

研究报告

酸奶菌群发酵糖蜜产复合有机酸化剂的研究

李月¹, 林青², 王子涵³, 娄恺², 祝长青^{*1}, 霍向东^{*2}

1 新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

2 新疆农业科学院微生物应用研究所新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

3 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

李月, 林青, 王子涵, 娄恺, 祝长青, 霍向东. 酸奶菌群发酵糖蜜产复合有机酸化剂的研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2100-2110

Li Yue, Lin Qing, Wang Zihan, Lou Kai, Zhu Changqing, Huo Xiangdong. Production of composite organic acidifier by fermentation of molasses with yogurt microbial consortium[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2100-2110

摘要:【背景】开发安全、有效、稳定、适口性好、对环境无危害的无抗饲料添加剂是我国畜牧业的重中之重, 酸化剂作为功能性饲料添加剂在众多替抗产品中有较大的优势。【目的】通过酸奶菌群发酵甜菜糖蜜制备低成本乳酸型复合液态酸化剂。【方法】以 11 种不同的新疆农牧民传统发酵酸奶菌群为出发菌, 经 MRS 培养基富集乳酸菌群, 选择产酸量高的菌群进行甜菜糖蜜发酵试验, 并对菌群发酵时间、发酵条件、糖蜜浓度、氮源及中和剂进行优化。【结果】在糖蜜浓度为 100 g/L、培养基未灭菌且 37 °C 静置发酵 48 h 时, B2 菌群发酵乳酸产量为 34.52 g/L, 总酸为 83.42 g/L, 加入中和剂 Na₂CO₃ 后其乳酸产量达 73.42 g/L, 总酸达到 169.37 g/L; B5 菌群发酵乳酸产量可达 61.12 g/L, 总酸可达 112.50 g/L, 加入中和剂 Ca(OH)₂ 后其乳酸产量达 74.37 g/L, 总酸为 137.26 g/L。B2 菌群发酵原液对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌及产气荚膜杆菌均有较强的抑制作用; B5 菌群发酵原液则对产气荚膜杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 和大肠杆菌 STEC 均有较强的抑制作用。【结论】富集新疆农家酸奶菌群, 生料发酵甜菜糖蜜可低成本生产乳酸型液态酸化剂。

关键词: 微生物菌群; 发酵; 甜菜糖蜜; 酸化剂

基金项目: 新疆生产建设兵团重点研发计划专项(2020AB013)

Supported by: Key Research and Development Program of Xinjiang Production and Construction Corps (2020AB013)

*Corresponding authors: E-mail: ZHU Changqing: 107621994010016@xjnu.edu.cn; HUO Xiangdong: Xiangdonghuo@163.com

Received: 2021-10-08; Accepted: 2021-11-24; Published online: 2022-01-10

Production of composite organic acidifier by fermentation of molasses with yogurt microbial consortium

LI Yue¹, LIN Qing², WANG Zihan³, LOU Kai², ZHU Changqing^{*1}, HUO Xiangdong^{*2}

1 College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

2 Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China

3 College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Developing safe, effective, stable, palatable, and environmentally friendly antibiotic-free feed additives is the top priority of China's animal husbandry. As a feed additive, acidifier stands out from the alternatives of antibiotics. [Objective] This study aims to produce low-cost lactic acid-based composite organic acidifier by fermenting beet molasses with yogurt microbial consortium. [Methods] Eleven microbial consortiums used for the fermentation of yogurt by farmers and herdsmen in Xinjiang were taken as the starting bacteria and enriched with MRS medium. The microbial consortiums with high acid production were selected for beet molasses fermentation. The fermentation time, fermentation conditions, molasses concentration, nitrogen source, and neutralizer were optimized. [Results] The optimized conditions of producing composite organic acidifier by fermenting molasses with yogurt microbial consortium were non-sterilized medium, molasses concentration of 100 g/L, and static fermentation at 37 °C for 48 h. Under the optimal conditions, the microbial consortium B2 produced 34.52 g/L lactic acid and 83.42 g/L total acids. When Na₂CO₃ was added as the neutralizer, B2 produced 73.42 g/L lactic acid and 169.37 g/L total acids. The microbial consortium B5 produced 61.12 g/L lactic acid and 112.50 g/L total acids. When Ca(OH)₂ was added as the neutralizer, B5 produced 74.37 g/L lactic acid and 137.26 g/L total acids. The fermentation broth of microbial consortium B2 mainly inhibited *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*, and that of microbial consortium B5 mainly inhibited *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *Escherichia coli* O517 and *E. coli* STEC. [Conclusion] The raw beet molasses fermented with microbial consortiums enriched from Xinjiang farmhouse yogurt flora can produce lactic acid-based composite liquid acidifiers at low costs.

Keywords: microbial consortium; fermentation; beet molasses; acidifier

2019年我国明确要求自2020年7月1日起,所有商业饲料生产中停止使用促生长抗生素,2020年12月31日起停止含有促生长抗生素的商业饲料流通。开发安全、有效、稳定、适口性好、对环境无危害的无抗饲料添加剂是我国畜牧业的重中之重,酸化剂作为功能性饲料添加剂在众多替抗产品中有较大的优势,是欧盟首推的抗生素替代品^[1],其具有无残留、无抗

药性及无毒害作用等特点。目前使用的酸化剂主要有无机酸化剂、有机酸化剂和复合酸化剂3种。无机酸化剂一般包括H₃PO₄、HCl及H₂SO₄;常见的有机酸化剂包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸和乳酸等;复合酸化剂是指将无机酸和有机酸复配,弥补单一组分酸化剂的不足,增强其使用效果。酸化剂与日粮配合饲喂动物可提高日粮的酸度^[2],调节动物胃肠道内pH,

减少病原菌感染^[3], 增强机体免疫性能及抗应激能力^[4-5], 提高动物生产性能^[6]。酸化剂在养殖业中具有巨大的应用价值和良好的发展前景^[7], 因此, 开发一种成本低、适口性好、舒缓型的有机酸化剂非常必要。

甜菜糖蜜是制糖过程中的主要副产物, 其中的酚类、色素、无机盐等非糖物质不断富集导致部分蔗糖始终无法结晶^[8], 呈黏稠、深棕色、半流动的液态状。糖蜜可为微生物生长繁殖提供丰富的廉价碳源^[9], 并且产生不同的酸类物质^[10]。以糖蜜作为曲酸发酵底物, 当总糖浓度为 80 g/L 时, 曲酸可达 9.02 g/L^[11]。用米曲霉发酵糖蜜, 在最佳条件下曲酸为 15.43 g/L^[12]。米根霉发酵糖蜜生产 L-乳酸, 在最适条件下其乳酸产量可达 61.88 g/L^[13]。用鼠李糖乳杆菌 SCT-10-10-60 发酵糖蜜生产 L-乳酸, 产量可达到 106 g/L^[14]。因此, 以甜菜糖蜜作为碳源用于菌群发酵生产酸化剂可行且能节约生产成本。

目前市场中的酸化剂产品普遍存在成本高、易腐蚀加工机械、易破坏饲料中的维生素和不易储存运输等弊端^[15]。通过多菌种复合发酵, 采用表层吹气策略发酵果蔬废弃物得到含多种有机酸、低 pH 值的酸化剂, 可显著提高仔猪的日增重和日采食量, 降低料肉比和腹泻率^[16]。将柠檬酸加入植物乳杆菌发酵废液制成包含柠檬酸和乳酸的酸化剂^[17], 将其按一定比例加入仔猪饮水中, 能改善仔猪的生长性能和免疫功能。已有的微生物发酵制备酸化剂生产工艺复杂且成本高, 未能产业化。利用低成本原料一步法制备酸化剂是现阶段研究的热点问题。

本研究利用乳酸菌群生料发酵甜菜糖蜜制成液态酸化剂, 以期有效利用糖蜜中的糖类物质, 获得高效、低成本饲用乳酸型复合酸化剂, 为酸化剂产业技术升级提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

收集 11 种新疆不同农家农牧民的传统发酵酸奶。

1.1.2 培养基和主要试剂、仪器

MRS 培养基(g/L): K_2HPO_4 2.0, 柠檬酸三铵 2.0, 无水乙酸钠 5.0, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6, 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 10.0, 酵母浸膏 5.0, 吐温-80 1 mL。LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸粉 3.0, 氯化钠 5.0。发酵培养基(g/L): 甜菜糖蜜 100.0, 玉米浆干粉 18.5。

甜菜糖蜜, 中粮屯河糖业有限公司; 玉米浆干粉, 湖州天睿生物科技有限公司。甜菜糖蜜主要成分(g/L): 粗蛋白 50.0, 粗脂肪 7.5, 无氮浸出物 596.0, 灰分 82.5, 蔗糖含量 368.0。玉米浆干粉主要成分(g/kg): 总蛋白质 447.0, 总氮 109.0, 总磷 33.0。

pH 计, 梅特勒-托利多国际贸易有限公司(上海); 多功能酶标仪, 美谷分子仪器有限公司(上海); 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 高产乳酸菌群的富集筛选

取 1 mL 酸奶样品接种于 50 mL MRS 培养基, 37 °C 静置培养, 培养液每隔 24 h 以 2% (体积分数) 的接种量接种于含有 50 mL MRS 培养基的 100 mL 锥形瓶中传代, 连续传代 12 次, 得到发酵性能稳定的菌群, 对各代菌群进行保藏。

1.2.2 指标测定

乳酸测定参考 Borshchevskaya 等^[18]使用的比色法; 总酸测定采用酸碱指示滴定法^[19]; 蔗糖测定采用 Solarbio 公司蔗糖含量检测试剂盒。

1.3 酸化剂发酵培养条件单因素试验

1.3.1 培养方式对发酵糖蜜产酸化剂的影响

微生物菌群经发酵培养基活化后, 按 2% (体

积分数,下同)的接种量接种至装有 50 mL 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中,糖蜜浓度为 100 g/L,发酵培养温度为 37 °C。发酵培养方式分 4 种:

(1) 灭菌,静置;(2) 灭菌,150 r/min 培养;(3) 未灭菌,静置;(4) 未灭菌,150 r/min 培养。培养 48 h 测定乳酸、总酸及蔗糖含量,每个处理设 3 个重复。

1.3.2 糖蜜浓度对菌群发酵产酸的影响

微生物菌群经发酵培养基活化后,按 2%接种至装有 50 mL 发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中,糖蜜浓度分别为 100、200、300、400、500 g/L,37 °C 静置培养 48 h 后测定乳酸与总酸含量,以未接菌培养基为对照组,比较其蔗糖剩余量,每个处理设 3 个重复。

1.3.3 发酵时间对菌群产酸的影响

按 2%将 B2、B5 菌群接种至装有 100 g/L 糖蜜的发酵培养基的 100 mL 锥形瓶中,37 °C 静置培养,分别测定 12、24、36、48、60、72 h 培养液中乳酸及总酸产量,每个处理设 3 个重复。

1.3.4 氮源对菌群产酸的影响

选择 10 种有机和无机氮源,分别是酵母浸粉、牛肉膏、蛋白胨、玉米浆干粉、硝酸铵、氯化铵、硝酸钾、硫酸铵、乙酸铵和尿素。每种氮源均以 5 g/L 的终浓度与糖蜜培养基混合,菌种按照 2%接种量接种于各种氮源发酵培养基中,37 °C 静置培养 48 h 后测定乳酸及总酸产量,每个处理设 3 个重复。

1.3.5 不同中和剂对菌群发酵产酸的影响

通过预实验对菌群发酵后的 pH 进行测定,

并利用中和剂对发酵液 pH 进行调节,将 pH 值调至 7.0 所用的各中和剂的量如表 1 所示。在糖蜜浓度 100 g/L 的发酵培养基中以 2%的接种量分别接种 B2 和 B5 菌群,培养基不灭菌,37 °C 静置培养,在培养 24 h 时向其中加入中和剂,以不加任何中和剂的发酵液为对照组,培养 72 h 后测定乳酸及总酸产量,每个处理设 3 个重复。

1.3.6 发酵液抑菌试验

利用大肠杆菌 O157、大肠杆菌 STEC、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和产气荚膜杆菌 5 种致病菌进行抑菌性试验。取 1 mL 一定浓度的各致病菌菌液,将其与 45 °C 左右的 LB 培养基混匀,置于无菌的一次性培养皿中。待培养基冷却后,用灭菌后的打孔器在培养基上进行打孔,孔的直径为 0.6 cm。分别取 50 μ L B2 和 B5 菌群发酵原液及 2 倍稀释液于每个孔中,将其置于 37 °C 的恒温培养箱中培养 24 h,观察抑菌效果并测量抑菌圈大小,每个样品做 3 个重复。

1.3.7 发酵液有机酸含量测定

经发酵培养基活化后的 B2 和 B5 菌群,以 2%的接种量接种至装有 50 mL 未灭菌的糖蜜浓度为 100 g/L 发酵培养基中,37 °C 静置培养 72 h,发酵得到液态酸化剂,菌群经过 72 h 发酵,每隔 6 h 对其发酵液进行取样测定其 pH,通过高效液相色谱法进行甲酸、乙酸、丙酸、乳酸和柠檬酸的含量测定。

液相色谱方法:色谱柱:Agilent TC-C18(2) 色谱柱,规格:250 mm \times 4.6 mm,5 μ m;流动相:0.05 mol/L (pH 2.7)磷酸二氢钾溶液/甲醇:97/3

表 1 将发酵液从 pH 4.0 调至 pH 7.0 所需中和剂量

Table 1 Neutralizing dose required to adjust fermentation solution pH 4.0 to pH 7.0

| Neutralizing agents | Neutralizer concentration | Amount added (per 50 mL bacterial solution) |
|---------------------------------|---------------------------|---|
| NaOH | 2 mol/L | 3 mL |
| Na ₂ CO ₃ | 2 mol/L | 3 mL |
| Ca(OH) ₂ | \geq 95% | 0.3 g |

(体积比); 流速: 0.6 mL/min; 进样体积: 20 μ L; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 214 nm。样品溶液经 0.22 μ m 水相滤膜过滤, 进样高效液相色谱仪分析。

1.3.8 数据处理

采用 Excel 进行数据的处理分析, 利用 Origin Pro 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 高产乳酸的菌群富集筛选结果

对 11 个酸奶样品富集得到的菌群传代培

养, 测定其乳酸及总酸产量, 并对沙门氏菌及金黄色葡萄球菌进行抑菌性试验。结果如图 1 所示, 在 MRS 培养基传代过程中 B2 产酸量明显高于其他 10 个菌群, 并且所有菌群在第 4 代时产酸量最高; 在抑菌性实验中, 只有 B2 和 B5 具有抑菌性能, 所以对 B2 和 B5 进行进一步研究。

2.2 培养方式对菌群发酵产酸的影响

四种培养方式对菌群产酸影响结果如图 2 所示, B2 菌群在灭菌情况下总酸和乳酸的产量明显高于不灭菌培养基; 培养基灭菌与否对 B5 菌

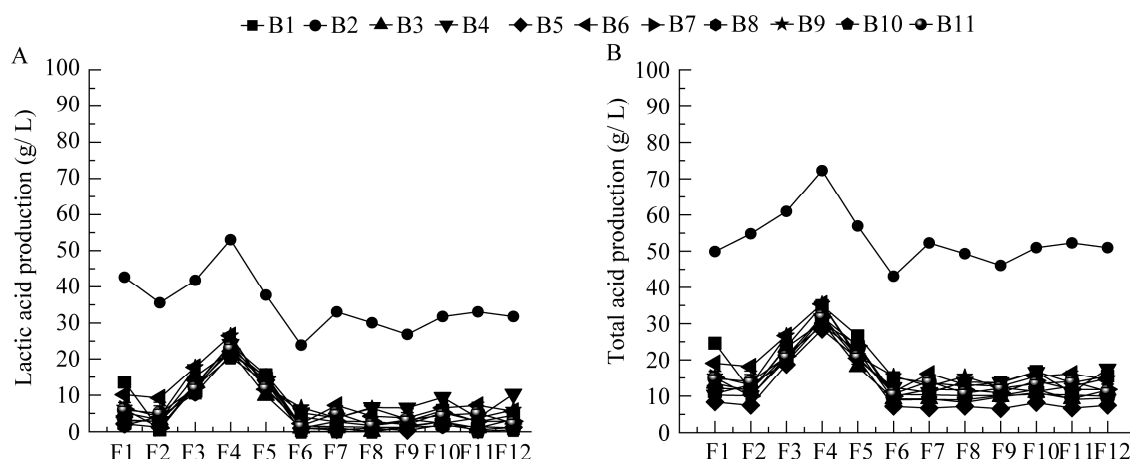


图 1 传代过程中菌群产酸量的变化 A: 乳酸产量; B: 总酸产量

Figure 1 Changes of acid production of microflora during passage. A: Lactic acid production; B: Total acid production.

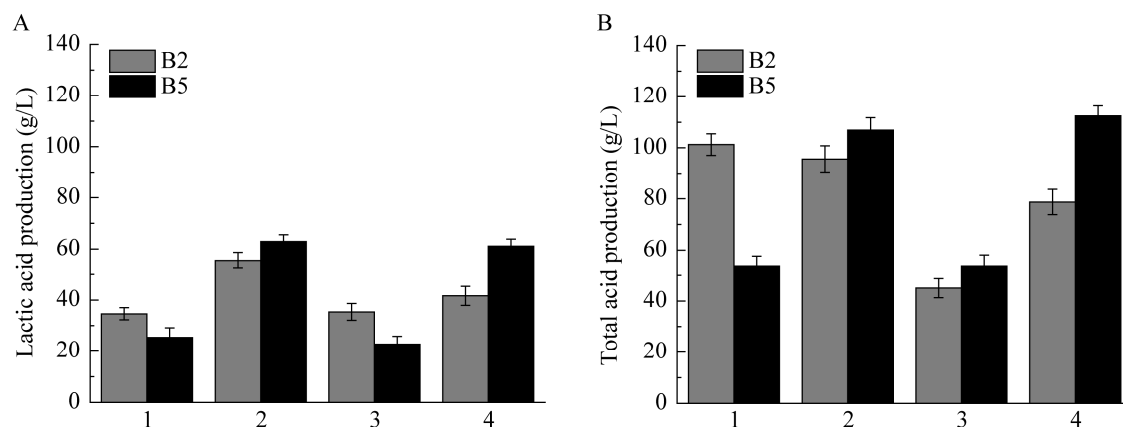


图 2 不同培养方式对菌群产酸的影响 1: 灭菌, 150 r/min 振荡; 2: 灭菌, 静置; 3: 未灭菌, 150 r/min 振荡; 4: 未灭菌, 静置

Figure 2 Effects of different culture methods on acid production of microflora. 1: Sterilization, 150 r/min shaking; 2: Sterilization, static culture; 3: No sterilization, 150 r/min shaking; 4: No sterilization, static culture.

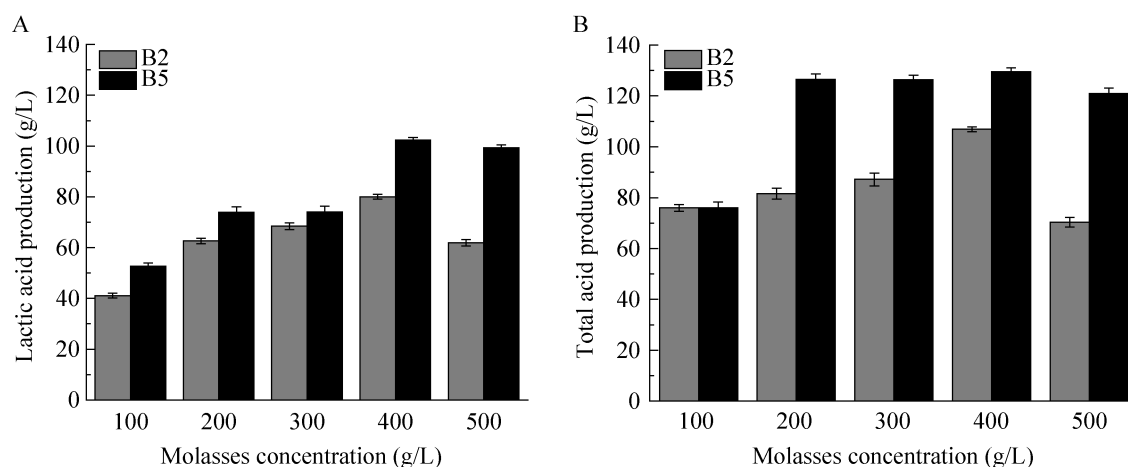


图3 糖蜜浓度对菌群产酸的影响

Figure 3 Effect of molasses concentration on acid production of microflora.

群产酸影响不明显；在静置条件下，B5 菌群的总酸和乳酸的产量都明显高于振荡培养。因此，后续实验中菌群的发酵培养均采用静置培养且培养基不灭菌。

2.3 不同糖蜜浓度对菌群发酵产酸的影响

随着培养基中糖蜜浓度的增加，菌群发酵液总酸及乳酸产量不断升高，结果如图 3 所示，当糖蜜浓度为 400 g/L 时达到最高值，之后总酸和乳酸产量均下降，说明 400 g/L 是 B2 和 B5 菌群耐受的最高糖蜜浓度。对培养 48 h 后菌液中的蔗糖剩余量进行测定，结果如图 4 所示，培养基糖蜜浓度为 100 g/L 时，B5 能完全利用其中蔗糖，但 B2 的蔗糖剩余量还很多，不能完全利用；糖蜜浓度高于 100 g/L 时，B2 和 B5 菌群均不能完全利用培养基中的糖蜜，考虑到原材料利用率，后续实验中均采用 100 g/L 糖蜜浓度进行发酵产酸。

2.4 培养时间对菌群产酸的影响

以 2% 的接种量将 B2、B5 菌群接种至糖蜜浓度为 100 g/L 的发酵培养基中，37 °C 静置培养，培养时间对菌群产酸的影响如图 5 所示。在培养过程中，随着时间的增加培养液中产酸量逐渐增加，在 48 h 时菌群产乳酸量和总酸量达到

了最高值，之后产酸量逐渐降低。因此 2 个菌群的最适产酸时间为 48 h，B5 菌群的乳酸及总酸产量始终高于 B2 菌群。

2.5 不同氮源对菌群发酵产酸的影响

B2 和 B5 菌群利用不同氮源的发酵产酸情况如图 6 所示，无机氮源与有机氮源对菌群产乳酸的作用效果类似，与有机氮源相比，菌群利用无机氮源产总酸效果较差。

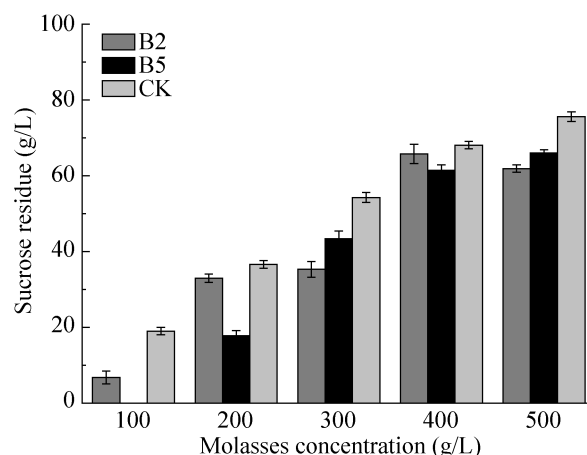


图4 培养 48 h 后菌液中的蔗糖剩余量

Figure 4 Residual sucrose in fermentation solution after 48 h of culture.

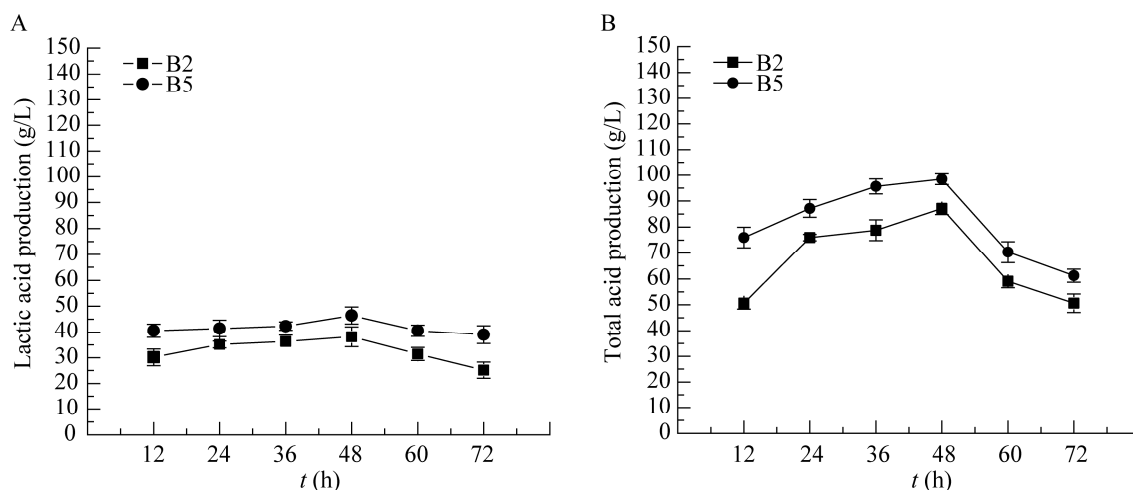


图5 培养时间对菌群产酸的影响

Figure 5 Effect of culture time on acid production of microflora.

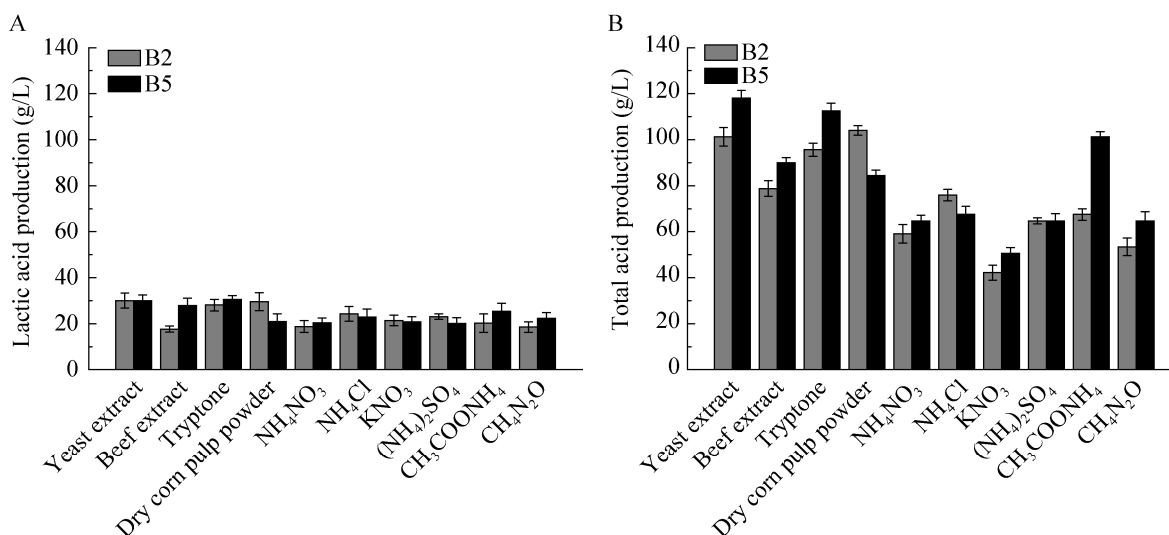


图6 氮源对菌群产酸的影响

Figure 6 Effect of nitrogen source on acid production of microflora.

2.6 不同中和剂对菌群发酵产酸的影响

在乳酸的批式发酵过程中,伴随着菌体的生长,产物乳酸不断积累,这会导致发酵液 pH 值的降低,进而影响菌体生长代谢。为了解除这种抑制作用,发酵过程中通常会采用中和剂对 pH 进行调控,一般利用 NaOH 溶液、Na₂CO₃ 溶液和 Ca(OH)₂ 等调节发酵液的 pH 值。

在菌群发酵过程中加入不同中和剂对菌群

产酸的影响如图 7 所示,与对照组相比,加中和剂 Na₂CO₃ 后,B2 菌群发酵产乳酸及总酸量明显高于对照组,B5 菌群的产酸量低于对照组;以 Ca(OH)₂ 作为中和剂,B5 菌群产乳酸和总酸的量较对照组明显升高。

2.7 发酵液抑菌实验结果

B2 和 B5 菌群的发酵液在不稀释及稀释 2 倍时均对产气荚膜杆菌有较强的抑菌作用(表 2)。

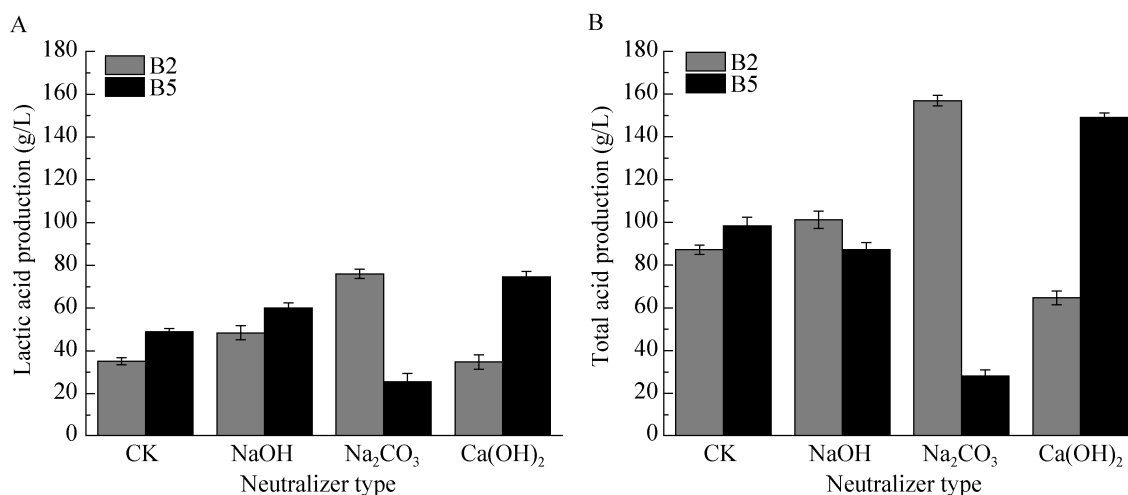


图 7 不同中和剂对菌群产酸的影响

Figure 7 Effects of different neutralizer on acid production of microflora.

表 2 菌群发酵液抑菌圈直径的测定结果

Table 2 Measurement results of bacteriostatic circle diameter of fermentation broth

| 致病菌种类 Pathogen species | 抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic zone (cm) | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| | B2 发酵原液 B2 original fermentation solution | B2 2×稀释发酵液 B2 2×diluted fermentation solution | B5 发酵原液 B5 original fermentation solution | B5 2×稀释发酵液 B5 2×diluted fermentation solution |
| | | | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 2.0 | 1.8 | 1.6 | 1.6 |
| <i>Salmonella enterica</i> | 1.8 | 0.0 | 1.5 | 1.2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.2 | 0.0 | 1.5 | 1.2 |
| <i>Escherichia coli</i> STEC | 0.0 | 0.0 | 1.2 | 0.7 |
| <i>Escherichia coli</i> O157 | 0.0 | 0.0 | 0.8 | 0.0 |

B2 菌群的发酵原液对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌生长具有抑制作用；B5 菌群的发酵原液对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 和大肠杆菌 STEC 均有抑制作用，但 B5 菌群的发酵原液稀释 2 倍后对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 的抑制作用明显减弱，并且其 2 倍稀释液对大肠杆菌 STEC 的抑制作用消失。

2.8 菌群发酵液有机酸含量及 pH 测定结果

测定发酵液中的甲酸、乙酸、丙酸、乳酸和柠檬酸含量，结果如图 8 所示。B2 菌群(图 8A)

的发酵液中，其主要有机酸成分为乙酸和乳酸，乳酸含量在发酵 30 h 时达到最高；随后逐渐降低，乙酸在 72 h 达到最高。B5 菌群(图 8B)在发酵初期乙酸含量较高，在 18 h 时达到最高；随后逐渐降低，直到 42 h 时被完全降解，此时柠檬酸含量达到最高，而乳酸含量随时间增加不断升高。

B2 和 B5 菌群发酵的 pH 值均在 48 h 时达到最低，随后小幅度上升(图 9)，可能是菌体自溶导致。

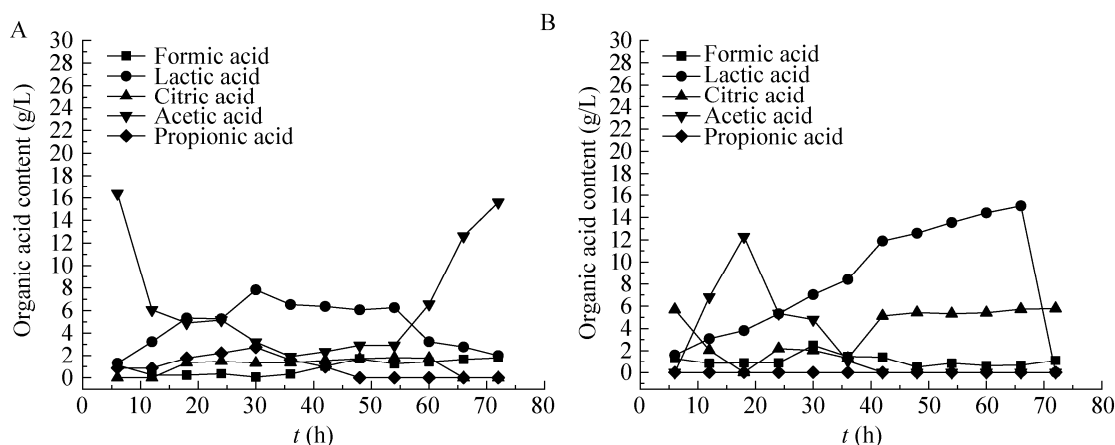


图 8 不同发酵时间有机酸含量

Figure 8 Organic acid content at different fermentation time. A: B₂; B: B₅.

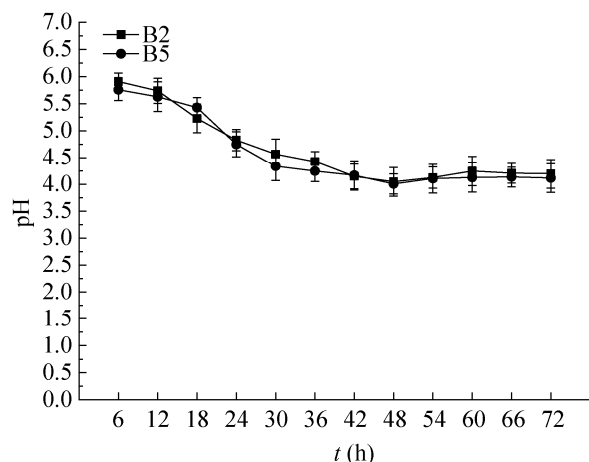


图 9 不同发酵时间发酵液 pH 变化

Figure 9 Change of pH of fermentation liquid at different fermentation time.

3 讨论与结论

新疆传统农家酸奶富含丰富的乳酸菌资源, 但不同自然发酵乳制品中的微生物种类及优势菌群存在一定差异, 南疆各地传统农家酸奶优势种不同, 阿图什市样品中乳杆菌属为绝对优势菌属, 乌什县以链球菌属、乳杆菌属及醋酸杆菌属为主, 链球菌属占优势^[20]。对不同海拔传统西藏牦牛酸奶乳酸菌的多样性研究发现^[21], 11 个样品中有 6 个样品的优势菌种为德氏保加利亚

乳杆菌, 而其他样品为瑞士乳杆菌; 将分离出的嗜热链球菌与市售酸奶菌株进行发酵产酸比较, 发现其有机酸成分和含量不同, 但野生型均显著优于市售菌株。本研究选择 11 种南、北疆不同农家发酵酸奶中的菌群进行富集, 结果发现 B₂ 菌群产酸优势明显。

微生物菌群发酵与传统纯种发酵相比, 在底物利用、环境适应性、代谢产物和生产性能有许多优势, 对底物耐受性更强且能促进各菌株间的协同作用。Li 等^[22]从长期多环芳烃污染的土壤中富集了一个降解多环芳烃的微生物菌群, 与单菌相比, QY1 菌群能更高效降解对多环芳烃菲-芘混合物。微生物菌群发酵更能适应粗放的环境, 以 350 g/L 未灭菌的糖蜜为底物, 用菌群 CEE-DL15 发酵生产乳酸, 乳酸产量及产率与传统昂贵的 MRS 培养基接近, 最终乳酸产量可达到 112.34 g/L, 与以葡萄糖为底物发酵相比, 原料成本降低约 50%^[23]。新疆是我国最大甜菜产区, 年产糖 50 万 t 左右, 占到全国产量 50% 以上^[24], 糖蜜价廉易得且资源化利用工艺简单, 其中的蔗糖、棉子糖和其他还原糖都是可被微生物利用的碳源, 与粮食和经济作物原料相比能省去烦琐的糖化工艺^[9], 再以优质廉价的玉米浆干

粉作为氮源, 不灭菌进行生料批式发酵, 减少灭菌能耗及复杂操作, 可大幅度降低乳酸型复合酸化剂的生产成本。

常见的饲用有机酸主要包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、延胡索酸、苹果酸及柠檬酸等, 为了克服单一酸化剂的不足或缺陷, 目前常将2种或多种有机酸进行复配制成复合有机酸化剂, 不同有机酸之间可产生互补协同效应, 从而提高酸化剂应用效果^[25]。杨继国等利用复合菌种一步发酵果蔬废弃物制备酸化剂, 其生产工艺需要外加蔗糖、2次接种和持续通无菌空气, 发酵时间为6 d^[16], 发酵周期长且工艺复杂。韩伟等利用植物乳杆菌发酵废液制成的酸化剂中, 只包含乳酸和外加的柠檬酸^[17], 有机酸种类较为单一。本研究对新疆农家酸奶进行12代的传代富集, 得到了稳定传代的酸奶菌群, 以B2菌群进行发酵工艺优化, 在100 g/L糖蜜和18.5 g/L玉米浆干粉的发酵培养基中生料静置发酵48 h, 其总酸产量能达到169.37 g/L, 其中乳酸含量达到73.42 g/L, 其余有机酸包括甲酸、乙酸、丙酸和柠檬酸等, 实现了简易、低成本微生物发酵生产多种有机酸的复合酸化剂。

REFERENCES

- [1] 徐森, 刘明宇, 黄竹, 姜丹, 解桂香, 刘忠刚, 王丽娟, 唐日益, 丁毅, 曹岩峰. 饲料酸化剂替代抗生素的作用机制及应用研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2021, 42(1): 51-55
Xu M, Liu MY, Huang Z, Jiang D, Xie GX, Liu ZG, Wang LJ, Tang RY, Ding Y, Cao YF. Research progress in action mechanism of feed acidifier in replacing antibiotics and its application[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2021, 42(1): 51-55 (in Chinese)
- [2] 郭鹏, 卢建, 李军, 罗四维, 赵国琦. 复合酸化剂对肉仔鸡消化道 pH 值和消化酶活性的影响[J]. 饲料工业, 2011, 32(11): 32-35
Guo P, Lu J, Li J, Luo SW, Zhao GQ. Effects of compound acidating agent on pH value and activity of elimination enzyme in broiler[J]. Feed Industry, 2011, 32(11): 32-35 (in Chinese)
- [3] Hashemi SR, Zulkifli I, Davoodi H, Zunita Z, Ebrahimi M. Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifiers[J]. Animal Feed Science and Technology, 2012, 178(3/4): 167-174
- [4] 李万军. 酸化剂对肉鸡生长及免疫的影响[J]. 饲料研究, 2012(4): 75-77
Li WJ. Effects of acidifier on growth and immunity of broilers[J]. Feed Research, 2012(4): 75-77 (in Chinese)
- [5] Gadde U, Kim WH, Oh ST, Lillehoj HS. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review[J]. Animal Health Research Reviews, 2017, 18(1): 26-45
- [6] 李运虎. 酸化剂在动物生产中的应用研究进展[J]. 湖南饲料, 2015(5): 24-26, 29
Li YH. Research progress on application of acidifier in animal production[J]. Hunan Feed, 2015, (5): 24-26, 29 (in Chinese)
- [7] 马嘉瑜, 朴香淑. 酸化剂改善畜禽生长和肠道健康的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(8): 1-10
Ma JY, Piao XS. Recent advances in acidifiers on growth performance and intestinal health of livestock and poultry[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2021, 57(8): 1-10 (in Chinese)
- [8] 杨强剑. 膜分离技术在糖蜜澄清和脱色中的应用基础研究[D]. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2019
Yang QJ. Applied basic research in clarification and decolorization of cane molasses by membrane technology[D]. Beijing: Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese)
- [9] 杨云东, 王倩, 张佳婵, 王昌涛, 刘继涛. 糖蜜及其发酵制品的应用研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(3): 232-236
Yang YD, Wang Q, Zhang JC, Wang CT, Liu JT. Research progress on application of molasses and its fermented products[J]. The Food Industry, 2020, 41(3): 232-236 (in Chinese)
- [10] 李军委. 米曲霉转化蔗糖及糖蜜生产曲酸的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2013
Li JW. The research of using sugar and molasses produce kojic acid by *Aspergillus oryzae*[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2013 (in Chinese)
- [11] 戴莉, 田雯, 崔媛媛, 唐湘毅, 苏芬芬, 孙卫东. 固定化米曲霉发酵甘蔗糖蜜生产曲酸的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 175-179
Dai L, Tian W, Cui YY, Tang XY, Su FF, Sun WD. Study on the production of kojic acid from fermented

- sugar cane molasses by immobilized *Aspergillus oryzae*[J]. Food Research and Development, 2016, 37(7): 175-179 (in Chinese)
- [12] 秦菊霞. 蔗糖及甘蔗糖蜜发酵生产 L-乳酸的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2008
- Qin JX. Studies on the basic technics of L-lactic acid fermentation from sucrose and cane molasses[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2008 (in Chinese)
- [13] 赵锦芳, 薛葳蕤, 张晓敏, 王永泽, 王金华. 大肠杆菌工程菌利用甘蔗糖蜜发酵产 L-乳酸研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(24): 6541-6545
- Zhao JF, Xue WR, Zhang XM, Wang YZ, Wang JH. L-lactic acid fermentation from engineering *Escherichia coli* by using sugarcane molasses[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(24): 6541-6545 (in Chinese)
- [14] 黄靖华, 孙靓, 吴军华, 孙菲菲, 李检秀, 黄艳燕, 郭铃, 黄日波. 甘蔗糖蜜发酵生产 L-乳酸工艺条件研究[J]. 广西科学, 2011, 18(3): 273-277
- Huang JH, Sun L, Wu JH, Sun FF, Li JX, Huang YY, Guo L, Huang RB. Fermentation condition studies on the production of L-lactic acid from sugarcane molasses[J]. Guangxi Sciences, 2011, 18(3): 273-277 (in Chinese)
- [15] 张秀芬, 杨琳. 饲用酸化剂在饲料应用的研究进展[J]. 广东饲料, 2014, 23(1): 31-33
- Zhang XF, Yang L. Research progress of feed acidifiers in feed[J]. Guangdong Feed, 2014, 23(1): 31-33 (in Chinese)
- [16] 杨继国, 夏晚霞, 任杰, 刘玮, 王云, 刘丹. 一种酸化剂、其复合菌一步发酵制备方法与应用[P]: 中国, CN109805175A. 2019-05-28
- Yang JG, Xia WX, Ren J, Liu W, Wang Y, Liu D. The invention relates to an acidifier and a one-step fermentation preparation method and application of a compound bacterium thereof[P]: China, CN109805175A. 2019-05-28
- [17] 韩伟, 王大为, 李晓敏, 张晓琳. 乳酸菌发酵废液制备酸化剂及其应用效果研究[J]. 粮油食品科技, 2018, 26(5): 70-75
- Han W, Wang DW, Li XM, Zhang XL. Study on the preparation of acidifying agent from lactic acid bacteria fermented wastewater and its application effects[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2018, 26(5): 70-75 (in Chinese)
- [18] Borshchevskaya LN, Gordeeva TL, Kalinina AN, Sineokii SP. Spectrophotometric determination of lactic acid[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2016, 71(8): 755-758
- [19] GB 12456-2021, 食品安全国家标准 食品中总酸的测定[S].
- GB 12456-2021, National food safety standard determination of total acid in food[S].
- [20] 西热娜依·阿布力克木. 南疆传统发酵酸奶微生物多样性及其乳酸菌生物被膜的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2017
- Xirina·Ablikim. Microbial diversity and LAB biofilm in Xinjiang traditional fermented milk[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2017 (in Chinese)
- [21] 王雪艳. 西藏高海拔地区酸奶中乳酸菌分离鉴定及其产酸能力评价[D]. 拉萨: 西藏大学硕士学位论文, 2016
- Wang XY. Isolate and authenticate lactic acid bacteria from the yogurt of Tibet's high altitude regions and evaluate their acid-producing ability[D]. Lasa: Master's Thesis of Tibet University, 2016 (in Chinese)
- [22] Li M, Yin H, Zhu MH, Yu YY, Lu GN, Dang Z. Co-metabolic and biochar-promoted biodegradation of mixed PAHs by highly efficient microbial consortium QY1[J]. Journal of Environmental Sciences, 2021, 107: 65-76
- [23] 徐振振. 微生物菌群 CEE-DL15 发酵甘蔗糖蜜和葡萄糖废液生产乳酸的研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2018
- Xu ZZ. Lactic acid production from sugar molasses and glucose waste mother liquid by microbial consortium CEE-DL15[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [24] 王健, 张栋, 赵抒娜, 吴子毅, 赵金力, 陈凌超, 张思聪, 武运, 王宝. 利用糖蜜和甜菜粕开发固态发酵饲料的初步探索[J]. 中国糖料, 2021, 43(3): 75-80
- Wang J, Zhang D, Zhao SN, Wu ZY, Zhao JL, Chen LC, Zhang SC, Wu Y, Wang B. Preliminary research on development of solid state fermentation using molasses and beet pulp[J]. Sugar Crops of China, 2021, 43(3): 75-80 (in Chinese)
- [25] 皮宇, 孙丽莎, 陈青, 顾雯雯. 饲用酸化剂的作用机理及其在畜禽生产中的应用[J]. 饲料博览, 2014(3): 26-31
- Pi Y, Sun LS, Chen Q, Gu WW. The mechanism of action of feed acidifiers and its application in animal production[J]. Feed Review, 2014(3): 26-31 (in Chinese)