



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105087420 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510145118. 8

(22) 申请日 2015. 03. 30

(71) 申请人 北京伟嘉人生物技术有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地三街9号嘉  
华大厦D座803

申请人 北京伟嘉盛邦生物技术有限公司

(72) 发明人 乔琳 姚宏明 高长斌 刘蕊  
金忠辉

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

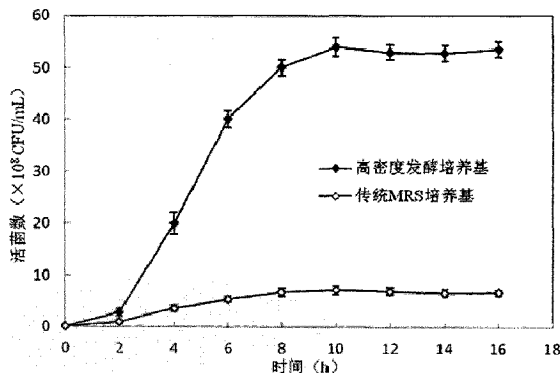
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

一株饲用屎肠球菌的高密度发酵培养基及其  
发酵工艺

(57) 摘要

本发明涉及一株饲用屎肠球菌的高密度发  
酵培养基及其发酵工艺。利用本发明提供的高  
密度发酵培养基及分批补料发酵工艺,屎肠球菌  
(Enterococcus faecium)WEI-10CGMCC No. 7746  
在50L发酵罐规模条件下的最高活菌数达到  
 $2.5 \times 10^{10}$ CFU/mL,在5吨发酵罐规模条件下的最  
高活菌数达到  $2.9 \times 10^{10}$ CFU/mL,分别是相同发酵  
规模条件下传统MRS培养基分批发酵活菌数的34  
倍和36倍以上,高密度发酵培养基成本比MRS培  
养基成本也有了显著降低,实现了作为微生态制  
剂屎肠球菌的低成本、高效率的生产。



1. 一种饲用乳酸菌的高密度发酵种子培养基及发酵培养基。所述饲用乳酸菌为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10 CGMCC No. 7746, 所述高密度发酵种子培养基及发酵培养基的主要成分及含量如下: 鱼蛋白胨 15-20g/L、蔗糖 15-25g/L, 三水合乙酸钠 3-7g/L, 三水合磷酸氢二钾 1-4g/L, 柠檬酸铵 1-4g/L, 七水合硫酸镁 0.05-0.4g/L, 一水合硫酸锰 0.02-0.2g/L、吐温 80 0.5-2g/L。

2. 根据权利要求 1 所述的种子培养基, 其特征在于培养基的配制方法如下:

称取培养基各组分, 充分溶解后, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0, 定容至所需体积, 121°C 灭菌 20 分钟。

3. 根据权利要求 1 所述的发酵培养基, 其特征在于培养基的配制方法如下:

(1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液, 装液量为 50-70%, 0.11-0.16Mpa 灭菌 1h, 冷却后放液, 用自来水冲洗发酵罐 2-4 次后放空发酵罐。

(2) 先称取鱼蛋白胨, 加入适量自来水搅拌至充分溶解。

(3) 依次称取加入其它培养基组分, 补加自来水至发酵罐总体积的 50-70%。

(4) 40°C, 100rpm 保温 1h, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后, 0.11-0.16Mpa 灭菌 20-40 分钟, 待温度稳定在 40°C 时, 校正溶氧为 100%。

(5) 灭菌后的培养基在 37-42°C, 50rpm, 不通气条件下空培至接种前。

4. 根据权利要求 1-3 所述饲用乳酸菌的高密度发酵种子及发酵培养基在 50L 发酵罐规模条件下的高密度发酵培养方法, 其特征在于主要步骤如下:

(1) 种子培养: 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10 CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 37-42°C 静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

(2) 进行 50L 发酵罐发酵前, 对发酵培养基及一级种子液进行镜检, 确保无杂菌污染。

(3) 接种前将 50L 发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调发酵培养基 pH 至 7.5-8.5 后, 按照 0.5-4% 的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

(4) 发酵。发酵参数设定为: 温度 37-42°C; 转速 100rpm; 不通气; 发酵液 pH 下限设定为 6.4-6.8, 当 pH 降至设定值以下时, 自动补氨水使 pH 维持在设定值; 发酵开始后 4.5-5.5h, 第一次补加 500g/L 的蔗糖, 补加量为发酵液体积的 2%; 发酵液的 pH 不再下降时, 第二次补加 500g/L 的蔗糖, 补加量为发酵液体积的 2%; 发酵结束时间为 12-18h。

5. 根据权利要求 1-3 所述饲用乳酸菌的高密度发酵种子及发酵培养基在 5 吨发酵罐规模条件下的高密度发酵培养方法, 其特征在于主要步骤如下:

(1) 一级摇瓶种子液: 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10 CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 37-42°C 静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

(2) 二级种子培养液: 按照权利要求 1 和权利要求 3 在 100L 发酵罐中配制二级种子培养基, 培养前对二级种子培养基及一级摇瓶种子液进行镜检, 确保无杂菌污染。接种前将 100L 发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调二级种子培养基 pH 至 7.5-8.5 后, 按照 0.5-2% 的接种量将一级摇瓶种子液接入 100L 发酵罐中, 发酵 10h 结束作为二级种子液。

(3) 进行 5 吨发酵罐发酵前, 对发酵培养基及二级种子液进行镜检, 确保无杂菌污染。接种前将 5 吨发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.5-8.5 后,

将二级种子液全部转接至 5 吨发酵罐中进行发酵；发酵参数设定为：温度 37-42℃；转速 100rpm；不通气；发酵液 pH 下限设定为 6.4-6.8，当 pH 降至设定值以下时，自动补氨水使 pH 维持在设定值；发酵开始 4.5-5.5h，第一次补加 500g/L 的蔗糖，补加量为发酵液体积的 2%；发酵液的 pH 不再下降时，第二次补加 500g/L 的蔗糖，补加量为发酵液体积的 2%；发酵结束时间为 12-18h。

## 一株饲用屎肠球菌的高密度发酵培养基及其发酵工艺

### 技术领域

[0001] 本发明属于乳酸菌培养技术领域,涉及一株饲用屎肠球菌的高密度发酵培养基及其发酵工艺。

### 背景技术

[0002] 屎肠球菌 (*Enterococcus Faecium*) 属于人及动物肠道中的正常菌群,进入肠道后可有效定殖。屎肠球菌发酵产生乳酸,有利于降低肠道环境 pH,抑制有害菌的生长。屎肠球菌代谢过程中还会产生过氧化氢,细菌素等物质,对致病菌有一定的杀灭作用,而且不发生药残。鉴于屎肠球菌的以上特性,越来越多的厂家选择其进行微生态制剂的发酵生产。

[0003] 传统的乳酸菌发酵多选用 MRS 培养基,价格昂贵,发酵后的活菌数低于  $1 \times 10^9$  CFU/mL,在益生菌有效使用剂量固定的情况下,低发酵水平等于变相的增加了成本。低成本的培养基,高效的放大的发酵工艺对于推进益生菌发酵的产业化有重大指导及实践意义。

### 发明内容

[0004] (一) 发明目的:

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 的低成本高密度发酵培养基;第二个目的是提供一种屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 的高密度液体发酵工艺。

[0006] (二) 技术方案:

[0007] 本发明的目的通过如下方案获得实现:

[0008] 1. 本发明提供了一种饲用屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 的高密度发酵的种子培养基及发酵培养基,其主要成分及含量如下:

[0009] 鱼蛋白胨 15-20g/L、蔗糖 15-25g/L,三水合乙酸钠 3-7g/L,三水合磷酸氢二钾 1-4g/L,柠檬酸铵 1-4g/L,七水合硫酸镁 0.05-0.4g/L,一水合硫酸锰 0.02-0.2g/L、吐温 80 0.5-2g/L。

[0010] 2. 本发明提供的种子培养基配制方法如下:

[0011] 称取培养基各组分,充分溶解后,用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,定容至所需体积,121℃ 灭菌 20 分钟。

[0012] 3. 本发明提供的发酵培养基的配制方法如下:

[0013] (1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液,装液量为 50-70%,0.11-0.16Mpa 灭菌 1h,冷却后放液,用自来水冲洗发酵罐 2-4 次后放空发酵罐。

[0014] (2) 先称取鱼蛋白胨,加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0015] (3) 依次称取加入其它培养基组分,补加自来水至发酵罐总体积的 50-70%。

[0016] (4) 40℃,100rpm 保温 1h,用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后,0.11-0.16Mpa 灭菌 20-40 分钟。待温度稳定在 40℃ 时,校正溶氧为 100%。

[0017] (5) 灭菌后的培养基在 37-42℃,50rpm,不通气条件下空培至接种前。

[0018] 4. 本发明提供的一级摇瓶种子液的培养方法：

[0019] 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)WEI-10 CGMCC No. 7746 斜面 (斜面为 MRS 琼脂培养基,成分参照 GB 478935-2010,下同),接种至种子摇瓶培养基中,37-42℃静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

[0020] 5. 本发明提供的 50L 发酵罐规模条件下的高密度发酵工艺如下：

[0021] (1) 发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检,确保无杂菌污染。

[0022] (2) 接种前将 50L 发酵罐转速调至 100rpm,并用灭菌的 40%氢氧化钠溶液调节发酵培养基的 pH 至 7.5-8.5 后,按照 0.5-4%的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

[0023] (3) 发酵。发酵参数设定为:温度 37-42℃;转速 100rpm;不通气;发酵液 pH 下限设定为 6.4-6.8,当 pH 降至设定值以下时,自动补氨水使 pH 维持在设定值;发酵开始 4.5-5.5h,第一次补加 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%;发酵液的 pH 不再下降时,第二次补 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%;发酵结束时间设定为 12-18h。

[0024] 6. 本发明提供的 5 吨发酵罐规模条件下的高密度发酵工艺如下：

[0025] (1) 先进行一级摇瓶种子液的培养。

[0026] (2) 在 100L 发酵罐中配制二级种子培养基,培养前对二级种子培养基及一级种子液进行镜检,确保无杂菌污染。接种前将 100L 发酵罐转速调至 100rpm,并用灭菌的 40%氢氧化钠溶液调二级种子培养基 pH 至 7.5-8.5 后,按照 0.5-2%的接种量将一级摇瓶种子液接入 100L 发酵罐中,发酵 10h 结束作为二级种子液。

[0027] (3) 进行 5 吨发酵罐发酵前,对发酵培养基及二级种子液进行镜检,确保无杂菌污染。接种前将 5 吨发酵罐转速调至 100rpm,并用灭菌的 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 7.5-8.5 后,将二级种子液全部转接至 5 吨发酵罐中进行发酵。发酵参数设定为:温度 37-42℃;转速 100rpm;不通气;发酵液 pH 下限设定为 6.4-6.8,当 pH 降至设定值以下时,自动补氨水使 pH 维持在设定值;发酵开始 4.5-5.5h,第一次补加 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%;发酵液的 pH 不再下降时,第二次补 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%;发酵结束时间设定为 12-18h。

[0028] (三) 意义：

[0029] 本发明优化了屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)WEI-10CGMCC No. 7746 的高密度发酵的种子培养基和发酵培养基,通过发酵过程中流加氨水控制发酵液 pH 和分批补加蔗糖的策略,实现了屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)WEI-10CGMCC No. 7746 的高密度发酵,50L 发酵罐规模条件下活菌数达到  $2.5 \times 10^{10}$ CFU/mL,5 吨发酵罐规模条件下活菌数达到  $2.9 \times 10^{10}$ CFU/mL,分别是相同发酵规模条件下传统 MRS 培养基分批发酵活菌数的 34 倍和 36 倍以上,活菌数在已报道的屎肠球菌高密度发酵中是最高的,培养基成本比 MRS 培养基降低了 23.17%,实现了作为微生态制剂屎肠球菌的低成本、高效率的生产。

## 附图说明

[0030] 图 1 为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)WEI-10CGMCC No. 7746 分别在高密度发酵培养基和传统 MRS 培养基中发酵生长曲线的比较。

[0031] 图 2 为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)WEI-10CGMCC No. 7746 在不同碱性 pH 中和剂流加条件下的发酵生长曲线。

[0032] 图3为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 在不同恒定 pH 条件下的发酵生长曲线。

[0033] 图4为屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 在5吨发酵罐规模条件下的高密度发酵生长曲线。

### 具体实施方式

[0034] 下列具体实施例可以更好地说明本发明,但本发明的应用范围并不仅限于以下实施例。

[0035] 本发明所选用的菌株为本单位从健康仔猪肠道中分离得到,经16S rRNA及生化鉴定,确定为屎肠球菌,命名为WEI-10。并于2013年6月19日送中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心保藏,编号为CGMCC No. 7746,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院中科院微生物研究所邮编:100101 电话:86-10-64807596。

[0036] 实施例一:高密度种子培养基和发酵培养基的配制及发酵活菌数的比较

[0037] 1. 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 的高密度发酵种子培养基和发酵培养基的主要成分及含量如下:

[0038] 鱼蛋白胨 15-20g/L,蔗糖 15-25g/L,三水合乙酸钠 3-7g/L,三水合磷酸氢二钾 1-4g/L,柠檬酸铵 1-4g/L,七水合硫酸镁 0.05-0.4g/L,一水合硫酸锰 0.02-0.2g/L、吐温 80 0.5-2g/L。

[0039] 优选的种子和发酵培养基的成分和组成为:鱼蛋白胨 17g/L、蔗糖 19g/L,三水合乙酸钠 5g/L,三水合磷酸氢二钾 2g/L,柠檬酸铵 2g/L,七水合硫酸镁 0.2g/L,一水合硫酸锰 0.05g/L,吐温 80 1g/L。

[0040] 2. 种子摇瓶培养基配制方法如下:

[0041] 称取培养基各组分,充分溶解后,用40%氢氧化钠溶液调pH至8.0,定容至所需体积,121℃灭菌20分钟。

[0042] 3. 发酵罐培养基配制方法如下:

[0043] (1) 发酵罐中装入17g/L氢氧化钠溶液,装液量为60%,0.11-0.16Mpa灭菌1h,冷却后放液,用自来水冲洗发酵罐2次后放空发酵罐。

[0044] (2) 先称取鱼蛋白胨,加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0045] (3) 依次称取加入其它培养基组分,补加自来水至发酵罐总体积的60%。

[0046] (4) 40℃,100rpm保温1h,用40%氢氧化钠溶液调pH至8.0后,0.14Mpa灭菌40分钟。待温度稳定在40℃时,校正溶氧为100%。

[0047] (5) 灭菌后的培养基在40℃,50rpm,不通气条件下空培至接种前。

[0048] 4. 50L发酵罐的发酵:

[0049] (1) 挑取新鲜培养的WEI-10斜面,接种至种子摇瓶培养基中,40℃静置培养10h作为一级摇瓶种子液。

[0050] (2) 发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检,确保无污染。

[0051] (3) 接种前将50L发酵罐转速调至100rpm,并用灭菌的40%氢氧化钠溶液调pH至8.0后,按照2%的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

[0052] (4) 发酵参数设定:发酵温度40℃,转速100rpm,不通气。发酵16h后停止发酵。

[0053] 5. 对照试验：

[0054] (1) 传统 MRS 培养基的主要成分及含量为：

[0055] 蛋白胨 10g/L, 牛肉粉 5g/L, 酵母粉 4g/L, 葡萄糖 20g/L, 三水合乙酸钠 5g/L, 七水合磷酸氢二钾 2g/L, 柠檬酸铵 2g/L, 七水合硫酸镁 0.2g/L, 四水合硫酸锰 0.05g/L, 吐温 80 1mL/L。

[0056] (2) 种子摇瓶培养基配制方法如下：

[0057] 称取培养基各组分, 充分溶解后, 用冰醋酸调 pH 至 6.2, 定容至所需体积, 121℃ 灭菌 15 分钟。

[0058] (3) 发酵罐培养基配制方法如下：

[0059] 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液, 装液量为 60%, 0.11-0.16Mpa 灭菌 1h, 冷却后放液, 用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。称取培养基各组分, 加入适量自来水搅拌至充分溶解, 补加自来水至发酵罐总体积的 60%。40℃, 100rpm 保温 1h, 用冰醋酸调 pH 至 6.2 后, 0.12Mpa 灭菌 30 分钟。待温度稳定在 40℃ 时, 校正溶氧为 100%。灭菌后的培养基在 40℃, 50rpm, 不通气条件下空培至接种前。

[0060] (4) 50L 发酵罐的发酵：

[0061] 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 40℃ 静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检, 确保无污染。接种前将 50L 发酵罐 转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 6.2 后, 按照 2% 的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。发酵温度 40℃, 转速 100rpm, 不通气, 发酵 16h 后停止发酵。

[0062] 6. 结果分析: 屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面在优化的高密度种子和发酵培养基中经 50L 发酵罐发酵后的活菌数达到  $5.4 \times 10^9$  CFU/mL, 而在传统 MRS 培养基中经 50L 发酵罐发酵后的活菌数仅为  $7.2 \times 10^8$  CFU/mL, 前者是后者的 7.5 倍, 从培养基成本来看, 前者比后者降低了 23.17%, 因此, 本发明提供的高密度种子培养基和发酵培养基无论从活菌产量还是生产成本上均好于传统 MRS 培养基, 初步实现了屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 的高密度发酵。在此基础上, 优化了该菌的分批补碱补料工艺, 使得屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 的发酵密度进一步提高。

[0063] 实施例二: 最适碱性 pH 中和剂的优化

[0064] 1. 种子和发酵培养基的成分和配制：

[0065] 种子及发酵培养基的主要成分及含量为: 鱼蛋白胨 17g/L、蔗糖 19g/L, 三水合乙酸钠 5g/L, 三水合磷酸氢二钾 2g/L, 柠檬酸铵 2g/L, 七水合硫酸镁 0.2g/L, 一水合硫酸锰 0.05g/L、吐温 80 1g/L。

[0066] 种子摇瓶培养基配制方法如下：

[0067] 称取培养基各组分, 充分溶解后, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0, 定容至所需体积, 121℃ 灭菌 20 分钟。

[0068] 发酵罐培养基配制方法如下：

[0069] (1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液, 装液量为 60%, 0.11-0.16Mpa 灭菌 1h, 冷却后放液, 用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。

[0070] (2) 先称取鱼蛋白胨,加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0071] (3) 依次称取加入其它培养基组分,补加自来水至发酵罐总体积的 60%。

[0072] (4) 40℃,100rpm 保温 1h,用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后,0.14Mpa 灭菌 40 分钟。待温度稳定在 40℃时,校正溶氧为 100%。

[0073] (5) 灭菌后的培养基在 40℃,50rpm,不通气条件下空培至接种前。

[0074] 2. 最适碱性 pH 中和剂的优化:

[0075] (1) 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)WEI-10CGMCC No. 7746 斜面,接种至种子摇瓶培养基中,40℃静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

[0076] (2) 发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检,确保无污染。

[0077] (3) 接种前将 50L 发酵罐转速调至 100rpm,并用灭菌的 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后,按照 2%的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

[0078] (4) 发酵参数设定:发酵温度 40℃;转速 100rpm;不通气;发酵液 pH 下限设定为 6.5。分别选择 40%的 NaOH、40%的 KOH 及氨水作为碱性 pH 中和剂,当 pH 降至设定值以下时,利用发酵系统的自动补碱功能进行自动控制流加,使 pH 维持在设定值,以不进行中和剂流加的分批发酵作为对照。发酵 16h 后停止发酵。每种碱性 pH 中和剂条件下做 3 个批次的平行试验。

[0079] 3. 结果分析:不管采用哪种中和剂,其发酵活菌数均大于不流加碱性 pH 中和剂的活菌数。以 40%的 NaOH 和 40%的 KOH 作为中和剂,发酵活菌数并无明显差异,但是当以 40% NaOH 流加时,最大活菌数为  $7.7 \times 10^9$ CFU/mL;以 40% KOH 流加时,最大活菌数为  $7.2 \times 10^9$ CFU/mL,前者略高于后者;而以氨水作为中和剂,发酵活菌数明显高于前两者,而且在发酵 12h 的时候活菌数出现了进一步的升高,最大活菌数达到  $1.1 \times 10^{10}$ CFU/mL。因此,确定氨水作为本发明的最适碱性 pH 中和剂。

[0080] 实施例三:最适恒定 pH 的优化

[0081] 1. 种子和发酵培养基的成分和配制:

[0082] 种子及发酵培养基的主要成分及含量为:鱼蛋白胨 17g/L、蔗糖 19g/L,三水合乙酸钠 5g/L,三水合磷酸氢二钾 2g/L,柠檬酸铵 2g/L,七水合硫酸镁 0.2g/L,一水合硫酸锰 0.05g/L、吐温 80 1g/L。

[0083] 种子摇瓶培养基配制方法如下:

[0084] 称取培养基各组分,充分溶解后,用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,定容至所需体积,121℃灭菌 20 分钟。

[0085] 发酵罐培养基配制方法如下:

[0086] (1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液,装液量为 60%,0.11-0.16Mpa 灭菌 1h,冷却后放液,用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。

[0087] (2) 先称取鱼蛋白胨,加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0088] (3) 依次称取加入其它培养基组分,补加自来水至发酵罐总体积的 60%。

[0089] (4) 40℃,100rpm 保温 1h,用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后,0.14Mpa 灭菌 40 分钟。待温度稳定在 40℃时,校正溶氧为 100%。

[0090] (5) 灭菌后的培养基在 40℃,50rpm,不通气条件下空培至接种前。

[0091] 2. 最适恒定 pH 的优化



[0092] (1) 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 40℃ 静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

[0093] (2) 发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检, 确保无污染。

[0094] (3) 接种前将 50L 发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后, 按照 2% 的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

[0095] (4) 发酵参数设定: 发酵温度 40℃; 转速 100rpm; 不通气; 以氨水为中和剂, 选定流加过程维持的恒定 pH 值分别为 6.0、6.5 和 7.0, 当 pH 降至设定值以下时, 利用发酵系统的自动补碱功能进行自动控制流加, 使 pH 维持在设定值, 发酵 16h 后停止发酵。每种恒定 pH 条件下做 3 个批次的平行试验。

[0096] 3. 结果分析: 恒定 pH 为 6.5 的条件下发酵活菌数明显高于 pH6.0 和 pH7.0, 达到  $1.1 \times 10^{10}$  CFU/mL。因此, 为了实现菌株 WEI-10 的高密度发酵, 流加 pH 中和剂的时候维持的最适恒定 pH 为 6.5。

[0097] 实施例四: 分批补料发酵实验

[0098] 进行分批补碱的发酵过程中, 测定了发酵液中的总糖含量, 结果表明, 当发酵开始 6h 后, 发酵液的 pH 不再降低, 糖几乎被完全消耗。由此可以推断, 发酵 6h 时, 培养基中的碳源已经消耗殆尽, 菌体无法继续生长, 发酵液 pH 不再降低。由此认为, 在培养基碳源耗尽之前补加碳源, 可能会促进菌体进一步生长, 起到提高活菌数的目的, 所以进行了分批补料发酵实验, 具体如下:

[0099] 1. 种子和发酵培养基的成分和配制:

[0100] 种子及发酵培养基的主要成分及含量为: 鱼蛋白胨 17g/L、蔗糖 19g/L, 三水合乙酸钠 5g/L, 三水合磷酸氢二钾 2g/L, 柠檬酸铵 2g/L, 七水合硫酸镁 0.2g/L, 一水合硫酸锰 0.05g/L、吐温 80 1g/L。

[0101] 种子摇瓶培养基配制方法如下:

[0102] 称取培养基各组分, 充分溶解后, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0, 定容至所需体积, 121℃ 灭菌 20 分钟。

[0103] 发酵罐培养基配制方法如下:

[0104] (1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液, 装液量为 60%, 0.11-0.16Mpa 灭菌 1h, 冷却后放液, 用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。

[0105] (2) 先称取鱼蛋白胨, 加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0106] (3) 依次称取加入其它培养基组分, 补加自来水至发酵罐总体积的 60%。

[0107] (4) 40℃, 100rpm 保温 1h, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后, 0.14Mpa 灭菌 40 分钟。待温度稳定在 40℃ 时, 校正溶氧为 100%。

[0108] (5) 灭菌后的培养基在 40℃, 50rpm, 不通气条件下空培至接种前。

[0109] 2. 分批补料发酵

[0110] (1) 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 40℃ 静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

[0111] (2) 发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检, 确保无污染。

[0112] (3) 接种前将 50L 发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后, 按照 2% 的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

[0113] (4) 发酵参数设定:发酵温度 40℃;转速 100rpm;不通气;以氨水为中和剂,选定流加过程维持的恒定 pH 值为 6.5,当 pH 降至设定值以下时,利用发酵系统的自动补碱功能进行自动控制流加,使 pH 维持在设定值。发酵开始 4.5-5.5h,第一次补加 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%,此时发酵液 pH 继续下降,氨水继续流加;当发酵液的 pH 不再下降时,第二次补 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%,发酵液 pH 再次下降,氨水继续流加,直到 pH 不再下降;发酵 16h 后停止发酵。

[0114] 3、结果分析:通过流加蔗糖浓缩液,为屎肠球菌 WEI-10CGMCC No. 7746 的进一步生长补充碳源,最终获得的最大活菌数为  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/mL,与不补加蔗糖的分批补碱工艺相比,活菌数有了进一步的提高。

[0115] 实施例五:屎肠球菌 WEI-10CGMCC No. 7746 的 50L 发酵罐规模条件下的高密度培养方法

[0116] 1. 种子和发酵培养基的成分和配制:

[0117] 种子及发酵培养基的主要成分及含量为:鱼蛋白胨 17g/L、蔗糖 19g/L,三水合乙酸钠 5g/L,三水合磷酸氢二钾 2g/L,柠檬酸铵 2g/L,七水合硫酸镁 0.2g/L,一水合硫酸锰 0.05g/L、吐温 80 1g/L。

[0118] 种子摇瓶培养基配制方法如下:

[0119] 称取培养基各组分,充分溶解后,用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,定容至所需体积,121℃灭菌 20 分钟。

[0120] 发酵罐培养基配制方法如下:

[0121] (1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液,装液量为 60%,0.11-0.16Mpa 灭菌 1h,冷却后放液,用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。

[0122] (2) 先称取鱼蛋白胨,加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0123] (3) 依次称取加入其它培养基组分,补加自来水至发酵罐总体积的 60%。

[0124] (4) 40℃,100rpm 保温 1h,用 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后,0.14Mpa 灭菌 40 分钟。待温度稳定在 40℃时,校正溶氧为 100%。

[0125] (5) 灭菌后的培养基在 40℃,50rpm,不通气条件下空培至接种前。

[0126] 2. 50L 发酵罐规模条件下的高密度发酵

[0127] (1) 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面,接种至种子摇瓶培养基中,40℃静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

[0128] (2) 发酵前对发酵培养基及一级摇瓶种子液进行镜检,确保无污染。

[0129] (3) 接种前将 50L 发酵罐转速调至 100rpm,并用灭菌的 40%氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后,按照 2%的接种量将一级摇瓶种子液接入发酵罐中。

[0130] (4) 发酵参数设定:发酵温度 40℃;转速 100rpm;不通气;以氨水为中和剂,选定流加过程维持的恒定 pH 值为 6.5,当 pH 降至设定值以下时,利用发酵系统的自动补碱功能进行自动控制流加,使 pH 维持在设定值。发酵开始 4.5-5.5h,第一次补加 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%,此时发酵液 pH 继续下降,氨水继续流加;当发酵液的 pH 不再下降时,第二次补 500g/L 的蔗糖,补加量为发酵液体积的 2%,发酵液 pH 再次下降,氨水继续流加,直到 pH 不再下降;发酵 16h 后停止发酵。

[0131] 3. 结果分析:50L 发酵罐规模条件下屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)

WEI-10CGMCC No. 7746 高密度发酵的活菌数达到  $2.5 \times 10^{10}$  CFU/mL, 是传统 MRS 培养基分批发酵活菌数的 34 倍以上, 活菌数在已报道的屎肠球菌高密度发酵中是最高的。

[0132] 实施例六: 屎肠球菌 WEI-10CGMCC No. 7746 的 5 吨发酵罐规模条件下的高密度培养方法

[0133] 1. 种子和发酵培养基的成分和配制:

[0134] 种子及发酵培养基的主要成分及含量为: 鱼蛋白胨 17g/L、蔗糖 19g/L, 三水合乙酸钠 5g/L, 三水合磷酸氢二钾 2g/L, 柠檬酸铵 2g/L, 七水合硫酸镁 0.2g/L, 一水合硫酸锰 0.05g/L、吐温 80 1g/L。

[0135] 种子摇瓶培养基配制方法如下:

[0136] 称取培养基各组分, 充分溶解后, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0, 定容至所需体积, 121°C 灭菌 20 分钟。

[0137] 发酵罐培养基配制方法如下:

[0138] (1) 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液, 装液量为 60%, 0.11-0.16Mpa 灭菌 1h, 冷却后放液, 用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。

[0139] (2) 先称取鱼蛋白胨, 加入适量自来水搅拌至充分溶解。

[0140] (3) 依次称取加入其它培养基组分, 补加自来水至发酵罐总体积的 60%。

[0141] (4) 40°C, 100rpm 保温 1h, 用 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后, 0.14Mpa 灭菌 40 分钟。待温度稳定在 40°C 时, 校正溶氧为 100%。

[0142] (5) 灭菌后的培养基在 40°C, 50rpm, 不通气条件下空培至接种前。

[0143] 2. 种子液制备

[0144] (1) 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 40°C 静置培养 10h 作为一级摇瓶种子液。

[0145] (2) 在 100L 发酵罐中配制二级种子培养基, 培养前对二级种子培养基及一级摇瓶种子液进行镜检, 确保无杂菌污染。

[0146] (3) 接种前将 100L 发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调二级种子培养基 pH 至 8.0 后, 按照 1% 的接种量将一级种子液接入 100L 发酵罐中。

[0147] (4) 发酵参数设定: 发酵温度 40°C; 转速 100rpm; 不通气; 不流加氨水及蔗糖, 发酵 10h 结束作为二级种子液。

[0148] 3. 5 吨发酵罐规模条件下的高密度发酵

[0149] (1) 发酵前对发酵培养基及二级种子液进行镜检, 确保无污染。

[0150] (2) 接种前将 5 吨发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0 后, 将二级种子液全部转接至 5 吨发酵罐中进行发酵。

[0151] (3) 发酵参数设定为: 温度 40°C; 转速 100rpm; 不通气; 发酵液 pH 下限设定为 6.5, 当 pH 降至设定值以下时, 自动补氨水使 pH 维持在设定值; 发酵开始 4.5-5.5h, 第一次补加 500g/L 的蔗糖, 补加量为发酵液体积的 2%; 发酵液的 pH 不再下降时, 第二次补 500g/L 的蔗糖, 补加量为发酵液体积的 2%; 发酵结束时间设定为 16h。

[0152] 4. 对照试验:

[0153] (1) 传统 MRS 培养基的主要成分及含量为:

[0154] 蛋白胨 10g/L, 牛肉粉 5g/L, 酵母粉 4g/L, 葡萄糖 20g/L, 三水合乙酸钠 5g/L, 七水

合磷酸氢二钾 2g/L, 柠檬酸铵 2g/L, 七水合硫酸镁 0.2g/L, 四水合硫酸锰 0.05g/L, 吐温 80 1mL/L。

[0155] (2) 种子摇瓶培养基配制方法如下：

[0156] 称取培养基各组分, 充分溶解后, 用冰醋酸调 pH 至 6.2, 定容至所需体积, 121℃ 灭菌 15 分钟。

[0157] (3) 发酵罐培养基配制方法如下：

[0158] 发酵罐中装入 17g/L 氢氧化钠溶液, 装液量为 60%, 0.11-0.16Mpa 灭菌 1h, 冷却后放液, 用自来水冲洗发酵罐 2 次后放空发酵罐。称取培养基各组分, 加入适量自来水搅拌至充分溶解, 补加自来水至发酵罐总体积的 60%。40℃, 100rpm 保温 1h, 用冰醋酸调 pH 至 6.2 后, 0.12Mpa 灭菌 30 分钟。待温度稳定在 40℃ 时, 校正溶氧为 100%。灭菌后的培养基在 40℃, 50rpm, 不通气条件下空培至接种前。

[0159] (4) 5 吨发酵罐的发酵：

[0160] 挑取新鲜培养的屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 斜面, 接种至种子摇瓶培养基中, 40℃ 静置培养 10h 作为一级种子液。在 100L 发酵罐中配制二级种子培养基, 培养前对二级种子培养基及一级种子液进行镜检, 确保无杂菌污染。发酵前对发酵培养基及二级种子液进行镜检, 确保无污染。接种前将 5 吨发酵罐转速调至 100rpm, 并用灭菌的 40% 氢氧化钠溶液调 pH 至 6.2 后, 将二级种子液全部接入发酵罐中。发酵温度 40℃, 转速 100rpm, 不通气, 发酵 16h 后停止发酵。

[0161] 5. 结果分析: 5 吨发酵罐规模条件下屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 高密度发酵的活菌数达到  $2.9 \times 10^{10}$  CFU/mL, 而在传统 MRS 培养基中采用分批发酵方式获得的最大活菌数为  $8.0 \times 10^8$  CFU/mL, 因此, 高密度发酵的活菌数是传统 MRS 培养基分批发酵活菌数的 36 倍以上, 完全满足屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) WEI-10CGMCC No. 7746 作为饲用乳酸菌的生产要求。

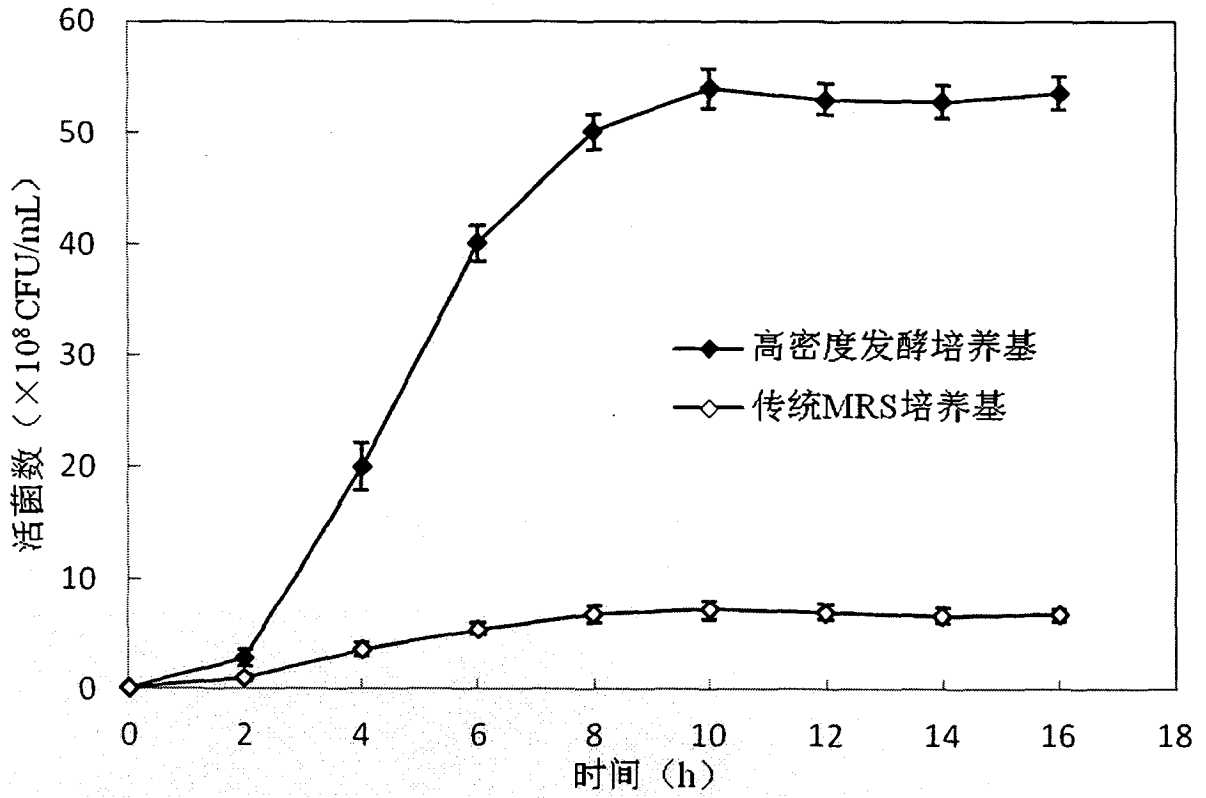


图 1

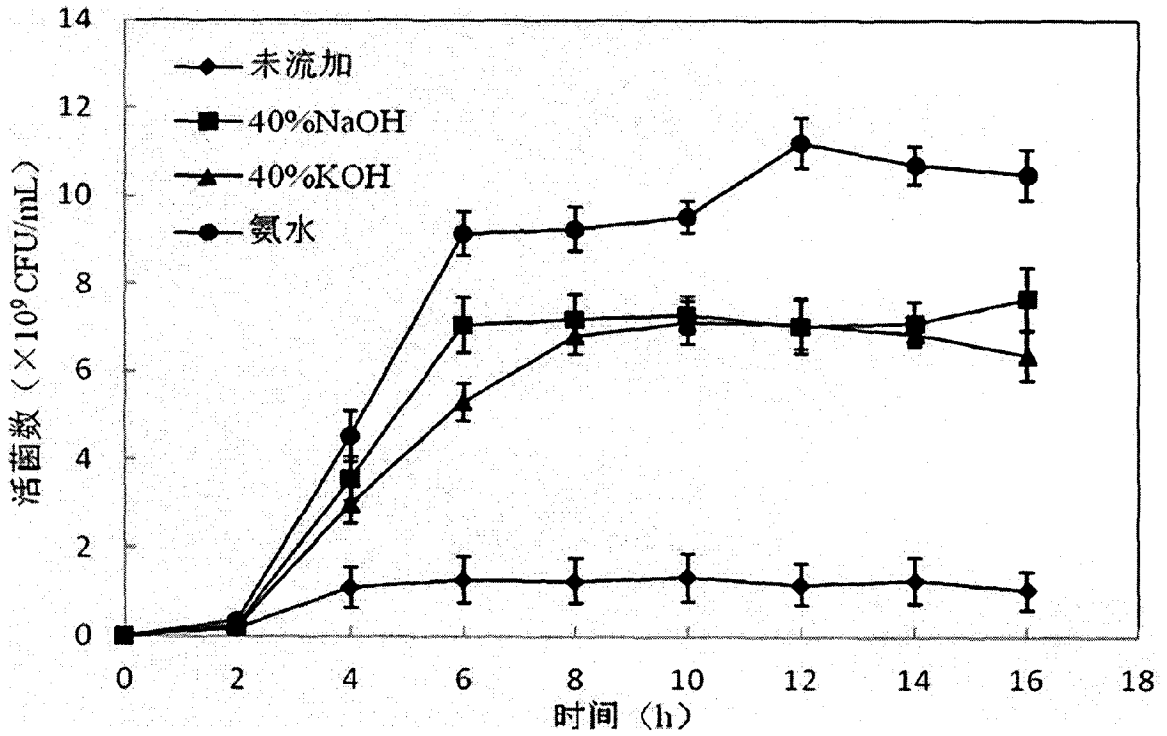


图 2

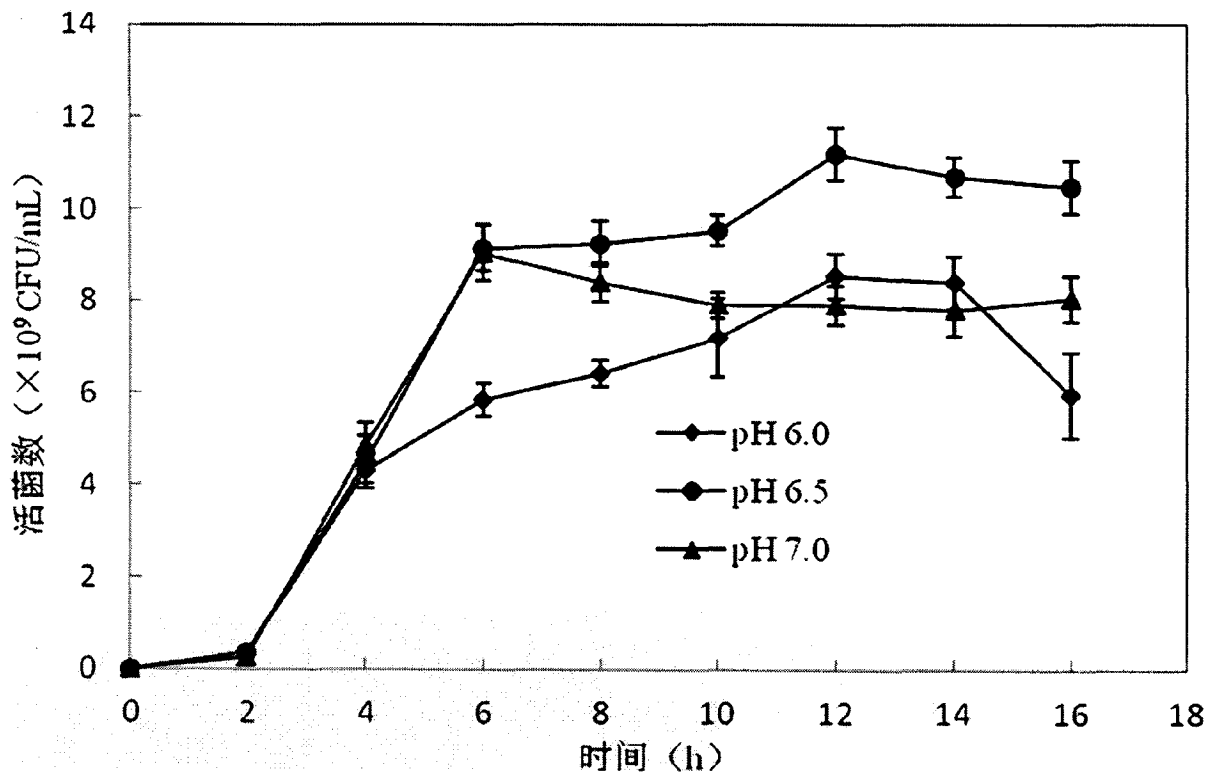


图 3

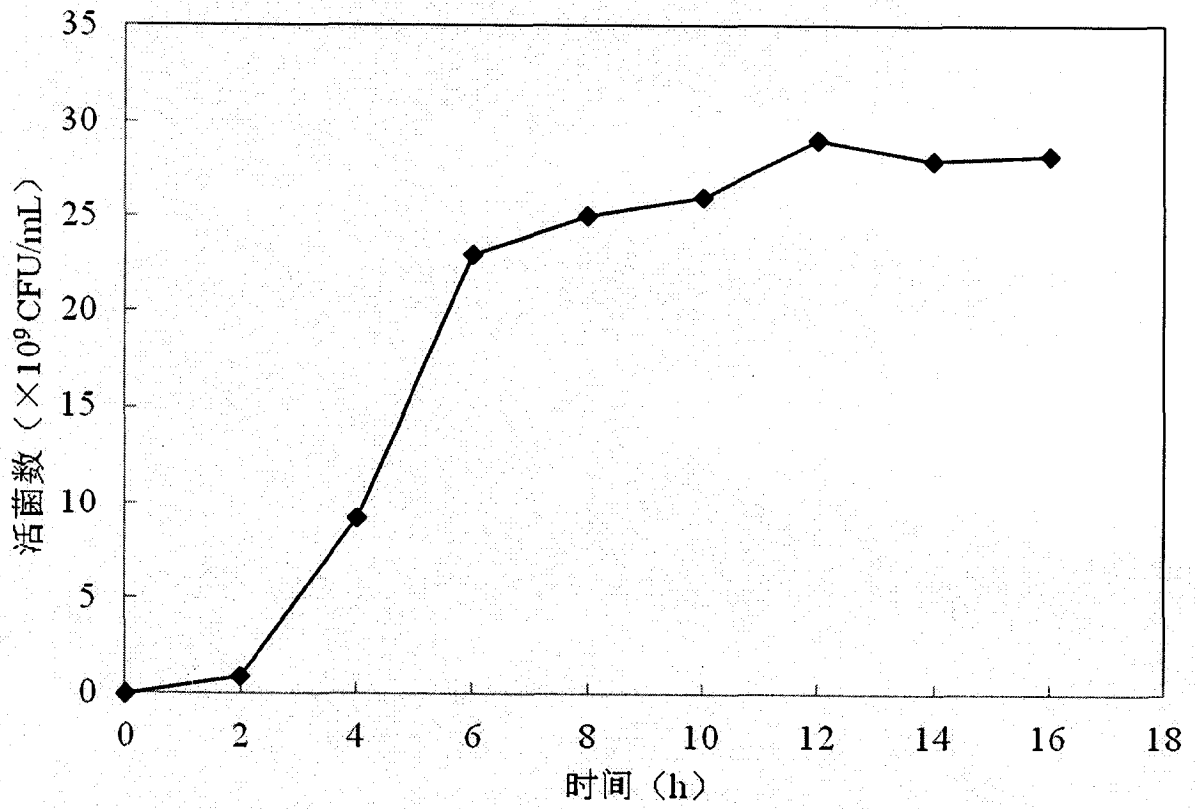


图 4