g, 氯化钠 5 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 10 g, 碳酸钙 10 g, 水 1 000 mL, pH 6.2~6.6, 121 °C 灭菌 20 min, 灭菌后放置水浴 52 °C 备用。

乳酸菌计数培养基: MRS 固体培养基。

1.1.3 试验仪器。 SPX-150B-Z 型生化培养箱, MJX-160B-Z 型霉菌培养箱, SW-CJ-2F 型洁净工作台, 均由上海博讯实业有限公司医疗设备厂生产; GZX-9240MBE 型电热鼓风干燥箱, 由上海精密科技有限公司生产; LS-B50L 型立式压力蒸汽灭菌锅, 由上海华线医用核子仪器有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌的筛选。 将对虾养殖环境中的水和底泥梯度稀释后, 涂布于初筛培养基上, 将平板置于 37 °C 培养 48 h。根据菌落是否具有溶钙圈, 以及其颜色、大小、光泽等, 挑取疑似乳酸菌的单菌落, 进行革兰氏染色检验。凡是革兰氏染色阳性的菌落, 在 MRS 培养基上平板划线分离纯化培养 2 次, 斜面保存。

基金项目 湛江市科技计划项目(2017A02001, 2017A03012); 湛江市海洋经济创新发展示范市建设项目(湛海创 2017C₈B₁); 广东省大学生创新实验项目(CXXL2017037)。

作者简介 陈蕾蕾(1995-)女, 甘肃定西人, 硕士, 研究方向: 微生物学。
* 通信作者, 副教授, 从事水产品加工的研究。

收稿日期 2018-09-17

1.2.2 乳酸菌的鉴定。将筛选出的菌株的 16S rDNA 进行扩增,扩增成功后的 PCR 产物送到上海生工公司测序,测序成功后得到的结果递交 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,再进行相似同源性分析,然后用 Maximum likelihood 法绘制系统发育树、BOOTSTRAP 分析法分析,最后选取重复 1000 来评估树的准确性^[10-13]。

1.2.3 乳酸菌的计数方法

乳酸菌的计数使用 MRS 培养基,将需要计数的样品进行梯度稀释后,涂布于 MRS 培养基,选取菌落数在 30~300 之间平板计数,1 个稀释度选择两个平板。

1.2.4 单因素实验优化发酵工艺。①糖蜜浓度的优化。选取 5%、10%、15%、20%、25% 甘蔗糖蜜浓度作为碳源,37 °C 发酵培养 48 h,测定发酵液中乳酸菌活菌数。②蛋白胨浓度的优化。甘蔗糖蜜浓度为 5%,添加蛋白胨作为有机氮源,6 组的添加量分别为 0%、0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%,37 °C 发酵培养 48 h,测定发酵液中乳酸菌活菌数。③硫酸铵浓度的优化。甘蔗糖蜜浓度为 5%,蛋白胨浓度为 0.75%,添加硫酸铵作为无机氮源,6 组的添加量分别为 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%,37 °C 发酵培养 48 h,测定发酵液中乳酸菌活菌数。④磷酸氢二钾浓度的优化。甘蔗糖蜜浓度为 5%,蛋白胨浓度为 0.75%,硫酸铵浓度为 0.5%,添加磷酸氢二钾作为磷源,6 组的添加量分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%,测定发酵液中乳酸菌活菌数。⑤发酵温度的优化。甘蔗糖蜜浓度为 5%,蛋白胨浓度为 0.75%,硫酸铵 0.5%,磷酸氢二钾的浓度为 0.5%,接种。分别在 30 °C、33 °C 以及 37 °C 培养 24 h,测定发酵液中乳酸菌活菌数。

⑥发酵时间的优化。蔗糖蜜浓度为 5%,蛋白胨浓度为 0.75%,硫酸铵 0.5%,磷酸氢二钾的浓度为 0.5%,配制发酵培养基,接种。在 37 °C 下培养 6 h、12 h、18 h、24 h、48 h、72 h,分别测定发酵液中乳酸菌活菌数。

1.2.5 正交实验优化发酵工艺。在单因素实验的基础上,选取糖蜜浓度、蛋白胨浓度、硫酸铵浓度及磷酸氢二钾浓度进行正交实验,正交实验因素和水平如表 1 所示

表 1 正交实验因素水平表

因素 Factor	水平 Level		
	1	2	3
A(糖蜜浓度) Molasses concentration	5	10	15
B(蛋白胨浓度) Peptone concentration	0.25	0.50	0.75
C(硫酸铵浓度) Ammonium sulfate concentration	0.30	0.40	0.50
D(磷酸氢二钾浓度) Potassium hydrogen phosphate concentration	0.30	0.40	0.50

2 结果与分析

2.1 乳酸菌 16Sr DNA 鉴定 将菌株 M5 的测序结果,通过 NCBI 进行 16S rDNA 数据库 BLAST, M5 与标准菌株 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 的相似性最高,高达 99.8%。选取序列相似度达 99% 的部分菌种,采用软件 Mega5.05, Maximum likelihood 法制作系统发育树,结果见图 1。由图 1 结果可知,菌株 M5 在系统发育树上与 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 在同一支系。综合以上分析,可初步鉴定菌株 M5 为粪肠球菌。

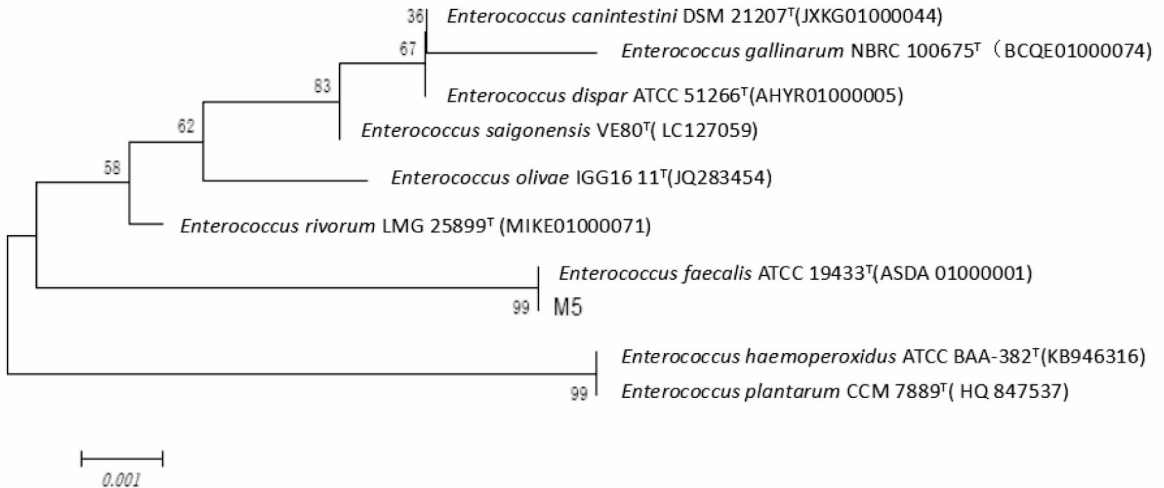


图 1 菌株 M5 的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of the strain M5

2.2 乳酸菌发酵工艺的优化

2.2.1 糖蜜浓度对乳酸菌发酵的影响。由图 2 结果可知,在发酵温度和时间相同的条件下,糖蜜浓度为 5% 时,乳酸菌发酵液中活菌数最多。当糖蜜浓度过高,乳酸菌代谢加快,产物积累,导致培养基的 pH 过低,抑制乳酸菌发酵。

2.2.2 蛋白胨浓度对乳酸菌发酵的影响。由图 3 结果所示,随着蛋白胨浓度的增加,发酵液中乳酸菌活菌数先增加

后减少,当蛋白胨浓度为 0.5% 时,乳酸菌活菌数最多。

2.2.3 硫酸铵浓度对乳酸菌发酵的影响。由图 4 结果可知,在液体发酵培养基中碳源以及有机氮源浓度为最优,发酵温度及时间相同的条件下,当硫酸铵浓度为 0.4% 时,乳酸菌的活菌数最多。

2.2.4 磷酸氢二钾浓度对乳酸菌发酵的影响。由图 5 结果可知,在液体发酵培养基中碳源、有机氮源以及无机氮源浓

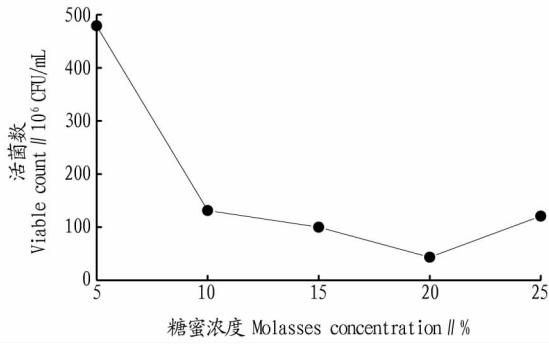


图2 不同糖蜜浓度对乳酸菌发酵的影响

Fig. 2 Effect of different molasses concentration on fermentation of lactic acid bacteria

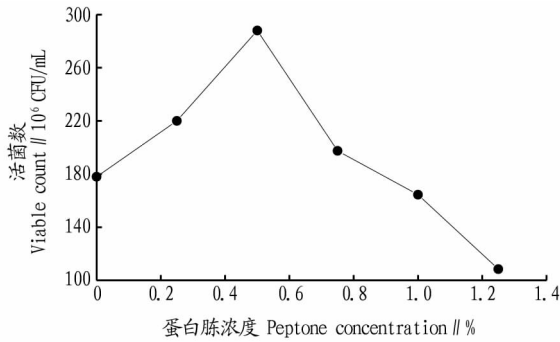


图3 蛋白胨浓度对乳酸菌发酵的影响

Fig. 3 Effect of peptone concentration on fermentation of lactic acid bacteria

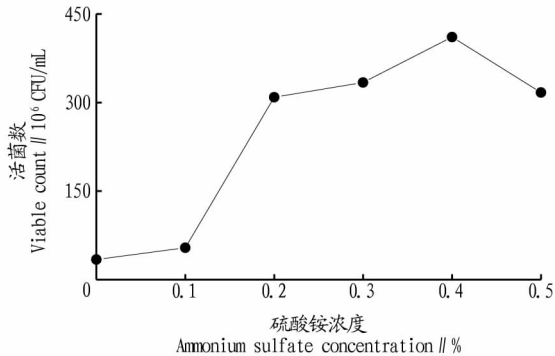


图4 硫酸铵浓度对乳酸菌发酵的影响

Fig. 4 Effect of ammonium sulfate concentration on fermentation of lactic acid bacteria

度最佳,发酵温度及时间相同的条件下,磷酸氢二钾浓度为0.4%时,乳酸菌的活菌数最多。

2.2.5 发酵温度对乳酸菌发酵的影响。由图6结果可知,当发酵温度为30℃时,乳酸菌活菌数最多。发酵温度升高后,乳酸菌活菌数减少,因此,最佳发酵温度应选择30℃。

2.2.6 发酵时间对乳酸菌发酵的影响。由图7结果可知:发酵时间小于48 h,乳酸菌在正常的发酵繁殖,活菌数逐渐增多;在48 h左右,活菌数达到最大值;在48 h之后,乳酸菌数目开始逐渐减少,甚至在96 h时,乳酸菌活菌数几乎为0。因此,最佳发酵时间为48 h。

2.2.7 正交实验优化发酵工艺。在单因子实验的基础上,利用正交实验对发酵工艺进行优化,结果如表2所示,由表2

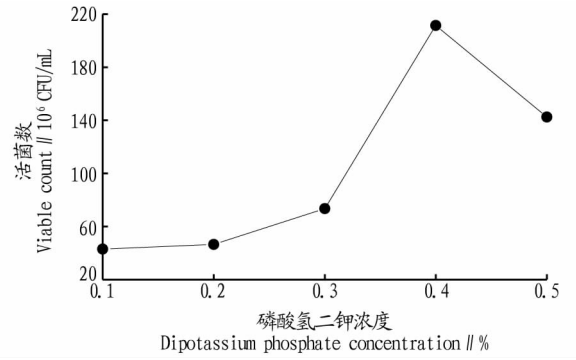


图5 磷酸氢二钾浓度对乳酸菌发酵的影响

Fig. 5 Effect of dipotassium phosphate concentration on fermentation of lactic acid bacteria

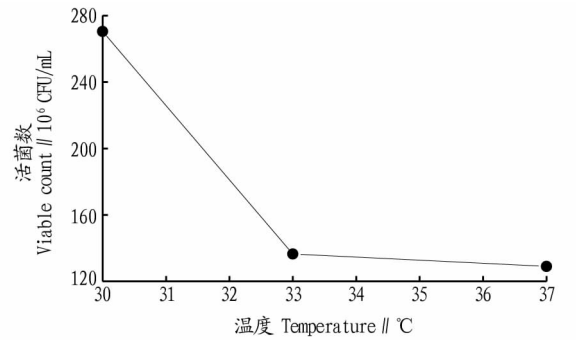


图6 温度对乳酸菌发酵的影响

Fig. 6 Effect of temperature on fermentation of lactic acid bacteria

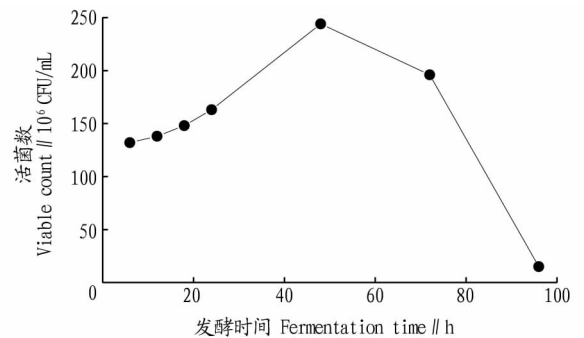


图7 时间对乳酸菌发酵的影响

Fig. 7 Effect of time on fermentation of lactic acid bacteria

可知,各因素的最佳水平为A1B3C3D3,即甘蔗糖蜜浓度为5%,蛋白胨浓度为0.75%,硫酸铵浓度为0.5%,磷酸氢二钾浓度为0.5%,并且在以上工艺下,发酵液中乳酸菌活菌数达到 4.97×10^8 CFU/mL,R值的大小分别为A>C>D>B。

3 结论与讨论

该试验采用从对虾养殖环境中的海水和底泥筛选出的乳酸菌作为菌种,利用革兰氏染色和16S rDNA基因序列分析进行乳酸菌的鉴定,通过单因素实验及正交试验,确定了粪肠球菌M5的最佳发酵工艺为:甘蔗糖蜜浓度为5%,蛋白胨浓度为0.75%,硫酸铵0.5%,磷酸氢二钾的浓度为0.5%,发酵温度为30℃,发酵时间为48 h。在以上工艺下,发酵液

(下转第102页)

显著高于其他组织。青蛤血细胞中的 *ERK* 基因上调最为明显,说明血淋巴作为软体动物非特异性免疫防御的首要组织担当着防御的重任,印证了青蛤的非特异性免疫应答机制。

目前贝类的病原菌包括细菌、真菌、病毒等^[23]。在体外 Poly I:C 模拟刺激后目的基因的表达量在 3 h 时开始上升并达到最大值,在 6、12 h 时试验组的表达量发生明显变化。在病毒类似物 Poly I:C 刺激下该基因的表达量有明显变化,这表明 *ERK* 基因作为青蛤体内潜在的免疫相关基因,参与了青蛤应答病毒感染的免疫反应。

针对近年暴发的青蛤病害现象,从青蛤的分子免疫通路入手,结合生物信息学、分子系统学及分子免疫学手段,对青蛤中的基因进行了研究。对青蛤分子免疫学领域的研究,不仅在提高青蛤存活率、防止青蛤季节性大批量死亡等方面提供了重要的理论基础,而且为其在医药开发方面提供了分子免疫学的理论保障。

参考文献

[1] 宋欣,张丽岩,高玮玮,等. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 磷酸酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 254-258.

[2] 张峰,赵婷,任毅鹏,等. 青蛤 Kazal 型丝氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆及其在组织间的表达分析[J]. 四川动物, 2014, 33(4): 563-567.

[3] 李杰,周庆,何孝军,等. MiR-146b 在急性 Stanford A 型主动脉夹层患者外周血清和主动脉组织中的表达及其临床意义[J]. 中南大学学报(医学版), 2017, 42(10): 1136-1142.

[4] 李刚,黎介寿,祁晓平. p38 丝裂原活化蛋白激酶信号级联在炎症反应中的作用[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(8): 737-740.

[5] 张景熙,胥武剑,韩一平,等. Poly(I:C)和 LPS 共刺激对人气道上皮细胞趋化因子表达的影响及机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(10): 1046-1050.

[6] 马贵华,陈道印,刘六英,等. 多酚对河蟹免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(4): 9-11.

[7] 秦丽雅,崔肇春. 有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)在信息传递中的作用[J]. 生命的化学(中国生物化学学会通讯), 1995, 15(4): 17-20.

[8] 高玮玮,潘宝平,闫春财. 青蛤 (*Cyclina sinensis*) TRAF6 基因克隆及其在 PolyI:C 胁迫下的免疫应答[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(5): 1041-1046.

[9] ZHANG Z L, SONG Q B, LIN M Q, et al. Immunomodulated signaling in macrophages: Studies on activation of Raf-1, MAPK, cPLA₂ and secretion of IL-12[J]. Science in China(Series C), 1997, 40(6): 583-592.

[10] 傅红. 受体酪氨酸激酶-Ras-MAPK 信号转导途径研究进展[J]. 国外医学(分子生物学分册), 1994, 16(6): 245-249.

[11] INAMORI K, ARIKI S, KAWABATA S. A Toll-like receptor in horseshoe crabs[J]. Immunol Rev, 2004, 198: 106-115.

[12] BELL J K, MULLEN G E D, LEIFER C A, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. Trends Immunol, 2003, 24(10): 528-533.

[13] AKIRA S. Toll-like receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38105-38108.

[14] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.

[15] 李基光,王三文,张德咏,等. RNAi 技术的研究及其在植物上的应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 3897-3899.

[16] 王玉梅,潘宝平,丁丹,等. 青蛤丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)基因的克隆及其在鳃弧菌胁迫下的表达分析[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2017, 48(5): 526-530.

[17] WOOTTON E C, DYRYNDA E A, RATCLIFFE N A. Bivalve immunity: Comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15(3): 195-210.

[18] XU Y W, TAO X, SHEN B H, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains[J]. Nature, 2000, 408: 111-115.

[19] YAMANAKA H, SUGIYAMA K, FURUTA H, et al. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* hemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity[J]. Journal of medicinal microbiology, 1990, 32(1): 39-43.

[20] TAKEDA K, AKIRA S. Toll-like receptors in innate immunity[J]. Int Immunol, 2005, 17(1): 1-14.

[21] TAKEDA K, AKIRA S. TLR signaling pathways[J]. Semin Immunol, 2004, 16(1): 3-9.

[22] UEMATSU S, AKIRA S. Innate immune recognition of viral infection[J]. Uirusu, 2006, 56(1): 1-8.

[23] HWANG S D, ASAH I T, KONDO H, et al. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29(4): 630-638.

(上接第 89 页)

表 2 正交试验结果
Table 2 Orthogonal test result

处理号 No.	因素 Factor				活菌数 Viable count 10 ⁶ CFU/mL
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	325
2	1	2	2	2	339
3	1	3	3	3	497
4	2	1	2	3	318
5	2	2	3	1	306
6	2	3	1	2	224
7	3	1	3	2	233
8	3	2	1	3	205
9	3	3	2	1	329
K ₁	387	292	251	320	
K ₂	283	283	329	265	
K ₃	256	350	345	340	
R	131	67	94	75	

中的乳酸菌的活菌数高达 4.97×10^8 CFU/mL, 对对虾养殖所用乳酸菌的发酵生产有一定的参考价值。

参考文献

[1] 程秀玉,王炎松. 海南省养殖南美白对虾药物残留检测[J]. 热带农业工程, 2016, 40(3): 1-3.

[2] 桂建芳. 水生生物学科学前沿及热点问题[J]. 科学通报, 2015, 60(22): 2051-2057.

[3] ESIÖBU N, ARMENTOS L, IKE J. Antibiotic resistance in soil and water environments [J]. Int J Environ Health Res, 2002, 12(2): 133-144.

[4] WANG Y B, LI J R, LIN J D. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook [J]. Aquaculture, 2008, 281(1/2/3/4): 1-4.

[5] 张家国,刘翠玲. 乳酸菌代替抗生素在水产养殖上的应用[J]. 中国水产, 2014(7): 66-68.

[6] KONGNUM K, HONGPATTARAKERE T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi* [J]. Fish&shellfish immunology, 2012, 32(1): 170-177.

[7] WANG W, LI M, FANG W H, et al. A predictive model for assessment of decontamination effects of lactic acid and chitosan used in combination on *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps [J]. International journal of food microbiology, 2013, 167(2): 124-130.

[8] 张玲. 一株对虾肠道益生菌的筛选及其作用机理和应用效果的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2007.

[9] 文金顺. 海南土著乳酸菌筛选及其对凡纳滨对虾生长影响的研究[D]. 海口:海南大学, 2017.

[10] 杨吉霞,张利玲,蒋厚阳,等. 眉山泡菜中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 158-163.

[11] 华鹤良. 乳酸菌的分离鉴定及其抗菌肽与发酵性能研究[D]. 扬州:扬州大学, 2014.

[12] 曾议霆,郭溪浪,周康,等. 富硒乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 178-182.

[13] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999: 1-25.