

# 培养幽门螺旋杆菌的发酵工艺研究\*

曾 浩 邹全明 张卫军

(第三军医大学临床微生物教研室 重庆 400038)

**摘 要** 采用摇瓶微需氧培养技术,模拟发酵条件,探讨不同因素(pH、转速、种子菌接种量)对幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)生长的影响,优化工艺参数,并级联放大到 10L 发酵罐发酵,经多次实验,建立了稳定的 Hp 发酵工艺,24h 发酵细菌的最大吸光度  $A_{600}$  达 3.89,收获菌体湿重达 5.2g/L。

**关键词** 幽门螺旋杆菌,发酵,溶氧

中图分类号:R379.9 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2002)05-0607-04

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是定植于人胃粘膜的重要致病菌,与慢性胃炎、消化性溃疡的发生密切相关<sup>[1]</sup>,长期、慢性感染可能导致胃癌发生。目前临床的三联治疗方案存在费用昂贵、耐药菌株不断增多及疗效欠佳等不足。使用 Hp 疫苗将有可能成为预防、治疗 Hp 所致疾病最有效的方法。疫苗研究往往需要较大量的细菌相关抗原及细菌的代谢产物用于纯化。通过动物模型可以研究其对机体的免疫原性和保护性。为解决抗原来源,本实验采用摇瓶培养和发酵技术<sup>[2~5]</sup>,摸索 Hp 发酵工艺,寻求最佳参数。

## 1 材料和方法

### 1.1 Hp 菌株

本实验采用的幽门螺旋杆菌 Hp27、Hp37、Hp39 和 HpM 菌株系由本室分离、鉴定、保存。

### 1.2 液体及发酵培养基

本实验中所用的改良布氏肉汤(含环糊精 0.2%)、小牛血清(5%)、葡萄糖(0.5%)、复合氨基酸溶液(0.15%)及抗生素混合液(0.01%),由本室自配。

### 1.3 仪器

分光光度计(Beckman)、厌氧罐及抽气换气装置(本室自制)、500mL 摇瓶、10L 发酵罐(B. Braun 德国)、恒温摇床(哈尔滨)、电子分析天平(上海)。

### 1.4 菌体湿重测定

培养完成后,取菌液于 4℃ 离心(5 000r/min)20 min,称取离心管中的最终菌体湿重。

### 1.5 吸光度 A 值测定

取少量培养液震荡混匀,用分光光度计测定  $A_{600}$ (布氏肉汤培养基调零)。

\* 国家“九五”重庆攻关计划(96-901-01-54)全军“九五”医药卫生科研基金资助(98D004)。

作者简介:曾浩(1976-),男,现在在第三军医大学临床微生物教研室攻读医学博士学位,主要研究方向为病原微生物的预防与诊治。

收稿日期:2001-10-22,修回日期:2002-04-17

## 1.6 摇瓶微需氧培养

本实验系采用摇瓶微需氧小量液体培养技术摸索工艺参数和制备种子菌。是指在 500mL 摇瓶中装 50mL ~ 100mL 的液体培养基,固定于厌氧罐内,通过气体过滤器连接厌氧罐进气口和真空泵进行抽气换气,人为地使罐内气体环境达到适宜 *Hp* 生长的微需氧条件(5% O<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>)置于恒温摇床中 37℃ 振荡培养。

## 1.7 最适菌种选择

*Hp* 固体选择培养基在微需氧条件下培养 *Hp*27、*Hp*37、*Hp*39、*Hp*M 48h,用 4mL 布氏肉汤洗涤。分别加入到 50mL 布氏肉汤培养基中(pH7.5),转速 200r/min,37℃ 微需氧培养,在 4 ~ 30h 间(间隔 2h)分别震荡混匀取样 0.4mL,涂片革兰氏染色观察形态并测定  $A_{600}$  以确定细菌对数生长期,30h 后离心收集细菌称重。

## 1.8 不同接种量对菌体产量的影响

分别将 10<sup>6</sup> cfu/mL、10<sup>7</sup> cfu/mL、10<sup>8</sup> cfu/mL 和 10<sup>9</sup> cfu/mL 不同浓度的 *Hp* 菌悬液各 4mL 接种于 50mL 改良布氏肉汤液体培养基中,微需氧条件下 37℃、200r/min 振荡培养 40 h。从 4 h 起,每间隔 4 h 取 100 $\mu$ L,测定  $A_{600}$ ,确定 *Hp* 菌株的最优接种浓度。

## 1.9 不同 pH 对不同 *Hp* 菌株液体培养的影响

配制不同 pH 梯度(pH6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)的布氏肉汤 50mL,以上方法培养 24 h,测定各菌株  $A_{600}$ ,以确定各菌液体培养的最适 pH。

## 1.10 转速对不同 *Hp* 菌株液体培养的影响

配制各菌株最适 pH 的布氏肉汤 50mL,37℃ 微需氧培养条件下,转速分别为 100、140、180、220、260 和 300r/min,于 24 h 测定各菌  $A_{600}$ ,比较不同转速对 *Hp* 菌株液体培养的影响。

## 1.11 发酵罐级联溶氧控制的分批补料培养

级联控制溶氧(DO)发酵,就是 DO 控制器为主控制器,搅拌与通气控制器为伺服控制器,设置二者为级联状态,即 DO 控制器的输出直接作用于搅拌与通气控制器的设置点。

5L 发酵培养基加入 10L 发酵罐中<sup>[2,3,6]</sup>,121℃ 高压灭菌 30min,冷却后采用氮气调零、空气校正溶氧电极。换用混合气体经除菌空气过滤装置通入发酵罐,使 DO 达 30%,进气速度 0.3 ~ 0.6L/min。分别加入种子菌 200mL、小牛血清 250mL、50% 葡萄糖 50mL、复合氨基酸溶液 7.5mL 及 20mL 抗生素混合液,补料采用 10% 的葡萄糖,通入 5% O<sub>2</sub> 和 10% CO<sub>2</sub> 的混合气体于 37℃ 发酵 2 h,混合气进气速度控制在 2 ~ 4L/min,转速 120 ~ 250r/min,使 DO 维持在 5% ~ 10%。2 h 后换用小流量的 N<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 人工持续通气(N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> 为 8:1),95% O<sub>2</sub> 采用脉冲方式自动供气,整个发酵过程 DO 始终控制在 5% ~ 10%。从 4 h 起间隔 2 h 取样,观察形态和测定  $A_{600}$  值。

# 2 结果

## 2.1 不同 *Hp* 菌株液体培养结果

*Hp*27、*Hp*37、*Hp*39、*Hp*M 菌株的对数生长期各不相同,各菌株不同时期的  $A_{600}$  生长曲线见图 1。其对数生长期波动在 18 ~ 24 h,各菌株在 30 h 后的收获湿菌量见图 2。由图 1、2 可以看出,*Hp*37 菌株的对数生长期 18h 左右,并且最后菌体湿重最大,所以 *Hp*37 菌株

最适于在改良布氏肉汤中生长。

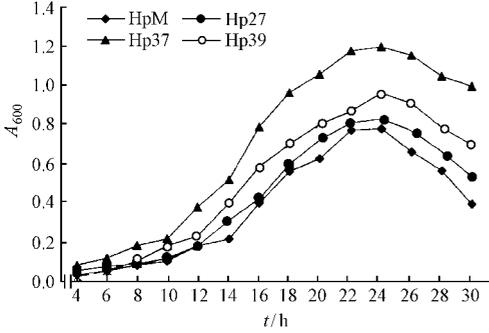


图 1 不同 *Hp* 菌株的生长曲线

Fig.1 Growth curve of different *Hp* strains

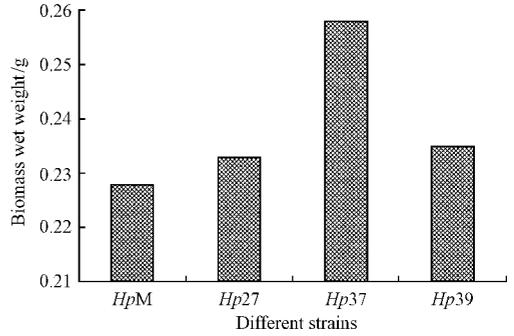


图 2 不同 *Hp* 菌株湿菌量

Fig.2 The wet weight of different *Hp* strains

## 2.2 不同接种量对菌体产量的影响

当接种浓度为  $10^8$  cfu/mL 和  $10^9$  cfu/mL 时,最大菌量分别于 24 h 和 30 h 后达到,随着接种浓度的降低,最大菌量所需时间相应推迟,当接种浓度  $10^6$  cfu/mL 和  $10^7$  cfu/mL 时,培养 36 h 后才达到最大菌量。结果显示,接种 *Hp* 菌液量越大,达到对数生长期和稳定期所需时间越短,且获取菌量也越大。因此我们确定最佳接种浓度为  $10^8$  cfu/mL。

## 2.3 pH 对 *Hp* 菌株生长的影响

在不同 pH 梯度布氏肉汤培养基中接种等量 *Hp* 菌株,微需氧条件培养 24 h。结果显示 *A* 株 *Hp* 菌株对不同 pH 值耐受不一,测定的  $A_{600}$  值及收获的菌体湿重有较大差异。pH6.0~7.0 生长较差,pH7.5~8.0 生长最佳,与文献报道的 *Hp* 在布氏肉汤中最适生长 pH 为  $8.0 \pm 0.5$  基本吻合。因此,我们确定 *Hp* 最适生长 pH 值为 7.5。

## 2.4 不同转速对 *Hp* 菌株生长的影响

转速的快慢直接影响细菌的生长。转速太慢,气体交换不充分,细菌生长缓慢;转速太快则由于剪切力作用会造成 *Hp* 菌体的损伤,且增加污染机会;如果放大到发酵罐,又会出现泡沫过多,从而影响发酵产率。从实验可以看出,转速达 300r/min 时培养 24 h, $A_{600}$  可达 1.686,细菌湿重达 0.28g/50mL,但由于摇瓶在厌氧罐内的固定原因,超过 250r/min 时,很易造成摇瓶破裂和倾斜而导致污染。220r/min 培养 24 h 时, $A_{600}$  达 1.634,密度达  $10^8$  cfu/mL,完全可以满足种子菌制备需要。因此我们确定最佳转速为 220r/min 左右。

## 2.5 发酵罐中发酵 *Hp37* 菌株的生长曲线

结果见图 3。

发酵罐内 *Hp* 菌株生长对数期在 18~28h,发酵至 28h 菌体出现球形改变及大量裂解(革兰氏染色证实)导致吸光值急剧下降,通过及时加入补料后,*Hp* 菌株又恢复弯曲状,生长曲线持平而不上升,仍呈对数生长。

## 3 讨论

*Hp* 是一种营养要求很高的细菌,一般培养条件下不能生长。目前,用于临床分离和

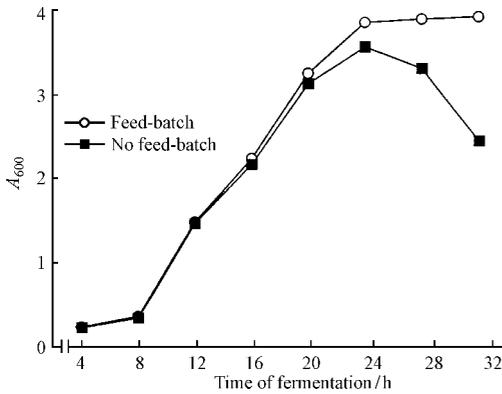


图3 *Hp37* 菌在发酵罐中的生长曲线

Fig.3 The growth curve of *Hp37* strain in the fermentor

纯培养的固体培养已较成熟,但 *Hp* 菌体培养尤其是大规模发酵培养,仍存在较多问题。本研究通过摇瓶微需氧条件小量液体培养,筛选出最适 *Hp* 菌株,并模拟发酵条件,对影响 *Hp* 菌株生长的相关因素(接种量、pH、转速)进行了优化,为大规模培养提供了可靠的工艺参数。

在 *Hp* 菌株发酵培养中,培养环境的气体条件是影响 *Hp* 生长的关键因素。由于发酵罐内培养基量大,增大转速虽可以提高溶氧,但金属转子高速旋转带来的剪切力,也不同程度的抑制 *Hp* 菌的生长,并且当 *Hp* 达对数生长期及以后的时间里,细菌快速生长产生的泡沫影响气体的通入和溶氧的维持。同时,提高转速可促使大量泡沫产生,采用硅酮消泡剂又抑制 *Hp* 的生长。为解决消泡和溶氧问题,我们采用发酵罐级联溶氧控制的分批补料培养,并通过改变气体通入模式和改变通入气体成分以及降低转速,既解决了消泡问题,又满足了 *Hp* 生长所需的气体条件。通过摸索发现,在发酵后期,如通入纯氧,将溶氧提高到 10% ~ 15%,及时加入补料,*Hp* 的生长更佳。总之,稳定的 *Hp* 发酵工艺的的建立使获得大量的 *Hp* 菌体成为可能,为纯化 *Hp* 相关抗原及 *Hp* 疫苗的研制显示了良好的前景。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Blanchard T G, Czinn S, Nedrud J G, et al. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, **241** :181 ~ 213.
- [ 2 ] Milind D, Emanuel C, Lacy D. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**( 6 ) :2431 ~ 2435.
- [ 3 ] Antonio M, Maria D A, Paola M, et al. *Arch Microbiol*, 1995, **164**( 1 ) :290 ~ 293.
- [ 4 ] 张春丽,赵世新,肖锡岭,等. 中国生物制品杂志, 1998, **11**( 4 ) :215 ~ 217.
- [ 5 ] 杨少民,陈方,付永标,等. 生物学杂志, 1998, **15**( 1 ) :13 ~ 15.
- [ 6 ] Gassmann E, Wipf B. *Biotech Forum Eur*, 1992, **9**( 2 ) :456 ~ 457.

## Study on the Fermentation Technology for *Helicobacter pylori* Cultivation

Zeng Hao Zou Quanming Zhang Weijun

( Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China )

**Abstract** : To investigate fermentation factors of *Helicobacter pylori* cultivation, the technique under microaerophilic gas phase condition in the flasks, searching for the optimum factors, including inoculum, pH, stirring speed, have been employed. Under such optimal fermentation condition, *Hp* could be grown to an  $A_{600}$  of 3.89 in 24 h and the cell output reached 5.2g/L.

**Key words** : *Helicobacter pylori*, Fermentation, Dissolved oxygen