

一株产乳酸的芽孢杆菌的分离及产物鉴定

褚西宁 卫军 陈海波 刘东兴 袁滔

(山西大学生物系,太原)

摘要 从捣碎大麦芽的增菌培养液表面的悬浮物中发现很多细菌芽孢。纯化后经形态观察、生理生化特征和乳酸旋光性测定等表明,此菌呈革兰氏染色阳性反应,产芽孢,周身鞭毛,产物为 DL-乳酸,系同型乳酸发酵类型。再经乳酸发酵试验,50℃ 发酵 120 小时,以葡萄糖为碳源,对葡萄糖的转化率为 86.5%。以玉米糖化液为碳源,对糖的转化率为 85.2%。

关键词 芽孢杆菌;分离;DL-乳酸;同型乳酸发酵

乳酸发酵是食品工业主要的微生物工艺之一,对其菌种和发酵工艺已有许多研究^[1]。产生乳酸的微生物种类甚多^[2]。为了防止杂菌干扰发酵,一般选择其中的耐高温菌作为生产用菌。我国乳酸生产厂均采用德氏乳杆菌,其产物为 DL-乳酸。曾报道^[3,5]嗜酸乳杆菌的耐热性比德氏乳杆菌强,在分类上属芽孢杆菌,其发酵产物为 L-乳酸。为此,我们进行了产芽孢的高温型乳酸产生菌的筛选,试图获得产 L-乳酸的生产菌种。结果表明,所得到的一株芽孢杆菌仍为产 DL-乳酸菌株。

材料与方 法

(一) 培养基

1. 平板分离(%): 马铃薯 20, 蛋白胨 0.5, 酵母膏 0.5, 葡萄糖 2, CaCO₃ 5, pH6.8—7.0, 琼脂 2。1kg/cm² 灭菌 30 分钟。

2. 产酸培养基(%): 葡萄糖 8, 蛋白胨 0.2,

酵母膏 0.5, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, NaCl 0.1, pH6.8—7.0。0.75kg/cm² 灭菌 40 分钟。

3. 发酵培养基: 基本成分同产酸培养基。葡萄糖为 7%。CaCO₃ 单独灭菌,在发酵过程中分批加入。

4. 发酵用水解糖培养基(%): 玉米粉 11, 米糠 1.1, 尿素 0.1, KH₂P0₄ 0.075。

玉米粉预处理: 先将玉米粉、米糠放三角瓶内,加入相应量的自来水,1kg/cm² 糊化 30 分钟,取出于 80℃ 恒温水浴中加入 α-淀粉酶(10u/g 玉米粉)液化 15 分钟。降温至 55℃,加黑曲糖化酶(120u/g 玉米粉),糖化 3—4 小时,最后以 0.75kg/cm² 蒸汽灭菌 30 分钟。CaCO₃ 单独灭菌,在发酵过程中流加。

(二) 菌种分离^[3-7]

84 级微生物专业毕业生张秋香、赵瑞珍参加部分工作。

1. 材料: 大麦芽。

2. 步骤: 将捣碎大麦芽, 放入液体产酸培养基中, 50℃ 恒温增殖培养 3 天。培养液面出现上浮物, 镜检发现有许多芽孢。用无菌移液管取含有芽孢的上浮物于灭菌小试管中, 在 80℃ 水浴加热 2 分钟, 稀释后倒平板。将此平板放在底部加有 10% NaOH 和焦性没食子酸的干燥器的隔板上、放 50℃ 恒温箱培养 3 天。挑取具有溶钙圈的菌落。再在含有 CaCO₃ 平板上反复分离几次, 经镜检确证为纯种为止, 挑入试管斜面保存。

3. 初筛

(1) 对试管中纯种菌株进行革兰氏染色及触酶试验, 保留革兰氏染色阳性和触酶阳性菌株。

(2) 将保留的纯种接种于液体产酸培养基中, 不加 CaCO₃, 每支试管装 10 ml, 管口棉塞外包二层塑料薄膜以隔绝空气。50℃ 培养 48 小时, 用标定的 0.1 mol/L NaOH 滴定, 挑取相对产酸量高的菌株。

(3) 乳酸的定性测定: 采用纸层析法^[3]。溶剂系统为 H₂O: 苯甲醇: 正丁醇 = 1:5:5, 再加 1% 甲酸。显色剂为 0.04% 溴酚蓝酒精溶液。层析时将试剂乳酸、柠檬酸、苹果酸、 α -酮戊二酸配成 1% 溶液, 用微量注射器点样 5 μ l, 乳酸发酵液也用 5 μ l 点样, 上行层析, 显色, 计算 R_f 值。

(三) 发酵试验

1. 将产酸相对高的菌株接种于葡萄糖和玉米粉水解糖为碳源的发酵培养基中, 1000ml 三角瓶装培养基 800ml。瓶口棉塞外包二层塑料薄膜, 放 50℃ \pm 1℃ 恒温箱培养。每 12 小时左右, 测定发酵液中葡萄糖含量、含钙量和 pH 值, 并流加 CaCO₃。当发酵液中残糖少于 0.1% 时, 终止发酵。

2. 发酵过程中各指标的测定: 定酸、定钙、定糖方法见文献[8]。

(四) 乳酸钙结晶的制备

发酵終了, 向发酵液中加 CaO 和 MgCl₂, 调 pH 至 14。90℃ 保温 2—4 小时, 离心去沉淀,

上清液浓缩至 15—16Be, 静置得乳酸钙结晶。必要时进行重结晶。

(五) 稀乳酸的制备

乳酸钙结晶加 1.2—1.3 倍蒸馏水, 加活性炭少许。加热搅拌溶解后, 用 49% H₂SO₄ 溶液酸解。到达终点后, 静置 4—6 小时, 去沉淀。上清液流经 732 阳离子树脂柱和 711 阴离子树脂柱, 流出液即为稀乳酸。

(六) 旋光度测定

将制备的稀乳酸作适当浓缩, 加 ZnCO₃, 得到乳酸锌结晶。然后将干燥乳酸锌配成 2.5% 溶液, 用 Perkin-Elmer 自动旋光仪直接打印旋光度。按下述公式计算比旋光度:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \times 100}{L \times C}$$

L: 为旋光管长度, 数值为 1 分米。C = 100ml 样品溶液含旋光物质的克数。

结果与讨论

(一) 菌种的主要形态特征

经纯种分离, 该菌呈革兰氏阳性, 触酶阳性。菌体均一, 皆为长杆状, 大小为 0.6—0.8 \times 2—5 μ m。一般单生, 产芽孢, 周身鞭毛, 生长温度广, 最低 25℃, 最高达 62℃, 是一株产乳酸的芽孢杆菌。

(二) 生理生化反应试验

将筛选得到的 7 号菌的生理生化反应试验结果与凝结芽孢杆菌的文献数据^[4] 对照列于表 1。

从表 1 的数据看出, 7 号菌与凝结芽孢杆菌除丙酸盐利用一项不同外, 其他基本相同。由于核酸纯度低于标准值, 7 号菌的 G+C mol% 较低, 该菌的分类鉴定, 尚需进一步研究。

(三) 发酵产物的定性鉴定

为了测定产物是否为乳酸, 我们采用纸层析法对一些试剂有机酸与发酵液进行了比较, 结果表明发酵液所生成的产物确系乳酸(表 2)。

(四) 乳酸的转化率

我们从分离的 17 株菌中选取产酸较高的 7

号、83号、9号三株菌,分别进行以葡萄糖和玉米粉水解糖为碳源的发酵试验,检验糖转化为

后分别测定残糖及乳酸钙含量,从而计算其转

表1 7号菌与凝结芽孢杆菌生化反应对照表

项目	7号	凝结芽孢杆菌
接触酶	+	+
生长温度		
最高	62℃	55—60℃
最低	25℃	15—25℃
对NaNO ₃ 的抗性	+	+
V-P 试验	+	+
V-P 液 pH	4.7	4.2—4.8
葡萄糖氧化发酵	兼性厌氧、产酸不产气	兼性厌氧、产酸不产气
水解淀粉	+	+
pH5.7 生长	+	+
石蕊牛奶	产酸,还原,砾化	产酸,还原
硝酸盐还原	-	d
柠檬酸盐利用	+	d
丙酸盐利用	+	-
7% NaCl 生长	-	-
从 Ara, Xyl, 甘露醇产酸	+	d
G + C%	40—44	47—48

表2 几种有机酸及发酵液的 Rf 值

层析样品	Rf 值*
酒石酸	0.24
柠檬酸	0.39
苹果酸	0.49
乳酸	0.71
琥珀酸	0.77
发酵液	0.70

* 层析系统及显色方法见“方法二”

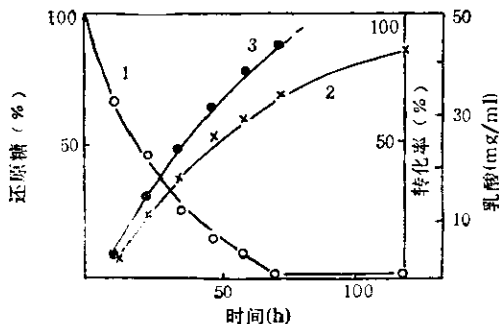


图1 以葡萄糖为碳源发酵时的转化率

1.还原糖, 2.转化率, 3.乳酸产量

乳酸的效率。经50℃±1℃厌氧培养5天,然

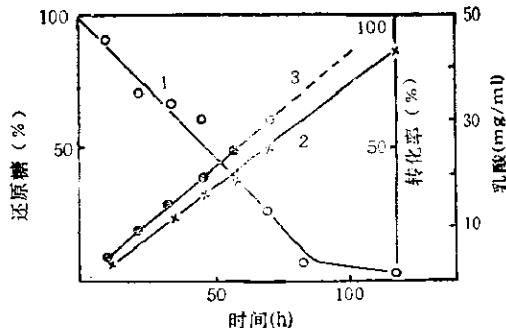


图2 以玉米粉糖化液为碳源时的转化率

1.还原糖, 2.转化率, 3.乳酸产量

表3 产乳酸芽孢杆菌的比旋光度

样品	α	1	2	3	平均	[α] _D ²⁰
DL-乳酸		-00.002	-00.002	-00.003	-00.0023	-00.092
7		-00.000	-00.001	-00.003	-00.0013	-00.052
9		-00.002	-00.001	-00.001	00.0006	-00.024
83		00.004	00.003	00.004	00.0033	-00.132

化率。三次重复结果表明,7号菌转化率最高,转化率分别为86.5%和85.2%。以葡萄糖为碳源的残糖曲线和产酸曲线比较符合规律,呈双曲线型(图1);然而用玉米粉糖化液为碳源时,上述曲线几乎成直线(图2)。尽管最终转化率相似,其原因除测定误差外,糖化液中的一些杂质也可能有一定影响。

(五) 旋光度测定

将2.5%乳酸锌溶液倒入旋光管,放入Perkin-Elmer旋光仪中,以钠灯为光源,自动打印出旋光度,结果如表3。按公式再计算出[α]_D²⁰。这三株菌的比旋光度接近于DL-型乳酸。

DL-乳酸为CP试剂;7、83、9为不同菌株产生的乳酸。

综上所述,从大麦芽液体培养物中分离到产乳酸芽孢杆菌,由于能产芽孢,耐高温,在斜面培养基上生长迅速,便于扩大菌种培养和保藏。产物为DL-型乳酸。如进一步研究和扩大试验,可望为工业发酵乳酸增加一新的菌种资源。

参 考 文 献

1. Buchta K: *Biotechnology*, 3:410, 1983.
2. 朝井勇宜等编著, 平安译: 细菌利用工业, 轻工业出版社, 北京, 105页, 1966。
3. 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 179页, 1978。
4. V.B.D 斯克尔曼著, 蔡妙英等译: 细菌的鉴定指南, 科学出版社, 北京, 1978。
5. R.E. 戈登等著, 蔡妙英等译: 芽孢杆菌属, 农业出版社, 北京, 1983。
6. R.E. 布坎南等编著, 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译: 伯杰细菌鉴定手册, 科学出版社, 北京, 1984。
7. 凌代文: 微生物学报, 11(4): 600, 1965。
8. 天津轻工业学院等合编: 工业发酵分析, 轻工业出版社, 北京, 1986。