

培养条件对 *Streptococcus equisimilis* 合成透明质酸相对分子质量的影响

刘金龙^{1,2}, 赵国群^{1,2*}, 李志敏¹, 高敏杰^{2,3}

(1. 河北科技大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050000; 2. 河北省发酵工程技术研究中心, 河北 石家庄 050000; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 作者比较了不同培养条件对 *Streptococcus equisimilis* 合成透明质酸相对分子质量的影响。结果表明:高质量浓度葡萄糖有利于长链透明质酸的合成,当发酵体系葡萄糖初始质量浓度从 20 g/L 上升至 80 g/L,相对分子质量从 1.24×10^6 增大到 2.02×10^6 ,提高了 62.9%。葡萄糖补料培养不利于高相对分子质量透明质酸的合成,利用葡萄糖间歇和连续补料培养的方式得到透明质酸相对分子质量分别为 1.53×10^6 和 1.42×10^6 ,比分批培养下降了 19.9% 和 25.7%。在 33~39 °C 范围内,较低温度有利于高相对分子质量透明质酸的合成,在 33 °C 培养条件下透明质酸相对分子质量最高可达 2.54×10^6 。发酵液 pH 显著影响透明质酸的相对分子质量,在 pH 8 时,达到了最高的 2.38×10^6 。较高溶氧水平有利于高相对分子质量透明质酸的合成,在 0~45% 溶氧浓度范围内,相对分子质量随溶氧水平的增加从 1.16×10^6 提升至 2.43×10^6 ,增长了 109.4%。本研究结果为后续高相对分子质量透明质酸的生产提供有用的实验依据。

关键词: 透明质酸;相对分子质量;*Streptococcus equisimilis*;培养条件

中图分类号: TQ 920 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)02—0209—06

Effect of Culture Condition on the Molecular Weight of Hyaluronic Acid Synthesized by *Streptococcus equisimilis*

LIU Jinlong^{1,2}, ZHAO Guoqun^{1,2*}, LI Zhimin¹, GAO Minjie^{2,3}

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, China; 2. Research Center for Fermentation Engineering of Hebei, Shijiazhuang 050000, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The molecular weight of hyaluronic acid significantly affected its physicochemical properties and application effects. Effects of different culture conditions on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus equisimilis* was compared, the results of which indicated that glucose with high concentration benefited the synthesis of long-chain hyaluronic acid.

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 河北省科技支撑项目(14222902B)。

作者简介: 刘金龙(1980—),男,河北石家庄人,工学博士,讲师,主要从事微生物多糖与农用微生物菌剂的研究与开发。

E-mail: jlliu18@126.com

* 通信作者: 赵国群(1963—),男,河北石家庄人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生化工程方面研究。E-mail: gqzhao18@126.com

The concentration of glucose had significantly effect on the molecular weight of hyaluronic acid. With the initial concentration of glucose enhancing from 20 g/L to 80 g/L, the molecular weight of hyaluronic acid was increased to 2.02×10^6 from 1.24×10^6 , i.e., increased by 62.9%. Feeding mode of glucose significantly affected the molecular weight of hyaluronic acid. The molecular weight of hyaluronic acid was respectively 1.53×10^6 and 1.42×10^6 through interval and continuous feeding modes of glucose, which was decreased by 19.9% and 25.7% by comparing with batch culture. Low temperature was beneficial to the synthesis of high-molecular-weight hyaluronic acid. Under the culture condition of 33 °C, the molecular weight of hyaluronic acid could reach to 2.54×10^6 at the maximum. pH also significantly affected the molecular weight of hyaluronic acid. When pH was 8, the molecular weight of hyaluronic acid reached to the highest 2.38×10^6 . Dissolved oxygen with higher level benefited the sythesis of high -molecular weight hyaluronic acid, within the concentration range of 0~45% of dissolved oxygen, the molecular weight was increased to 2.43×10^6 from 1.16×10^6 with the increasing concentration of dissovled oxygen, increased by 109.4%.

Keywords: hyaluronic acid, molecular weight, *Streptococcus equisimilis*, culture conditon

透明质酸(Hyaluronic acid, HA)是由葡萄糖醛酸与 N-乙酰氨基葡萄糖组成的双糖单位重复连接而成的一种重要微生物多糖,相对分子质量显著影响其理化特性与应用效果^[1-2]。相对分子质量大于 10^4 的透明质酸具备优异的保湿性、黏弹性以及润滑作用,被广泛应用于医药、食品以及化妆品领域。低相对分子质量($2 \sim 3.5 \times 10^3$)透明质酸在促血管生成、抗肿瘤、保护关节方面具有良好的应用前景^[3-5]。微生物发酵法是目前透明质酸的主要生产方法,但是由于缺乏调控透明质酸相对分子质量的理论与技术,附加值较高的低相对分子质量和高相对分子质量透明质酸产品,占发酵总产量的比例并不高^[5]。因此,深入探索透明质酸相对分子质量的影响规律,具有十分重要的现实意义。

C 组链球菌 *Streptococcus zooepidemicus*、*Streptococcus equisimilis* 等是合成透明质酸的常用生产菌株,培养条件和培养方式显著影响透明质酸的产量,这一点已被许多报道所证明^[6-8]。但迄今为止有关透明质酸相对分子质量影响因素的报道较少。本研究旨在通过考察和比较 *S. equisimilis* 在不同温度、pH、溶氧和营养水平以及补料方式下合成透明质酸的相对分子质量,确定培养条件对透明质酸相对分子质量的影响规律,为实现高品质透明质酸的生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

马链球菌(*Streptococcus equisimilis*):由河北省发酵工程技术研究中心保藏;牛脑浸粉、牛心浸粉、酵母粉、蛋白胨:购自北京奥博星生物技术有限责任公司, BR 级;磷酸氢二钾、四硼酸钠、咪唑、氯化钠、氢氧化钠、无水乙醇、硫酸镁、硫酸:均购自天津江天化工技术有限公司,分析纯;葡萄糖醛酸,购自 Sigma,分析纯。

Biotech-5BG 发酵罐:上海保兴生物工程设备有限公司;752 型紫外分光光度计:上海光谱仪器有限公司;ZWY-1102 双层恒温摇床:上海智城分析仪器有限公司;TGL16M 型离心机:长沙市易达科贸公司;SW-CJ-2FD 型超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司;YXQ-LS-18SI 型自动手提式灭菌器:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;HG72-1 恒温干燥箱:北京市朝阳区来广营医疗器械厂;XS-18 型光学显微镜:北京发恩科贸有限公司;OMP200A 型分析天平:上海第二天平仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基

1)斜面培养基:牛脑浸粉 12 g/L,牛心浸粉 6 g/L,蛋白胨 10 g/L,葡萄糖 2 g/L,氯化钠 5 g/L, K_2HPO_4 2.5 g/L,琼脂 20 g/L;自然 pH。

2)种子培养基:葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母粉 10 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, K_2HPO_4 2 g/L;调 pH 7.0。

3)发酵基础培养基:葡萄糖 60 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母粉 10 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, K_2HPO_4 2 g/L;调 pH 7.0。在实验过程中,根据需要调整葡萄糖质量浓度和 pH 值。

1.2.2 培养方法

1)种子培养:将 1~2 环斜面种子培养物接种至装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中培养,摇床转速 250 r/min,温度 37 ℃,培养 12~14 h。

2)分批培养:5 L 发酵罐中添加发酵培养基体积为 4 L,接种体积分数 5%,初始葡萄糖质量浓度定为 60 g/L,发酵过程维持温度 37 ℃,通气量 1 vvm,搅拌转速为 400 r/min,通过流加 4 mol/L 氢氧化钠溶液控制 pH 7。将初始葡萄糖浓度分别设定为 20、40、60、80 g/L 四个梯度进行实验,其他条件同分批培养。将温度分别设为 33、35、37、39 ℃ 4 个梯度进行实验,其它条件同分批培养。将 pH 分别设为自然发酵(不控制)、pH 6、pH 7、pH 8 四种方式进行实验,其它条件同分批培养。通过调整搅拌转速(50~1 000 r/min)或者氮气和氧气与空气输入比例,将溶氧水平分别设置为 0、15%、30%、45% 四个梯度进行实验,其它条件同分批培养。

3)葡萄糖补料培养:间歇补料培养是将葡萄糖质量浓度初始设定为 10 g/L,发酵过程中分别在 4、8、12、16 h 补加 50 g 葡萄糖,其它条件同分批培养;连续补料培养是将葡萄糖初始质量浓度设定为 10 g/L,从发酵 4 h 开始以 100 mL/h 的速率流加 200 g/L 的葡萄糖溶液,其它条件同分批培养。所有补料培养方式葡萄糖总量与分批培养方式相等。

1.2.3 菌体浓度的测定 采用紫外可见分光光度计法。将培养液稀释一定倍数,在 660 nm 处测其 OD 值,根据 OD 值与细胞干重关系式得菌体浓度。

1.2.4 透明质酸浓度测定 采用 Bitter-Muir 氏法^[9]。

1.2.5 相对分子质量测定 采用 Laurent 的特性粘度法^[10]。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖初始质量浓度对透明质酸相对分子质量的影响

如图 1 所示,在葡萄糖初始质量浓度从 20 g/L

上升至 80 g/L 的过程中,菌体浓度、透明质酸产量以及相对分子质量均呈上升趋势,各自从 3.21 g/L、0.92 g/L 和 1.24×10^6 提高到 8.44 g/L、4.33 g/L 和 2.02×10^6 ,分别提高了 162.9%、370.7%和 62.9%。说明葡萄糖初始质量浓度显著影响菌体生长和透明质酸合成。

葡萄糖为菌体生长提供碳源和能量,因此葡萄糖的多寡直接影响着菌体的生长状况。此外,葡萄糖是组成透明质酸结构的基本双糖单位——葡萄糖醛酸与 N-乙酰氨基葡萄糖胺的基础前体物质^[11]。因此透明质酸产量以及相对分子质量均受到葡萄糖质量浓度的显著制约。总之,作为菌体生长和产物合成的共同必需资源,葡萄糖的供给水平决定着菌体和产物的合成效率,进而影响透明质酸的相对分子质量。

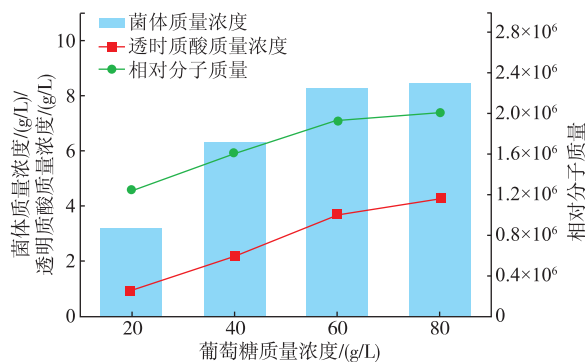


图 1 不同葡萄糖初始质量浓度对透明质酸发酵的影响
Fig. 1 Effects of initial concentration of different glucose on the fermentation of hyaluronic acid

2.2 葡萄糖补料培养对透明质酸相对分子质量的影响

在考察葡萄糖初始质量浓度对透明质酸相对分子质量影响的基础上,进一步考察了葡萄糖补料培养对透明质酸相对分子质量的影响。如表 1 所示,相对分子质量受到葡萄糖补料方式的显著影响,分批培养方式下得到的透明质酸相对分子质量最大,达到 1.91×10^6 ;采用葡萄糖间歇和连续补料培养的方式,透明质酸的相对分子质量分别为 1.53×10^6 和 1.42×10^6 ,与分批培养相比,分别下降了 19.9%和 25.7%。不同培养方式下,透明质酸的产量与相对分子质量的变化趋势一致,分批培养条件下,产量为 3.74 g/L,间歇和连续补料培养条件下,透明质酸产量分别为 3.43 g/L 和 2.96 g/L。

值得一提的是,在本研究采用的三种不同培养

方式下,最大菌体浓度与产量和相对分子质量变化趋势正好相反,分批培养条件下,最大菌体质量浓度为 8.22 g/L,间歇和连续补料培养条件下,菌体质量浓度分别为 9.93 g/L 和 11.11 g/L。当菌体质量浓度升高的情况下,透明质酸的产量和相对分子质量反而下降。

采用葡萄糖补料培养的方式,可以在一定程度

上消除高浓度底物和副产物乳酸对菌体生长的抑制,有利于菌体浓度的快速积累;另一方面,与分批培养相比,葡萄糖补料培养的方式使底物葡萄糖的质量浓度在透明质酸发酵过程中处于较低的水平,这会加剧菌体生长与透明质酸合成竞争葡萄糖资源的程度,作为次级代谢产物的透明质酸在竞争中处于弱势。

表 1 补料培养方式对透明质酸发酵的影响

Table 1 Effect of feeding method on the fermentation of hyaluronic acid

培养模式	菌体质量浓度/(g/L)	产量/(g/L)	相对分子质量 $\times 10^6$	最大比生长速率/ h^{-1}	产率/%
分批培养	8.22 $\pm$ 0.13	3.74 $\pm$ 0.13	1.91 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.13	0.041 $\pm$ 0.004
间歇补料培养	9.93 $\pm$ 0.19	3.43 $\pm$ 0.23	1.53 $\pm$ 0.13	1.15 $\pm$ 0.23	0.032 $\pm$ 0.002
连续补料培养	11.11 $\pm$ 0.33	2.96 $\pm$ 0.17	1.42 $\pm$ 0.11	1.23 $\pm$ 0.18	0.028 $\pm$ 0.004

2.3 培养温度对透明质酸相对分子质量的影响

培养温度是影响微生物发酵的一个重要环境因素,菌体生长和产物合成需要适宜的培养温度,通常情况下,次生代谢产物合成的适宜温度与菌体生长的适宜温度并不一致,见图 2。低温有利于透明质酸的合成,表现为低温条件下透明质酸产量和相对分子质量较高,在 33 °C 培养条件下,透明质酸产量和相对分子质量最高,分别达到了 4.41 g/L 和 2.54×10^6 。高温有利于菌体生长,在 39 °C 培养条件下,菌体质量浓度达到了 8.72 g/L。

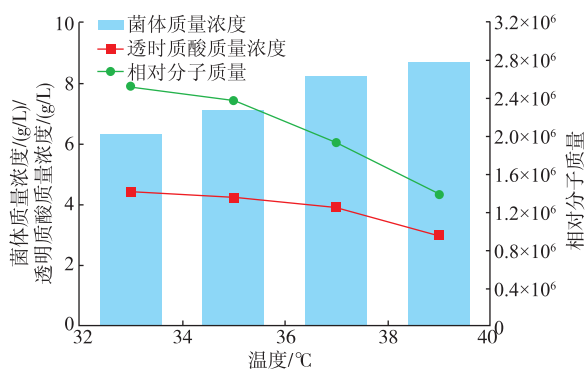


图 2 不同培养温度对透明质酸发酵的影响

Fig. 2 Effects of different culture temperature on the fermentation of hyaluronic acid

一般情况下,细菌的最适培养温度为 37 °C,而本实验中 *S.equisimilis* 的最适宜培养温度为 39 °C,这说明该菌为嗜热菌株,这与链球菌属的一些嗜热菌株类似,如嗜热链球菌和粪链球菌等。较低温度有利于透明质酸合成,推测这可能是由于低温菌

体生长缓慢,与透明质酸的资源竞争弱化,促进了产物合成效率的提高。

2.4 培养 pH 对透明质酸相对分子质量的影响

同温度一样,pH 也是微生物发酵过程中显著影响菌体生长和产物合成的一个关键环境因素。表 2 显示的是不同的 pH 控制方式对透明质酸发酵的影响,可以看出 pH 对于透明质酸相对分子质量影响显著,在不控制 pH 的自然发酵状态下,透明质酸最终相对分子质量只有 0.81×10^6 。乳酸是实验菌株 *S.equisimilis* 的主要代谢产物,大部分摄入的葡萄糖(约 80%)都被菌株转化为乳酸,所以在发酵过程中,如果不补加碱性物质,发酵体系 pH 下降很快,最低可降至 pH 3 左右,这严重抑制了菌体生长和产物合成,导致菌体浓度积累、透明质酸产量和相对分子质量均处于较低水平。

分别将培养环境 pH 控制在弱酸性 pH 6、中性 pH 7、弱碱性 pH 8 的条件下,菌体生长差异不显著,菌体浓度在三种培养条件下分别为 7.75、8.21、8.14 g/L;但是透明质酸的产量和相对分子质量受 pH 影响显著,产量在 pH 7 时最高,达到了 3.72 g/L,比最低水平 3.01 g/L(pH 8)提高了 23.6%;而相对分子质量在 pH 8 时,达到了最高的 2.38×10^6 ,比最低水平 1.62×10^6 (pH 6)提高了 46.9%。

在 pH 7 和 pH 8 两种培养条件下,菌体生长无明显差异,但前者产量显著高于后者,而后者相对分子质量显著高于前者,在透明质酸合成效率较高状态下(pH 7),产物相对分子质量反而较低(与 pH 8 相比),这说明透明质酸的相对分子质量不仅与产

表 2 pH 对透明质酸发酵的影响

Table 2 Effect of pH on the fermentation of hyaluronic acid

培养模式	菌体质量浓度/(g/L)	产量/(g/L)	相对分子质量 $\times 10^6$	最大比生长速率/ h^{-1}	产率/%
pH 不控制	2.13 $\pm$ 0.16	0.72 $\pm$ 0.12	0.81 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.07	0.017 $\pm$ 0.003
pH 6	7.75 $\pm$ 0.23	3.13 $\pm$ 0.23	1.62 $\pm$ 0.12	0.65 $\pm$ 0.11	0.036 $\pm$ 0.002
pH 7	8.21 $\pm$ 0.21	3.72 $\pm$ 0.15	1.93 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.08	0.041 $\pm$ 0.003
pH 8	8.14 $\pm$ 0.09	3.01 $\pm$ 0.15	2.38 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.13	0.038 $\pm$ 0.003

物合成过程有关,还可能受到其他因素比如多糖跨膜分泌的调控。

2.5 溶氧条件对透明质酸相对分子质量的影响

如图 3 所示,在溶氧浓度从 0 上升至 45%过程中,菌体浓度、透明质酸产量以及相对分子质量均呈上升趋势,其中相对分子质量上升趋势最为显著,从 1.16×10^6 提高至 2.43×10^6 ,提高了 109.4%。菌体质量浓度在溶氧浓度从 0 上升至 30%过程中,增加显著,从 4.72 g/L 增加到 8.73 g/L,而透明质酸产量在溶氧质量浓度从 0 上升至 15%过程中增加最为显著,从 0.72 g/L 增加到 3.63 g/L。

S.equisimili 是兼性菌,在厌氧和好氧环境中均能生长,但有氧环境下生长效率更高,但随着发酵体系溶氧浓度的进一步提高(溶氧浓度从 30%上升至 45%),剪切力和氧自由基等对菌体生长不利的因素逐渐增强,阻碍了菌体生长效率的进一步提高。

透明质酸合成过程是一个高耗能的过程,每延伸一个结构单元的长度需要消耗相当于 4 个 ATP 当量的能量^[12]。厌氧培养条件下,*S. equisimili* 的产能效率显著低于好氧条件下,因此,透明质酸好氧培养(溶氧浓度大于 0)的合成效率显著高于厌氧培养(溶氧浓度为 0)。

当溶氧浓度进一步提高(溶氧浓度从 15%上升至 45%),透明质酸合成效率并未呈现同步提高的态势,这表明 15%的溶氧浓度已足以解除透明质酸

合成的能量限制,而透明质酸相对分子质量延续增长态势表明,糖链的长度除了受到合成效率的影响,还受到其他因素的调控。

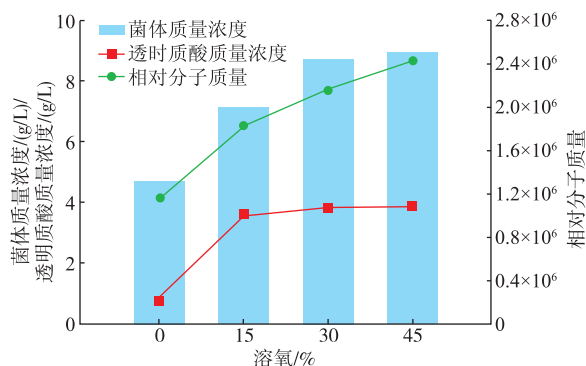


图 3 不同溶氧浓度对透明质酸发酵的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of dissolved oxygen on the fermentation of hyaluronic acid

3 结 语

透明质酸相对分子质量受到培养条件的显著影响:高起始质量浓度葡萄糖有利于高相对分子质量透明质酸的合成;葡萄糖补料培养的透明质酸相对分子质量显著低于同等条件下分批培养的结果;低温有利于高相对分子质量透明质酸的合成;在 pH 6~8 的范围内,透明质酸的相对分子质量随着 pH 的升高而增加;在 0~45%溶氧浓度范围内,相对分子质量随着溶氧水平的增加而增加。

参考文献:

- [1] Armstrong D C, Johns M R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 2759-2764.
- [2] 杨素珍, 陈贵锐. 透明质酸的特性及其在食品中的应用[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(6): 317-320.
YANG Suzhen, CHEN Guirui. The characteristics of hyaluronic acid and its application in food [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2008, 29(6): 317-320. (in Chinese)
- [3] Jagannath S, Ramachandran K B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48(2): 148-158.

- [4] Sun J, Wang M, Chen Y, et al. Understanding the influence of phosphatidylcholine on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2012, 168(1):47–57.
- [5] Sheng J Z, Ling P X, Zhu X Q, et al. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*; a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer[J]. **J Appl Microbiol**, 2009, 107: 136–144.
- [6] Huang W C, Chen S J, Chen T L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation[J]. **Biochem Eng J**, 2006, 32:239–243.
- [7] Kim S J, Park S Y, Kim C W. A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* [J]. **J Microbiol Biotechnol**, 2006, 16:1849–1855.
- [8] 叶华, 陈猛, 钟林, 等. 透明质酸发酵流加过程的研究[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33:20–26.
YE Hua, CHEN Meng, ZHONG Lin, et al. Effect of fed-batch models on production of hyaluronic acid (HA)[J]. **J Beijing Univ Chem Technol**, 2006, 33:20–26. (in Chinese)
- [9] Bitter T, Ewins R. Modified carbazole reaction for uronic acid[J]. **Biol Chem**, 1961, 81:43.
- [10] Laurent T C, M Ryan, A Pietruszkiewicz. Fraction of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body[J]. **Biochim Biophys Acta**, 1960, 42:476–485
- [11] Shah M V, Badle S S, Ramachandran K B. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway[J]. **Biochem Eng J**, 2013, 80, 53–60.
- [12] Chong F B, Blank L M, McLaughlin R, et al. Microbial hyaluronic acid production[J]. **Appl Microbiol Biot**, 2005, 66, 341–351.
- [13] Liu L, Wang M, Sun J et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*[J]. **Bioresour Technol**, 2008, 99:8532–8536.
- [14] Weigel P H, Baggenstoss B A. Hyaluronan synthase polymerizing activity and control of product size are discrete enzyme functions that can be uncoupled by mutagenesis of conserved cysteines[J]. **Glycobiology**, 2012, 22(10):1302–10.
- [15] Weigel P H, DeAngelis P L. Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases [J]. **J Biol Chem**, 2007, 282: 36777–36781.

科技信息

欧盟批准丁酸梭菌(CBM 588)作为新食品原料

据欧盟网站消息, 2014年12月16日, 欧盟委员会发布关于批准丁酸梭菌(CBM 588)作为新食品原料投放市场的决定, 并规定了其使用规格和指标。

丁酸梭菌(CBM 588)属于革兰氏阳性菌、产芽孢厌氧菌、非病原性、非转基因细菌。状态为白色或浅灰色药片, 具有特有气味与甜味。

当其作为新食品原料用于食品补充剂时, 最大剂量为 1.35×10^8 CFU/天, 还需满足 2002/46/EC 的相关要求。

微生物指标如下:

好氧性菌总数	不超过 10^3 CFU/g
大肠杆菌	1 g 量不检出
金黄色葡萄球菌	1 g 量不检出
绿脓杆菌	1 g 量不检出
酵母与霉菌	不超过 10^2 CFU/g

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟批准丁酸梭菌 (CBM 588) 作为新食品原料 [EB/OL]. (2014-12-18). <http://news.foodmate.net/2014/12/288737.html>.