

双歧杆菌生长和代谢过程的研究

杨基础 刘佳

(清华大学化工系, 北京 100084)

摘要 研究了双歧杆菌在两种培养基(牛乳培养基和肉汤培养基)中的生长和代谢的规律, 测定了厌氧发酵过程中菌体生长及基质消耗曲线, 探索了在发酵过程中流加碱调节 pH 值以提高产菌量的途径。

关键词 双歧杆菌, 厌氧发酵, 分批培养, 流加培养

近年来国内外对微生态制剂的研究日益增多^[1,2]。它可以弥补抗生素的使用所造成的菌群失调。对于调整人体的微生态平衡有非常重要的作用。目前已有一些相关产品投放市场, 其中有用双歧杆菌制成的饮料、营养液、片剂和胶囊。双歧杆菌产品是最有前途、应用最广的产品之一。

双歧杆菌是一种专性厌氧菌, 对于营养条件要求较高, 对氧极为敏感, 对低 pH 的抵抗能力较差, 活性保持较困难。目前市场上的大多数产品活菌量很低, 保存不到一个月就全部死亡, 这是当前亟待解决的问题之一。本文对双歧杆菌在不同培养基中的生长繁殖和基质消耗进行了研究, 旨在了解双歧杆菌的生长代谢规律, 改善培养条件, 提高活菌量和活菌保持能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种: 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*), 由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供, 经过耐氧化。

1.1.2 培养基(%)

肉汤培养基: 蛋白胨 2, 葡萄糖 0.5, 酵母浸膏粉 0.3, NaCl 0.5, Na_2HPO_4 0.25, 硫代乙醇酸钠 0.1, L-半胱氨酸 0.1, 牛肉汤 50ml, 肝汤 50ml, 调节 pH7.5, $0.7 \times 10^5\text{Pa}$ 灭菌 20min。用于种子培养和发酵。

牛乳培养基: 奶粉 3.5, 豆粉 0.5, 蛋白胨

0.1, 葡萄糖 0.75, 酵母浸膏粉 0.125, NaCl 0.125, Na_2HPO_4 0.125, L-半胱氨酸 0.025, 双歧促生长因子 0.5, 调节 pH7.5, $0.7 \times 10^5\text{Pa}$ 灭菌 20min。用于发酵。

血平板培养基: 蛋白胨 2, 葡萄糖 0.5, 酵母浸膏粉 0.25, NaCl 0.5, Na_2HPO_4 0.25, 硫代乙醇酸钠 0.1, L-半胱氨酸 0.1, 琼脂 2, 牛肉汤 50ml, 肝汤 50ml, 调节 pH7.5, $0.7 \times 10^5\text{Pa}$ 灭菌 20min。灭菌后冷却至 55℃ 左右, 加入 5%—6% 的无菌兔血或羊血, 制成培养皿平板, 用于菌种分离和活菌计数。

1.1.3 混合气体: N_2 、 CO_2 、 H_2 , 由北京分析仪器厂配制。

1.2 实验方法

1.2.1 双歧杆菌的培养条件

小瓶实验: 250ml 细口瓶装培养基 200—250ml, 接种量 8%—10%, 以胶塞封口, 在 38℃ 下恒温静置培养。

发酵罐实验: 1L 发酵罐装培养基 800ml, 接种量 10%, 定时搅拌并通入混合气体, 然后封闭所有的管口, 在 38℃ 下进行发酵。

平板培养^[3]: 平板涂布菌液后置于厌氧罐中, 同时放入钯催化剂(使用前在 160—170℃ 下再生 2h)和产气袋, 密封罐盖。产气袋与水接触产生的 H_2 与罐内的 O_2 反应造成厌氧环境。在 38℃ 下培养 48h。

1.2.2 活菌数的测定: 采用平板计数法。38℃

下厌氧培养 48h, 计数平板上的菌落数。

1.2.3 酸度的测定^[6]: 采用吉尔涅尔度(°T)表示。

1.2.4 糖浓度的测定^[7]: Fehling 试剂法。

1.2.5 蛋白浓度的测定^[6]: 考马斯亮蓝比色法。

2 结果与讨论

2.1 小瓶静置培养中双歧杆菌的生长和代谢

2.1.1 菌体生长: 生长曲线的测定^[7]有助于了解双歧杆菌的生长规律。在牛乳培养基和肉汤培养基中分别接入 10% 的种液进行小瓶发酵。定时取样, 测定发酵液中的活菌数、pH 及酸度。

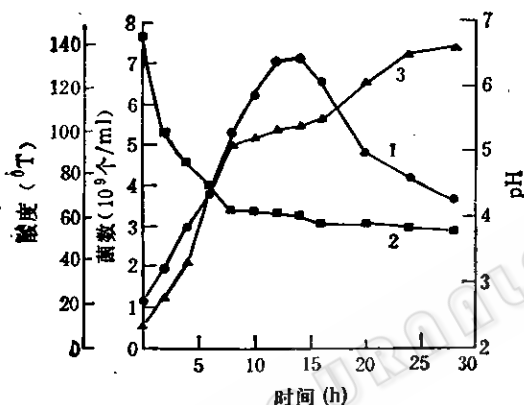


图 1 双歧杆菌在牛乳培养基中的生长曲线
1. 菌数, 2. pH, 3. 酸度

从图 1 可以看出, 双歧杆菌在牛乳培养基中的生长过程具有以下特点:

a. 生长过程中无明显的迟滞期, 接种后很快进入快速生长期; 静止期也很短, 当菌量达到最大值后即开始下降。

b. 发酵液酸度的变化与菌量的变化基本是相对应的。在快速生长期, 酸度迅速增加, 随后则显著减慢。

c. 产酸量大, pH 值下降速度很快, 终 pH 值低于 4.0。

d. 活菌量达到峰值的时间为 13h。

e. 利用生长曲线对动力学参数进行了估算:

$$\mu = \frac{\ln(x_2/x_1)}{t_2 - t_1}$$

前 8h 快速生长期平均比生长速率为 0.186 h⁻¹。

双歧杆菌在肉汤培养基中的生长规律与此相似, 其差别在于:

a. 终 pH 值较高, 为 4.8, 造成这种差异的原因可能是牛乳中含有大量的乳糖, 能够较容易被菌体利用, 产生大量的酸。

b. 活菌量达到峰值的时间较晚, 为 16h, 但活菌量的增长比牛乳培养基中多。

c. 前 8h 平均比生长速率略低, 为 0.178 h⁻¹。

2.1.2 基质的消耗: 为进一步弄清双歧杆菌的生长规律, 本文对基质的消耗情况进行了测定。

a. 糖的消耗: 取如下四个样品: 1#、2# 分别为未接种的肉汤培养基和牛乳培养基 (对照), 3# 为肉汤培养基接种 10% 并发酵 18h 后的培养液, 4# 为牛乳培养基接种 10% 并发酵 14h 后的培养液。待测样在 10000r/min 的转速下离心 15min, 取一定体积的上清液进行测定。结果发现, 肉汤培养基糖消耗率为 68.9%, 牛乳培养基糖消耗率为 51.5%。说明双歧杆菌对糖具有较强的发酵能力, 利用率较高。

b. 蛋白质的消耗: 取如下六个样品: 1#、2# 分别为未接种的肉汤培养基和牛乳培养基, 3# 为 2# 液与等体积 20% NaOH 的混合液 (1#、2#、3# 均为对照), 4# 为肉汤培养基接种 10% 并发酵 18h 的培养液, 5# 为牛乳培养基接种 10% 并发酵 14h 的培养液, 6# 为 5# 液与等体积 20% NaOH 的混合液。

待测样在 10000r/min 的转速下离心 15min, 取一定体积上清液进行测定。

对于牛乳培养基来说, 当 pH 值较低时, 处于蛋白质的等电点附近, 绝大部分的蛋白质都已形成沉淀, 离心时会被除去。而 3# 和 6# 样加碱的目的正是使蛋白质沉淀重新溶解, 以保证测出实际的蛋白消耗量。

测定结果表明, 肉汤培养基中蛋白质的消耗率为 21.2%, 牛乳培养基中蛋白质的消耗率

为 31.9%。而且,牛乳培养基发酵后的上清液(5#样)中的残余蛋白质浓度(0.751mg/ml)比接种前的肉汤培养基(1#样)中的蛋白质浓度(0.546 mg/ml)还要高,而 1#样中的蛋白质已经可以满足菌体生长的需要。可见,牛乳培养基中的蛋白是大量过剩的。

2.2 1L 发酵罐分批培养中双歧杆菌的生长和代谢

在 1L 发酵罐中研究了双歧杆菌的生长代谢过程,采用牛乳培养基,接种量 10% 进行发酵,定时取样,测定发酵液的 pH 值、活菌量、总糖及蛋白的含量,结果如图 2 所示。可以看出发酵罐培养中双歧杆菌的生长规律与静置培养相似,但由于增加了搅拌,改善了传质,最大菌量较静置培养有所增加。

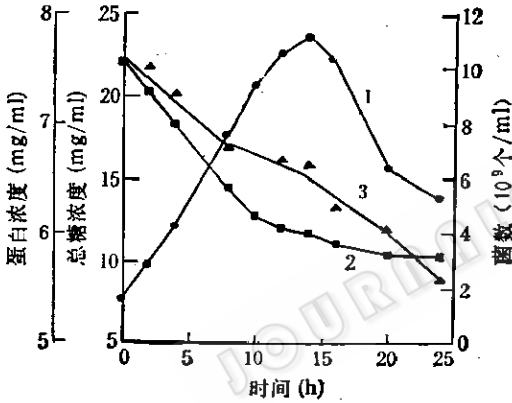


图 2 双歧杆菌在 1 升发酵罐中用牛乳培养基的生长代谢曲线
1.菌数 2.总糖浓度 3.蛋白质浓度

对牛乳培养基,前 8h 是快速生长期,平均比生长速率为 $0.192h^{-1}$,细胞对糖的得率系数为 9.05×10^8 (个细胞/mg 糖),而细胞对蛋白质的得率系数为 9.97×10^9 (个细胞/mg 蛋白)。

2.3 流加碱调节 pH 值的发酵过程

双歧杆菌的生长与 pH 值有密切联系,适宜的 pH 值为 6.5~7.0,当 pH 值过高或过低时则生长缓慢甚至不能生长。双歧杆菌在生长过程中不断产生乙酸和乳酸,使培养液的 pH 下降。因此,如果在发酵过程中,流加碱中和菌体代谢所产生的酸,调节 pH 值在一个适当的范

围内,将会有利于菌体的生长、增殖,提高产菌量。为此,进行了以下的对比实验,研究流加碱调节 pH 对发酵过程的影响。

3 份组成相同的牛乳培养基,接种量、培养条件均相同。在发酵过程中,1# 的 pH 值不作调节,而 2#、3# 每隔 2h 以 6mol/L NaOH 的溶液调一次 pH 值,目标值分别为 pH 5.5 和 pH 6.5,定时测定活菌量。pH 值的变化曲线如图 3 所示,活菌量的测定结果见表 1。

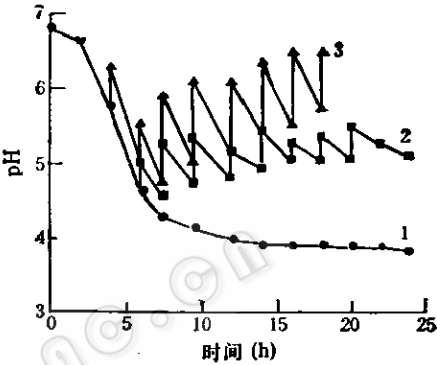


图 3 pH 值变化曲线

表 1 第 12 小时的活菌数

序 号	1	2	3
pH	不调节	4.57—5.43	4.74—6.50
活菌数($\times 10^9$ 个/ml)	1.50	2.50	5.52

从上面的数据可以看出:

a. 在发酵过程中调节 pH 值确实有利于双歧杆菌的生长,提高生物量。而且在一定范围内 pH 值越高越有效。例如,在 12h, 2#、3# 的菌数分别是 1# 的 1.7 倍和 3.7 倍。

b. 调节 pH 值可以延长双歧杆菌的增殖时间,从而提高产菌量。以 2# 为例,发酵 20h 以后菌量仍在增长,而一般的发酵过程到 12—14h 以后菌量就已开始呈下降趋势。

c. 不调节 pH 值时,发酵终态的 pH 值处于蛋白质的等电点附近,蛋白质大量沉淀下来;而 pH 值较高时,发酵液中的沉淀物很少,但颜色较深。对于饮料的生产来说,调节适当的 pH 值对口味也有所改善。

在 1L 发酵罐上进行了流加碱调节 pH 值

的发酵实验,控制 pH 值在 4.5—6.5 之间,结果见表 2。

表 2 1L 发酵罐上批加碱调节 pH 值的发酵实验

时间 (h)	12	16	20	24	28
活菌量($\times 10^9$ 个/ml)	3.21	5.72	8.53	3.16	2.92

与小瓶流加培养相似,菌量的增殖时间延长到 20h,最大值达到 8.53×10^9 个/ml,是第 12h 的 2.66 倍。

综上所述,双歧杆菌在牛乳培养基和肉汤培养基中的生长规律相类似,生长曲线上无明显的迟滞期和静止期。两者相比,双歧杆菌在牛乳培养基中发酵稍快,终 pH 值低,在肉汤中培养,菌量达到最大值的时间较迟。研究了基

质消耗情况,测定了基质消耗曲线,表明糖和蛋白质利用很不完全。在发酵过程中流加碱调节 pH 值,使之保持在 6.5 左右,可以显著提高产菌量。

参 考 文 献

- [1] 康白. 微生物学. 大连: 大连出版社, 1988.
- [2] 康白. 中国微生物学杂志, 1991, 3(1): 89—91.
- [3] 赵国屏. 微生物学通报, 1984, 11(1): 26—29.
- [4] 金世琳. 乳与乳制品生产, 北京: 轻工业出版社, 1977.
- [5] 郑昌学, 匡贵秋, 黄建. 生物化学实验指导. 中央广播电视大学, 1987.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [7] 钱旭初, 黄月琴, 陈彬华. 微生物学通报, 1990, 17(2): 96—98.

STUDY OF CELL GROWTH AND METABOLISM OF BIFIDOBACTERIUM

Yang Jichu Liu Jia

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084)

Abstract The process of cell growth and metabolism of *Bifidobacterium bifidum* in two different kinds of media (milk medium and broth medium) was investigated, the curves of cell growth and substrate utilization during the process of anaerobic fermentation were determined, the inhibitors of cell growth were discussed, the kinetic parameters maximum specific growth rate μ and yield factor $Y_{x/s}$ were estimated. In order to increase the number of live bifidobacteria in broth, the way of fed-batch of alkali to adjust pH during fermentation was explored, and the number went up by over 3.7 times.

Key words *Bifidobacterium*, Anaerobic fermentation, Batch fermentation, Fed-batch fermentation