

整肠生菌的生长条件和罐上发酵试验*

胡尚勤

(重庆师范学院生物系 重庆 400047)

摘要: 对整肠生菌进行了最佳生长条件的研究, 获得了该菌生长的最佳 C/N 为 4~4.5:1, 以及所需的各种维生素、氨基酸, 提出了优化的生长培养基组成。经发酵中试表明, 在最适 pH 5.5~6.5, 最适生长温度 35℃~37℃条件下, 提高菌数产量 3 倍。

关键词: 整肠生菌, 高产, 条件, 发酵。

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 06-0054-05

THE GROWING CONDITION AND FERMENTAL EXPERIMENT OF THE BACILLUS LICHENIFORMIS IN THE FERMENTER

HU Shang-Qin

(Dept of Biology, Chongqing Normal university, Chongqing 400047)

Abstract: Study of most favorable growing condition for the *Bacillus licheniformis*, acquirement the most favorable C/

* 四川省教委资助课题 (No.1995-36)

收稿日期: 2001-10-10, 修回日期: 2002-02-28

N of the growing of this bacteria is 4~4.5, requisite the vitamins, amino-acid. Result Shows that the most favorable pH was 5.5~6.5, temperature was 35°C~37°C in this study. the yield of the bacteria can be made to increased 3times.

Key words: *Bacillus licheniformis*, Highyield, Condition, Ferment

整肠生菌 (*Bacillus licheniformis*) 属芽孢菌属 (*Bacillus*)^[1]。是我国首次从正常待产妇阴道分离到的一种可用于生产口服微生态制剂“整肠生”的菌种^[2]。但对该菌系统的生理生化及高产方面的研究报道尚少^[3]，为了满足厂家生产上的需要，我们从营养需要和稳产高产角度，对该菌进行了生理生化与营养需要的研究，以弄清该菌最佳 C/N 和生长因子、氨基酸、以及优化的培养条件，以便扩大生产、降低成本、提高产量。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

1.1.1 菌种: 整肠生菌 (*Bacillus licheniformis*) 由重庆师范学院应用微生物研究室提供^[2]。

1.1.2 培养基: (1) 牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、琼脂 20g，水 1,000mL，pH 7.2， 1×10^5 Pa 灭菌 30min^[4]。该培养基用作斜面菌种培养基，上述培养基去掉琼脂配制成液体作为本研究发酵对照培养基。(2) 20% S₁ 汁液 1000mL、蔗糖 20g、维生素 H (VH)^[5] 50mg， 0.70×10^5 Pa 灭菌 15min。该培养基作为本研究中试发酵及生产培养基。

1.1.3 药品: L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、D-苯丙氨酸、L-天冬氨酸、DL-天门冬酰氨、L-赖氨酸、酪氨酸、L-苏氨酸、白氨酸、组氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、L-胱氨酸、DL-戊氨酸 (上海康达氨基酸厂生产)，VH、VB₁、VB₂、VB₃、VB₅、VB₆、VB₁₁ (成都制药十厂生产) 等。

1.1.4 仪器设备: 5L 发酵瓶，300L 发酵罐 (型号: FXN-G, 300L)，20~250r/min 振荡培养器 (温控范围 10°C~90°C)，10°C~45°C 生化培养箱，酸度计，721 分光光度计，细菌计数器和菌落计数器等。

1.2 方法

1.2.1 最佳生长温度和 pH 值的确定: 将 (1) 号培养基配成液体培养基，分别调节 pH 为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0， 1×10^5 Pa 灭菌 30min 后，分别接种活化培养 18h 后的整肠生菌菌悬液，一批接种量为 7.1×10^7 个/100mL 培养基，另一批接种量 1.8×10^7 个/100mL。分别在 20°C、30°C、35°C、37°C、40°C、45°C、50°C 下培养 24h (110 r/min 振荡培养) 每个处理 9 个重复，分别在 5、10、15、18、20、24h，准确取样液体振荡培养物，10 倍稀释法稀释后，用显微镜直接计数法和平板菌落计数器计数法测定其总菌数，以找出最佳生长温度和 pH 值。

1.2.2 最佳生长的 C/N 的测定: 用合成培养基，以葡萄糖为碳源、甘氨酸为氮源，配成 C/N 为 2: 1、2.5: 1、3.0: 1、3.5: 1、4.0: 1、4.5: 1、5.0: 1、5.5: 1、6.0: 1，同时加入 K、Ca、Mg、Fe、Na、Mn、VH、VB₁、VB₂、VB₃、VB₅、VB₆、VB₁₁ (维生素过滤除菌后加入) 各 2mg/L，pH 6.5 的液体培养基， 0.70×10^5 Pa 灭菌 15min。分别接种活化培养 18h 的整肠生菌种，接种量为 3.8×10^7 个/100mL 培养基，36°C~37°C 培养 24h。检测方法同前，最终根据活菌数确定最适 C/N。

1.2.3 最佳生长的氨基酸和维生素需要的测定: 用葡萄糖为碳源、不同氨基酸为氮源, 按 C/N = 4:1, 加入 Fe、K、Ca、Mn、Na、VB₁、VB₂、VB₃、VB₅、VB₆、VB₁₁ 各 2mg/L, 配成液体培养基 0.70 × 10⁵ Pa 灭菌 15min 后 (维生素过滤除菌后一批按上述量加入, 另一批按不同量加入), 分别接种活化培养 18h 的整肠生菌悬液, 一批接种量为 7.3 × 10⁷ 个/100mL 培养基, 另一批接种量 9.0 × 10⁷ 个/100mL, 每种 9 个重复, 37℃ 培养 24h, 用前法测定活菌数, 根据菌数确定该菌最佳生长对氨基酸和维生素的需要情况。

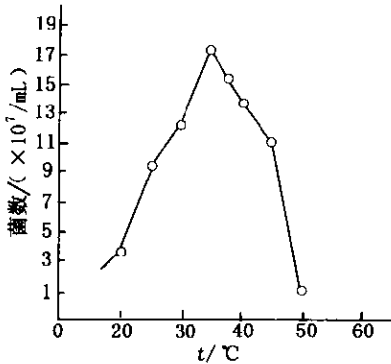


图1 整肠生菌生长与温度的关系

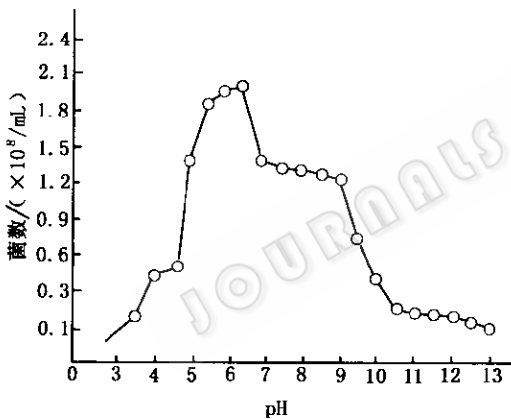


图2 整肠生菌生长和 pH 值的关系

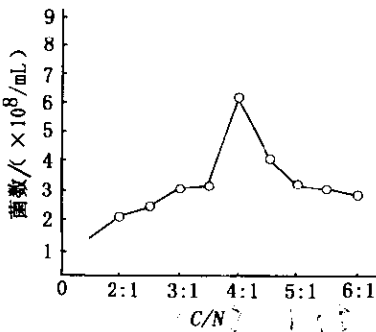


图3 整肠生菌生长与 C/N 的关系

2 结果与分析

2.1 整肠生菌最适生长温度与 pH 值

按材料和方法所述对整肠生菌增殖生长与温度关系作了测定, 结果见图 1 和图 2。

图 1 数据表明整肠生菌在液体培养基中培养时, 30℃ ~ 45℃ 之间, 菌体增殖都较快, 菌数为 12.8 × 10⁷ 个/mL, 17.2 × 10⁷ 个/mL, 15.0 × 10⁷ 个/mL, 13.4 × 10⁷ 个/mL, 11.0 × 10⁷ 个/mL。但最适合该菌增殖生长的温度是 35℃ ~ 37℃, 这时菌数最高, 为 15.01 ~ 17.20 × 10⁷ 个/mL。

图 2 中数据表明整肠生菌生长的 pH 值范围较宽, 5 ~ 10 均可生长, 但最适生长 pH 是在 5.5 ~ 6.5 这时菌数最高, 1.84 × 10⁸ 个/mL 和 1.95 × 10⁸ 个/mL, 比通常生产用 pH7 ~ 7.2 时菌数高, 是 pH 7.2 的 (1.35 × 10⁸ 个/ml) 1.4 倍, pH 9.5 以上和 pH 4.5 以下时整肠生菌生长差, 菌数明显降低, 为 6.44 × 10⁷ 个/mL 和 4.99 × 10⁷ 个/mL 以下。

2.2 整肠生菌生长最适 C/N

不同 C/N 对整肠生菌生长的影响, 结果见图 3。

图 3 结果表明整肠生菌生长最适 C/N 为 4.0:1, 在此时, 菌体增殖最多, 菌数为 6.2 × 10⁸ 个/mL, 其次是 4.5:1, 菌数为 4.1 × 10⁸ 个/mL, 分别是生产上长用 C/N (对照 3.2 × 10⁸ 个/mL) 的 2.1 倍和 1.9 倍。3.5:1 以下为 3.4 × 10⁸ 个/mL, 5:1 以上为 3.2 × 10⁸ 个/mL 或者更低。所以, 为了提高菌数产量, 最适 C/N 采用 4 ~ 4.5:1 为好。

2.3 整肠生菌生长对氨基酸和维生素营养的需要

不同氨基酸对整肠生菌生长的影响, 结果见表 1 和表 2。

表1 整肠生菌生长与氨基酸的关系

氨基酸	活菌数 (个/mL)		氨基酸	活菌数 (个/mL)	
	单一氨基酸	混合氨基酸		单一氨基酸	混合氨基酸
赖氨酸	8.70×10^7		甘氨酸	2.42×10^7	
白氨酸	3.20×10^7		鸟氨酸	2.81×10^7	
D-苯丙氨酸	3.90×10^7		半胱氨酸	3.02×10^7	
氨基异戊酸	3.30×10^7	5.40×10^7	赖氨酸	8.65×10^7	4.52×10^7
天冬氨酸	3.60×10^7		酪氨酸	2.81×10^7	
			苏氨酸	3.90×10^7	
酪氨酸	2.80×10^7		异亮氨酸	3.80×10^7	
组氨酸	3.40×10^7				
丝氨酸	3.95×10^7		天门冬酰氨	4.01×10^7	
色氨酸	2.41×10^7	2.72×10^7	胱氨酸	3.01×10^7	
精氨酸	3.33×10^7		脯氨酸	3.04×10^7	3.59×10^7
丙氨酸	3.25×10^7		L-苯丙氨酸	2.40×10^7	
			谷氨酸	2.24×10^7	
全部混合	5.74×10^7				

表1数据表明,整肠生菌生长对氨基酸的需要可分为3种情况,(1)D-苯丙氨酸、L-天冬氨酸、L-苏氨酸、白氨酸、组氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、L-胱氨酸、DL-异戊氨酸、赖氨酸等,对生长有较好作用,菌数都较高,平均为 3.50×10^7 个/mL。可看作不可取代氨基酸。(2)酪氨酸、L-苯丙氨酸、L-谷氨酸等,对该菌生长较差,菌数平均为 2.25×10^7 个/mL。可看作可取代氨基酸。(3)赖氨酸、DL-天门冬酰氨对该菌生长影响最大,菌数最高,为 8.70×10^7 个/mL和 4.01×10^7 个/mL。可看作不仅不可取代而且有刺激作用^[6,7]。同时表明,在含有赖氨酸和天门冬酰氨的不同氨基酸组合中,该菌生长亦明显要好,菌数为 $4.52 \sim 5.74 \times 10^7$ 个/mL。因此,为了高产,必须满足该菌对不可取代氨基酸和刺激生长作用的氨基酸的需要。

表2 整肠生菌生长与维生素的关系

维生素	用量 (mg/L)	活菌数 ($\times 10^7$ 个/mL)	维生素	用量 (mg/L)	活菌数 ($\times 10^7$ 个/mL)
VB ₁	1	2.20	VB ₂	1	2.25
	2	3.55		2	2.45
	3	2.21		3	2.40
	4	2.20		4	2.25
	5	2.20		5	2.25
VB ₃	1	2.65	VB ₅	1	2.15
	2	3.90		2	2.65
	3	3.10		3	2.80
	4	3.45		4	3.01
	5	2.30		5	2.69
VB ₆	1	2.50	VB ₁₁	1	2.10
	2	2.57		2	3.15
	3	2.50		3	2.55
	4	2.31		4	1.65
	5	2.10		5	1.40
VH	10	12.2	VH	40	16.7
	20	13.5		50	18.50
	30	15.35		60	18.51
对照		1.00			

表2数据表明,当VB₁、VB₂、VB₃、VB₆、VB₁₁分别为2mg/L时有利于该菌生长,菌数较高,为 3.55×10^7 个/mL、 2.45×10^7 个/mL、 3.90×10^7 个/mL、 2.57×10^7 个/mL、 3.15×10^7 个/mL,VB₅为4mg/L时,菌数最高, 3.01×10^7 个/mL。尤其是VH对促进该菌生长有最明显作用,菌数最高, $15 \sim 18.5 \times 10^7$ 个/mL,而且随着维生素用量增加而增加,但从成本考虑应该在30~50mg/L以下为好。

表3 在5L和300L发酵试验结果

发酵规模	原配方(1)号	新配方(2)号
	活菌数(个/mL)	活菌数(个/mL)
5L	1.00×10^9	3.10×10^9
300L	1.01×10^9	3.00×10^9

2.4 发酵试验

根据上述试验结果设计出(2)号培养基, 以此培养基在5L发酵瓶和300L发酵罐进行3批中试和生产重复发酵试验。发酵后经卫生防疫站和本研究室测定, 结果见表3。

2.4.1 发酵工艺流程: 斜面菌种活化培养 → 菌悬液制备 → 三角瓶一级种子培养 → 1L种子瓶种子培养 → 5L发酵瓶发酵 → 浓缩 → 加辅料



成品 ← 压片

50L发酵罐培养 → 300L发酵罐发酵生产 → 浓缩 → 加辅料 → 装胶囊 → 产品(图略)

2.4.2 中试及生产发酵结果: 用(2)号培养基进行5L和300L发酵试验时, 平均活菌数产量是原配方(1)号培养基生产时的3倍以上(表3)。

3 结论

整肠生菌最适生长温度 $35^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 最适, pH值 $5.5 \sim 6.5$ 。

整肠生菌生长最佳 C/N = $4 \sim 4.5:1$ 。

赖氨酸、天门冬氨酸、D-苯丙氨酸、L-天冬氨酸、白氨酸、组氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、L-胱氨酸、DL-异戊氨酸等为不可取代氨基酸。尤其是赖氨酸和天门冬酰胺对该菌有明显刺激生长作用。

维生素H对该菌有很好的刺激生长的作用。因此, 在满足整肠生菌生长最佳碳氮比、pH值和氨基酸以及维生素在种类和数量上的需要的情况下, 可使该菌菌数提高2倍以上。采用(2)号培养基发酵生产, 可使产量提高3倍以上。

参考文献

- [1] 刘自熔译. 细菌学概论. 济南: 山东科学出版社, 1981. 150.
- [2] 辜明铭, 杨致帮. 中国医疗卫生荟萃(感染与微生物). 成都: 成都科技大学出版社, 1995. 366.
- [3] 胡尚勤, 唐安科. 重庆师范学院学报, 2001, 18(2): 15~18.
- [4] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 121.
- [5] 杨森, 魏国勤. 食用维生素基础知识定量方法. 北京: 中国环境出版社, 1989. 179.
- [6] 胡尚勤. 微生物学通报, 1993, 20(3): 121~122.
- [7] Michael J. Pelczar, jr laboratory exercises in microbiology, 4th edn. new york. McGraw-Hill Company. 1997. 237.