

# 金丝猴源益生粪肠球菌 dlt7a 的发酵工艺

白文妹<sup>1</sup> 李雪梅<sup>1</sup> 申立泉<sup>1</sup> 石德时<sup>1</sup>  
杨敬元<sup>2</sup> 姚辉<sup>2</sup> 龙兴权<sup>3</sup> 欧阳潮<sup>3</sup> 肖运才<sup>1</sup>

1. 农业微生物学国家重点实验室/华中农业大学动物医学院, 武汉 430070;

2. 湖北神农架金丝猴保育生物学湖北省重点实验室, 神农架 442411;

3. 湖北华大瑞尔科技有限公司, 荆州 434000

**摘要** 从神农架金丝猴的粪便中分离出1株益生菌株dlt7a, 经鉴定为粪肠球菌。为进一步提高发酵液中dlt7a的活菌数量, 对菌株dlt7a的发酵工艺进行优化。通过单因素水平试验, 确定dlt7a的最佳培养条件为装液量20%(50 mL/250 mL), 接种量2%, 培养基初始pH 6.5。设计Plackett-Burman(PB)试验和响应面试验, 找出发酵培养基中影响dlt7a活菌数的主要成分是蔗糖、鱼粉和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 并优化3种重要成分的含量, 确定最优发酵培养基配方为: 蔗糖2.55%, 鱼粉2.63%, 豆粕2.5%, 酵母膏0.4%, CaCO<sub>3</sub>1.0%, KCl0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.014%。在此条件下培养dlt7a菌株, 活菌数可达58.83×10<sup>8</sup> cfu/mL, 比优化前提高了46.53%。

**关键词** 金丝猴; 粪肠球菌; 发酵工艺; 响应面法; 优化

**中图分类号** R 378.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)05-0074-07

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)又叫粪链球菌, 是一种兼性厌氧乳酸菌<sup>[1]</sup>, 大多为圆形或椭圆形, 成双或短链状排列。粪肠球菌是人和动物肠道中的正常菌群之一<sup>[2]</sup>, 现已作为益生菌广泛应用于动物养殖、医学和食品工程领域。农业部将粪肠球菌列入《饲料添加剂品种目录(2013)》, 适用于养殖动物。研究表明, 粪肠球菌繁殖速度快、能产生多种抗菌物质, 对肠道中的沙门氏菌、大肠杆菌等致病菌具有良好的抑制作用<sup>[3-6]</sup>, 激活肠道的免疫功能或刺激机体的免疫系统<sup>[7-8]</sup>。粪肠球菌能够将饲料中的纤维变软, 提高饲料的转化率<sup>[9]</sup>, 可有效调节肠道微生态平衡, 促进动物生长, 提高动物的生产性能<sup>[10]</sup>。

川金丝猴是我国特有的珍稀物种, 一级重点保护动物<sup>[11-12]</sup>, 已被列入濒危物种名录<sup>[13]</sup>。金丝猴肠道菌群失调严重威胁其种群的复壮, 目前国内外还没有关于调节金丝猴肠道健康的专用微生态制剂的报道。本课题组从野生健康的金丝猴粪便中分离到1株具有良好益生特性和安全性的粪肠球菌, 命名为dlt7a菌株<sup>[14]</sup>, 并应用Minitab17软件进行响应面试验设计, 对该菌株的液态发酵培养基进行优化,

以期为规模生产金丝猴专用微生态制剂奠定工艺基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 菌种。粪肠球菌dlt7a: 由笔者所在实验室从神农架健康野生金丝猴的粪便中分离并保存。

2) 培养基。种子培养基: MRS肉汤, 购于青岛高科园海博生物技术有限公司; 基础发酵培养基: 蔗糖2.8%, 鱼粉2%, 豆粕2.5%, 酵母膏0.4%, CaCO<sub>3</sub>0.1%, KCl0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.02%。

### 1.2 方法

1) 菌种的培养。取粪肠球菌dlt7a冻干粉在MRS平板上活化2代后, 接入含有50 mL种子培养基的150 mL三角瓶中, 37℃、190 r/min摇床培养12 h后, 以2%的接菌量将粪肠球菌dlt7a种子液转接到50 mL发酵培养基中(250 mL三角瓶), 于37℃、190 r/min摇床培养16 h。

2) 活菌数的计数方法。采用平板菌落计数法, 即在无菌条件下, 取0.5 mL已发酵完成的发酵液

收稿日期: 2016-11-27

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2013BAD03B01)

白文妹, 硕士研究生。研究方向: 兽医微生物与免疫学。E-mail: 971959868@qq.com

通信作者: 肖运才, 博士, 副教授。研究方向: 兽医微生物与免疫学。E-mail: xyc88@mail.hzau.edu.cn

参照文献[15]对其进行 10 倍系列的稀释、涂布和活菌数的计数。

3) 生长曲线的绘制。取 27 个 150 mL 的三角瓶, 每个装 50 mL 液体种子培养基, 灭菌后, 按 2% 的接种量接种活化的种子液, 于 37 °C、190 r/min 条件下恒温摇床培养。接种时刻作为 0 h, 每隔 2 h 取出 3 瓶取样, 分别测定 OD<sub>600</sub> 和 pH 值, 计算平均值作为该时刻的 OD<sub>600</sub> 和 pH 值。

4) 摆瓶发酵条件优化。分别对粪肠球菌 dlt7a 的装液量(20%、40%、60%)、250 mL 三角瓶的接种量(1%、2%、3%、4%)和初始 pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)进行优化, 确定其最适摇瓶发酵条件。

5) Plackett-Burman 设计。以基础发酵培养基为基础, 进行实验次数为 12 的 Plackett-Burman (PB) 设计<sup>[16]</sup>, 考察蔗糖、鱼粉、豆粕、酵母膏、CaCO<sub>3</sub>、KCl、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 对粪肠球菌活菌数(Y)的影响, 同时设置 1 个虚拟因子用以平衡实验误差, 确定影响活菌数的主要因素。利用 Minitab17 软件创建九因素试验组, 每个因素取“高(+1)”“低(-1)”2 个水平, PB 设计的因素水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design %

因素 Factors	编码 Coding	水平 Levels	
		-1	+1
蔗糖 Sucrose	X <sub>1</sub>	1.87	2.80
鱼粉 Fish meal	X <sub>2</sub>	2.00	3.00
豆粕 Soya bean	X <sub>3</sub>	2.50	3.75
酵母膏 Yeast extract	X <sub>4</sub>	0.40	0.60
CaCO <sub>3</sub>	X <sub>5</sub>	1.00	1.50
KCl	X <sub>6</sub>	0.06	0.10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	X <sub>7</sub>	0.06	0.10
虚拟变量 Dummy variable	X <sub>8</sub>	0.00	0.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	X <sub>9</sub>	0.016	0.020

6) 最陡爬坡试验。参考 PB 试验所得的回归方程和生产实际, 设计最陡爬坡试验, 寻找响应面试验的最大生物量区域。若回归方程中变量的系数为正, 表明增大该变量的取值对应变量的效应递增, 反之递减, 根据系数的大小并结合生产实际确定步长。

7) Box-Behnken 试验设计。通过最陡爬坡试验找到最高点的中心区域后, 运用 Minitab17 的 Box-Behnken 响应面法设计三因素三水平试验, 包括 12 个析因试验和 3 个零点试验, 以发酵后的活菌数为响应值, 3 个显著影响因素为自变量。三水平用

“-1、0、+1”编码。分析试验结果数据, 寻求响应面的最高点, 确定最优发酵培养基<sup>[17]</sup>。Box-Behnken 试验设计各因素编码水平见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验设计水平

Table 2 Levels of the Box-Behnken design

编码水平 Coding levels	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>9</sub>
下水平(-1) Lower level	2.1	2.4	0.012
零水平(0) Zero level	2.6	2.6	0.014
上水平(+1) Upper lever	3.1	2.8	0.016
步长△ Step size	0.5	0.2	0.002

8) 优化前后发酵培养基的比较。分别配置基础发酵培养基和优化后发酵培养基各 50 mL 于 250 mL 三角瓶中, 进行摇瓶发酵试验, 每组 4 个重复, 接种量 2%, 37 °C、190 r/min, 培养 16 h 后, 采用平板菌落计数法进行活菌计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线的绘制

由图 1 可知: 0~2 h 是粪肠球菌的迟缓期, 2 h 以后, 菌体呈对数增长趋势, 从 8 h 开始菌体生长缓慢, 10 h 后菌体生长进入稳定期, 菌体浓度基本保持稳定。由生长曲线可知, 对数生长期内 pH 急剧下降, 这是由于生长过程中不断产生乳酸所致。随着培养时间的延长, 乳酸的积累也会抑制菌体的繁殖, 因此, 细菌生长变缓、pH 降低的幅度逐渐减小, 最终保持动态平衡状态。故后期试验选取接种后培养 10 h 时的粪肠球菌 dlt7a 种子液为最适发酵液接菌时间。

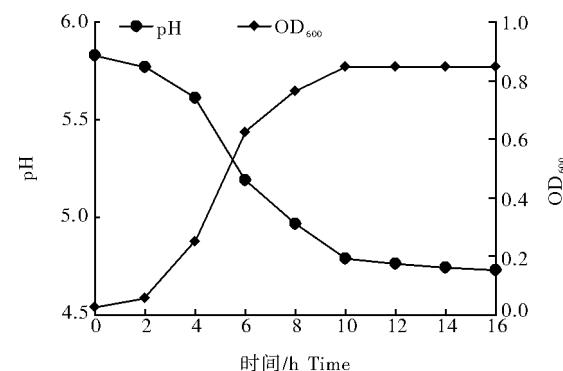


图 1 dlt7a 的生长曲线与 pH 曲线

Fig.1 The growth curve and pH curve of dlt7a

### 2.2 发酵条件的优化结果

在基础发酵培养基的基础上, 对粪肠球菌 dlt7a 的装液量、接种量及其培养基的初始 pH 分别进行优化(图 2)。结果表明, 最佳条件分别为装液量 20% (50 mL/250 mL), 接种量 2%, 初始 pH 6.5。

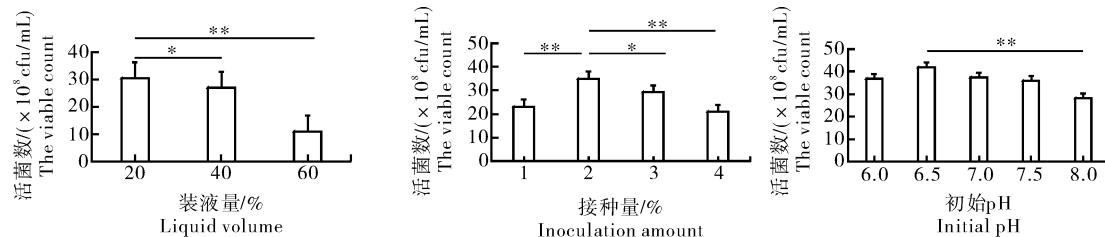


图 2 不同装液量、接种量、初始 pH 对 dlt7a 发酵的影响

Fig.2 Effect of liquid volume, inoculation amount, initial pH on the fermentation of dlt7a

### 2.3 Plackett-Burman 试验结果

利用 Minitab17 软件对 PB 试验结果(表 3)进行回归分析,得出培养基中各因素的回归系数、效应及其显著性,结果(表 4)显示,蔗糖( $X_1$ )、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $X_9$ )的  $P$  值均小于 0.05,说明蔗糖和

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  对 dlt7a 发酵的影响显著,且这 2 种因素均产生负效应;其次的重要影响因素是鱼粉( $X_2$ ),产及其显著性,结果(表 4)显示,蔗糖( $X_1$ )、生正效应。因此,确定蔗糖、鱼粉、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为 dlt7a

表 3 PB 试验设计及结果

Table 3 Arrangement and experimental results of the PB design

试验号 Experiment No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	活菌数 Strain $Y/(\times 10^8 \text{ cfu/mL})$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	24.00
2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	34.65
3	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	32.80
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	35.55
5	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	36.00
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	16.30
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	32.80
8	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	44.25
9	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	34.70
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	42.40
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	25.00
12	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	35.00

表 4 PB 试验设计结果回归分析

Table 4 The regression analysis for the PB experimental results

项 Source	效应 Effective	系数 Coefficient	P 值 P value	T 值 T value	重要性顺序 The order of significance
$X_1$	-9.642	-4.821	0.039	-4.89	1
$X_2$	3.658	1.829	0.205	1.86	3
$X_3$	0.775	0.387	0.732	0.39	7
$X_4$	2.325	1.163	0.360	1.18	5
$X_5$	1.642	0.821	0.493	0.83	6
$X_6$	3.342	1.671	0.232	1.69	4
$X_7$	-0.325	-0.162	0.884	-0.16	8
$X_8$	-0.325	-0.162	0.884	-0.16	9
$X_9$	-9.325	-4.662	0.042	-4.73	2

发酵培养基的主要影响因素。

### 2.4 最陡爬坡试验结果

由表 5 可知,试验组 1~3 发酵培养基中活菌数

逐渐增加,试验组 3~4 活菌数呈下降趋势。因此,

活菌数最大的区域在试验组 3 附近,以此条件作为

后续响应面试验的中心点。

表 5 最陡爬坡试验设计和结果

Table 5 Arrangement and results of the experiment of the steepest ascent path

试验编号	Trial number	X <sub>1</sub> /%	X <sub>2</sub> /%	X <sub>9</sub> /%	Y/(×10 <sup>8</sup> cfu/mL)
1		3.6	2.2	0.018	36.17
2		3.1	2.4	0.016	38.20
3		2.6	2.6	0.014	50.83
4		2.1	2.8	0.012	45.53
5		1.6	3.0	0.010	43.57

## 2.5 Box-Behnken 试验结果

以最陡爬坡试验得到的中心点进行 Box-Behnken 试验设计(表 6), 对试验结果进行二次多项回归分析, 获得 dlt7a 发酵液的活菌数 Y 对 3 个显

著因素的二次多项式回归方程:

$$Y = 58.917 - 2.844X_1 + 2.094X_2 + 2.375X_9 - 13.427X_1 \times X_1 - 9.677X_2 \times X_2 - 9.115X_9 \times X_9 + 1.687X_1 \times X_2 + 3.500X_1 \times X_9 + 2.125X_2 \times X_9$$

表 6 Box-Behnken 试验设计及其结果

Table 6 Arrangement and experimental results of the Box-Behnken design

试验编号	Trial number	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>9</sub>	Y/(×10 <sup>8</sup> cfu/mL)
1		1	0	1	35.25
2		0	0	0	61.75
3		0	1	-1	35.75
4		-1	0	-1	44.50
5		1	1	0	33.25
6		-1	1	0	40.25
7		0	-1	1	40.25
8		0	-1	-1	33.50
9		1	0	-1	29.75
10		-1	-1	0	35.00
11		0	1	1	51.00
12		0	0	0	58.75
13		0	0	0	56.25
14		1	-1	0	34.75
15		-1	0	1	36.00

由表 7 可知, 该数学模型的  $P = 0.024 < 0.05$ , 说明该二次模型差异显著, 可以进行统计学分析; 失拟项反映数学模型与实验结果的差异情况, 本模型中  $P = 0.195 > 0.05$ , 两者差异不显著, 表明该数学模型与实验结果拟合良好; 决定系数  $R^2$  表示回归模型的误差在总误差中的百分比, 该回归模型中  $R^2$  为 92.44% > 85%, 表明回归模型与实验数据的吻合度

很好。综上分析, 本试验得到的回归模型可以真实地反映实验结果。由表 8 可知,  $X_1 \times X_1$  的  $P$  值小于 0.01, 说明蔗糖的二次项对模型有极显著的影响,  $X_2 \times X_2$  和  $X_9 \times X_9$  的  $P$  值均小于 0.05, 说明鱼粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的二次项对模型有显著的影响, 交互作用的  $P$  值均大于 0.05, 说明  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_9$  三因素之间无显著的交互作用。

表 7 响应面试验的方差分析

Table 7 ANOVA for the Box-Behnken test

来源 Source	自由度 df	离差平方和 SS	均方差 MS	F 值 F value	P 值 P value
回归 Regression	9	1 374.56	152.729	6.79	0.024
线性 Linear	3	144.89	48.297	2.15	0.213
平方 Square	3	1 151.22	383.740	17.06	0.005
交互作用 Interaction	3	78.45	26.151	1.16	0.411
残差误差 Error of residuals	5	112.49	22.499	—	—
失拟项 Lack of fit	3	97.33	32.443	4.28	0.195
纯误差 Pure error	2	15.17	7.583	—	—
合计 Total	14	—	—	—	—
决定系数 $R^2$	—	—	0.924 4	—	—

表 8 回归模型系数的估计

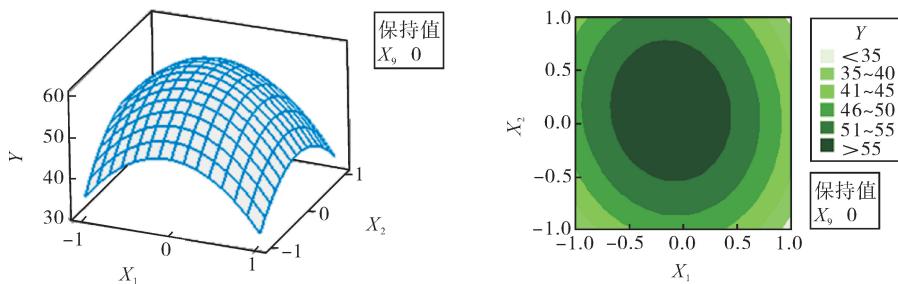
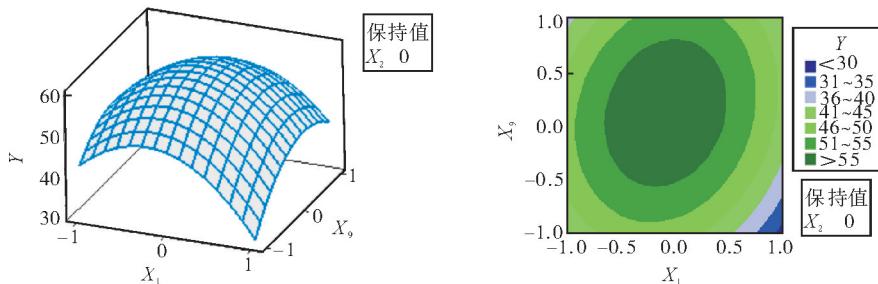
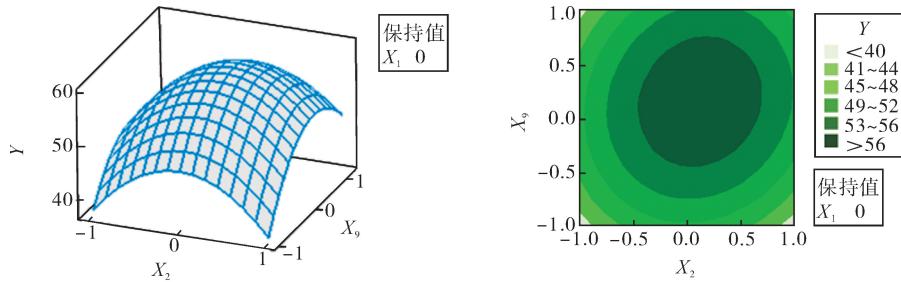
Table 8 Coefficient estimates for regression model

项 Source	系数 Coefficient	系数标准误 Coefficient standard error	T 值 T value	P 值 P value
常量 Constant	58.917	2.739	21.514	0.000
$X_1$	-2.844	1.677	-1.696	0.151
$X_2$	2.094	1.677	1.249	0.267
$X_9$	2.375	1.677	1.416	0.216
$X_1 \times X_1$	-13.427	2.468	-5.439	0.003
$X_2 \times X_2$	-9.677	2.468	-3.920	0.011
$X_9 \times X_9$	-9.115	2.468	-3.692	0.014
$X_1 \times X_2$	-1.687	2.372	-0.712	0.509
$X_1 \times X_9$	3.500	2.372	1.476	0.200
$X_2 \times X_9$	2.125	2.372	0.896	0.411

## 2.6 响应面各因素间交互作用的分析

拟合  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_9$  三因素的响应值后, 得到发酵培养基中活菌数( $Y$ )与两两试验因素间关系的三维

曲面图和等值线图(图 3~5)。利用 Minitab17 软件分析得到模型存在的最大值:  $X_1 = -0.090\ 909\ 1$ 、 $X_2 = 0.131\ 313$ 、 $X_9 = 0.131\ 313$ , 结合原点和步长,

图 3  $X_1$ 、 $X_2$  交互影响 dlt7a 发酵活菌数的曲面图和等值线图Fig.3 Fermentation response surface for the cross-interaction of  $X_1$  and  $X_2$ 图 4  $X_1$ 、 $X_9$  交互影响 dlt7a 发酵活菌数的曲面图和等值线图Fig.4 Fermentation response surface for the cross-interaction of  $X_1$  and  $X_9$ 图 5  $X_2$ 、 $X_9$  交互影响 dlt7a 发酵活菌数的曲面图和等值线图Fig.5 Fermentation response surface for the cross-interaction of  $X_2$  and  $X_9$

解析求得实际值为  $X_1 = 2.55$ 、 $X_2 = 2.63$ 、 $X_9 = 0.014$ ，此时预测的响应值(活菌数)为  $59.34 \times 10^8$  cfu/mL。综合以上试验结果,优化后的发酵培养基组分:蔗糖 2.55%, 鱼粉 2.63%, 豆粕 2.5%, 酵母膏 0.4%,  $\text{CaCO}_3$  1.0%, KCl 0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.014%。

## 2.7 优化前后发酵培养基的比较

由表 9 可知, 初始发酵培养基(蔗糖 2.8%, 鱼粉 2.0%, 豆粕 2.5%, 酵母膏 0.4%,  $\text{CaCO}_3$  1.0%, KCl 0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02%) 的活菌数为  $40.15 \times 10^8$  cfu/mL, 优化后发酵培养基(蔗糖 2.55%, 鱼粉 2.63%, 豆粕 2.5%, 酵母膏 0.4%,  $\text{CaCO}_3$  1.0%, KCl 0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.014%)。

表 9 发酵液优化前后活菌数

Table 9 The viable count of dlt7a in initial and optimized formula fermentation broth

$\times 10^8$  cfu/mL

实验编号	Trial number	初始配方	The initial formula	优化后配	The optimized formula
1			37.90		59.50
2			41.25		61.00
3			44.70		58.50
4			36.75		56.30
平均值±标准差	Mean±SD		40.15±3.58		58.83±1.97

$\text{CaCO}_3$  1.0%, KCl 0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.014%) 活菌数为  $58.83 \times 10^8$  cfu/mL, 提高了 46.53%。

## 3 讨 论

目前, 笔者未发现有关金丝猴源益生菌的报道。笔者所在实验室从神农架健康野生金丝猴的肠道中分离出粪肠球菌 dlt7a 菌株, 经前期研究证明<sup>[14]</sup>, 该菌株具有良好的抗逆性、安全性和益生特性, 适宜作为金丝猴的专用微生态制剂。因此, 本试验对粪肠球菌 dlt7a 的发酵工艺进行研究, 以期为规模化生产粪肠球菌 dlt7a 提供理论基础。

工业生产中需要同时考虑菌株的营养需求和原料成本<sup>[18]</sup>, 本试验选用的基础发酵培养基为蔗糖、鱼粉、豆粕等来源广泛且价格较低的物质, 可为微生物的生长提供必需的营养。

在发酵生产实践中接种的种子液, 不仅要求具有较高的活菌浓度, 还要求菌种具有较强的繁殖力, 这样的种子液可以在发酵培养基中快速适应并增殖<sup>[19]</sup>。因此, 接种适宜种龄的菌种非常重要。本试验测定了 dlt7a 的生长曲线, 结果表明, 粪肠球菌 dlt7a 的生长曲线与猪源粪肠球菌 DT-02 的生长曲线的变化趋势一致<sup>[20]</sup>, 确定了菌种进入对数后期的时间为 10 h, 此时的种子液可以保证具有较高的活菌浓度和旺盛的代谢水平。

目前关于粪肠球菌发酵培养基配方的优化, 主要采用的方法是正交法和响应面法。响应面法适合优化影响因素较多且各因素间关系较复杂的工艺, 与正交法相比更精确。笔者使用 Minitab17 软件设计响应面试验, 通过分析数据得到与试验拟合程度

较高的数学模型, 得出发酵培养基中影响活菌数的 3 个重要因素的质量百分数为蔗糖 2.55%、鱼粉 2.63%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.014%。

因每种菌株的生长特性不同, 菌株在发酵培养基中的繁殖力各异, 生产中需要针对每种菌株进行发酵工艺的优化, 以提高菌株发酵的活菌数。莫海燕等<sup>[19]</sup>优化的 1 株粪肠球菌的活菌数可达  $67.0 \times 10^8$  cfu/mL。尹望等<sup>[20]</sup>将粪肠球菌 DT-2 的活菌数优化到  $16.99 \times 10^8$  cfu/mL, 提高了 58.79%。周英等<sup>[21]</sup>将粪肠球菌 F71 的活菌数优化到  $2.78 \times 10^8$  cfu/mL, 比基础培养基提高 54.6%。而笔者将 dlt7a 的活菌数优化到  $58.83 \times 10^8$  cfu/mL, 比优化前提高了 46.53%, 达到了比较理想的效果。

## 参 考 文 献

- [1] 李梅, 李卫芬, 姚江涛. 猪源肠球菌的分离及鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(3): 48-50.
- [2] 王亚宾, 陈丽颖, 胡慧, 等. 猪源粪肠球菌和屎肠球菌多重 PCR 快速鉴定方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(8): 1123-1127.
- [3] DIMOV S G, PEYKOV S, RAYKOVA D, et al. A newly discovered bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 3915[J]. Beneficial microbes, 2010, 1(1): 43-51.
- [4] 鲍延娥, 董晓芳, 佟建明, 等. 粪肠球菌益生性的体外评价[J]. 西北农业学报, 2013, 22(11): 202-207.
- [5] 侯璐. 猪源粪肠球菌的特性及对仔猪生长性能和免疫力影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- [6] AHMED K A A, DRIDER-HADIOUCHE K, RAVALLEC R, et al. Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium [J]. Frontiers in microbiology, 2015, 6(227): 227.
- [7] 潘宝海, 孙冬岩, 孙笑非, 等. 不同微生物饲料添加剂对断奶仔

- 猪生长性能的影响[J].饲料研究,2014(5):46-47.
- [8] 魏清甜,李平华,汪涵,等.粪肠球菌替代抗生素对保育仔猪生长性能、腹泻率、体液免疫指标和肠道微生物数量的影响[J].南京农业大学学报,2014,37(6):143-148.
- [9] 席兴军,韩鲁佳,原慎一郎,等.添加乳酸菌和纤维素酶对玉米秸秆青贮饲料品质的影响[J].中国农业大学学报,2003,8(2):21-24.
- [10] 邬向东,刘明珠,包淋斌,等.乳酸粪肠球菌对常用抗生素耐受性及肠道致病菌抑制作用[J].饲料研究,2013(8):83-84.
- [11] 余辉亮.湖北神农架自然保护区川金丝猴投食群行为学初步研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [12] 何静平.国家重点保护野生动物名录[J].云南国防,2004(3):48-48.
- [13] 王应祥.中国濒危动物红皮书,兽类[M].北京:科学出版社,1998.
- [14] 岳会会.神农架金丝猴肠道益生菌的筛选和鉴定[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [15] 李雯静,李则静,田中元,等.羊源丁酸梭菌 HDRyYB1 发酵工艺的优化[J].微生物学通报,2016(3):534-540.
- [16] BOX G E P, HUNTER J S. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces[J]. Annals of mathematical statistics, 1957, 28(1):195-241.
- [17] WIDDEL F. Cultivation of anaerobic microorganisms with hydrocarbons as growth substrates[M]// TIMMIS K N. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010:3787-3798.
- [18] 沈中艳.猪源益生乳酸菌的筛选及发酵工艺研究[D].武汉:华中农业大学,2007.
- [19] 莫海燕,包慧芳,王宁,等.响应面法优化粪肠球菌摇瓶发酵培养基[J].新疆农业科学,2014,51(18):1532-1540.
- [20] 尹望,杜志琳,李雪平.一株猪源粪肠球菌 DT-02 的培养基优化[J].饲料研究,2015(1):18-21.
- [21] 周英,高紫兰,袁凌南,等.粪肠球菌 F71 的增殖培养基优化研究[J].现代农业科技,2012(3):35-36.

## Fermentation technology for probiotic *Enterococcus faecalis* dlt7a isolated from golden snub-nosed monkey

BAI Wenmei<sup>1</sup> LI Xuemei<sup>1</sup> SHEN Liquan<sup>1</sup> SHI Deshi<sup>1</sup>

YANG Jingyuan<sup>2</sup> YAO Hui<sup>2</sup> LONG Xingquan<sup>3</sup> OUYANG Chao<sup>3</sup> XIAO Yuncai<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Veterinary Medicine,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Key Laboratory of Conservation Biology for Shennongjia Golden Monkey, Hubei Province,  
Shennongjia Forest District 442411, China;

3. Hubei Huada Real Technology Co. Ltd, Jingzhou 434000, China

**Abstract** A probiotic strain dlt7a was isolated from feces of the Shennongjia golden snub-nosed monkey and was identified as *Enterococcus faecalis*. In order to improve the viable count of dlt7a in the fermentation broth, the fermentation technology of dlt7a was optimized. The optimal culture condition with 20% (50 mL/250 mL) loading volume, 2% inoculation amount, and initial pH of 6.5, was obtained by single-factor-experiment. In the study, Plackett-Burman experiment and response surface experiment were designed to identify the main nutrients affecting the viable count of dlt7a in the fermentation broth and to optimize the content of the three main nutrients including sucrose, fish meal and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The optimum nutrients in the media consisted of 2.55% sucrose, 2.63% fish meal, 2.5% soya bean, 0.4% yeast extract, 1.0% CaCO<sub>3</sub>, 0.1% KCl, 0.1% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O and 0.014% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. *E. faecalis* dlt7a were then cultured by the optimized fermentation medium and condition, and the viable count reached 58.83 × 10<sup>8</sup> cfu/mL, which was 46.53% higher than that not optimized.

**Keywords** golden snub-nosed monkey; *Enterococcus faecalis*; fermentation technology; response surface methodology; optimization

(责任编辑:边书京)