

优化益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 高密度培养条件

李 妍 赵文静 高鹏飞 张和平* 陈永福

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

摘 要: 为实现 *L. casei* Zhang 的高密度培养, 在之前优化增殖培养基的基础上进一步寻求适宜该菌的培养条件。研究了不同中和剂、缓冲盐浓度、葡萄糖浓度、pH 值控制、通气条件和补料分批培养对菌体在恒 pH 条件下发酵的影响, 根据不同条件下菌体的比生长速率、菌体密度和活菌数情况, 确定 *L. casei* Zhang 较适宜的高密度培养条件为: 培养基葡萄糖浓度为 80 g/L~100 g/L, 以氨水为中和剂使 pH 保持 5.9, 采用间歇通氮气的方法保持环境厌氧, 分批培养方式下 37°C 保温发酵 10 h~12 h 后, *L. casei* Zhang 细胞干重达到 7 g/L, 活菌数 3.5×10^{10} CFU/mL, 比优化前提高 7 倍以上, 能够满足益生菌制品生产要求的高菌体密度。

关键词: *L. casei* Zhang, 高密度培养, 发酵条件

Optimization of Cultural Conditions of Probiotic Bacteria *Lactobacillus casei* Zhang for High Cell Density Cultivation

LI Yan ZHAO Wen-Jing GAO Peng-Fei ZHANG He-Ping* CHEN Yong-Fu

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

Abstract: To get high cell density, pH-stat fermentations of *L. casei* Zhang were carried out in the medium optimized previously under different cultural conditions. The influences of neutralizing agents, the concentration of buffer salts and glucose in the medium, pH, aeration and fed batch fermentation on the growth of *L. casei* Zhang were investigated. Based on the values of maximum specific growth rate, biomass and viable cells count in different cultural conditions, the optimal growth condition was regarded as follows: Glucose level of the medium was 80 g/L ~100 g/L; The pH was kept constant at 5.9 with aqua ammonia and anaerobic condition was kept by sparged with nitrogen periodically; The temperature was set at 37°C and cultured for 10 h ~12 h. The biomass and viable cells' number of *L. casei* Zhang under this culture conditions were 7 g/L and 3.5×10^{10} CFU/mL respectively, and were 7 times as high as that before optimized, which can meet the requirements of probiotics.

Keywords: *L. casei* Zhang, High cell density culture, Cultural condition

基金项目: 国家“863 计划”项目资助(No. 2006AA10Z345)

* 通讯作者: Tel: 86-471-4319940; 信箱: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2008-06-30; 接受日期: 2008-09-23

乳酸菌是重要的工业菌种,广泛应用于食品、化工和医药领域。无论何种应用都是建立在高的乳酸菌细胞浓度和活性的基础之上的,因此对于如何获得高浓度高活力的乳酸菌发酵制品的研究从没有间断过。

高密度培养(High-cell-density cultivation, HCDC)是指应用一定的技术和装置提高菌体的发酵密度,使其较常规培养的菌体密度有显著提高。其核心在于提供菌体生长所需最佳条件,同时使限制菌体生长的因素最小化^[1]。目前国外对乳酸菌高密度培养研究通常采用专门设计的生物发酵器,采用膜技术与发酵罐耦联,不断过滤除去乳酸,截留菌体返回发酵罐实现菌体细胞循环培养,最高菌体密度可高达 10^{11} CFU/mL^[2],此方法需耗费大量培养基,且仅限于实验室水平,很难扩大到生产应用规模。因此不适于推广使用。国内仍主要采用培养基成分的优化基础上的分批培养方式,此方法简单,容易实现规模放大,但所得到的菌体密度不高,通常在 10^9 CFU/mL^[2-4]。

Lactobacillus casei 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 *L. casei* ATCC334 的同源性为 100%^[5]。该菌具有良好的耐酸性、人工胃肠液耐受性及胆盐耐受性^[6],动物实验表明该菌在免疫系统调节,降血脂,抗肿瘤等方面都有效果^[7-9]。前期对 *L. casei* Zhang 增殖培养基优化已取得初步成效,在优化培养基中菌体密度可达 4.8×10^9 CFU/mL^[10],本研究在其基础上采用 pH-stat 培养和补料分批培养进一步对可能影响该菌生长的各种条件进行优化,以建立适宜此菌株的高密度培养条件,为该菌在益生菌发酵剂或益生菌制剂中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

L. casei 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种库保藏。

1.2 优化培养基

培养基成分:葡萄糖(一水合)根据实验情况在 20 g/L~100 g/L 之间,如无特殊说明则为 20 g/L;酵母粉 10.4 g/L;大豆蛋白胨 10.4 g/L;缓冲盐(buffer)

包括 K_2HPO_4 3.6 g/L、乙酸钠 15 g/L 和柠檬酸钠 2.4 g/L;微量元素包括 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 54 mg/L;吐温 80 1.0 g/L。其中缓冲盐浓度计为“1×buffer”。葡萄糖购自山东保龄宝集团,酵母粉和大豆蛋白胨购自厦门鑫隆达化学试剂公司,其余购自天津风船化学试剂厂。

1.3 菌株的保存与活化

L. casei 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,活化两代备用。

1.4 接种与发酵

5 L 发酵罐(上海高机生物工程公司,中国丽 biof-2000m),有效工作发酵液体积 3 L。将活化好的菌种按 2%(V/V)接种于优化培养基中,37℃ 预培养 10 h 后按 7%(V/V)接种于发酵罐中,通过自动流加中和剂的方法控制发酵过程中发酵液 pH 恒定,搅拌速度控制在 200 r/min~300 r/min,在控制的条件下培养,每 2 h 取样检测菌体生长和代谢情况直至发酵结束。

1.5 不同发酵条件的优化

在 1.4 发酵工艺基础上,依次采用不同中和剂、不同缓冲盐浓度、不同 pH、不同底物(葡萄糖)浓度和不同通气条件进行发酵试验,根据不同发酵条件下的最大比生长速率(μ_{max}),菌体密度(以细胞干重计,DCW)和活菌数情况,确定 *L. casei* Zhang 适宜发酵条件。

根据 logistic equation 生长动力学模型^[11]推算 μ_{max} 如下:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \cdot C_x \left(1 - \frac{C_x}{C_M}\right) \quad (1)$$

其中: C_x —菌体密度,以干重计,单位 g/L; μ_{max} —最大比生长速率,单位 h^{-1} ; $C_{x,max}$ —最大菌体密度; t —发酵时间,单位 h。对式(1)积分并转化为线性方程得:

$$\mu_{max} \cdot t = \ln\left(\frac{C_M}{C_0} - 1\right) + \ln\left(\frac{C_x}{C_M - C_x}\right)$$

由实验数据以 $\ln[C_x / (C_M - C_x)]$ 对时间 t 作图,得到斜率为 μ_{max} 。

1.6 补料分批培养

在发酵罐中 2 L 培养基(葡萄糖 30 g/L)基础上发酵至对数生长期(6 h)时开始分别以 100 mL/h 和 200 mL/h 的速度流加新鲜培养基(葡萄糖含量

250 g/L, 其余成分同优化培养基), 直至发酵液菌体密度不再增加为止。监控发酵过程中菌体密度和活菌数的变化, 与分批培养比较分析, 确定适合的培养方式。

1.7 统计分析

每组试验至少重复两次, 结果采用 SAS 软件 ANOVA 程序统计分析。

2 结果

2.1 不同发酵条件的优化

2.1.1 中和剂的选择: 本研究采用 4 种不同碱液 (6 mol/L NaOH, 6 mol/L KOH, 25% 氨水和 30% Na_2CO_3) 做中和剂进行发酵。结果见图 1, 不同中和剂对于 *L. casei* Zhang 的生长影响不一, 以氨水的效果最好, 菌体发酵的 μ_{\max} 、菌体密度和活菌数都高于用其他三种中和剂的发酵效果; Na_2CO_3 的效果稍逊于氨水, 但两者统计学差异不显著 ($P < 0.05$), NaOH 溶液的效果最差。后续实验采用氨水作为中和剂。

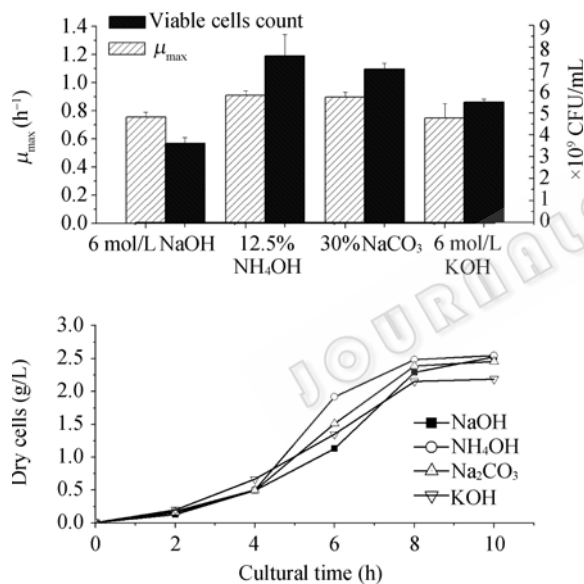


图 1 不同中和剂对生长的影响

Fig. 1 The influence of different neutralizing agent on the growth of *L. casei* Zhang

2.1.2 培养基缓冲盐含量优化: 原优化培养基中缓冲盐用量记为“1buffer”, 减少培养基中缓冲盐用量至一半(0.5×buffer)和 1/4(0.25×buffer)及不添加缓冲盐(0×buffer)进行发酵, 结果见图 2, 减少或不加缓冲盐的培养基发酵效果不及原培养基的发酵效果好。虽然添加不同浓度缓冲盐的发酵液最终菌体密度(dry cells)相差不大, 但 μ_{\max} 和活菌数却存在显著

差异 ($P < 0.05$)。随着缓冲盐添加量的减少, μ_{\max} 和活菌数都随之降低。

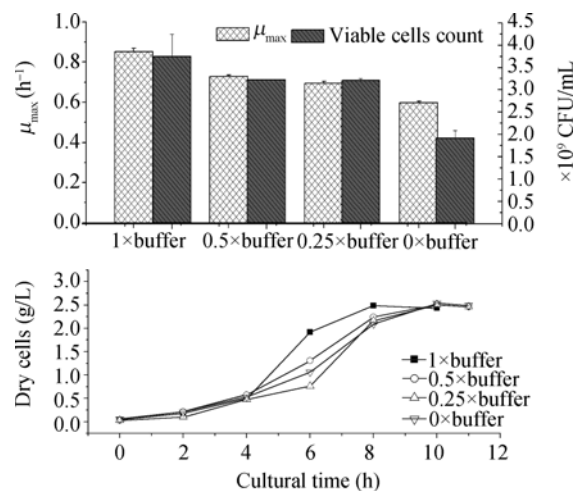


图 2 不同缓冲盐浓度对于 *L. casei* Zhang 生长的影响

Fig. 2 The influence of different concentrations of buffer salts on the growth of *L. casei* Zhang

2.1.3 不同 pH 条件对发酵的影响: 本试验研究了 *L. casei* Zhang 在 pH 5.3~pH 6.8 范围内的生长情况, 根据图 3 所示, 活菌数在 pH 5.6~pH 6.5 的范围内变化不大, 但高于或低于此 pH 范围后活菌数显著降低 ($P < 0.05$), μ_{\max} 在 pH 5.9 时达到最高, 高于或低于此 pH 值, 生长速率呈显著降低 ($P < 0.05$)。

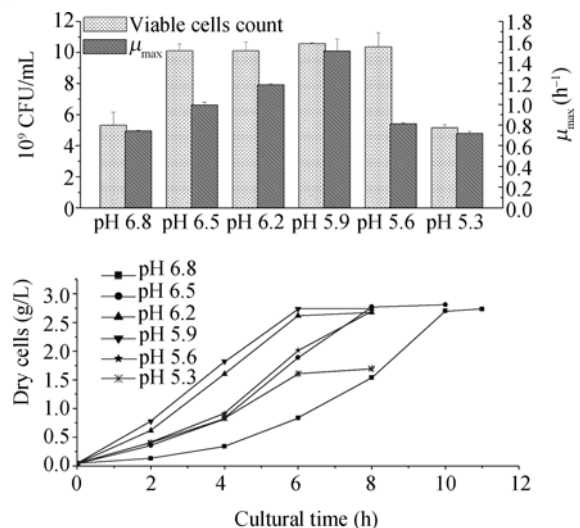


图 3 不同 pH 条件下 *L. casei* Zhang 的生长情况

Fig. 3 The influence of different pH on the growth of *L. casei* Zhang

2.1.4 不同碳源浓度下 *L. casei* Zhang 的生长: 在 pH 5.9-stat 条件下, 对于培养基中葡萄糖的浓度进一步研究, 从图 4 可以看出, 葡萄糖浓度由 20 g/L

提高至 100 g/L 过程中, 菌体密度和活菌数随葡萄糖浓度提高而提高, 最高达到 3.5×10^{10} CFU/mL, 再提高葡萄糖浓度至更高时, 菌体密度不再增加, 在 150 g/L 葡萄糖浓度培养时菌体死亡增加, 活菌数显著下降。 μ_{\max} 随着葡萄糖浓度增加而显著降低 ($P < 0.05$), 高浓度葡萄糖对菌体的生长有一定抑制作用, 但在葡萄糖浓度 50 g/L~100 g/L 的范围内 μ_{\max} 变化不大。

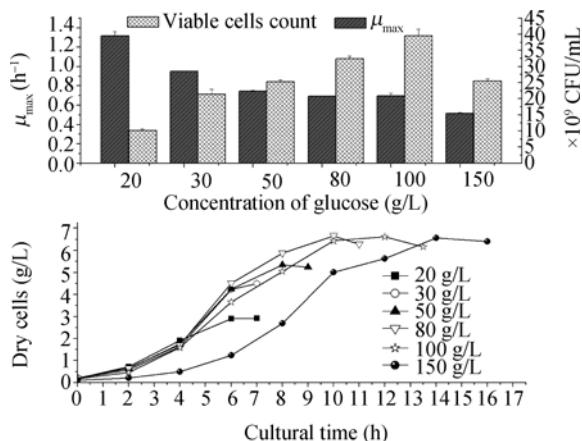


图 4 不同葡萄糖浓度下 *L. casei* Zhang 的生长情况

Fig. 4 The influence of different glucose concentrations on the growth of *L. casei* Zhang

2.1.5 不同通气条件的影响: 从图 5 可见, 不同通气条件对于 *L. casei* Zhang 的生长存在一定影响。总体上厌氧条件培养效果略优于通气培养。但采用不同的通气方式进行的厌氧发酵, 效果不同, 间歇通氮气条件下发酵得到的菌体密度、活菌数和比生长

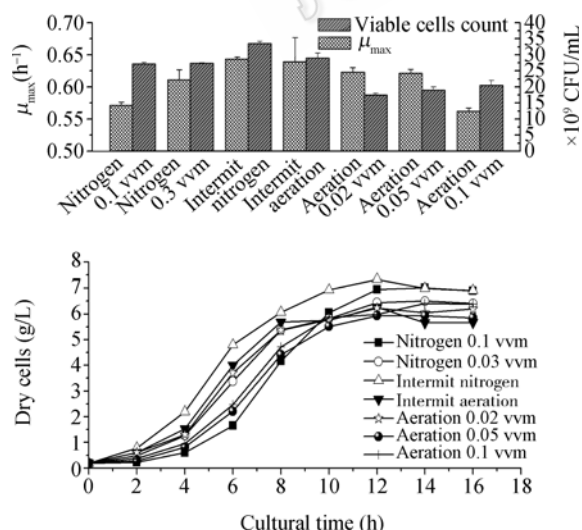


图 5 不同通气条件下 *L. casei* Zhang 的生长情况

Fig. 5 The influence of different aeration on the growth of *L. casei* Zhang

速率高于连续通氮气发酵。间歇通空气(微通氧状态)下发酵效果略逊于间歇氮气, 优于连续通氮气的效果, 其他通气条件发酵效果不佳。

2.2 培养方式

在发酵 6 h 时开始向发酵液中流加新鲜培养基, 实现补料分批培养, 从图 6 中可以看出, 以 100 mL/h 速度补料, 发酵至 12 h 和 14 h 时活菌数和菌体密度相继达到最大, 继续培养则活菌数和菌体密度开始下降。100 mL/h 补料分批发酵与分批培养(培养基葡萄糖浓度 80 g/L)的发酵效果无显著差异 ($P < 0.05$)。当补料速度增加至 200 mL/h 时, 发酵在 8 h 就达到峰值, 继续补料出现了稀释效应, 菌体密度和活菌数下降。

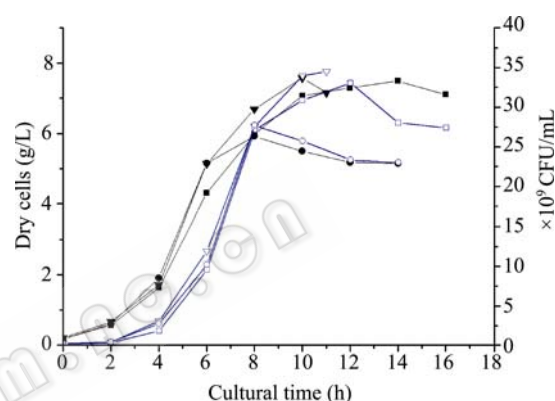


图 6 补料分批培养与分批培养菌体密度和活菌数变化

Fig. 6 Time-course of biomass and viable cells' count in fed-batch and batch fermentation

注: \square 、 \square : 100 mL/h 补料分批培养的细胞干重、活菌数; \bullet 、 \circ : 200 mL/h 补料分批培养的细胞干重、活菌数; \blacktriangle 、 \triangle : 分批培养(培养基葡萄糖浓度 80 g/L)的细胞干重、活菌数变化。

Note: The dry cells weight and viable cells counts of fed-batch culture with feed rate 100 mL/h were shown as \square and \square respectively; And these of fed-batch culture with feed rate 200 mL/h were shown as \bullet and \circ ; The dry cells weigh and viable cells counts of batch culture were shown as \blacktriangle and \triangle .

3 讨论

3.1 发酵条件的优化

NaOH、KOH 和氨水是 pH-stat 发酵工艺中最常使用的中和剂, 但不同中和剂对于菌株发酵的影响罕有报道。中和剂对发酵的影响与菌株和所用的培养基成分都有一定关系, 本研究中以氨水的效果最好。

培养基中添加缓冲盐主要是为了缓解发酵过程中产酸导致培养基 pH 降低而对菌体生长产生的抑制作用^[1]。PH-stat 发酵中通过流加中和剂使 pH 保持恒定, 不再依赖于培养基自身的缓冲作用, 同时

过多的盐含量可能因为高的渗透压而对菌体生长不利, 因此考虑减少培养基中缓冲盐的用量, 然而实验结果出乎意料, 减少缓冲盐的培养基发酵效果不及原培养基的发酵效果好(见图 2), 这说明培养基中的盐分除了缓解 pH 变化外可能还对菌体有其他作用, 不能随意减少用量。

许多报道乳杆菌在微酸性环境中生长更好, 大多数情况下最大比生长速率通常在 pH 5.5~6.0^[12-14]。本试验也证实了这一点, *L. casei* Zhang 在 pH 5.9 发酵时 μ_{\max} 和活菌数均达到最大, 过酸和过碱性都对其生长速率和存活产生一定抑制。

碳源是菌体生长的主要能源物质, 前期优化培养基葡萄糖浓度是在不控制 pH、通气条件等静态培养下确定的^[11], 未必能满足在 pH-stat 条件下菌体生长所需, 故在此研究过程中进一步研究以确定适宜的葡萄糖浓度, 同时考察高浓度葡萄糖是否对 *L. casei* Zhang 菌体生长有抑制。结果(图 4)表明一定范围内葡萄糖是 *L. casei* Zhang 生长的主要限制性营养物质, 菌体密度随着葡萄糖浓度增加而增加, 葡萄糖浓度 100 g/L 时菌体密度最高。另一方面增加的葡萄糖浓度对菌体一定抑制作用, 随葡萄糖浓度增加菌体生长速率降低, 但在葡萄糖浓度 50 g/L~100 g/L 的范围内 μ_{\max} 变化不大。综合葡萄糖的营养限制和生长抑制, 其浓度 80 g/L~100 g/L 较适宜, 过低不能满足高密度菌体生长的营养需求, 过高则对菌体生长和存活抑制作用严重。

乳酸菌高密度发酵大多在厌氧条件下进行, 但 Schiraldi 等人研究中发现微通气状态有利于 *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 的生长^[15]。因此本研究探讨了厌氧和有氧条件对于 *L. casei* Zhang 的发酵的影响, 结果表明厌氧和微通氧(间歇通空气)条件下菌体生长效果都较好, 微通氧条件略逊于间歇通氮气培养的效果(见图 5), 优于连续通氮气进行的厌氧培养。过量的氮气似乎对 *L. casei* Zhang 的生长不利, 随着通氮气量的增加, 生长速率下降, 这在后续中试过程中也得到证实(未发表数据)。因此选择间歇通氮气的方式进行 *L. casei* Zhang 的高密度发酵。

3.2 培养方式

补料分批培养通过两方面作用来促进菌体生长, 一方面是营养成分流加可以减少培养基中某些营养成分过浓产生底物抑制效应, 另一方面是流加的培养液对发酵液有一定的稀释作用, 从而减少某些产

物对菌体生长的抑制^[1]。然而对于 *L. casei* Zhang 而言, 补料(100 mL/h)分批培养与分批培养效果无明显差异, 100 mL/h 的补料速度并不足以稀释代谢产生的乳酸而起到促进生长的作用(见图 6), 而增大补料速度至 200 mL/h 时, 菌体增殖速度小于补料的稀释速度, 开始出现稀释效应。因此分批培养方式更合适 *L. casei* Zhang 的高密度培养。

3.3 结论

(1)在 *L. casei* Zhang 发酵过程中, 中和剂的选择、缓冲盐浓度、底物(葡萄糖)浓度、pH 值控制和通气条件对菌体生长均有不同程度的影响;

(2)简单易行的分批培养方式比补料分批培养更适用于 *L. casei* Zhang 的高密度培养;

(3)通过对影响 *L. casei* Zhang 生长各因素的优化, 确定其高密度培养条件为: 在前期优化培养基基础上, 葡萄糖浓度调整为 80 g/L~100 g/L, 发酵过程中流加氨水中和发酵产生的乳酸, 使 pH 保持在偏酸性(pH 5.9), 通过间歇通氮气(每 2 h 通气 2 min)的方法保持环境厌氧, 分批培养方式下 37°C 保温发酵 10 h~12 h, 菌体密度比优化前(4.8×10^9 CFU/mL)提高 7 倍以上, 细胞干重达到 7 g/L, 活菌数 3.5×10^{10} CFU/mL。能够满足益生菌制品生产所要求的高菌体密度。

参 考 文 献

- [1] 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.3-12.
- [2] Hayakawa K, Sansawa H, Nagamune T, et al. High density culture of *Lactobacillus casei* by a cross-flow culture method based on kinetic properties of the microorganism. *J Ferment Bioeng*, 1990, **70**(6): 404-408.
- [3] 黄良昌, 吕晓玲, 姚秀玲, 等. 保加利亚乳杆菌浓缩培养的研究. 中国乳品工业, 2002, **30**(1): 12-15.
- [4] 靳志强, 郝 林, 李平兰, 等. 德氏乳杆菌保加利亚亚种高密度培养的研究初探. 现代食品科技, 2006, **22**(2): 4-8.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 张和平, 张七斤, 孟和毕力格, 等. *L. casei* Zhang 对小

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

- 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.
- [8] 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.
- [9] 托娅, 张和平. 一株分离自内蒙古传统酸马奶中的乳酸杆菌 *L. casei* Zhang 对小鼠免疫功能的影响. 中外医疗, 2008, 27: 39-42.
- [10] 高鹏飞, 李妍, 赵文静, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养基的优化. 微生物学通报, 2008, 35(4): 623-628.
- [11] 顾瑞霞, 刘爱萍, 骆承庠. 唾液链球菌嗜热亚种 LCX2001 胞外多糖分批发酵动力学. 微生物学通报, 2001, 28(4): 35-39.
- [12] Giraud, E, Lelong B, Raimhault M. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 36: 96-99.
- [13] Roy D, Le Duy A, Goulet J. Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Canadian J Chem Eng*, 1987, 65: 597-603.
- [14] Norton S, Lacroix C, Vuilleumard JC. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 457-466.
- [15] Schiraldi C, Adduci V, Valli V, et al. High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production. *Bio-technol Bioeng*, 2003, 82(2): 213-222.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“精品教学”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!