

# 响应面法优化青贮饲料乳酸菌的培养条件

洪梅<sup>1</sup> 刁其玉<sup>1\*</sup> 闫贵龙<sup>2</sup> 屠焰<sup>1</sup> 张乃锋<sup>1</sup> 姜成钢<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院饲料研究所,农业部饲料生物技术重点实验室,北京 100081;2. 河北北方学院,张家口 075000)

**摘要:**为更好地提高青贮饲料的质量,降低微生物接种剂的生产成本,本研究对采集自德国青贮窖中的主导菌群中一株乳酸菌 GLP01 进行了分子学鉴定,并对培养条件进行了优化。通过单因素试验设计研究培养基组成(碳源、氮源)和培养条件(温度、接种量、起始 pH 等)对 GLP01 乳酸菌生长繁殖的影响;采用二次响应面分析方法对 GLP01 培养条件进行优化,得到 GLP01 生长模型,以及取得模型最优值时各因素的水平。单因素试验结果表明, GLP01 的最适碳源是果糖,最佳氮源是酵母粉;二次响应面分析确定的 GLP01 最佳培养条件是起始 pH 5.47、培养温度 35.3 °C、接种量 8.16%。结果提示,乳酸菌 GLP01 可以作为微生物接种剂制作青贮饲料,但青贮效果仍有待研究。

**关键词:**青贮饲料;乳酸菌;培养基优化;响应面法

**中图分类号:** S816.3;S816.5<sup>+</sup>3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1006-267X(2010)05-1307-07

青贮饲料是反刍动物饲料的重要组成部分,青贮菌制剂通过微生物作用,可以改善青贮产品品质,有效延长青贮饲料的保存时间,具有重要的使用价值。青贮的原理是在厌氧条件下,通过附着于植物体的乳酸菌利用原料中的可溶性碳水化合物,发酵产生有机酸(主要是乳酸),迅速降低 pH,从而杀灭各种微生物或者抑制他们活动,达到长期保存青绿饲料的目的<sup>[1]</sup>。同型发酵乳酸菌是非常重要的青贮饲料菌制剂,例如植物乳杆菌和片球菌等,它们能够迅速降低 pH,提高乳乙酸的生成比例,有效降低乙醇和氨态氮的产量。以往的试验研究表明,植物乳杆菌属于同型发酵乳酸菌,是青贮饲料中的主导菌群,广泛应用于青贮饲料的生产中,对于饲料的保存,提高饲料适口性以及提高奶牛的生产性能具有显著作用<sup>[2-6]</sup>。近年来我国青贮饲料产业得到了快速的发展,几乎所有的大、中、小型奶牛场所用的粗饲料都是以青贮饲料为主,但是我国自主研发的微生物青贮接种剂的种类和数量都很少,而且单位重量的活菌数量低,造成饲料成本较高。

响应面分析(response surface analysis, RSA)方法基于数学与统计学的结合,它以回归方法作为函数估算的工具,在多因子试验中,用多项式将因子

与试验结果(响应值)的关系函数化,同时对影响因素的各因子水平及其交互作用进行优化与评价,因此可快速有效地确定多因子系统的最佳条件,该法已经广泛地应用于各类培养基以及发酵条件的优化实践中<sup>[7-12]</sup>。

本试验对一株分离自德国青贮窖中的乳酸菌进行鉴定,并且在不同条件下对其进行人工培养,测定其生物学特性,以探索其在人工环境下的最佳生长条件,为规模化生产新型青贮菌制剂提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验用菌

供试菌株是本实验室从德国青贮窖中分离、筛选的,编号为 GLP01,由本实验室保藏。

#### 1.1.2 乳酸菌的总 DNA 提取及 16S rDNA 基因扩增

16S rDNA 由于其高度保守型广泛应用于细菌的鉴定,随着分子技术的发展,越来越多的细菌序列被测定并收录在 GenBank,为菌种的鉴定提供了快捷、方便的平台。本实验室从德国青贮窖中分离、筛选的 1 株细菌,使用 TIANGEN 细菌基因组 DNA

收稿日期:2010-04-11

基金项目:国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD04A04-05)

作者简介:洪梅(1985—),女,回族,山东临清人,硕士研究生,从事反刍动物饲料与营养研究。E-mail: hongmei0635@163.com

\* 通讯作者:刁其玉,教授,博士生导师,E-mail: diaoqiuyu@mail.caas.net.cn

提取试剂盒(离心柱型)提取菌株 DNA,引物为原核生物 16S rDNA 的通用引物:27f(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')和 1 492r(5'-TACCTT-GTTACGACTT-3')。扩增条件为:95 ℃ 5 min、94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min、30 个循环、72 ℃ 7 min。16S rDNA PCR 产物全序列由北京博迈德生物有限公司测定。

### 1.1.3 基础培养基成分

MRS 培养基:大豆蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、酵母粉 5 g、葡萄糖 20 g、柠檬酸二胺 2 g、乙酸钠 5 g、硫酸镁 0.1 g、硫酸锰 0.05 g、磷酸氢二钾 2 g、吐温 80 1 mL、琼脂 15 g、去离子水定容至 1 000 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 115 ℃ 灭菌 30 min,自然 pH 为 6.5。

## 1.2 方法

### 1.2.1 试验设计

采用单因素试验设计方法,筛选最适碳源、氮源、培养基起始 pH、培养温度及接种量,然后使用 3 因素 3 水平的响应面分析法对培养条件进行优化。

### 1.2.2 菌株生长曲线的测定

将种子液按 1% 接种到 MRS 培养基上,37 ℃ 培养,每隔 3 h 取样测定发酵液的 pH 及 OD<sub>600 nm</sub> 值,以发酵时间为横坐标,分别以 pH 和 OD<sub>600 nm</sub> 值为纵坐标绘制菌株生长曲线。

### 1.2.3 不同碳源对乳酸菌生长的影响

分别以果糖、蔗糖、乳糖等量替代 MRS 培养基中的碳源(即葡萄糖),其他各条件与生长曲线测定相同,培养后测定活菌数,确定菌株生长的最适碳源。

### 1.2.4 不同氮源对乳酸菌生长的影响

分别以大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉以及牛肉膏作为单一氮源等量替代 MRS 中的总氮源(包括大豆蛋白胨、酵母粉、牛肉膏),其他各条件与生长曲线测定相同,培养后测定活菌数,确定菌株生长的最适氮源。

### 1.2.5 培养基起始 pH 对乳酸菌生长的影响

用 1 mol/L 的盐酸和 1 mol/L 的氢氧化钠将 MRS 培养基的起始 pH 分别调至 2.0、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0,培养过程中不测酸,其他各条件与生长曲线测定相同,培养后测定活菌数,确定最佳起始 pH。

### 1.2.6 培养温度对乳酸菌生长的影响

将培养温度分别设定为 30、35、37、40 和 42 ℃,按照 1% 的接种量<sup>[13]</sup>接入种子液,其他各条件与生

长曲线测定相同,培养后测定活菌数,确定菌株生长的最适培养温度。

### 1.2.7 接种量对乳酸菌生长的影响

将接种量分别设定为 0.5%、1.0%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0%,其他各条件与生长曲线测定相同,培养后测定活菌数,确定最适接种量。

### 1.2.8 响应面法优化乳酸菌的培养条件

通过对影响 GLP01 生长的单因素分析,确定在单因素条件下适合 GLP01 生长的起始 pH、温度、接种量范围,再用 3 因素 3 水平的响应面分析,优化 GLP01 的生长条件,并且在响应面分析法得到的 GLP01 最佳生长条件下,测定培养后的活菌数,做为验证试验,以证实响应面方法的可靠性。

## 1.3 数据统计

采用 SAS 8.0 软件包中的 One-way ANOVA 对单因素试验分析的结果数据进行分析,均值的多重比较采用 Duncan 氏法进行,以  $P < 0.05$  作为差异显著性判断标准;以 Box-Behnken 进程对响应面设计进行二次响应面分析。

## 2 结果

### 2.1 测序结果

测得序列与 Blast 比对,该菌株与 GenBank 中的 *Lactobacillus plantarum strain KLDS*(登录号:EU626013.1)相似度为 98%。

### 2.2 GLP01 在 MRS 培养基中生长曲线的测定

以时间为横坐标,OD<sub>600 nm</sub> 值及 pH 为纵坐标,绘制的 GLP01 生长曲线,如图 1、图 2 所示。菌株在经过培养 0~12 h 时,pH 迅速下降(图 2),而此时菌株进入对数期,发酵产生的乳酸较多;菌株培养到 18 h 时进入稳定期,pH 趋于稳定,说明此时发酵产生的乳酸较多,已经开始抑制 GLP01 的生长。这与 GLP01 在 MRS 中的生长曲线(图 1)恰好吻合,菌株在经过培养 12 h 左右开始进入对数生长期,到 18 h 开始进入稳定期,24 h 到达稳定后期;因此把 GLP01 在 MRS 培养基中的稳定后期,即 24 h 作为最佳收获期。

### 2.3 不同碳源对 GLP01 生长的影响

不同碳源培养时 GLP01 活菌数结果见表 1。试验结果表明,以果糖为碳源时培养 GLP01 所得活菌数与其他组相比差异显著( $P < 0.05$ ),蔗糖的效果次之( $P < 0.05$ ),乳糖对活菌数的影响差异不显著( $P > 0.05$ ),效果最差,所以应选择果糖作为最适碳源。

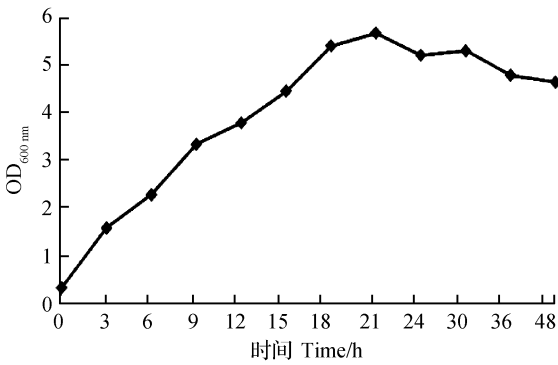


图 1 GLP01 在 MRS 培养基中的生长曲线

Fig.1 The growth curve of GLP01 in MRS agar

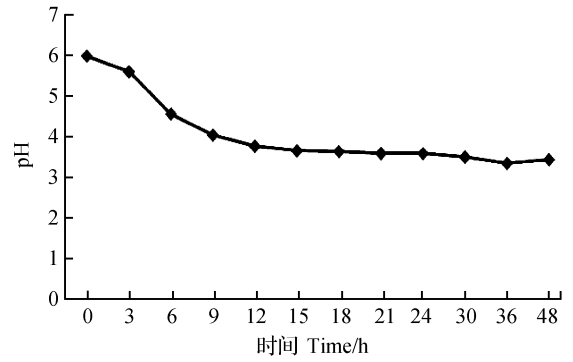


图 2 GLP01 在 MRS 培养基中 pH 的变化

Fig.2 Changes of pH of GLP01 in MRS agar

表 1 不同碳源对 GLP01 生长的影响

Table 1 Effect of different carbon sources on growth of GLP01

碳源 Carbon sources	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	乳糖 Lactose	蔗糖 Sucrose	lg(cfu/mL)
活菌数 Viable count	8.46 <sup>c</sup>	11.56 <sup>a</sup>	9.08 <sup>c</sup>	10.09 <sup>b</sup>	

同行数据肩标不同小写字母者差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下表同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as below.

### 2.4 不同氮源对 GLP01 生长的影响

不同氮源下培养后 GLP01 活菌数结果见表 2。试验结果表明,以酵母粉或大豆蛋白胨作为氮源培养 GLP01 时所得活菌数与 MRS 培养基的活菌数差异不显著 ( $P > 0.05$ ),以大豆蛋白胨或胰蛋白胨

作为氮源时,培养菌株所得的活菌数差异不显著 ( $P > 0.05$ ),在以牛肉膏为单一氮源的培养基上, GLP01 几乎没有生长,说明单一使用牛肉膏不利于 GLP01 的生长。考虑到酵母粉价格更加低廉,本试验将酵母粉作为 GLP01 的最佳氮源。

表 2 不同氮源对 GLP01 生长的影响

Table 2 Effect of different nitrogen sources on growth of GLP01

氮源	大豆蛋白胨	胰蛋白胨	牛肉膏	酵母粉	MRS 培养基	lg(cfu/mL)
Nitrogen sources	Soya peptone	Tryptone	Beef extract	Yeast powder	MRS agar	
活菌数 Viable count	8.59 <sup>ab</sup>	7.93 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>	9.88 <sup>a</sup>	9.71 <sup>a</sup>	

### 2.5 培养基起始 pH 对 GLP01 生长的影响

不同培养基的起始 pH 培养后 GLP01 活菌数结果见图 3。GLP01 最适生长的起始 pH 范围为 4.5~7.0,起始 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0 和 8.0 时培养 GLP01 所得的活菌数与其他组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ),但是起始 pH 为 7.0 时,OD 值最高,表明此时活菌生物量最多。同时由图 3 可知,起始 pH 过低会抑制 GLP01 的生长。因此选择最适起始 pH 为 7.0。

### 2.6 温度对 GLP01 生长的影响

将 GLP01 在不同温度下培养后测定活菌数,结果如表 3 所示。从表 3 中可以看出,培养温度为 30、37、40 °C 时,GLP01 的活菌数差异不显著;当温度达到 42 °C 时,GLP01 的存活率几乎为 0,说明温度过高会抑制细菌的生长,甚至不利于菌株的存活。而培养温度为 35 °C 时,GLP01 生长良好,所得活菌

数显著高于其他组 ( $P < 0.05$ ),表明该 GLP01 的最适培养温度为 35 °C。

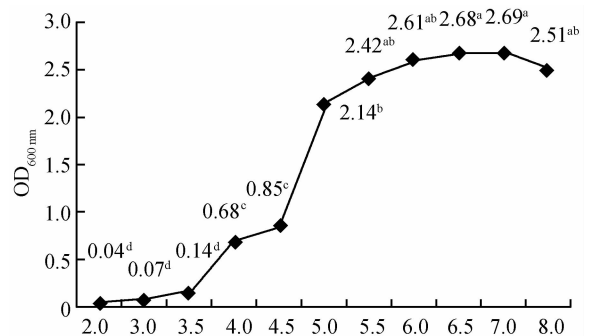


图 3 MRS 培养基起始 pH 对 GLP01 生长的影响

Fig.3 Effect of initial pH of MRS agar on growth of GLP01

表3 不同温度对 GLP01 生长的影响

Table 3 Effect of different temperature on the growth of GLP01

温度 Temperature/°C	30	35	37	40	42
活菌数 Viable count/lg(cfu/mL)	11.25 <sup>b</sup>	11.86 <sup>a</sup>	11.05 <sup>b</sup>	11.02 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>

## 2.7 接种量对 GLP01 生长的影响

不同接种量 GLP01 培养后活菌数见表 4。从表 4 可知,接种量在 4.0%、6.0% 和 8.0% 时,培养 GLP01 24 h 后,所得的活菌数之间没有显著差异,但是显著高于其他组 ( $P < 0.05$ );接种量为 2.0% 和 4.0% 时,活菌数显著高于接种量为 0.5% 和 1.0% 组

( $P < 0.05$ ),由此可以看出,在一定范围内,接种量越高,GLP01 的活菌数越多,当接种量过高时,并不能促进 GLP01 的生长。接种量为 4.0%、6.0% 和 8.0% 时,3 组活菌数没有显著差异,但是接种量为 4.0% 的活菌数与其他两组相比较小,8.0% 为最佳接种量,而从经济的角度出发,应选择 6.0% 接种量为宜。

表4 接种量对 GLP01 生长的影响

Table 4 Effect of inoculum size on the growth of GLP01

接种量 Inoculum size/%	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
活菌数 Viable count/lg(cfu/mL)	6.68 <sup>c</sup>	8.02 <sup>c</sup>	9.03 <sup>b</sup>	9.55 <sup>ab</sup>	10.09 <sup>a</sup>	10.11 <sup>a</sup>

## 2.8 二次响应面分析优化培养条件

在以上单因素试验的基础上,通过 SAS 8.0 的 Box-Behnken 的中心组合设计原理,对培养条件设计了 3 因素 3 水平试验,所得数据分析见表 5 和表 6。

以活菌数为响应值,根据表 6 中 Box-Behnken 设计的试验结果,利用 SAS 软件对其进行二次回归

分析,得到菌落数  $Y$  对编码自变量  $x_1$ 、 $x_2$  和  $x_3$  的二次多元回归方程:

$$Y = 2\ 091.5 - 161x_1 + 5.17x_1^2 - 92.72x_2 + x_2^2 - 6.44x_3 - 1.25x_3^2 + 3.03x_1x_2 + 0.8x_2x_3 - 0.25x_1x_3。$$

表5 响应面分析试验因素和水平

Table 5 Experimental variables and levels for response surface analysis

因素 Factors	编码 Encode	水平 Levels		
		-1	0	1
pH	$x_1$	6.0	6.5	7.0
温度 Temperature/°C	$x_2$	34	35	36
接种量 Inoculum size/%	$x_3$	7.0	8.0	9.0

表6 响应面分析试验结果

Table 6 The result of response surface analysis

试验号 Group No.	pH	温度 Temperature/°C	接种量 Inoculum size/%	活菌数 Viable count/lg(cfu/mL)
1	6.0	33	8.0	12.50
2	7.0	33	8.0	16.50
3	6.0	36	8.0	18.67
4	7.0	36	8.0	31.50
5	6.0	35	7.0	12.50
6	7.0	35	7.0	23.50
7	6.0	35	9.0	12.50
8	7.0	35	9.0	23.00
9	6.5	33	7.0	16.00
10	6.5	36	7.0	19.00
11	6.5	33	9.0	13.00
12	6.5	36	9.0	21.00
13	6.5	35	8.0	17.50
14	6.5	35	8.0	18.00
15	6.5	35	8.0	18.00

对上述回归模型进行可信度分析(表7),结果表明,模型是极显著的( $P = 0.0044$ ),回归模型的决定系数为0.9632,说明该模型与实际情况拟合较

好,可以解释96.32%的变化。因此可用此模型对GPL01不同条件下的生长情况进行分析和预测。

表7 模型的可信度分析

Table 7 Reliability analysis of the model

方差来源 Source	自由度 DF	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F值 F value	$Pr > F$
模型 Model	9	355.919	39.547	14.53	0.0044
误差 Error	5	13.610	2.723		
总回归 Corrected total	14	369.529			
可决定系数平方 R-square	0.9632				
变异系数 Coefficient of variation	9.0593				

从方差分析(表8)中可以看出,因子 $x_1$ 、 $x_2$ 即起始pH、温度对菌落数影响显著( $P < 0.05$ ),交互项 $x_1x_2$ 的 $P$ 值为0.0365,说明培养基的起始pH与温度对GPL01生长的交互作用显著,而 $x_3$ 即接种量对菌落数影响较小( $P = 0.8104$ ),温度和接种量以及起始pH和接种量对GPL01生长的交互作

用不显著。

利用SAS 8.0软件,对菌体数的二次响应面分析可知,3个因素的最优试验点(pH、温度、接种量)的代码值(-2.069、0.2609、0.1588),即稳定点为(5.47、35.3℃、8.16%)。

表8 回归模型方差分析

Table 8 Analysis of variance with regression model

变量 Variable	自由度 DF	估计值 Estimate value	误差 Error	t值 t value	$Pr >  t $	估计值 Estimate value
截距 Intercept	1	2091.49971	632.24074	3.31	0.0213	0.00000
$x_1$	1	-161.04465	59.60578	-2.70	0.0427	-11.84778
$x_1x_1$	1	5.16833	3.43437	1.50	0.1927	4.94464
$x_2$	1	-92.72134	31.37069	-2.96	0.0317	-20.98790
$x_2x_2$	1	1.00375	0.44017	2.28	0.0715	15.63347
$x_3$	1	-6.44728	25.49599	-0.25	0.8104	-0.94863
$x_3x_3$	1	-1.25042	0.85859	-1.46	0.2051	-2.94639
$x_1x_2$	1	3.03421	1.07054	2.83	0.0365	8.95316
$x_2x_3$	1	0.80263	0.53527	1.50	0.1940	4.35553
$x_1x_3$	1	-0.25000	1.64982	-0.15	0.8855	-0.28104

## 2.9 验证试验

分别以响应面分析得到的GLP01最佳生长条件和未优化的培养条件培养GLP01,以验证响应面分析法的效果。结果表明,未优化的培养条件下,GPL01的活菌数为 $4.83 \times 10^6$  cfu/mL,而响应面法优化的培养条件下活菌数达到 $3.34 \times 10^7$  cfu/mL,提高了6.92倍,说明采用响应面法优化的发酵条件是行之有效的,可以用于摇瓶发酵GLP01。

## 3 讨论

本试验中,GPL01生长最佳碳源是果糖,虽然

同样是植物乳杆菌,但是李想等<sup>[14]</sup>的结果却表明分离自发酵糯玉米的植物乳杆菌的最佳碳源是蔗糖。这可能是因为菌种虽然同属于植物乳杆菌属,但是因为菌种来源不同,受生存环境的影响,种间仍有区别。

GLP01发酵过程中,发酵液的pH迅速降低,因此只有在发酵液中加入一定的缓冲盐,才能有效地缓解pH的降低对菌种生长的抑制作用,从而获得最高的生物量。本试验加入乙酸钠和磷酸氢二钾作为缓冲盐使用,但是并没有就缓冲盐的种类和添加量进行更深入的研究,这是本试验的不足之处,因

为不同的缓冲盐的终产物不同,从而对发酵液的影响也不相同。

青贮饲料是反刍动物日粮的重要组成部分,目前关于如何制作优质青贮饲料的研究有很多,但是其中较多的偏向于现有的微生物接种剂对于饲料青贮效果的研究,而微生物的培养与青贮效果没有有效地结合起来。本试验从青贮窖中筛选一株植物乳杆菌,对其生长特性等进行深入研究,结果表明,植物乳杆菌 GLP01 的生长适应性较强,在 pH 为 2~8,温度为 30~40 °C 的范围条件下都能生长。在中国用于制作青贮饲料的常用原料如玉米、苜蓿等,收割时原料的 pH 范围为 4.6~6.3<sup>[6,15-17]</sup>,正适合 GLP01 的增值,为其成为主导菌群提供了有利条件。此外,青贮饲料的制作时间通常为夏季,环境温度在 30 °C 左右,非常适合 GLP01 的生长,由此可见,将菌株 GLP01 用来制作青贮饲料时可行的,但是使用效果,需要后期进行青贮窖发酵试验对其验证。

## 4 结 论

① 适合 GLP01 生长的培养基中,最佳碳源、氮源分别是果糖、酵母粉,起始 pH 7.0,温度 35 °C,接种量 8.0%。

② 采用二次响应面分析优化后 GLP01 的最佳培养条件为温度 35.3 °C、起始 pH 为 5.47、接种量为 8.16%。

## 参考文献:

- [1] MCDONALD P, HENDERSON A R, HERON S J E. The Biochemistry of Silage[M]. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.
- [2] 付彤. 微生物接种剂对玉米青贮饲料发酵进程及其品质的影响[D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [3] FILYA I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *L. plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silage[J]. Journal of Dairy Science, 2003a, 86:3575-3581.
- [4] FILYA I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of wheat, sorghum, and maize silage[J]. Journal of Applied Microbiology. 2003b, 95:1080-1086.
- [5] WEINBERG Z G, ASHBELL G H Y, AZRIELI

A, et al. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, 28:7-11.

- [6] HU W, SCHMIDT R J, MCDONELL E E, et al. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92:3907-3914.
- [7] 徐子钧, 李剑, 梁凤来, 等. 利用 SAS 软件优化 *L*-乳酸发酵培养基[J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 85-88.
- [8] 黄丽金, 陆兆新, 袁勇军, 等. 响应面法优化唾液链球菌嗜热芽种增殖培养基[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5):27-32.
- [9] 张建友, 徐静波, 王军良, 等. 冻干乳酸菌菌种增菌培养基增殖因子的优化[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1):16-17.
- [10] 熊智强, 徐平, 涂国全. 利用响应面法优化红谷霉菌发酵培养基[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4):5-9.
- [11] 杨实权, 张喜成, 刘军锋, 等. 响应面法优化酿酒酵母产油脂条件[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 91-95.
- [12] PANKAJ S, MANPREET S, ASHWINI L K. Response surface optimization of the critical medium components for carbonyl reductase production by *Candida viswanathii* MTCC 5158[J]. Bioresource Technology, 2007, 98:829-833.
- [13] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005:117.
- [14] 李想, 王然, 程建军, 等. 植物乳杆菌培养基的优化[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(9):96-99.
- [15] RANJIT N K, KUNG L JR. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage[J]. Journal of Dairy Science, 2000, 83:526-535.
- [16] YU Y D, YU ZHU, SHAO TAO. Effects of different additives on the fermentation quality and chemical composition of creck milkvetch silages[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2008, 20(4): 447-452.
- [17] SCHMIDT R J, HU W, KUNG L JR. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92: 5005-5010.

## Optimization of Culture Conditions for Silage Lactic Acid Bacteria via a Response Surface Technique

HONG Mei<sup>1</sup> DIAO Qiyu<sup>1\*</sup> YAN Guilong<sup>2</sup> TU Yan<sup>1</sup> ZHANG Naifeng<sup>1</sup> JIANG Chenggang<sup>1</sup>

(1. *Key Laboratory of Feed Biotechnology of Ministry of Agriculture, Institute of Feed Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*; 2. *Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China*)

**Abstract:** To improve the quality of silage and reduce the cost of microbial inoculants, molecular biological assay was carried out on a major strain of lactic acid bacteria called GLP01, which was isolated from a silage cellar in Germany, and the culture conditions were optimized. One-factor-at-a-time approach was used to investigate the effects of different medium components (carbon source and nitrogen source) and different culture conditions (temperature, initial pH, and inoculum size) on growth of GLP01; response surface technique (RST) was applied to the optimization of culture condition to get the growth model and factor levels of the optimal model value. The results showed as follows: the optimal carbon source and nitrogen source were fructose and yeast powder, respectively; the optimal culture conditions of GLP01 were pH 5.47, temperature 35.3 °C, and inoculum size 8.16%. In conclusion, lactic acid bacteria GLP01 can be used as silage microbial inoculants, but the effect remains to be clarified. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(5):1307-1313]

**Key words:** silage; lactic acid bacteria; culture medium optimization; response surface technique