

益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养基的优化

高鹏飞 李妍 赵文静 陈霞 崔景丽 张磊 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要: *Lactobacillus casei* Zhang 是一株分离自传统酸马奶中的益生菌。本文研究了不同碳源、氮源、碳氮比例、微量元素及缓冲盐对 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养的效果, 并采用响应面法对优选的碳源、氮源和缓冲盐类的组成含量进行优化, 得到 *Lactobacillus casei* Zhang 的增殖培养基为: 葡萄糖 20.9 g/L、大豆蛋白胨 10.45 g/L、酵母粉 10.45 g/L、 K_2HPO_4 3.5 g/L、醋酸钠 14.6 g/L、柠檬酸钠 2.3 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L、 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 54 mg/L、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg/L、吐温 80 为 1 g/L。*Lactobacillus casei* Zhang 在此增殖培养基中经 37℃ 18 h 培养活菌数可达到 4.78×10^9 CFU/mL, 比在 MRS 中 (4.8×10^8 CFU/mL) 提高近 10 倍。

关键词: 干酪乳杆菌, 营养, 增殖培养基, 优化

Study on the Optimization of Enrichment Medium of *Lactobacillus casei* Zhang

GAO Peng-Fei LI Yan ZHAO Wen-Jing CHEN Xia CUI Jing-Li
ZHANG Lei ZHANG He-Ping*

(Key Lab of Dairy Biotechnology and Bioengineer, Education Ministry of China, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

Abstract: The effects of different carbon source, nitrogen source, proportion of carbon and nitrogen source, microelement and buffer salts on the growth of *Lactobacillus casei* Zhang isolated from Koumiss were studied. The enrichment medium for *Lactobacillus casei* Zhang was optimized by response surface methodology and its composition was glucose 20.9 g/L, soy peptone 10.45 g/L, yeast extract 10.45 g/L, K_2HPO_4 3.5 g/L, sodium acetate 14.6 g/L, sodium citrate 2.35 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 54 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg/L, tween 80 1.0 g/L. After cultivated in enrichment medium for 18h at 37 °C, the living cells of *Lactobacillus casei* Zhang were 4.78×10^9 CFU/mL, which was about 10 times higher than in MRS (4.8×10^8 CFU/mL).

Keywords: *Lactobacillus casei*, Nutrients, Enrichment medium, Optimization

益生菌是“当摄入一定量时能对宿主健康有作用的微生物活体”^[1]。益生菌制剂的实质是通过其所含活性菌的生命活动来达到调节宿主体内正常菌群的平衡,从而促进宿主健康。因此益生菌产品中高浓度的活性菌体细胞是其发挥功效的必要条件^[2]。Chaitow(1990)指出治疗用的活菌制剂,在有效期应保证活菌含量不低于 10^9 个/克。因此,实现益生菌的高密度培养是近几年益生菌研究领域的重要目标与方向之一。

Lactobacillus casei Zhang(*Lb. Zhang*)是分离自内蒙古地区传统酸马奶中的一株潜在益生菌,经16S rDNA 同源性分析与 GenBank 中标准菌株 *Lb. casei* ATCC334 的同源性为100%^[3]。经研究表明该菌株具有良好的耐酸性、人工胃肠液耐受性及胆盐耐受性^[4],对免疫系统具有显著的调节功能^[5,6],喂饲该菌体能显著降低高脂饲料大鼠血清胆固醇和低密度脂蛋白含量^[7]。这些研究证实该菌具有良好的益生潜力,对其益生菌制剂的研究开发亟待深入。

本研究目的在于根据 *Lb. Zhang* 的生物学特性和营养需求,对菌体的增殖培养基成分和含量进行筛选和优化,以确定适宜的增殖培养基用于菌体的高密度培养,为高浓缩益生菌制剂的开发创造良好的基础条件。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

Lb. Zhang 分离自内蒙古锡林浩特传统发酵酸马奶中,由内蒙古农业大学乳品与生物技术教育部重点实验室乳酸菌菌种库保藏。

1.2 活化与接种发酵

Lb. Zhang 菌株于灭菌脱脂乳中 -80 保存,使用前,接种于MRS培养基,37 培养16 h~18 h,活化两代。以 $1\text{ CFU/mL} \times 10^6\text{ CFU/mL}$ 接种于相应的培养基中,37 培养18 h后测定菌体生长情况。

1.3 培养基营养成分的筛选

1.3.1 碳源和氮源的筛选:在MRS培养基的基础上采用各种不同的碳源和氮源分别取代MRS中的碳源和氮源配制培养基,接种发酵,根据菌体生长情况判断和筛选碳源和氮源。

1.3.2 碳氮比的确定:分别用不同的碳氮总量和碳氮比取代MRS中的碳源和氮源配制培养基,接种发

酵,根据菌体生长情况确定适宜的碳氮比例。

1.3.3 缓冲盐、微量元素、增殖因子的筛选:在碳氮源优化的基础上,添加不同的缓冲盐体系,微量元素、生长因子,分别以不添加缓冲盐、微量元素和生长因子培养基为对照,接种发酵,根据菌体生长情况,确定缓冲体系和微量元素及生长因子的作用。

1.4 培养基组成的优化

由培养基营养成分筛选确定的主要影响因素包括碳源、氮源和缓冲盐,设计三因素正交旋转回归实验,以菌体干重为响应值作响应面设计,对营养成分进行优化。

1.5 菌体生长情况监控

菌体密度:发酵培养液直接用紫外可见分光光度计(HITACHI U-2000)在波长600 nm下测定光密度。

菌体干重:5 mL 发酵液3500 r/min 离心15 min,收集菌体,蒸馏水洗涤两次后重新悬浮于5 mL 蒸馏水中,600 nm 测定光密度然后根据标准曲线转化为菌体干重(g/L)。标准曲线的制备方法为蒸馏水洗涤后的菌悬液,离心收集菌体,102 烘箱烘干至恒重,同时在600 nm下测定菌悬液光密度得到 OD_{600} 与菌体干重的标准曲线。如果菌液过浓则用蒸馏水适当稀释后测定^[8]。

活菌数:发酵液用灭菌生理盐水梯度稀释至一定倍数后,采用MRS琼脂培养基平板倾注法,37℃培养48 h后计菌落总数。

1.6 统计分析

采用SAS软件进行ANOVA分析;响应面试验采用Design Expert 软件进行试验设计和分析。

2 结果与讨论

2.1 碳源和氮源的筛选

不同的碳源和氮源对于 *Lb. Zhang* 的生长影响极为显著($P<0.01$),结果见表1。综合考虑培养基的成本和效果,选定葡萄糖作为最佳碳源。大豆蛋白胨与酵母粉复合使用作为氮源。其配合比例及对菌体生长情况的影响见表2。大豆蛋白胨与酵母粉比例为1:2和1:1时菌体生长效果较好,因此选定1:1比例的大豆蛋白胨与酵母粉复合氮源。

表 1 *Lb. Zhang* 在不同碳氮源培养基中培养 18 h 的菌体密度(OD_{600})($n=3, x \pm D$)
Table 1 Cell density of *Lb. Zhang* in different carbon and nitrogen source medium for 18h(OD_{600})($n=3, x \pm D$)

碳源 2% (W/W) Carbon	菌体密度 Cell density	氮源 2% (W/W) Nitrogen	菌体密度 Cell density
葡萄糖 Glucose	2.356±0.004 ^a	大豆蛋白胨 Soy peptone	2.186±0.012 ^b
果糖 Fructose	2.267±0.006 ^b	酵母粉 Yeast extract	2.409±0.002 ^a
蔗糖 Sucrose	2.418±0.002 ^a	胰蛋白胨 Tryptone	1.845±0.005 ^c
低聚果糖 Fructo-Oligosaccharide	2.352±0.002 ^{ab}	牛肉蛋白胨 Beef peptone	0.571±0.007 ^d
果葡糖浆 Fructose syrup	2.332±0.011 ^{ab}	牛肉膏 Beef extract	0.667±0.016 ^d
麦芽低聚糖 Maltooligosaccharide	1.648±0.046 ^{cd}	硫酸铵 Annonium sulfate	0.150±0.084 ^e
低聚异麦芽糖 Isomaltooligosaccharide 900	1.561±0.027 ^e	浓缩乳清蛋白 Whey protein concentrate	0.049±0.010 ^e
糊精 Dextrin	1.581±0.021 ^{de}	硝酸钾 Potassium Nitrate	0.022±0.004 ^e
淀粉 Starch	1.422±0.054 ^f		

注: 角标含相同字母的数据之间差异不显著($P < 0.01$)

Note: ^{a b c d e} Means in the same column without a common subscript are significantly different($P < 0.01$)

表 2 *Lb. Zhang* 在不同比例大豆蛋白胨与酵母粉复合氮源培养基中菌体密度(OD_{600})($n=3, x \pm D$)
Table 2 Cell density of *Lb. Zhang* in nitrogen source medium of different soy peptone and yeast extract proportion(OD_{600})($n=3, x \pm D$)

大豆蛋白胨: 酵母粉 [*] Soy peptone: yeast extract [*]	菌体密度(OD_{600}) Cell density(OD_{600})
1 1 : 2	2.403±0.0061 ^a
2 1 : 1	2.404±0.0222 ^a
3 2 : 1	2.313±0.0767 ^{ab}

注: ^{*}: 大豆蛋白胨和酵母粉总添加量为 3%;

角标含有相同字母的数据之间差异不显著($P < 0.05$)

Note: ^{*}: The total addition of soy peptone and yeast extract is 3%;

^{a,b}: In the same column without a common subscript are significantly different ($P < 0.05$)

2.2 碳氮比

碳源和氮源利用之间有密切的关系, 二者之间的比例能够直接影响微生物的生长和发酵产物的积累^[9]。培养基碳氮比例的不同对菌体密度的影响情况显著($P < 0.05$)。就总体趋势来看, 培养基碳氮比例在 1.0 左右时, 菌体生长较好, 菌体密度较高。培养基碳氮比例的对菌体密度的影响趋势随碳氮量的变化而变化。结果见图 1。

2.3 缓冲体系

由表 3 可见, 培养基中补充一定的缓冲盐对菌体的增殖效果明显高于对照组, 不同的缓冲体系和同一缓冲体系不同浓度对菌体的增殖效果之间差异都显著, 以柠檬酸钠/NaAc/KH₂PO₄ 缓冲体系对菌体促生长效果最好。因此选定此缓冲体系进一步通

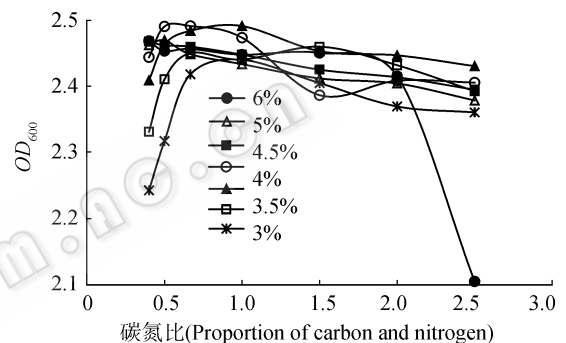


图 1 *Lb. Zhang* 在不同碳氮量和碳氮比培养基中的菌体密度

Fig. 1 Cell density of *Lb. Zhang* in carbon and nitrogen source medium of different content and proportion

过三因素三水平正交试验对缓冲体系各成分比例进行优化(实验数据略), 得到最佳水平为: NaAc 12.5 g/L、柠檬酸钠 2.0 g/L、KH₂PO₄ 3.0 g/L。

2.4 微量元素

Fe、Mg、Cu、Mn 等微量元素作为酶的激活剂或生物活性物质的组成成分也是微生物在生长繁殖过程中不可缺少的, 虽然在培养基原料中可能含有一定量, 但不同菌株对微量元素的需要程度是不同的^[9,10], 因此需试验确定培养基中这些元素的用量。图 2 显示了在分别添加了不同浓度的 MgSO₄·7H₂O、MnSO₄·5H₂O、FeSO₄·7H₂O 和 CuSO₄ 的培养基中 *Lb. Zhang* 的生长情况。

锰离子作为乳酸脱氢酶的组成成分, 是 *Lb. casei* 生长的关键的生长因子之一^[11], 已有报道利用 *Lb. casei* 发酵乳清水解物生产乳酸是必须补充

表3 不同缓冲盐体系培养基中的菌体密度(OD_{600})($n=3, x \pm D$)
Table 3 Cell density of *Lb. Zhang* in medium of different buffer salts(OD_{600}) ($n=3, x \pm D$)

缓冲盐成分 Composition of buffer salts	不同缓冲盐浓度(mol/L)下的菌体密度*				
	Cell density of <i>Lb. Zhang</i> in medium of different buffer salts*				
	0.00	0.02	0.04	0.08	0.12
柠檬酸钠(Sodium citrate)/乙酸钠 (Sodium acetate)/ KH_2PO_4		—	—	2.467 ± 0.002^a	—
Na_2HPO_4/NaH_2PO_4		2.263 ± 0.122^{ghij}	2.209 ± 0.008^{ijkl}	2.278 ± 0.008^{fghi}	2.314 ± 0.018^{efgd}
$KH_2PO_4/NaOH$		2.188 ± 0.004^{kl}	2.165 ± 0.003^l	2.222 ± 0.001^{hijkl}	2.333 ± 0.001^{cdef}
$Na_2HPO_4/Citric\ acid$	2.176 ± 0.032^{kl}	2.284 ± 0.004^{efgh}	2.349 ± 0.015^{bcde}	2.418 ± 0.001^{ab}	2.379 ± 0.004^{bcd}
Na_2HPO_4/KH_2PO_4		2.198 ± 0.001^{jkl}	2.18 ± 0.023^{kl}	2.238 ± 0.019^{ihjk}	2.370 ± 0.007^{bcd}
柠檬酸(Citric acid)/柠檬酸钠(Sodium citrate)		2.419 ± 0.014^{ab}	2.384 ± 0.005^{bc}	0.028 ± 0.005^m	0.035 ± 0.010^m
柠檬酸钠(Sodium citrate) / NaOH		2.283 ± 0.068^{efgh}	2.246 ± 0.013^{shijk}	0.052 ± 0.035^m	0.078 ± 0.002^m

注：*培养基初始 pH 均为 6.5；角标中含有相同字母的数据之间差异不显著($P < 0.05$)

Note: *The initial pH of medium is 6.5; ^{a-m}: Without a common subscript are significantly different ($P < 0.05$)

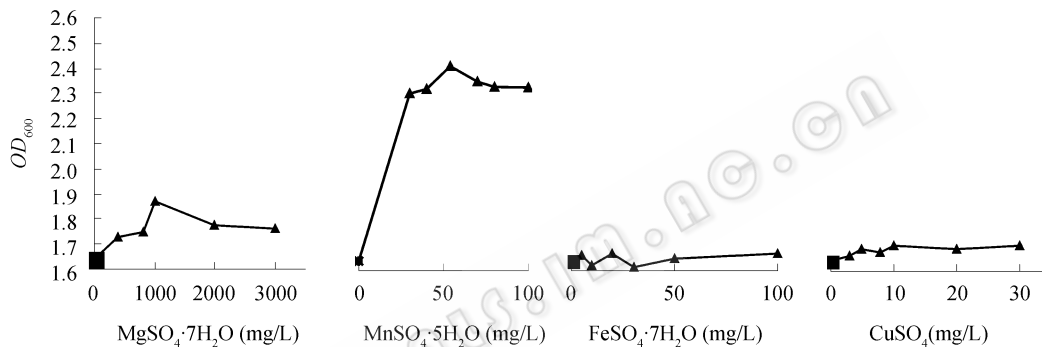


图2 *Lb. Zhang* 在不同微量元素含量的培养基中的菌体密度

Fig. 2 Cell density of *Lb. Zhang* in medium of different microelement content

锰离子以提高乳糖的利用率和乳酸产量^[12]。从本试验结果看培养基中添加锰离子对 *Lb. Zhang* 的生长促进作用尤为突出, 可以使菌体密度较对照(图2中离子添加量为0的点)培养基提高50%, 锰离子最适添加量为54 mg/L。

培养基中补充适当的镁离子和铜离子对 *Lb. Zhang* 的生长也有一定促进作用($P < 0.05$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CuSO_4$ 的最适添加量分别为1000 mg/L和10 mg/L。培养基中添加铁离子对 *Lb. Zhang* 的生长没有显著影响。

2.5 其它增殖因子

乳酸菌的营养需求复杂, 除碳源氮源等营养物质之外, 有报道某些氨基酸和维生素对其生长也很重要, IK-KEUN 等报道培养基中补充适量的B族维生素能够促进 *Lactobacillus casei* 的生长和提高乳酸产量^[13, 14]。因此对补充维生素和氨基酸的效果进行

了研究, 在上述确定的培养基各组分基础上分别补充了不同含量的B族维生素(包括VB1、VB2、VB6、烟酸、泛酸)、维生素C、氨基酸(包括谷氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、组氨酸、精氨酸、酪氨酸)和L-半胱氨酸盐酸盐, 接种发酵观察菌体生长情况, 结果与对照组(未添加上述营养物质)相比各试验组 *Lb. Zhang* 的生长情况均未得到改善(试验数据略)。这说明已确定培养基中维生素和氨基酸的含量已足够满足菌体的生长需求, 无需另外补充。

2.6 培养基组成的优化

采用 Design Expert 软件的中心点设计(Central Composite Design)三因素二次正交旋转设计对上述选定的培养基主要营养成分碳源、氮源和缓冲盐含量进行优化, 以菌体干重为响应值。具体因素水平情况和试验结果见表4。

表 4 三因素二次正交旋转回归设计及试验结果
Table 4 Three factors twice rotation perpendicular regressive design and result

试验号 Index	因素和水平 Factors and levels			干重 Dry weight (g/L)	
	X ₁ 碳源 (g/L) X ₁ Carbon	X ₂ 氮源 (g/L) X ₂ Nitrogen	X ₃ 缓冲盐 (g/L) X ₃ Buffer salts	实际值 Actual value	预测值 Predictive value
1	-1(8)	1(22)	-1(7)	1.611	1.552
2	0(15)	-1.682(3.2)	0(14)	0.491	0.544
3	1(22)	1(22)	-1(7)	1.982	1.932
4	0(15)	0(15)	0(14)	2.276	2.300
5	-1(8)	1(22)	1(21)	1.347	1.300
6	0(15)	0(15)	0(14)	2.286	2.300
7	0(15)	1.682(26.8)	0(14)	2.461	2.529
8	1.682(26.8)	0(15)	0(14)	2.312	2.383
9	0(15)	0(15)	0(14)	2.320	2.300
10	0(15)	0(15)	0(14)	2.190	2.300
11	1(22)	1(22)	1(21)	2.770	2.720
12	0(15)	0(15)	0(14)	2.480	2.300
13	1(22)	-1(8)	1(21)	1.963	1.894
14	0(15)	0(15)	-1.682(22)	1.630	1.692
15	0(15)	0(15)	0(14)	2.295	2.300
16	0(15)	0(15)	1.682(25.8)	2.359	2.432
17	-1(8)	-1(8)	-1(7)	1.322	1.258
18	-1(8)	-1(8)	1(21)	1.646	1.594
19	-1.682(3.2)	0(15)	0(14)	0.728	0.802
20	1(22)	-1(8)	1(7)	1.387	1.318

注: 碳源为葡萄糖; 氮源为酵母粉和大豆蛋白胨 1:1 比例混合氮源; 缓冲盐为柠檬酸钠、醋酸钠和磷酸二氢钾以 4:25:6 比例混合物
Note: The carbon source is glucose, the nitrogen source is mixture of soy peptone and yeast extract (1:1), and the buffer salt is mixture of citrate sodium, sodium acetate and potassium dihydrogen phosphate (4:25:6)

通过 Design Expert 软件对表 4 数据进行多项回归分析, 获得 *Lb. Zhang* 菌体干重对碳源 x_1 , 氮源 x_2 , 缓冲盐 x_3 的多项回归方程为:

$$Y = 2.30 + 0.47x_1 + 0.59x_2 + 0.22x_3 + 0.18x_1x_2 + 0.16x_1x_3 - 0.047x_2x_3 - 0.25x_1^2 - 0.27x_2^2 - 0.084x_3^2 + 0.100x_1x_2x_3 - 0.41x_1^2x_2 - 0.039x_1^2x_3 - 0.20x_1x_2^2$$

式中 Y 为菌体干重预测值(g/L), x_1 、 x_2 、 x_3 分别为碳源、氮源和缓冲盐对应的编码值。方差分析表明该模型极显著 ($P = 0.0002$), 失拟项不显著 ($P = 0.0600$)。模型确定系数 $R^2 = 0.9859$, 校正系数 $\text{adj}R^2 = 0.9554$, 表明模型与实际情况拟合较好。因此该模型可用于预测菌株 *Lb. Zhang* 的实际生长情况。碳源、氮源、缓冲盐交互作用对菌体干重的影响变化趋势由图 3 可以见。

求解方程极值得到预测最优培养基配方为: 碳源 $X_1 = 20.9$ g/L, 氮源 $X_2 = 20.9$ g/L, 缓冲盐 $X_3 = 20.5$ g/L, 预测最大菌体干重为 2.84 g/L。将 *Lb.*

Zhang 接种于模型预测最优化培养基中, 经 37 18 h 培养后实际测得菌体干重 2.73 g/L, 与模型预测值拟合率达 96.1%。活菌数 4.78×10^9 CFU/mL, 比在 MRS 培养基中培养活菌数 (4.8×10^8 CFU/mL) 提高了近 10 倍。

3 结论

经试验确定 *Lb. Zhang* 最适培养基为: 葡萄糖 20.9 g/L, 大豆蛋白胨 10.45 g/L, 酵母粉 10.45 g/L, K_2HPO_4 3.51 g/L, NaAc 14.64 g/L, 柠檬酸钠 2.34 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 54 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 mg/L, 吐温 80 1 g/L。 *Lb. Zhang* 在增殖培养基中经 37 18 h 培养活菌数可达到 4.78×10^9 CFU/mL, 是 MRS 培养基中培养菌数的 10 倍左右。可以作为 *Lb. Zhang* 的高密度发酵技术研究的基础培养基用于进一步研究。

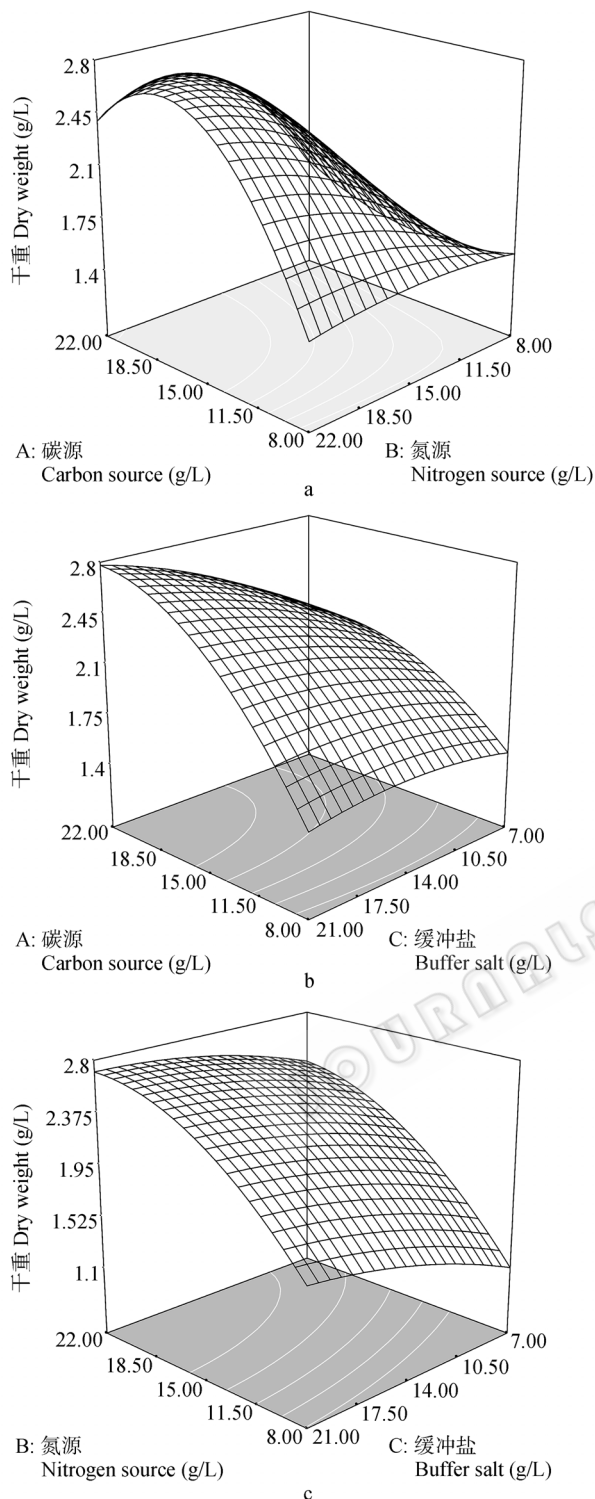


图3 碳源、氮源和缓冲盐交互影响菌体干重的响应曲面图

Fig. 3 The response surface of reciprocal effect to cell dry weight by carbon source, nitrogen source and buffer salts

注 : a: 缓冲盐 = 14 g/L, 碳源-氮源交互作用; b: 氮源 = 15 g/L, 碳源-缓冲盐交互作用; c: 碳源 = 15 g/L, 氮源-缓冲盐交互作用

Note: a: Buffer salt=14 g/L, the interaction of carbon and nitrogen source; b: Nitrogen source=15 g/L, the interaction of carbon source and buffer salt; c: Carbon source =15 g/L, the interaction of nitrogen source and buffer salt

参考文献

- [1] Guarmer F, Schaafsma GJ. Probiotics. *J Food microbial*, 1998, **39**(4): 237-238.
- [2] SHAN NP. Probiotic bacteria : selective enumeration and survival in dairy foods. *Jounry of Dairy Sci*, 2000, **83**(7): 894-907.
- [3] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *Lb. casei* Zhang 和 ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析. *中国乳品工业*, 2005, **33**(6): 4-9.
- [4] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 分离自内蒙古传统发酵酸马奶中 *L. casei* Zhang 潜在益生特性的研究. *中国乳品工业*, 2006, **34**(4): 6-11.
- [5] 张和平, 张七斤, 孟和毕力格, 等. *L. casei* Zhang 对小鼠 T 淋巴细胞亚群及血清 IgG 和肠粘膜 SIgA 的影响. *中国乳品工业*, 2006, **34**(10): 4-8.
- [6] 托娅, 苏雅勒玛, 张和平. 乳杆菌 *Lb. casei*. Zhang 对小鼠血清中细胞因子水平的影响. *食品科学*, 2006, **27**(11): 488-491.
- [7] 云月英, 王立平, 张和平, 等. 喂饲 *Lactobacillus casei* Zhang 对大鼠体内脂质代谢的影响. *微生物学通报*, 2006, **33**(3): 60-64.
- [8] Lee YL, Chang HN. High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, **36**(5): 330-337.
- [9] 曹军卫, 马辉文. *微生物工程*. 北京: 科学出版社, 2002, pp.80-88.
- [10] 李寅, 高海军, 陈坚. *高细胞密度发酵技术*. 北京: 化学工业出版社, 2006, pp. 50-51.
- [11] John JF, Malte A, Shara S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. *Process Biochemistry*, 2001, **36**(6): 671-675.
- [12] Senthuran A, Senthuran V, Mattiasson B, et al. Lactic acid fermentation in recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **55**(10): 841-853.
- [13] IK-KEUN Y, Chang HN, Lee EG, et al. Effect of B Vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **84**(3): 172-175.
- [14] Kurmann JA. Starters for fermented milks. *Bulletin of the IDF*, **227**(2): 41-52.