



酪酸梭状芽孢杆菌发酵培养基的优化

戚 薇, 何玉慧, 李安东, 王海宽

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 验证了高层半固体琼脂试管法比固体琼脂平板法更具有良好的厌氧性能,能准确地对酪酸梭状芽孢杆菌进行活菌计数. 通过对发酵培养基中不同碳源、氮源、生长因子进行单因素研究, $L_9(3^3)$ 正交实验进一步优化得到最佳培养基组成为 (g/L): 胰蛋白胨 10, 葡萄糖 8, 酵母膏 4. 用此培养基在 37 °C 培养 24 h, 活菌数可达 $4.1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 培养基中添加 K_2HPO_4 5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 CaCO_3 1 g/L 培养 32 h 时, 酪酸梭状芽孢杆菌芽孢转化率可达 95%.

关键词: 酪酸梭状芽孢杆菌; 高层半固体琼脂; 饲料添加剂; 培养基优化

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)02-0018-04

Optimization of Fermentation Medium for *Clostridium butyricum*

QI Wei, HE Yu-hui, LI An-dong, WANG Hai-kuan

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The high layer semi-solid agar tube method has been studied firstly, which shows that it is more anaerobic and accurate than the traditional plate method in counting live bacterium. The optimal fermentation medium for *Clostridium butyricum* were obtained by the single factor test and the orthogonal test of carbon source, nitrogen source and growth factors design, with the composition of tryptone 10 g/L, glucose 8 g/L and yeast extract 4 g/L. After incubating at this condition for 24 h, the number of viable cells could get to $4.1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. To increase the spore forming rate, some inorganic elements and microelements should be added into the fermentation medium. The results indicated when there were K_2HPO_4 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L and CaCO_3 1 g/L in the medium, the highest spore forming rate reached 95% after fermentation for 32 h.

Keywords: *Clostridium butyricum*; high layer semi-solid agar; feed additives; medium optimization

酪酸梭状芽孢杆菌 (*Clostridium butyricum*), 又名丁酸梭状芽孢杆菌和宫入菌^[1]. 人们研究酪酸梭状芽孢杆菌有 130 多年的历史, 现在被越来越多地研制成饲料添加剂和兽药等^[2]. 酪酸梭状芽孢杆菌在肠道产淀粉酶、蛋白酶、维生素 K 和氨基酸等多种酶类和营养物质, 这些活性酶对动物的营养物质的吸收和利用有促进作用, 并且可以提高动物的生产性能^[3-4]. 酪酸梭状芽孢杆菌专性厌氧^[5], 有着促进有益菌和抑制有害菌的双重作用, 并纠正肠道菌群失调, 减少肠道疾病的产生, 起到动物防病的作用^[6-7]. 因其良好的特

性, 从而克服了使用抗生素作为普通饲料添加剂带来的副作用. 酪酸梭状芽孢杆菌内生芽孢, 作为饲料添加剂, 避免了在其他益生菌制作和贮存等过程中易受外界各种物化因素影响而失去活性等的问题^[8], 具有广阔的发展前景, 表现出巨大的社会效益和生态效益^[9]. 为此, 本文以提高酪酸梭状芽孢杆菌菌体得率和芽孢转化率为指标, 对活菌计数法进行了选择改进和对发酵培养基各组分进行优化, 降低成本, 获得有效且简易的发酵培养基, 为进一步实现工业化生产提供理论依据.

收稿日期: 2009-06-16; 修回日期: 2009-09-17

基金项目: 天津市农业科技成果转化与推广项目 (0802030)

作者简介: 戚 薇 (1963—), 女, 天津人, 教授; 通信作者: 王海宽, 副教授, haikuanwangcn@yahoo.com.cn.

1 材料与方法

1.1 菌种

酪酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)菌株,天津科技大学微生物菌种保藏管理中心保藏。

1.2 培养基

种子培养基:脑心浸液 37 g/L。

发酵培养基(g/L):胰蛋白胨 20,牛肉浸膏 10,酵母膏 6,葡萄糖 4, K_2HPO_4 2, KH_2PO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4, $CaCl_2$ 0.2, $FeSO_4$ 0.1, 盐酸半胱氨酸 0.5, pH 7.2。

高层半固体琼脂培养基:液体发酵培养基添加 0.3%的琼脂。

固体平板计数培养基:液体发酵培养基加 2%的琼脂。

1.3 培养方法

种子培养:液体试管深层静置培养,37℃厌氧培养 16 h。

发酵培养:5%的接种量加入发酵培养基于 100 mL 平底烧瓶中,37℃厌氧培养 32 h。

1.4 检测方法

1.4.1 活菌数量的测定

高层半固体琼脂试管计数法^[10],用移液管取 1 mL 菌液加到 9 mL 半固体琼脂试管培养基中,振荡搅匀,不要有气泡,依次进行 10 倍梯度稀释,稀释管和计数管于同一管,每个稀释度作 3 个平行,37℃厌氧培养 36 h。

固体琼脂平板计数法:取 1 mL 发酵液加入到 9 mL 灭菌的生理盐水中,依次进行 10 倍梯度稀释,选取 3 个适当的稀释倍数,吸取 1 mL 稀释液注入无菌培养皿中,倾法加入 15 mL 培养基混匀,每个稀释度作 3 个平行。37℃厌氧培养 48 h。

1.4.2 芽孢数量的测定

取菌液 5 mL 于 80℃水浴加热 10 min,杀死营养体细胞,然后进行适当 10 倍梯度稀释,其后操作同活菌计数法。

1.5 数据统计分析

用 SPSS 软件分析所得结果,各组数据均以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。进行方差分析和 *t* 检验。

2 结果与讨论

2.1 不同活菌计数法对实验结果的影响

酪酸梭状芽孢杆菌是严格厌氧细菌,在有氧气的环境下会停止生长。用固体平板培养计数必须具备

严格的厌氧条件,才能确保所测得的数据准确可靠^[11]。因此,创造无氧的环境来进行活菌计数是必要的。根据高层半固体琼脂培养基较好的厌氧性能,且稀释管和计数管于同一管,降低了氧对菌体的毒害,因此用高层半固体试管法与固体平板法进行了比较。高层半固体试管法培养 36 h 和固体平板法培养 48 h 后计生长菌落数,并换算出发酵液中的活菌数,结果见表 1。

表 1 不同活菌计数法实验结果($n=3$)

Tab.1 Results of different methods for counting live bacterium ($n=3$)

组号	活菌数/(10^8 mL ⁻¹)	
	固体平板培养	高层半固体试管培养
1	1.11±0.60 ^a	4.10±0.13 ^b
2	1.45±0.48 ^a	3.93±0.16 ^b
3	1.53±0.41 ^a	4.05±0.15 ^b

注: a、b 不同字母之间的差异 $P=0.05$ 。

由表 1 可知,固体琼脂平板法计数法与高层半固体琼脂试管法有显著差异($P<0.05$)。固体琼脂平板法计数活菌时,每组实验均值较低(最大可达 1.53×10^8 mL⁻¹),且标准差值较大。高层半固体琼脂试管法与之相比,平均值较高(最大可达 4.10×10^8 mL⁻¹),且每组标准差值较小,能够较准确地反映酪酸梭状芽孢杆菌的活菌数。所以,本文采用高层半固体琼脂试管法来测酪酸梭状芽孢杆菌活菌数,既简便快速,又节约了成本和减少菌体在氧气中暴露的时间。

2.2 碳源对活菌数量的影响

以原培养基为基础,分别添加 10 g/L 的葡萄糖、蔗糖和玉米粉等作为碳源,考察不同碳源对酪酸梭状芽孢杆菌活菌数的影响,结果如图 1 所示。

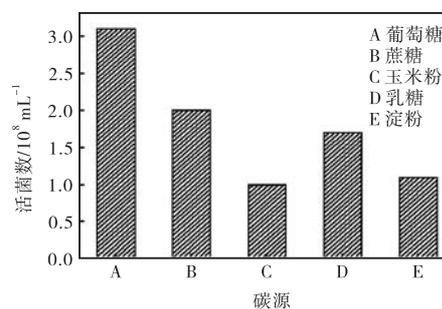


图 1 碳源对活菌数的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on the growth of *Clostridium butyricum*

由图 1 可见,以葡萄糖为碳源时,对菌体生长影响最为明显,最大活菌数可达 3.1×10^8 mL⁻¹,远远高于其他碳源,所以选择葡萄糖作为碳源。

2.3 氮源对活菌数量的影响

根据 2.1 的结果,继续分别添加 20 g/L 的胰蛋白胨、蛋白胨、大豆蛋白胨、酵母膏、牛肉膏以及玉米浆作为氮源,考察氮源对活菌数的影响,结果见图 2.

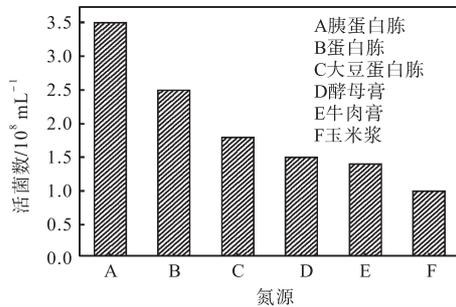


图 2 氮源对活菌数的影响

Fig.2 Effect of nitrogen sources on the growth of *Clostridium butyricum*

由图 2 可知,添加胰蛋白胨时,24 h 活菌数较高,可达 $3.5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$;而添加蛋白胨以及大豆蛋白胨这些氮源时,活菌数较低;玉米浆虽是速效氮源,但不利于菌体生长,活菌数最低,仅为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,所以选择胰蛋白胨作为氮源. 目前研究酪酸梭状芽孢杆菌用的氮源基本是复合氮源,如胰蛋白胨、酵母膏和牛肉膏这 3 种氮源的复合^[12],相应菌体活菌数可达 $5.5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 本研究进行培养基优化,选择胰蛋白胨作为氮源,减少了复合氮源的成分,降低培养基的成本,活菌数可达 $3.5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

2.4 生长因子对活菌数量的影响

在上述确定的条件基础上,以葡萄糖为碳源,胰蛋白胨为氮源,分别选取 0.3%酵母膏、牛肉膏、玉米浆、牛心浸汁和牛脑浸汁进行酪酸梭状芽孢杆菌生长因子的选择实验,结果见图 3.

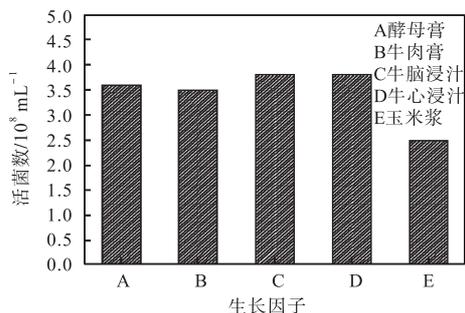


图 3 生长因子对活菌数的影响

Fig.3 Effect of growth factors on the growth of *Clostridium butyricum*

由图 3 可以看出,5 种生长因子的效果基本接近,其中,牛心浸汁和牛脑浸汁对菌体生长效果较好,活菌数为 $3.8 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,但这两种成本较高. 而添加酵母膏时,活菌数为 $3.6 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$. 酵母膏中富含丰

富的氨基酸、维生素等活性因子,有利于菌体生长,而且可以补充菌体发酵中后期的氮源,综合经济成本和发酵考虑,选用酵母膏作为生长因子.

2.5 培养基组成正交实验设计和分析^[13]

在上述碳源、氮源等单因素研究中,确定了最佳碳源、氮源和生长因子,但碳氮比和各成分适合的质量浓度对菌体的生长也有很大的影响. 为进一步研究营养因子间的相关性,选取葡萄糖、酵母膏、胰蛋白胨进行 $L_9(3^3)$ 正交实验,结果见表 2 和表 3.

表 2 正交实验结果

Tab.2 Optimization analysis of orthogonal results

实验号	A 葡萄糖/ (g/L)	B 胰蛋白胨/ (g/L)	C 酵母膏/ (g/L)	活菌数/ (10^8 mL^{-1})
1	6	8	3	2.68
2	6	10	4	2.80
3	6	12	5	3.45
4	8	8	4	3.85
5	8	10	5	4.10
6	8	12	3	3.60
7	10	8	5	2.80
8	10	10	3	3.00
9	10	12	4	1.75
k_1	2.55	2.59	2.81	
k_2	3.43	3.32	2.73	
k_3	2.56	2.63	3.00	
R	0.88	0.73	0.28	

表 3 正交实验方差分析

Tab.3 Variance analysis of orthogonal results

因素	偏差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
葡萄糖	1.526	2	0.763	5.45	*
胰蛋白胨	1.020	2	0.510	3.64	*
酵母膏	0.124	2	0.620	0.44	
误差	0.28	2			
总和	2.95	8			

注: $F_{0.25}(2,2) = 3$.

极差分析与方差分析结果表明,碳源对活菌数量影响最为显著,其次是氮源,最后是酵母膏. 即胰蛋白胨 10 g/L、葡萄糖 8 g/L、酵母膏 4 g/L. 菌体培养 24 h 活菌数达 $4.1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

2.6 无机盐对芽孢转化率的影响

在前述碳、氮源配比的基础上已经可以获得较高的活菌数. 但对芽孢转化率的影响变化不大. 调整培养基中无机盐及微量元素配比可以提高芽孢转化率^[14-15],例如,可以向培养基中添加 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等,特别是 Mg^{2+} 能够大大提高芽孢的转化率. CaCO_3 还可以中和发酵液里的酸,起到调节 pH 的作用. 故添加 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 CaCO_3 到发酵培养基进行实验,结果见表 4. 由表

4 可知,第 2 组无机盐及微量元素配比最佳,即: 1 g/L 、 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 时培养 32 h,其芽孢转化率 $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 、 CaCO_3 可达 95%。

表 4 添加无机盐培养 32 h 时的活菌数及芽孢转化率

Tab.4 Comparison of cell concentration and spore forming rates for *Clostridium butyricum* cultured 32 h in various inorganic salt concentration

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4
$\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3
$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	5	5	5	5	5	5	5	5	5
$\text{CaCO}_3/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	1	1	1	1	1	1	1	1	1
活菌数/ 10^8 mL^{-1}	3.70	4.20	4.20	3.90	4.00	4.00	3.80	3.90	3.60
芽孢转化率/%	83	95	78	80	71	64	52	50	36

3 结论

通过比较固体琼脂平板法和高层半固体琼脂试管法测定发酵液中的活菌数的准确性,确认高层半固体琼脂试管法有良好的厌氧性能 ($P < 0.05$)。采用高层半固体琼脂试管法进行酪酸梭状芽孢杆菌的活菌计数,在准确反映活菌数的同时,还有明显缩短培养时间,减少培养成本等优点。

通过单因素实验对酪酸梭状芽孢杆菌的发酵培养基中碳源、氮源、生长因子进行研究,确定最佳碳源为葡萄糖,氮源为胰蛋白胨,生长因子为酵母膏。采用正交实验进一步优化,得到合适的配比,即:葡萄糖 8 g/L 、胰蛋白胨 10 g/L 、酵母膏 4 g/L 。此时活菌数可达 $4.1 \times 10^8\text{ mL}^{-1}$ 。

通过调整添加无机盐和微量元素之间的配比,当添加 $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 、 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 、 CaCO_3 1 g/L 时培养 32 h,芽孢转化率可达 95%。最终优化后发酵培养基配方为:葡萄糖 8 g/L 、胰蛋白胨 10 g/L 、酵母膏 4 g/L 、 K_2HPO_4 5 g/L 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 、 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L 、 CaCO_3 1 g/L 。此培养基与其他发酵培养基配方相比,不但保持了同样的活菌数,提高了芽孢转化率,而且简化了培养基,降低了发酵成本。

参考文献:

- [1] Fujita I, Maeda A, Takashik. Studies on the anti-diarrheal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi II 588[J]. Jpn Pharmacol Ther, 1986, 14: 6073-6080.
- [2] 唐宝英,朱晓慧,刘佳. 新一代微生态制剂——酪酸梭状芽孢杆菌的研究和开发前景[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 297.
- [3] Han L K, Lee S C, Lee J H, et al. Studies on the growth promoting effects of probiotics: The effect of *Clostridium butyricum* ID on the permannance and changes in the micro-
- bial flora of the faeces and intestinal of the broiler chickens[J]. Kor J Anim Sci, 1984, 26(2): 158-165.
- [4] 施大林,匡群,孙梅,等. 酪酸梭状芽孢杆菌制剂对肉鸡生产性能的影响[J]. 饲料工业, 2007, 27(21): 46-47.
- [5] Kawasaki S, Nakagawa T, Nishiyama Y, et al. Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus *Clostridium*), and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in *Clostridia*[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(4): 368-372.
- [6] 宋会议,吴天星. 酪酸梭状芽孢杆菌微生态制剂的生物学功能及在饲料中的应用[J]. 饲料工业, 2006, 27(12): 10-11.
- [7] Murayama T, Mita N, Tanaka M. Effects of orally administered *Clostridium butyricum* MIYAIRI588 on mucosal immunity in mice[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1995, 48(3-4): 333-342.
- [8] 黄俊,韩铭海,余晓斌. 一株饲用酪酸梭状芽孢杆菌特性及培养条件的研究[J]. 饲料工业, 2004, 25(2): 22-25.
- [9] 冉雪松,王振华,潘康成. 丁酸梭状芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(4): 37-39.
- [10] 马向前,周德庆. 双歧杆菌和乳酸菌的一种简便快速计数法[J]. 微生物学报, 1997, 37(1): 62-64.
- [11] 朱晓慧,唐宝英,刘佳. 酪酸梭状芽孢杆菌制剂活菌检测方法的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(2): 108-109.
- [12] 匡群,孙梅,施大林. 酪酸梭状芽孢杆菌培养条件的研究[J]. 饲料工业, 2005, 26(10): 36-39.
- [13] 李春喜,王文林. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社, 1998: 186-204.
- [14] 胡尚勤,唐安科. 维生素和矿物质对整肠生菌芽孢形成的影响[J]. 重庆师范学院学报:自然科学版, 2001, 18(2): 15-18.
- [15] 王刚. 酪酸梭状芽孢杆菌培养条件的研究[J]. 饲料研究, 2002(5): 8-12.