

双歧杆菌 22-5 产胞外多糖发酵条件的优化

丁薛龙, 沈 骞, 陈 倩, 尚 楠, 旭日花, 梁志宏*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 在 5L 发酵罐中对双歧杆菌 22-5 产胞外多糖的发酵条件进行研究。针对发酵液 pH 值、培养温度和接种量 3 个主要影响因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对双歧杆菌 22-5 高产胞外多糖条件进行优化, 优化结果为发酵液恒定 pH 值为 7.0, 培养温度为 31℃, 接种量为 3.0%。在此优化条件下, 胞外多糖的产量达到了 5.8g/L, 是优化前的 1.75 倍。

关键词: 双歧杆菌; 胞外多糖; 正交试验

Optimizing Fermentation Conditions for High Productivity of Exopolysaccharide from *Bifidobacterium* 22-5

DING Xue-long, SHEN Qian, CHEN Qian, SHANG Nan, XU Ri-hua, LIANG Zhi-hong*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract : In order to study optimal conditions for high productivity of exopolysaccharide (EPS), fermentation experiments of *Bifidobacterium* 22-5 were conducted through orthogonal design based on three factors: pH of fermentation medium, temperature of fermentation medium and inoculation amount. Results indicated that optimal fermentation conditions for high productivity of EPS from *Bifidobacterium* 22-5 were stable pH at 7.0 for fermentation broth, 31 °C as the fermentation temperature and 3.0% inoculation amount. Under these optimal conditions, the productivity of EPS reached 5.8 g/L with 1.75-fold enhancement.

Key words: *Bifidobacterium*; exopolysaccharide; orthogonal design

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0214-04

双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)是主要存在于人和动物的肠道内的一种厌氧革兰氏阳性菌, 是人体肠道内典型的有益细菌, 对宿主发挥生物屏障、营养、免疫、控制内毒素血症、延缓衰老、抗肿瘤等生理作用^[1]。伴随植物多糖、乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)等研究领域的发展, 越来越多的学者相信, 双歧杆菌属所具有的生理功能与它的 EPS 息息相关。近年的研究表明, 乳酸菌 EPS 具有改善发酵乳的组织状态^[2]、改善菌株对肠道黏膜的吸附^[3]、抗肿瘤^[4]、保护细胞体^[5]、促进免疫系统等功能^[6]。双歧杆菌相比乳酸菌具有更高的安全性, 同时又建立克隆体系实现 EPS 的大量表达, 相比植物多糖具有更简便的提取工艺和更低廉的成本^[7]。

双歧杆菌 EPS 的合成, 除了受到菌的遗传特性影响外, 还会受到环境因素的影响, 包括培养基成分、培养基 pH 值、发酵温度、接种量等, 不同菌种产 EPS 的最优条件有所不同。欧阳清波等^[8]经厌氧瓶培养优化了双歧杆菌 22-5 产 EPS 的培养基成分, 确定了对其影响

较大的发酵温度、培养基 pH 值和接种量 3 个主要因素。在此研究基础上, 本实验在 5L 发酵罐中以双歧杆菌 EPS 为目标产物进行其发酵参数的优化研究, 以期为该 EPS 的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

双歧杆菌 22-5 由中国农业大学食品科学与营养工程学院微生物教研组提供, 分离自广西巴马长寿老人肠道。

1.1.2 培养基

MRS 培养基, 改良 MRS 培养基(实验室配方)。

1.1.3 试剂

95% 乙醇、重蒸酚、浓硫酸、氢氧化钠、盐酸均为化学纯。

1.1.4 仪器与设备

平凡牌 TGL-20M 高速冷冻离心机 长沙平凡仪器仪

收稿日期: 2009-08-26

基金项目: 国家大学生创新性实验计划项目(081001914); 国家“863”计划项目(2008AA10Z324)

作者简介: 丁薛龙(1988—), 男, 本科生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: paul024@163.com

* 通讯作者: 梁志宏(1969—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。E-mail: hongziliang@gmail.com

表有限公司; PHS-25 型酸度计(数显) 上海精密科学仪器有限公司; 752 型紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司; Sartorius BP221S 电子天平 Sartorius 公司; GBCS-5 C 型全自动磁力搅拌玻璃发酵罐 镇江东方生物工程设备技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

将甘油管保存的菌株以 10ml MRS 培养基活化 1 代, 37℃ 培养 18h 后于 4℃ 冰箱保存。以 5.0% 的接种量转接于 MRS 培养基试管活化 2、3 代, 37℃ 培养 18h 后于 4℃ 冰箱冷藏备用。

1.2.2 菌株生长曲线及 EPS 生产曲线的测定

将 3 代菌以 1.0% 接种量接种于厌氧发酵罐中, 培养基为改良 MRS 培养基, 初始 pH7.0, 37℃ 恒温培养, 一定时间间隔测定活菌数、pH 值及 EPS 含量, 绘制菌株生长曲线和 EPS 生产曲线, 并根据曲线确定单因素试验和正交试验的控制点。

1.2.3 恒定发酵液 pH 值对 EPS 产量的影响

选用改良 MRS 培养基, 初始 pH7.0, 接种量为 1.0%, 培养温度为 37℃, 研究从控制点开始, 到产糖平稳为止, 测定恒定发酵液不同 pH 值(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)对 EPS 产量的影响。

1.2.4 发酵温度对 EPS 产量的影响

选用改良 MRS 培养基, 初始 pH7.0, 接种量为 1.0%, 初始培养温度为 37℃, 研究从控制点开始, 到产糖平稳为止, 不同发酵温度(19、25、31、37℃)对 EPS 产量的影响。

1.2.5 接种量对 EPS 产量的影响

选用改良 MRS 培养基, 初始 pH7.0, 培养温度为 37℃, 研究不同接种量(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%)对 EPS 产量的影响。

1.2.6 双歧杆菌 EPS 生产条件优化的正交试验

根据以上单因素多水平试验结果, 以最优结果为因素水平, 选取 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交试验。

1.2.7 发酵液中 EPS 的提取及测定

取 10ml 发酵液, 加入 95% 的乙醇, 在 4℃ 冰箱中放置 48h。将酒精倒掉后加 10ml 水复溶, 置于 4℃ 冰箱备用。

EPS 含量的测定方法采用苯酚-硫酸法^[9]。

2 结果与分析

2.1 菌株生长曲线及 EPS 生产曲线的测定

从图 1 可见, 菌株在 17h 进入对数期, 35h 进入稳定期。EPS 产量随培养时间成增加趋势, 且在衰亡期之

前与活菌数变化保持一致。EPS 产量在菌株进入衰亡期之前的最大值出现在 43h 左右, 略晚于活菌数最大值的出现时间, 说明 EPS 在双歧杆菌生长稳定后有较大产量, 同时证明 EPS 是双歧杆菌的一种次生代谢产物^[10]。菌株进入衰亡期后, 虽然多糖含量有上升, 但是由于菌株的死亡可能造成胞内多糖释放, 不能肯定是否为 EPS。

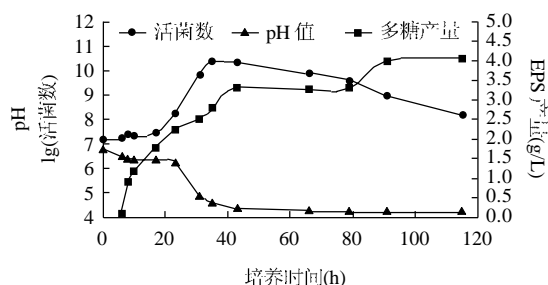


图 1 菌株 22-5 生长曲线及其 EPS 生产曲线

Fig.1 Growth curve of *Bifidobacterium* 22-5 and production curve of EPS

由图 1 还可发现, EPS 产量从 23h 开始迅速增长, 比菌株生长进入对数期的时间要晚, 此时 pH 值约为 6.0, 因此确定培养基由初始的 pH7.0 降到 pH6.0 为实验因素的控制点, 进行单因素控制以及正交试验条件控制。60h 以后至衰亡期前, 多糖产量基本稳定, 因此确定 60h 为实验截止时间。

2.2 恒定发酵液 pH 值对 EPS 产量的影响

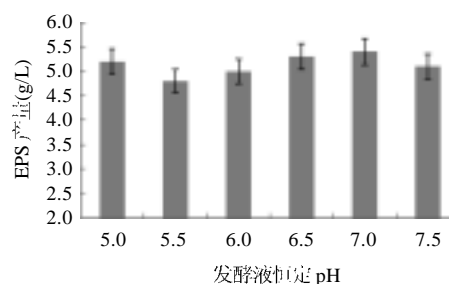


图 2 恒定发酵液 pH 值对 EPS 产量的影响

Fig.2 Effects of fermentation broth pH value on productivity of EPS

由图 2 可见, 在较低的 pH 值条件下(pH < 6.0)EPS 的产量都不高, 而当 pH7.0 时, EPS 的产量达到最大, 继续升高 pH 值并没有使 EPS 产量继续提高。显然, 过高和过低的 pH 值都会抑制菌体的生长, 从而对 EPS 的产量产生影响。

考虑到 pH 值控制的误差, 选取 pH5.0、6.0、7.0 为正交试验的 pH 值。

2.3 发酵温度对 EPS 产量的影响

由图 3 可见, 双歧杆菌 EPS 的产量在温度影响下变化明显。在 19~31℃ 之间, EPS 的产量随着温度的上升

而增长,当温度到达31℃时达到最大。当温度超过31℃时, EPS 的产量明显下降。EPS 生产的最适温度比文献记载的双歧杆菌最适温度37℃略低。EPS 是双歧杆菌的次生代谢产物,在菌株可以生长的条件下,适当的低温可以使细胞壁合成减缓,让更多的磷酸类异戊二烯用于整合多糖重复单元合成EPS^[11],从而增加EPS产量。因此在正交试验中,选择的温度条件为25、31、37℃。

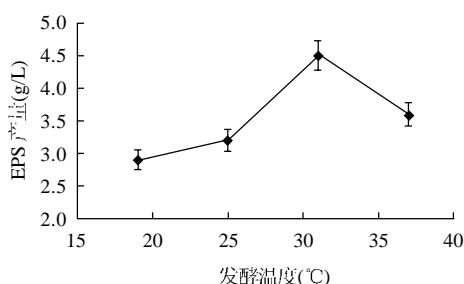


图3 不同培养温度对EPS产量的影响

Fig.3 Effects of fermentation temperature on productivity EPS

2.4 接种量对EPS产量的影响

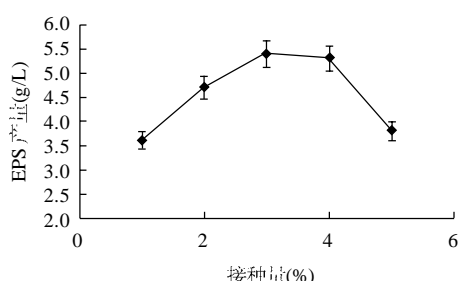


图4 不同接种量对EPS产量的影响

Fig.4 Effect of inoculation amount on productivity of EPS

由图4可知,对于小于3.0%的接种量,由于培养基丰富的营养,菌株充分生长,EPS的产量也随着接种量的增加而明显增加。接种量为3.0%,EPS产量达到最大值,3.0%和4.0%的接种量下EPS产量相差不大。而当接种量大于4.0%时,由于前期菌株疯长而导致的后期产EPS前体物质不足,EPS的产量迅速下降^[12]。因此在正交试验中,选择接种量为2.0%、3.0%、4.0%。

2.5 双歧杆菌EPS生产条件优化的正交试验

根据单因素试验的结果,选取温度、pH值、接种量3个主要影响因素各3个水平,设计L₉(3⁴)正交试验见表1。

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in orthogonal design

水平	因素		
	温度(℃)	pH	接种量(%)
1	37	7.0	2.0
2	31	6.0	3.0
3	25	5.0	4.0

选用改良MRS培养基,初始pH值为7.0,初始培养温度为37℃,根据正交试验设计确定的接种量、发酵液pH值和发酵温度进行试验,测定EPS产量和菌体产量,结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 正交设计试验结果
Table 2 Results of orthogonal test

试验号	因素			误差	EPS产量(g/L)	菌体产量(g/100ml)
	温度	pH	接种量			
1	1	1	1	1	5.2	0.472
2	1	2	2	2	4.7	0.528
3	1	3	3	3	4.2	0.505
4	2	1	2	3	5.8	0.405
5	2	2	3	1	4.5	0.538
6	2	3	1	2	4.7	0.367
7	3	1	3	2	4.6	0.478
8	3	2	1	3	4.3	0.412
9	3	3	2	1	4.5	0.350
K ₁	4.700	5.200	4.733	4.733		
K ₂	5.000	4.500	5.000	4.667		
K ₃	4.467	4.467	4.433	4.767		
K _{1/3}	1.567	1.733	1.578	1.578		
K _{2/3}	1.667	1.500	1.667	1.556		
K _{3/3}	1.489	1.489	1.478	1.589		
R	0.533	0.733	0.567	0.100		

表3 方差分析结果
Table 3 Variance analysis for orthogonal test

误差来源	SS	df	S	F	P
温度	0.4289	2	0.2144	27.5714	< 0.05
pH	1.0289	2	0.5144	66.1429	< 0.05
接种量	0.4822	2	0.2411	31.0000	< 0.05
误差	0.0156	2	0.0078		

注:查F分布表得F_{0.95(2,2)}=19.00, F_{0.99(2,2)}=99.00。

从表3方差分析结果可见,温度、pH值、接种量对于EPS产量均有显著影响($\alpha=0.05$)。从表2可见, R₂ > R₃ > R₁, 因此本次试验的3个因素相对影响顺序为: pH值 > 接种量 > 温度, 由于温度和接种量的R值接近, 可以近似认为二者对EPS产量的影响效果接近。又由max{K₁₁, K₂₁, K₃₁} = K₂₁, max{K₁₂, K₂₂, K₃₂} = K₁₂, max{K₁₃, K₂₃, K₃₃} = K₂₃, 因此, 温度31℃、接种量3.0%、pH 7.0是生产EPS的最优条件组合。

2.6 双歧杆菌菌体产量与EPS产量的相关性

表4 双歧杆菌菌体产量与EPS产量的相关性
Table 4 Correlation between Bifidobacterium productivity and EPS productivity

测定指标	正交试验批次								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
X菌体产量(g/100ml)	0.472	0.528	0.505	0.405	0.538	0.367	0.478	0.412	0.350
Y EPS产量(g/L)	5.2	4.7	4.2	5.8	4.5	4.7	4.6	4.3	4.5

假设菌体产量和EPS产量间无线性关系, 则线性回归的显著性检验简化为检验H₀: b=0

经计算, 回归方程为: $y = -1.33x + 5.32$

且 $r^2 = 0.035$ 有

$$F = (n-2) \frac{r^2}{(1-r^2)} = 0.00123 < F_{0.90(1,7)} = 3.59 (\alpha=0.1)$$

∴ 回归效果不显著。

∴ 原假设成立, 说明双歧杆菌 22-5 菌体产量与 EPS 产量间无线性关系

3 讨论

双歧杆菌在生长过程中会产生乳酸和一些酶类, 这些物质会使培养基 pH 值下降, 从而影响菌体的生长和代谢。因此, 在胞外多糖的生产发酵中, 选择适宜的培养基起始 pH 值并在培养过程中进行适当的 pH 值控制, 有利于提高胞外多糖的产量。本实验利用发酵罐的优势, 将培养基起始 pH 值定为 7.0, 在产糖控制点再调节并恒定发酵液 pH 值, 有利于减少因为初始 pH 值导致菌株无法生长而对 EPS 产量的影响。发酵液 pH 值的优化结果也符合中性偏酸 pH 值适宜 EPS 生产的研究结果。

接种量是直接影响定量培养基中菌株的最初数量和生长速度, 进而影响 EPS 产量的重要因素。实验表明, 过高或过低的接种量都导致 EPS 产量降低, 这可能是因为太小的接种量菌体细胞数量不足, EPS 产量较低; 而当接种量过大时, 前期菌体生长过于迅猛, 菌液浓度过大, 导致后期因营养物质的消耗过度而大大减少了 EPS 前体物质的含量^[12], 也导致了 EPS 的产量下降。

培养温度对 EPS 产量的影响主要体现在对菌株生长的影响上。过高或过低的温度, 会抑制菌株相关酶类的活性, 从而限制 EPS 的生产。在双歧杆菌适宜的生长温度范围内, 较低的温度除了可以使磷酸类异戊二烯更多的用于 EPS 的生产, 还会使活菌数数量缓慢增加, 延长对数期和稳定期从而提高胞外多糖的产量。

正交试验设计同时考虑了发酵液 pH 值、培养温度和接种量 3 个影响因素对 EPS 产量的影响, 结果表明 3 个因素对于双歧杆菌 22-5 的 EPS 产量都有显著影响, 相关研究表明这些因素的影响效果因菌种不同差异较大。在固定发酵时间的条件下, 大部分菌的 EPS 产量都受发酵液 pH 值影响较大^[9, 12-13], 本实验也得出了这样的结果, 而接种量和培养温度则因培养容器的区别, 以及各菌最适生长温度的不同, 对 EPS 产量的影响有人有小^[8-9, 13]。

4 结论

4.1 培养温度、pH 值和接种量 3 个条件对双歧杆菌 22-5 产 EPS 都有影响, 其中 pH 值的影响最为显著, 接种量的影响次之, 培养温度影响最小。接种量和培养温度对于 EPS 产量的影响差别不大。

4.2 根据 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 确定双歧杆菌 22-5 在 5L 发酵罐产 EPS 的最优条件是: 发酵温度 31℃, 接种量为 3.0%, pH 7.0。

4.3 经过在发酵罐中的正交设计试验优化, 双歧杆菌 22-5 的 EPS 产量最高可达到 5.8g/L, 是优化前的 1.75 倍, 更是比厌氧瓶优化的结果提高了近 4.5 倍^[8], 证明双歧杆菌 22-5 有实现工业化生产 EPS 的可能和潜力。

参考文献:

- [1] ARUNACHALAM K D. Role of *Bifidobacteria* in nutrition, medicine and technology[J]. Nutrition Research, 1999, 19(10): 1559-1597.
- [2] 马丽, 覃小林, 刘雄民, 等. 不同的脱蛋白方法用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 116-119.
- [3] ARTHUR C O, ERIKA I, PIRKKA V K, et al. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 172: 61-64.
- [4] 郭俊杰. 双歧杆菌细胞壁的免疫调节和抑瘤作用研究[D]. 安徽: 安徽理工大学, 2006.
- [5] 赵振锋. 红曲霉胞外多糖的产量提高及纯化、结构研究[D]. 无锡: 江南大学, 2002.
- [6] KITAZAWA H, ISHII Y, UEMURA J. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*[J]. Food Microbiology, 2000, 17(1): 109-118.
- [7] WILLEM M. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(1): 3-10.
- [8] 欧阳清波, 李平兰. 长双歧杆菌 22-5 胞外多糖(EPS)合成条件的优化[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(2): 12-15.
- [9] 刘慧, 张红星, 代娟. 藏灵菇嗜热链球菌高产胞外多糖发酵条件的优化[J]. 中国酿造, 2007(6): 41-45.
- [10] PATRICIA R M, JEROEN H, PIETERNELA Z. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2/3): 163-171.
- [11] 杨贞耐, HUTTUNEN E. 乳酸菌分泌胞外多糖的生物学基础和多糖分子结构修饰[C]. 北京: 第三届中国乳业科技大会论文集, 2006: 95-100.
- [12] 刘慧, 熊利霞, 韩容, 等. 藏灵菇源干酪乳杆菌 KL1 高产胞外多糖发酵条件的优化研究[J]. 中国农业通报, 2008, 24(11): 117-121.
- [13] 郝利民, 孙金旭, 邢新会, 等. 裂褶菌菌丝体与胞外多糖发酵条件研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(1): 10-13.