

五种益生菌在纤维固定化连续培养系统的共存定殖

薛胜平^{1,2} 杜连祥^{1*} 路福平¹

(1. 天津工业微生物重点实验室 天津科技大学 天津 300457)
(2. 河北经贸大学 生物科学与工程学院 石家庄 050061)

摘要: 模拟肠道的半固态生境, 建立以玉米纤维为载体的固定化连续搅拌培养系统, 并以非固定化连续搅拌培养系统为对照, 稀释率为 0.0417, 分别连续培养 12 d, 双歧杆菌、酪酸菌、嗜酸乳杆菌、肠膜芽孢杆菌、粪肠球菌五种菌在两种系统中均可稳定共存, 固定化系统固相五种菌数均高于非固定化系统, 以双歧杆菌增幅最大, 半固态的固定化连续培养较液态连续培养的菌相与肠道菌相较一致, 能更好地模拟肠道微生态。扫描电镜观察五种菌在玉米纤维上固定形成了生物膜。

关键词: 固定化, 连续培养, 混合培养, 玉米纤维

Stable Coexistence of Five Bacterial Strains as a Community in an Immobilized Continuous Culture System

XUE Sheng-Ping^{1,2} DU Lian-Xiang^{1*} LU Fu-Ping¹

(1. Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)
(2. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei Economic and Business University, Shijiazhuang 050061)

Abstract: Five kinds of probiotic bacteria are immobilized and cultured continuously in simulated intestinal systems with corn fiber as the carrier. The biomass and the colonization in biofilm are investigated by selective culture methods and scanning electron microscope. *Bifidobacterium longum* TQ21-2-2, *Lactobacillus acidophile* CICC06005, *Clostridium butyric* TO-A, *Bacillus mesentericus* TO-A and *Enterococcus faecalis* T-110 can coexist stably. The biomass of five probiotics in the immobilized phase is greater than that of liquid in the continuous shake flask reactor. Five kinds of probiotic bacteria formed biofilm on corn fiber which be observed by SEM. Continuous culture of immobilized cells could be used better model than that of liquid, the model can be used to study for microecology and microecological agent.

Keywords: Immobilization, Continuous culture, Mixed culture, Probiotics

肠道是一个开放的连续培养系统, 肠道菌群在宿主生命活动中作用重大, 益生菌以其维持肠道菌群平衡、防治腹泻、增强免疫和供给营养的确切功

效, 在药品、食品、功能食品及饲料方面均有广泛应用。长期以来益生菌剂组方及其比例关系缺乏依据, 复方制剂中各种菌的生态关系不清, 导致产品

* 通讯作者: Tel: 022-60272190

收稿日期: 2007-05-23; 接受日期: 2007-07-09

内在稳定性差。连续培养技术可用来建立体外模型以模拟正常菌群生态系统,而模拟肠道时以液态连续培养居多^[1],得出的菌数比肠道菌相明显偏低,也有以多种食用胶类和黏蛋白构建的半固态连续搅拌培养系统^[2],但固相的双歧杆菌菌数低于液相。大肠内容物除微生物、脱落的肠道细胞及其它废物外,东方人以未消化的植物纤维为主^[3],肠道菌不仅黏附于肠黏膜,也于食物残渣上形成生物膜^[4],尚未见以纤维作为固定化载体模拟肠道半固态生境的研究报道。随着人们对微生物相互作用和群落结构认识的发展,有限定混合培养(defined mixed culture)生物反应器逐步发展起来,本研究选用十大优势菌群中的双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、酪酸菌及粪肠球菌,外加肠膜芽孢杆菌为研究对象,对照研究半固态与液态连续培养中菌的生态关系、代谢特性,当达到稳态时,可得到以一定比例组成的稳定性好的益生菌剂组方。

1 材料与方 法

1.1 菌种

长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum* TQ21-2-2; 肠膜芽孢杆菌 *Bacillus mesentericus* TO-A; 酪酸菌 *Clostridium butyricum* TO-A; 粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* T-110。以上菌为天津科技大学应用微生物研究室保留菌种。嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC06005, 购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基

PTYG、RCM、肉汤培养基、MRS及BS均见文献^[5]。以棉籽糖代替BS中的葡萄糖,并加入溴甲酚紫作pH指示剂。连续培养的培养基根据文献^[2]改良,而以玉米纤维代替食用胶及黏蛋白。玉米纤维:购自华北制药康欣有限公司,呈薄片不规则状,大小约5mm×6mm×1mm。

1.3 方法

1.3.1 连续培养:连续摇瓶反应(Continuous shake flask reactor: CSFR)在HYG-FJ生物反应摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司)上进行,温度、pH、搅拌均自动控制。37、60 r/min培养,pH控制为6。反应器为1L三口玻璃瓶,工作体积420 mL,以2.5 L/h通入N₂保持厌氧环境。当达到工作体积时,培养液从溢流管流到回收瓶中加有5%玉米纤维皮作为固定化载体的为固定化连续培养(I-CSFR),与培养基预置于反应器中,装置灭菌后,将混菌培养好的一

级种子无菌接入,连接系统,37 培养1d作为二级种子,再打开蠕动泵按一定流速加培养基,流量为24 h流入420 mL,稀释率(D)为0.0417 h⁻¹,取样测定淀粉、乳酸,各菌菌数,数据稳定,即达到稳态。连续培养12 d。

1.3.2 测定方法:淀粉含量的测定采用斐林法^[6],乳酸含量采用SBA-40C型生物传感分析仪(山东省科学生物研究所)测定;乙酸、丙酸、丁酸的含量采用GC-7870 II气相色谱仪(Techcomp)测定^[2]。

1.3.3 活菌计数方法:改良BS的丙酸钠、LiCl及巴龙霉素抑制其他四种菌,双歧杆菌特异性分解棉子糖呈褐色菌落。酸化MRS选择性生长嗜酸乳杆菌。头孢V抑制其他四种菌生长,对粪肠球菌具有选择作用。酪酸菌可在高管半固体RCM上产气,以MPN法计数。肠膜芽孢杆菌在肉汤琼脂上形成特征性的膜状菌落。玉米纤维上的生物膜活菌计数方法^[7]:培养结束,无菌操作将样品置40℃,10 h,称取样品,置于含50 mmol/L半胱氨酸的1000 mmol/L NaCl溶液中振荡15 min,取上清计数。

1.3.4 扫描电镜:样品预处理方法同文献^[2],用扫描电镜(S-3500N, HITACHI)进行观察。

2 结果与讨论

2.1 连续培养操作及稳态的判断

以结肠最小排空时间24h为依据,本研究采用较小的稀释率0.0417 h⁻¹。一般认为连续培养循环5次可达稳态^[8],从第3天开始测定pH、淀粉、乳酸,并作无菌检查,第7天上述数值较稳定后,连续测定五菌菌数,数值平稳,至12天结束。两系统同时对对照运行3批,操作稳定性较好,未发生堵塞、断流与染菌现象。

2.2 生物膜活菌计数

以含50 mmol/L半胱氨酸的1000 mmol/L NaCl洗下玉米皮上的活菌得到的计数结果较稳定,而以无菌水洗计数结果较低。表明菌在纤维上的粘附力较强。

2.3 固定化系统与非固定化系统菌相比较

由表1可见,固定化系统(I-CSFR)的固相菌数普遍高于非固定化系统(F-CSFR)游离状态的菌数。固定化系统中固相菌高于液相菌,固定化系统中液相菌的双歧杆菌高于非固定化系统(F-CSFR),原因是固定化使固相中的双歧杆菌增高,随着搅拌,吸附力弱的菌不断脱落于液相中繁殖。固定化系统固相中五菌的比较:酪酸菌最低,肠膜芽孢杆菌菌

表 1 固定化系统与非固定化系统菌相比较

[Log₁₀cfu/mL, Log₁₀cfu/g] 平均数 ± s (n=2)]

Table 1 Comparison of planktonic populations in the continuous system with those in biofilm

[Mean Log₁₀cfu/mL, Log₁₀cfu/g] $\bar{X} \pm s$ (n=2)]

| Bacteria | F-CSFR | | I-CSFR | |
|-----------------------|-------------|------------|-------------|----------|
| | In effluent | In solid | In effluent | In solid |
| <i>B. longum</i> | 5.9 ± 0.1 | 10.5 ± 0.3 | 7.85 ± 0.2 | |
| <i>B. mesente</i> | 7.4 ± 0.2 | 8.9 ± 0.3 | 5.7 ± 0.2 | |
| <i>C. butyri</i> | 7.3 ± 0.3 | 8.2 ± 0.2 | 7.1 ± 0.2 | |
| <i>E. faecalis</i> | 7.2 ± 0.2 | 9.3 ± 0.2 | 6.8 ± 0.1 | |
| <i>L. acidophilus</i> | 7.2 ± 0.3 | 9.7 ± 0.2 | 6.9 ± 0.1 | |

数较高, 因它形成生物膜的能力较强^[9], 较少脱落。

2.4 体外模型与肠道菌相的比较

人体成年组肠道菌相双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌及酪酸菌分别为: 9.8 ± 0.7, 6.7 ± 1.8, 7.7 ± 1.3, 4.8 ± 1.7, 本文固定化系统固相双歧杆菌较高, 而乳杆

菌、肠球菌数量居中, 酪酸菌较低, 与肠道中各菌数量趋势是一致的。5 种菌接种时比例数相同, 但固定化连续培养系统中固相与液相双歧杆菌均显著高于游离的液态连续培养。液态连续培养的双歧杆菌以外的其余四菌数值在 7.2~7.4 之间, 差别较小, 而在以纤维为载体的固定化系统中 5 种菌菌数为 8.2~9.7 之间, 差别较大, 且与肠道菌相相近, 能更好地模拟肠道微生态。

2.5 生物膜的扫描电镜观察

图 1(A)可见, 在玉米纤维疏松多孔的网状结构上细菌凝集形成了细菌微集落, 类似生物膜的结构。图 1(B)可见, 从形状、长度、大小可区分中等的肠膜芽孢杆菌、细长的嗜酸乳杆菌、粗大的酪酸菌, 双歧杆菌为不规则杆状, 嗜酸乳杆菌与肠膜芽孢杆菌、粪肠球菌依次相贴的黏附在一起。

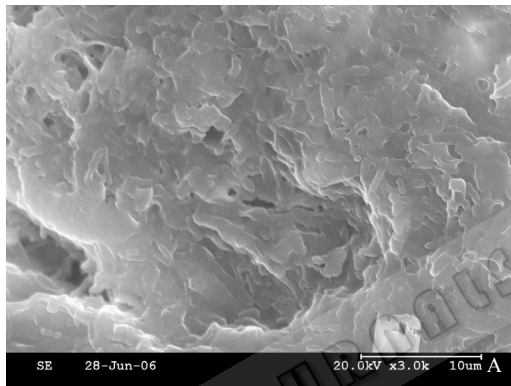


图 1 5 种菌于玉米纤维形成生物膜的 SEM 图

Fig.1 SEM image of colonization of five bacteria on corn fiber A: (30000 ×); B: (50000 ×)

2.6 不同培养条件下短链脂肪酸的变化

短链脂肪酸总量及丁酸、丙酸、乙酸含量: 固定化连续培养 > 液态连续培养 (I-CSFR > F-CSFR)。固定化后细胞活性增高, 生成代谢产物增多。

表 2 不同培养条件下有机酸产量的变化 (mmol/L)

Table 2 Organic acids content in F-CSFR and I-CSFR (mmol/L)

| Item | F-CSFR | I-CSFR |
|----------------|--------------|--------------|
| Acetic acid | 8.40 ± 0.70 | 11.66 ± 1.0 |
| Propionic acid | 6.25 ± 0.30 | 8.54 ± 0.40 |
| Butyric acid | 1.10 ± 0.21 | 1.62 ± 0.33 |
| Total | 15.75 ± 1.21 | 21.82 ± 1.73 |

3 讨论

不同种群的微生物之间相互关系是以共同处于

一个环境中, 彼此间发生的使一方或双方受益, 一方或双方受害, 双方互不影响的后果而划分的, 一般认为益生菌之间具有一方或双方受益的共生关系。在一定稀释率下, 系统达到稳态后, 包括 pH 在内的各种环境因素均稳定不变, 连续培养使分批培养难以控制的各种细胞的相对含量在高效的过程控制下能维持不变, 处于稳定状态的五种菌之间的比例也保持基本不变, 因而连续培养系统是研究混合培养菌际关系的较好模型。5 种菌除肠膜芽孢杆菌外, 均为肠道的优势菌, 将五种菌在加入玉米纤维模拟肠道的半固态连续培养系统中培养, 5 种菌之间的生物量、比例关系与液态不同, 突出特点是双歧杆菌数较高, 与肠道菌相比较一致。而国外以食用胶、黏蛋白做固相培养双歧杆菌数较低, 与肠道菌相不符^[2,10]。本研究双歧杆菌数较高的原因如下: 1、吸

附在玉米纤维载体上的菌可进行高密度增殖而维持反应器较高细胞浓度,使连续培养时代时长的双歧杆菌免于洗出;2、固定化一方面使生态位得以分离避免了菌间竞争,另一方面形成的微集落又加快相互作用的物质的传递;3、混合培养中的肠膜芽孢杆菌产双歧因子^[11]、酪酸菌产丁酸也可促进双歧杆菌生长;4、双歧杆菌代谢产物乙酸盐为混合培养体系的嗜酸乳杆菌、酪酸菌利用,解除了产物抑制。

电镜观察五菌在玉米纤维上形成生物膜。玉米纤维具开放性长链和粗糙疏松多孔的网状结构,利于微生物的吸附。洗脱液的高离子强度在菌体与纤维载体间形成离子屏蔽,从而削弱静电作用力而使菌体洗脱,说明固定化机理为物理吸附,固定化的细胞处于生长状态,细胞成链、团后被捕集于纤维空穴,推测细菌先以静电力、氢键、疏水键吸附到纤维表面,然后分泌黏性高分子物质及一些化合物,实现较牢的黏附,逐渐形成生物膜。

单菌连续培养时,随稀释率的加大,菌数先上升,维持一段平台后,下降,在与最大生长比速相等的稀释率下被洗出。多菌连续培养时,理论上生长比速小的菌被洗出^[8]。动物机体肠道种类众多的菌彼此之间、与宿主之间,在长期进化过程中形成稳定的共生体,但当肠蠕动过速(腹泻)时,菌群比例关系出现失调,双歧杆菌会减少甚至缺失。本研究采用较小的稀释率是以结肠最小排空时间 24 h 为依据, $1/24=0.0417\text{h}^{-1}$,如进一步实验,以超过天然连续培养系统的肠道的排空时间(稀释率),考察五种菌之间比例关系的改变,也可能观察到代时长的菌被洗出。因此五种菌稳定的共存比例关系将随稀释率、游离或固定状态而改变。以生理状态的稀释率下五种菌的比例关系组方得到了稳定性好的与肠道菌群相近的益生菌制剂(另文发表)。大肠内容物除微生物、脱落的肠道细胞及其它废物外,以未消化的植物纤维为主^[3],以纤维为载体的固定化连续培养研究方法简单易行,模拟了肠道生境,又解决了连续培养易污染的问题,可用于研究益生菌的生态关系与配方。

4 结论

固定化系统固相 5 种菌数均高于非固定化系统,以双歧杆菌增幅最大,而酪酸菌菌数增幅较低,半固态较液态连续培养的菌相与肠道菌相较一致,能更好地模拟肠道微生态。

双歧杆菌、酪酸菌、嗜酸乳杆菌、肠膜芽孢杆菌、粪肠球菌在肠道排空时间(稀释率)的游离与固定的连续培养系统中均可稳定共存,按其比例可组成稳定性好的益生菌菌剂。

纤维做载体的固定化连续培养系统可较好的用于研究益生菌的生态与益生菌剂的配方。

致谢:感谢中科院微生物研究所郭兴华研究员、河北科技大学徐亲民教授审阅论文、微生态学会主任委员熊德鑫研究员对试验设计提供指导,对论文提出宝贵意见。

参 考 文 献

- [1] Probert HM, Apajalahti JH, Rautonen N, *et al.* Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Appl Environl Microbiol*, 2004, **70**(8): 4505-4511.
- [2] Macfarlane S, Emma J Woodmansey, Macfarlane GT. Colonization of Mucin by Human Intestinal Bacteria and Establishment of Biofilm Communities in a Two-Stage Continuous culture system. *Appl Environl Microbiol*, 2005, **71**(11): 7483-7492.
- [3] Richard D Jurd. Instant notes in animal biology. *Bios scientific publishers limited*, 1997, p.157.
- [4] Macfarlane S, Macfarlane GT. Composition and Metabolic activities of Bacterial Biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl Environl Microbiol*, 2006, **72**(9): 6204-6211.
- [5] 杜连祥, 赵 征. 乳酸菌及其发酵制品生产技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1999, p.64, p.61.
- [6] 王福荣. 生物工程分析与检验. 北京: 中国轻工业出版社, 2005, pp.148-150.
- [7] Munehiro Kubota, Masayoshi Matsui, Hiroyuki Chiku. Cell adsorption and selective desorption for separation of microbial cells by using chitosan-immobilized silica. *Appl Environl Microbiol*, 2005, **71**(12): 8895-8920.
- [8] Jens Nielsen, John Villadsen. 生物反应工程原理, 第二版(英文影印版). 北京: 化学工业出版社, 2004, p.50, p.401.
- [9] Masaaki, Morikawa. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J of Bioscience and Bioengineering*, 2006, **101**(1): 1-8.
- [10] Cecile Cinquin, Gwenaelle Le Blay, Ismaril Fliss, *et al.* New three-stage invitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, **57**(2): 324-336.
- [11] Fumiko O, Yoshihiro I, Akiko S. Purification and characterization of 3, 3-dihydroxyazetidione from culture medium of *Bacillus mesentericus* and *B.subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, **50**(1): 91-95.