

双歧杆菌固定化的研究

杨基础 刘 佳

(清华大学化学工程系, 北京 100084)

目前市场上的大多数双歧杆菌产品活菌量很低, 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。本文对双歧杆菌的固定化进行了研究, 旨在提供一种制备高活性双歧杆菌片剂或胶囊的新方法。采用细胞的固定化技术, 以无毒的凝胶包埋双歧杆菌制得所需形状的固定化细胞有许多优点: 简便易行, 条件温和, 活细胞损失少, 细胞不易漏出, 稳定性好。

凝胶包埋法常用的载体有海藻酸钠^[1]等。海藻酸钠完全无毒, 比生物学上使用的其它高分子物质更清洁, 同时海藻酸钠不能被大多数微生物分解或作为基质, 所以是一种理想的生物载体。k-角叉菜(俗称卡拉胶)、琼脂糖胶、明胶等也适合包埋各类细胞, 没有毒性, 不影响细胞生长。本文报道以海藻酸钠、卡拉胶、明胶为载体固定化双歧杆菌的方法, 活性的检测, 以及活性的保持。

1 材料与方法

1.1 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, 经过耐氧驯化。

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, Na₂HPO₄ 0.25, 硫代乙醇酸钠 0.1, L-半胱氨酸 0.1, 牛肉汤 50ml, 肝汤 50ml, pH7.5, 0.7 × 10⁵Pa 灭菌 20min。用于种子培养和发酵。

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, Na₂HPO₄ 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, pH7.5, 0.7 × 10⁵Pa 灭菌 20min。冷却至 55℃ 左右, 加入 5%~6% 的无

菌兔血或羊血, 制成平板。用于菌种分离和活菌计数。

1.1.3 细胞固定化载体: 海藻酸钠(北京旭东化工厂), k-卡拉胶(日本和光纯药工业株式会社), 明胶。

1.2 方法

1.2.1 双歧杆菌的培养条件: 小瓶实验: 250ml 细口瓶装肉汤培养基 200~250ml, 接种量 8%~10%, 以胶塞封口, 在 38℃ 下恒温静置培养 16~18h。

平板培养^[2]: 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 H₂ 气与罐内的 O₂ 气反应造成厌氧环境。在 38℃ 下培养 48h。

1.2.2 活菌数的测定: 采用平板计数法。在 38℃ 下厌氧培养 48h, 统计平板上的菌落数。

2 结果与讨论

2.1 以海藻酸钠为载体制备双歧杆菌的固定化细胞^[3,4]

2.1.1 固定化方法: 肉汤培养基接种 8%, 培养 18h。培养液在 6000r/min 的转速下离心 30min, 得到的湿菌体加生理盐水配成一定浓度的菌液。取等体积的菌液和海藻酸钠溶液混合均匀, 通过注射器针头滴注到 5 倍体积的 0.1mol/L CaCl₂ 溶液中, 并浸泡 1h 进行固定化。然后倾去 CaCl₂ 溶液, 以生理盐水洗涤, 得到直径约 3mm 的珠形固定化细胞。

2.1.2 固定化细胞中活菌量的测定方法: 当海藻酸钠中的 Na⁺ 离子被 Ca²⁺ 离子取代后, 即可

形成凝胶。反之,若要使海藻酸钙凝胶溶解,应设法除去 Ca^{2+} 离子。可供选择的试剂有柠檬酸盐、EDTA、多磷酸盐等。实验中尝试了不同的方法溶解海藻酸钙凝胶,结果表明:采用 0.2mol/L 的柠檬酸三钠较为适宜,溶解时间为 35min 。

因此,海藻酸钠固定化细胞中活菌量的测定方法为:将一定量的海藻酸钙固定化细胞加于 5 倍体积的 0.2mol/L 柠檬酸三钠溶液中并搅拌,使其溶解。用平板计数法测定菌悬液中的活菌量,并测量其体积,从而计算出固定化细胞中的活菌量。

2.1.3 固定化条件的确定:影响细胞固定化效果的因素有温度、搅拌等。但对本体系来说,影响最大的是海藻酸钠浓度和细胞浓度。在不同海藻酸钠浓度下进行对比实验,结果见表 1。

表 1 海藻酸钠浓度对细胞固定化的影响

序号	1	2	3	4	5
细胞浓度(%)	5	5	5	5	5
海藻酸钠浓度(%)	2	3	4	5	6
活菌回收率(%)	69.3	78.9	79.1	76.5	79.4
成珠难易	易	易	较易	较难	难

由表 1 可知:随着海藻酸钠浓度的增大,细胞的回收率有所增加,但变化不大,而体系的粘度则大幅度增加,操作的难度也随之增大。

在 4% 的海藻酸钠浓度下,使细胞浓度由 5% 增至 40%,活菌回收率从 71.5% 降低至 42.9%,但体系的粘度变化不大。综合考虑活菌回收率和操作的难易程度两方面的因素,可以确定较为理想的固定化条件为:海藻酸钠浓度 3%~4%,细胞浓度 5%~10%。

2.1.4 海藻酸钠固定化细胞的保存:将制得的固定化细胞放在锥形瓶中,以胶塞封口,于冰箱 (6.5°C) 中保存,定期取样测定活菌量。实验分如下三组进行:

1[#] 肉汤培养液不经离心分离菌体,直接与海藻酸钠溶液混合,制得珠形固定化细胞。

2[#] 肉汤培养液经过离心分离菌体,配成菌液与海藻酸钠溶液混合,制得固定化细胞。

3[#] 肉汤培养液(对照)。检测结果见表 2。

表 2 固定化细胞在保存过程中菌量的变化

1 [#]		2 [#]		3 [#]	
取样时间 (d)	活菌量 (个/g)	取样时间 (d)	活菌量 (个/g)	取样时间 (d)	活菌量 (个/ml)
0	1.53×10^9	0	6.33×10^8	0	1.91×10^9
7	3.45×10^8	5	2.83×10^8	7	2.93×10^8
15	2.83×10^8	11	2.12×10^8	15	7.30×10^7
22	2.24×10^8	26	1.41×10^8	22	2.41×10^7
30	8.05×10^7	/	/	30	8.12×10^6

可见,双歧杆菌的固定化细胞具有明显的优点,它可以保存相当长的时间而活菌的损失较少。一个月后,保存在试验 1[#] 和 3[#] 中的双歧杆菌的活菌量衰减 99.5%,而经过离心分离菌体制得的珠形固定化细胞,衰减 80%。

2.2 卡拉胶和明胶制备固定化细胞^[3,5]

以卡拉胶为载体制得的固定化细胞,成胶不均匀,包埋率较低,活菌回收率仅为 25.6%;以明胶为载体时,活菌回收率为 37.8%,固定化细胞机械强度差,包埋率低,且在室温下放置一段时间后就会变粘、液化。

综上所述,以海藻酸钠为载体包埋双歧杆菌的适宜条件为:湿菌体浓度 5%~10%,海藻酸钠浓度 3%~4%,活菌回收率可达 70%,操作也较容易。这种固定化的双歧杆菌在冰箱 (6.5°C) 中保存时,活菌量衰减较慢,一个月后仍达到 10^8 个/g 凝胶。

参 考 文 献

- [1] 刘健. 应用微生物, 1988, 4: 1~7.
- [2] 赵国屏. 微生物学通报, 1984, 11(1): 26~29.
- [3] 孙万儒. 微生物学通报, 1986, 13(1): 33~35.
- [4] 由英才, 王寿亭, 王补森, 等. 离子交换与吸附, 1992, 8(1): 1~4.
- [5] 寇秀芬, 王祯祥. 微生物学通报, 1987, 14(5): 204~207.