

文章编号:1009-038X(2005)01-0074-06

Clostridium butyricum Z-10 的生长特性与培养基优化

赵建新, 田丰伟, 陈卫, 张灏, 汤坚

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 对 *Clostridium butyricum* Z-10 的生长特性研究表明, 其最适生长温度为 36 ℃, 最低和最高生长温度分别为 16 ℃ 和 44 ℃; 最适起始生长 pH 值为 7.2, 最低和最高起始生长 pH 值分别为 4.6 和 10.6; 最高耐胆酸盐质量浓度为 4 g/dL, 起始氧化还原电位为 -21 mV; 丁酸梭状芽孢杆菌对青霉素不敏感, 主要代谢产物为丁酸和乙酸。通过对生长因子、氮源的选择性研究, 得出采用酵母膏做为生长因子, 胰蛋白胨作为氮源有较好的效果。优化培养基试验得出当胰蛋白胨质量浓度为 22 g/L, 葡萄糖质量浓度为 10 g/L, 盐酸半胱氨酸质量浓度为 0.5 g/L 时, 总菌体浓度可达到 3.6×10^8 个/mL。

关键词: 丁酸梭状芽孢杆菌; 生长特性; 培养基; 优化

中图分类号: Q 93.331

文献标识码: A

Studies on the Growth Characteristics and Culture Medium Optimization of *Clostridium butyricum* Z-10

ZHAO Jian-xin, TIAN Feng-wei, CHEN Wei, ZHANG Hao, TANG Jian
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The growth characteristics of *Clostridium butyricum* Z-10 was studied. It showed that the optimal, lowest, and highest temperature for the growth of *C. butyricum* was 36 ℃, 16 ℃ and 44 ℃, respectively. With regard to the pH value for the cell growth, the optimal value was 7.2, and the upper and lower limitation were 10.4 and 4.6, respectively. The *Clostridium butyricum* Z-10 strain could grow well in the media containing up to 4 g/dL of cholate, but no growth was found if the initial Eh exceed 21 mV. *Clostridium butyricum* Z-10 was not sensitive to penicillin while its main metabolites were butyric acid and acetic acid. Through the study of growth factors and nitrogen source for *Clostridium butyricum*, it was found that, yeast extract and tryptone were the better growth factor and nitrogen source, respectively. Total cells could reach 3.6×10^8 CFU/mL on the optimized medium containing tryptone 22 g/L, glucose 10 g/L and HCL-cysteine 0.5 g/L.

Key words: *Clostridium butyricum*; growth characteristics; culture medium; optimization

收稿日期:2003-12-16; 修回日期:2004-04-20.

作者简介: 赵建新(1971-), 男, 河南三门峡人, 讲师, 食品科学博士研究生。

Clostridium butyricum, 中文名丁酸梭状芽孢杆菌、酪酸梭状芽孢杆菌, 又名宫入菌^[1]。作者所在实验室从健康人群粪便中筛选到一株 *Clostridium butyricum* Z-10, 革兰氏阳性, 在培养后期能变为阴性, 专性严格厌氧^[2]。*Clostridium butyricum* 是人体肠道内固有的有益菌, 主要在大肠和盲肠周边增殖, 作为微生态制剂广泛应用于各种原因引起的肠道菌群失调、急慢性腹泻、肠易激综合症、抗生素相关性肠炎、便秘或腹泻便秘交替症等疾病的治疗, 疗效显著^[3~7]。由于其有产芽孢的特性, 可以耐酸、耐热、耐胆汁、耐抗生素, 应用范围甚广。丁酸菌还可作饲料添加剂^[8], 在动物肠道内拮抗动物病原菌, 维持和调节微生态平衡, 增强动物的免疫功能, 并产生淀粉酶、维生素, 促进动物对饲料的消化吸收, 广泛适用于鸡、猪、牛等动物。作者对筛选的 *Clostridium butyricum* Z-10 株的生长特性进行了研究, 为丁酸梭状芽孢杆菌的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源 *Clostridium butyricum* Z-10, 江南大学食品学院食品生物技术学科组筛选并保存^[9]。

1.1.2 培养基 梭菌培养基(组分 g/dL): 胰蛋白胨 2, 牛肉浸膏 1, 酵母膏 0.6, 葡萄糖 0.4, 复合盐 1 份(K_2HPO_4 0.2, KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.04, $CaCl_2$ 0.02, $FeSO_4$ 0.01, 盐酸半胱氨酸 0.05)。pH 值 7.2, 121 °C 杀菌 15 min。

不同 pH 值的梭菌培养基: 将梭菌培养基用 NaOH 调至不同的 pH 值, 分别过滤除菌即可。

生长因子选择培养基(组分 g/dL): 胰蛋白胨 2, 葡萄糖 0.4, 复合盐 1 份(K_2HPO_4 0.2, KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.04, $CaCl_2$ 0.02, $FeSO_4$ 0.01, 盐酸半胱氨酸 0.05)。pH 值 7.2, 121 °C 杀菌 15 min。

氮源选择培养基(组分 g/dL): 酵母膏 1.0, 葡萄糖 0.4, 复合盐 1 份(K_2HPO_4 0.2, KH_2PO_4 0.1, $MgSO_4$ 0.04, $CaCl_2$ 0.02, $FeSO_4$ 0.01, 盐酸半胱氨酸 0.05)。pH 值 7.2, 121 °C 杀菌 15 min。

1.2 实验方法

1.2.1 最适生长温度的测定 将试验菌株以体积分数 5% 接种到梭菌培养基, 在 28~38 °C 恒温培养 12 h, 以没有接种的培养基作参比, 于 660 nm 测定培养液的光密度值, 依据光密度的大小确定最适生长温度。

万方数据

1.2.2 最低和最高生长温度测定 将试验菌株以体积分数 5% 接种到梭菌液体培养基, 分别于低温和高温下按要求培养 7 d, 观察有无生长。

1.2.3 最适生长 pH 值测定 将试验菌株以体积分数 5% 接种到不同 pH 值的梭菌培养基, 在最适温度下培养 12 h, 以没有接种的同 pH 值液体培养基作参比, 于 660 nm 测定培养液的光密度值, 依据光密度的大小确定最适生长 pH 值。

1.2.4 最低和最高生长 pH 值测定 将试验菌株以体积分数 5% 接种到不同 pH 值梭菌培养基, 于最适温度培养 7 d, 观察有无生长。

1.2.5 耐胆汁试验 在梭菌培养基中添加不同量的牛胆酸盐, 接种体积分数 5%, 于最适 pH 值和最适温度下培养 12 h, 观察生长情况。

1.2.6 起始生长氧化还原电位的测定 将梭菌培养基在三角瓶中放置 5 d, 然后分装到不同试管, 分别平行加入过滤灭菌的硫代乙醇酸钠 0, 50, 100, 150, 200 mg, 测平行试管的氧化还原电位后, 在没有污染的试管中分别接种体积分数 5%, 培养 12 h, 观察生长情况。

1.2.7 耐青霉素试验 将稀释到不同浓度(10~400 IU/L)的青霉素加入到培养基, 接种培养 30 h, 观察生长结果。

1.2.8 有机酸的色谱分析 采用美国 Finnigan Mat 4610B 型气质联用仪。色谱条件: 高纯氮气体积流量 1 mL/min, PEG-20M 柱, 起始温度 60 °C, 保持 1 min, 升温速率 5 °C/min, 最终温度 190 °C, 保持 30 min。质谱条件: 电子轰击法(EI), 电子能量 70 eV, 灯丝发射电流 0.25 mA, 电子倍增器电压 1 500 V, 接口温度 200 °C。质量扫描范围: 33~400 AMU/(s·次)。化合物定性由计算机检索并与标准图谱对照复核。

2 结果与讨论

2.1 *Clostridium butyricum* Z-10 的最适生长温度

将 *Clostridium butyricum* Z-10 以体积分数 5% 接入梭菌培养基, 分别于不同温度下培养 12 h, 在 660 nm 下测光密度值, 结果见图 1。

从图 1 可以看出, *Clostridium butyricum* Z-10 的最适生长温度为 36 °C, 与一般细菌的最适生长温度相似。

2.2 *Clostridium butyricum* Z-10 的最低和最高生长温度

将 *Clostridium butyricum* Z-10 以体积分数 5% 接入梭菌培养基, 分别于不同温度下培养 7 d,

结果见表1.

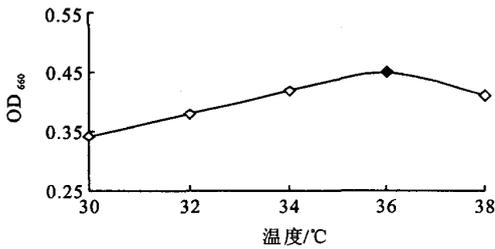


图1 *Clostridium butyricum* Z-10 的最适生长温度
Fig.1 Optimal temperature for *Clostridium butyricum* Z-10 growth

从表1可以看出, *Clostridium butyricum* Z-10 的最低生长温度为 16 °C, 最高生长温度为 44 °C.

表1 *Clostridium butyricum* Z-10 的最低和最高生长温度
Tab.1 The lowest and highest temperature for *Clostridium butyricum* Z-10 growth

温度/ °C	生长情况	温度/ °C	生长情况
10	-	40	++
12	-	42	+
14	-	44	+ -
16	+ -	46	-
18	+	48	-

注：“+”生长，“-”不生长，“++”生长良好，“+ -”略微生长。

2.3 *Clostridium butyricum* Z-10 的最适起始生长 pH 值

将 *Clostridium butyricum* Z-10 以体积分数 5% 接入不同 pH 值的梭菌培养基, 于 36 °C 下培养 12 h, 于 660 nm 测 OD₆₆₀ 值, 结果见图 2.

从图 2 中可以看出, *Clostridium butyricum* Z-10 的最适生长起始 pH 值为 7.2, 与一般细菌相似.

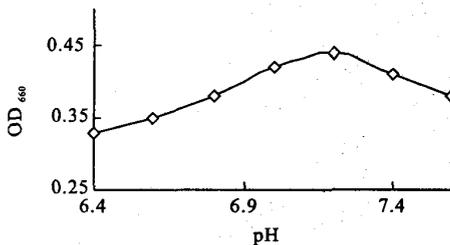


图2 *Clostridium butyricum* Z-10 的最适起始生长 pH 值

Fig. 2 The optimal initial pH for *Clostridium butyricum* Z-10 growth

2.4 *Clostridium butyricum* Z-10 的最低和最高起始生长 pH 值

将 *Clostridium butyricum* Z-10 以体积分数 5% 接入不同 pH 值的梭菌培养基, 36 °C 培养 7 d, 结果见表 2.

从表 2 可以看出, *Clostridium butyricum* Z-10 的最低起始生长 pH 值为 4.6, 最高起始生长 pH 值为 10.6, 有一个相对较宽的 pH 值范围.

表2 *Clostridium butyricum* Z-10 的最低和最高起始生长 pH 值

Tab. 2 The lowest and highest initial pH for *Clostridium butyricum* Z-10 growth

起始 pH 值	生长情况	起始 pH 值	生长情况
4.2	-	10.0	++
4.4	-	10.2	+
4.6	+ -	10.4	+
4.8	++	10.6	+ -
5.0	++	10.8	-

注：“+”生长，“-”不生长，“++”生长良好，“+ -”略微生长。

2.5 *Clostridium butyricum* Z-10 的耐胆汁试验

作为微生态制剂, 服用后必须经过胃和小肠, 因此要求要能耐受较低的 pH 值和一定质量浓度的胆汁. *Clostridium butyricum* 能生成芽孢, 而芽孢一般对外界环境有较强的抵抗力, 在胃中停留的时间也相对较短, 因此胃液对菌株的活力基本没有影响. 但在小肠中停留的时间要长得多, 因此对菌株进行耐胆汁的考察十分必要, 结果见表 3.

从表 3 可以看出, *Clostridium butyricum* Z-10 最终能在 4 g/dL 的牛胆酸盐中生长, 说明 *Clostridium butyricum* Z-10 对肠道环境也有较强的适应性, 可作为微生态制剂应用.

表3 *Clostridium butyricum* Z-10 的耐胆汁试验

Tab. 3 Bile-tolerant tests of *Clostridium butyricum* Z-10

牛胆酸盐质量浓度/(g/dL)	生长情况	牛胆酸盐质量浓度/(g/dL)	生长情况
0.5	++	2.5	++
1.0	++	3.0	++
1.5	++	3.5	+
2.0	++	4.0	+

注：“+”生长，“-”不生长，“++”生长良好，“+ -”略微生长。

2.6 *Clostridium butyricum* Z-10 的起始生长对氧化还原电位的要求

Clostridium butyricum 属严格厌氧菌^[9], 缺少过氧化氢酶。氧的存在对菌体有毒害作用, 一般作为严格厌氧菌开始生长的电位约 -0.1 V (pH 7.0 时)^[10], 通过在培养基中加入不同量还原剂——硫代乙醇酸钠^[11], 降低培养基的氧化还原电位, 测定该菌最高起始生长的氧化还原电位 (RH)。

从表 4 可以得出, *Clostridium butyricum* Z-10 的起始生长的氧化还原电位应低于 -21 mV。

表 4 *Clostridium butyricum* Z-10 起始生长对氧化还原电位的要求

Tab. 4 Initial Eh for *Clostridium butyricum* Z-10 growth

添加量/ mg	氧化还原 电位/mV	生长 情况
0	+120	—
50	+12	—
100	-21	+—
150	-110	++
200	-241	++

注: “+”生长, “—”不生长, “++”生长良好, “+—”略微生长。

2.7 *Clostridium butyricum* Z-10 的耐青霉素试验

药敏试验一般常用抑制细菌生长作为判定标准, 用最低抑菌浓度 MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 表示。针对目前临床应用最广泛的抗生素, 选用青霉素作为考察对象, 分别在培养基中加入不同国际单位的青霉素钠, 培养 30 h 后观察生长情况, 结果见表 5。

表 5 *Clostridium butyricum* Z-10 耐青霉素试验

Tab. 5 Penicillin-tolerant tests of *Clostridium butyricum* Z-10

添加量/(IU/L)	生长情况
0	++
100	++
200	+
300	+—
400	—

注: “+”生长, “—”不生长, “++”生长良好, “+—”略微生长。

各种细菌对不同抗菌药物的敏感性不一, 同一种细菌的不同菌株间对不同抗菌药物的敏感性也常存在差异^[12]。不同细菌对不同抗菌药物的敏感性也显示了不同种类细菌所具有的特征。从表 5 可以

万方数据

看出, *Clostridium butyricum* Z-10 最终能在 300 IU 的青霉素中生长 (MIC = 300), 远远高于耐药标准 18 IU, 说明 *Clostridium butyricum* Z-10 能耐受较高浓度的青霉素, 同时也表明 *Clostridium butyricum* Z-10 可以和青霉素在治疗时配合使用, 并不会影响其疗效。

2.8 *Clostridium butyricum* Z-10 的代谢产物 (有机酸) 的色谱分析

图 3 是培养液有机酸总离子流图, 检索结果得出, *Clostridium butyricum* Z-10 的主要代谢产物为丁酸和乙酸, 这与文献^[13]报道一致。

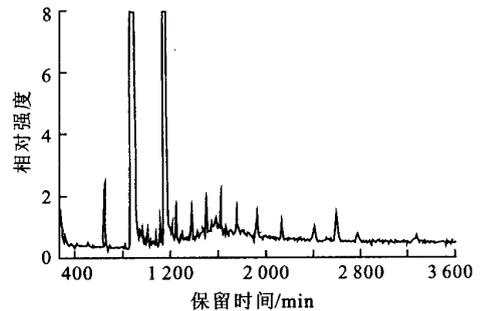


图 3 培养液有机酸总离子流图

Fig. 3 Total ions of organic acids in liquid culture

2.9 *Clostridium butyricum* Z-10 生长因子的选择

Clostridium butyricum 的生长因子为生物素^[14], 生物素在天然培养基原料中分布十分广泛。分别选用酵母膏、玉米浆、牛肝浸液、麦芽汁 (添加量为 0.1 g/dL), 进行生长因子的比较试验, 结果见图 4。

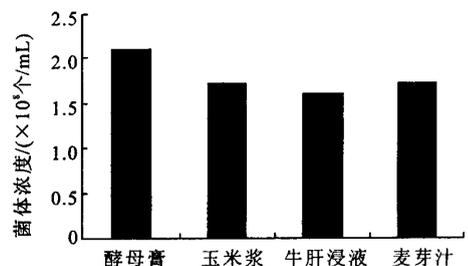


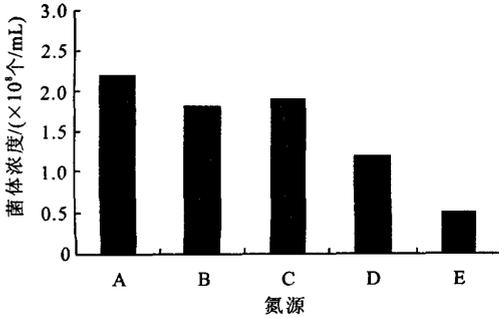
图 4 不同生长因子对 *Clostridium butyricum* Z-10 生长的影响

Fig. 4 The effect of different growth factors on the growth of *Clostridium butyricum* Z-10

从图 4 可以看出, 4 种生长因子的效果基本接近, 酵母膏作为生长因子菌体浓度稍高, 可能是酵母膏提供了一部分其它类型能适应 *Clostridium butyricum* Z-10 生长的营养物质的缘故。因此酵母膏作为生长因子无论从经济上还是从效果上都是可行的。

2.10 有机氮源的选择

选用胰蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、大豆分离蛋白、蛋白胨等培养基中常用的氮源进行研究,添加量为 1 g/dL,结果见图 5.可以看出,采用胰蛋白胨可以得到较高的菌体浓度,达到 2.2×10^8 个/mL,故采用胰蛋白胨作为氮源使用.



A:胰蛋白胨;B:酵母膏;C:牛肉膏;D:大豆分离蛋白;E:蛋白胨

图5 不同氮源对 *Clostridium butyricum* Z-10 生长的影响

Fig.5 Effect of different nitrogen sources on the growth of *Clostridium butyricum* Z-10

2.11 培养基的正交优化及验证

碳源的过量会造成细胞代谢的旺盛,代谢产物的积累会抑制细胞生长^[15],而使总菌数下降.为了增加总菌数,分别以影响成本较大的葡萄糖、胰蛋白胨、盐酸半胱氨酸作为考察对象,各取 3 个水平,以总菌数为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,极差分析结果见图 6.

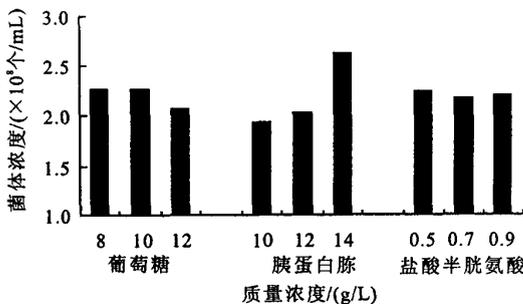


图6 培养基正交试验结果极差分析

Fig.6 Optimization analysis of orthogonal results

依据直观分析结果得出,3 个因素关系依次为:胰蛋白胨>葡萄糖>盐酸半胱氨酸,胰蛋白胨为最大影响因素.但直观分析不能给出误差大小的估计,也不知分析的精度,因此对结果进行方差分析,见表 6.

考虑到微生物试验误差较大的特点,对方差分析的结果可以放宽尺度,从显著水平 $\alpha=0.25, F_{0.25}(2,2)=3.0$ 可以看出,A,B,C 3 项均不显著.从

方差分析的角度,不显著的因素可以选取试验范围内的任一点^[16],因此不对正交试验的结果进行验证.为了检验试验范围的选取是否恰当,对试验结果进一步验证.选取 R 值最大的胰蛋白胨进行研究,葡萄糖 10 g/L,盐酸半胱氨酸 0.5 g/L,其余条件不变,结果见图 7.

表6 正交试验结果方差分析
Tab.6 Variance analysis of orthogonal results

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F
A	0.080	2	0.040	0.19
B	0.860	2	0.430	2.08
C	0.007	2	0.004	0.02
误差	0.413	2	0.207	
总和	1.36	8	$\sum x_i = 19.8$	$\sum x_i^2 = 44.92$

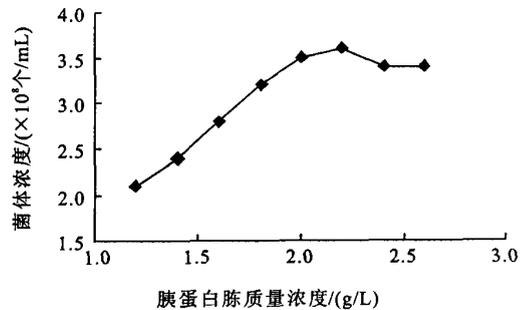


图7 胰蛋白胨质量浓度对总菌数的影响

Fig.7 The effect of tryptone level on the total cell number

从图 7 可以得出,当达到最大菌体浓度(3.6×10^8 个/mL)时,胰蛋白胨的用量为 22 g/L.优化后的培养基组成为:胰蛋白胨 22 g/L,葡萄糖 10 g/L,盐酸半胱氨酸 0.5 g/L.

3 结论

通过试验对 *Clostridium butyricum* Z-10 生长特性进行了研究,得出 *Clostridium butyricum* Z-10 的最适生长温度为 36 °C,最低和最高生长温度分别为 16 °C 和 44 °C.最适起始生长 pH 值为 7.2,最低和最高起始生长 pH 值分别为 4.6 和 10.6.最高耐胆酸盐质量浓度为 4 g/dL.起始氧化还原电位为 -21 mV. *Clostridium butyricum* Z-10 对青霉素不敏感, MIC = 300, GC-MS 检测其主要代谢产物为丁酸和乙酸.

通过对生长因子、氮源的选择性研究,得出分别采用酵母膏做为生长因子,胰蛋白胨作为氮源有

较好的效果. 采用正交试验优化培养基的组成, 方差分析表明, 3 个因素均不显著. 对影响总菌数最大的因素胰蛋白胨进行研究, 得出胰蛋白胨 22 g/L,

葡萄糖 10 g/L, 盐酸半胱氨酸 0.5 g/L 时, 菌体浓度可以达到 3.6×10^8 个/mL.

参考文献:

- [1] Fujita I, Maeda A, Takashik. Studies on the anti-diarrneal activity of *Clostridium butyricum* Miyairi II 588[J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 1986, 14: 6073—6080.
- [2] 赵建新, 张灏, 田丰伟. 丁酸菌的分离、筛选及鉴定[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(6): 597—601.
- [3] Kuroiwa T, Kobti K, Iwanga M. Inhibition of enteropathogens by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588[J]. *J Jpn A Inf D*, 1990, 64(2): 257—263.
- [4] Kuroiwa T, Iwanaga M, Kobari K. Preventive effect of *Clostridium butyricum* M588 against the proliferation of *Clostridium difficile* during antimicrobial therapy[J]. *J Jpn A Inf D*, 1990, 64: 1425—1432.
- [5] 张达荣, 董晓初, 包幼甫. 肠易激综合征患者服用酪酸菌制剂前后肠道菌群状况[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(3): 164—165.
- [6] 张继强, 王友风, 张达荣, 等. 口服酪酸菌对肝硬化患者免疫紊乱的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 1998, 7(4): 356—357.
- [7] 汤仲英, 高怀荃, 汪俭, 等. 酪酸菌制剂治疗儿童幽门螺杆菌感染的临床观察[J]. 安徽医科大学学报, 1999, 34(5): 371—372.
- [8] Magata T, Shinoi C. *Clostridium butyricum* Migairi used as feed additive for baby pigs [J]. *Chikusan-Kenkyu*, 1971, 25(5): 739—740.
- [9] Hambleton R, Rigby G J. The effect of oxygen on the germination and outgrowth of spores of *Clostridium butyricum*[J]. *J appl Bact*, 1970, 33: 674—678.
- [10] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [11] Hachisuka Y, Suzuki I, Morikawa K. The effect of oxidation-reduction potential on spore germination, outgrowth and vegetative growth of *Clostridium tetani*, *Clostridium butyricum* and *bacillus subtilis* [J]. *Microbiol Immunol*, 1982, 26(9): 803—811.
- [12] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M], 北京: 中国轻工出版社, 1999.
- [13] Gvan Andel J, Rzoutberg G. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, 23: 21—26.
- [14] Buchanan R E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Baltimore: Williams & Wilkins Co. 1974.
- [15] Zeng A. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44(8): 902.
- [16] 曾秋成. 技术数理统计方法[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1982.

(责任编辑: 李春丽)

欢迎订阅 2005 年《冷饮与速冻食品工业》

《冷饮与速冻食品工业》杂志 是经国家新闻出版总署批准出版, 教育部主管, 江南大学(原无锡轻工大学)等单位主办, 面向国内外公开发行的国家级专业性技术指导类刊物, 是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、生产者、经营者研发新品、寻求商机、开拓市场的良师益友。

《冷饮与速冻食品工业》杂志 及时报道国内外冷饮与速冻食品领域及其相关行业的科研成果、生产技术及市场动态, 通过邮局在全国各地发行, 影响广泛, 同时竭诚为我国冷饮与速冻食品行业的广大企业提供广告服务。广告内容涉及冷饮与速冻食品行业的新产品, 各种速冻、冷藏机械设备, 食品添加剂及原辅料等。

地址: 江苏省 无锡市惠河路 170 号, 江南大学 青山湾校区 51 号信箱《冷饮与速冻食品工业》杂志编辑部; 电话: 0510—5814561, 5877448; 传真: 0510—5814561; 邮编: 214036; 电子邮件地址: csbf@sytu.edu.cn. 联系人: 周佩琴, 秦和平。