

研究报告

费氏丙酸杆菌两个亚种的分离与鉴定

谭蓓英 陈 敏* 程光胜 凌代文

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 用亨格特(Hungate)厌氧技术从不同奶制品分离出 3 株丙酸杆菌 *Propionibacterium*, 编号为 PTC-1, PTC-2 和 PTC-3。细胞呈多形态, 杆状, 革兰氏阳性, 不形成芽孢, 不运动, 菌落在 PYG 深层洋菜中呈双凸透镜状, 白至土黄色, 从葡萄糖、乳糖等 8 种碳水化合物发酵产酸, 葡萄糖发酵产物包括大量丙酸和乙酸, 少量异丁酸, 琥珀酸和 CO_2 , 厌氧至耐氧。PTC-1 的 DNA 的 GC 百分含量测定值为 67.8 mol%(Tm)。三株菌的特性很接近, 只在硝酸盐还原和牛奶凝固特性有差别。它们分别被鉴定: PTC-1 和 PTC-2 是同一个种, 为费氏丙酸杆菌费氏亚种(*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*), PTC-3 是费氏丙酸杆菌谢氏亚种(*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*)。保藏号依次为 AS 1.2128, AS 1.2129 和 AS 1.2130。

关键词 费氏丙酸杆菌, 分离, 鉴定

分类号 Q 939.1

丙酸杆菌在发酵和乳品工业中的应用已有悠久的历史。丙酸杆菌属约包括 10 个种^[1,2,3]。在分类上依栖息地不同将它们分成两组, 其中来自奶制品、无致病性的一组称经典丙酸杆菌(classical propionibacteria)^[1]。它们在丙酸和乙酸的工业发酵, 天然防腐剂的制备, 干酪等乳制品加工以及促生剂的应用上过去、现在和将来都是很重要的^[4]。其中费氏丙酸杆菌的费氏亚种和谢氏亚种是该组中更具有应用价值的种。国内曾发表过该属的一个新种^[5], 但尚无前述的这些重要种的报道。本研究试从不同来源的奶制品以及青贮饲料中分离这些丙酸杆菌并进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 厌氧技术

培养基的制备和全部实验操作均采用 Hungate 厌氧技术^[6,7]。丙酸杆菌有不同程度的耐氧性, 对厌氧条件的要求不十分严格。

1.2 培养基

分离纯化培养基和鉴定培养基分别见文献^[8,9]。

1.3 菌株的分离和纯化

收集奶制品, 包括鲜奶、国产及外国干酪

(瑞士、美国、意大利和日本)以及青贮饲料和羊瘤胃液等 16 个样品。从中分离丙酸为主要产物的菌株, 用气相色谱检测有机酸^[9]。用滚管方法或装于厌氧罐的平皿培养方法分离单菌落进行纯化。一般培养温度为 30℃。

1.4 菌株的鉴定

按照细菌鉴定的有关文献进行^[1,9,10,11,12,13]。用特氏丙酸杆菌的标准菌株(*Propionibacterium thoenii* ATCC 4874)作为对照。

2 结果和讨论

分离到 3 株丙酸杆菌: PTC-1 来自瑞士干酪, PTC-2 来自国产干酪和 PTC-3 来自鲜奶。有趣的是这块瑞士干酪在 4℃ 冰箱已存放 8 年, 丙酸杆菌依然存活, 只是开始生长启动很慢, 一旦启动繁殖速度却很快。如在滚管中培养第 5d 才生长出菌落, 第 6d 菌落直径由 1mm 增大至 4mm。丙酸杆菌和其他厌氧菌一样, 种群之间关系密切, 这给纯化带来困难, 曾用加 Tween 80 和玻璃珠振荡的方法来分散细胞达到纯化的目的。

*现在中国科学院植物研究所 北京 100093

国家自然科学基金资助项目

1997-04-03 收稿

2.1 细胞和菌落形态

细胞呈多形态,短杆,略弯曲或近球形,棒状,直径 $0.6\sim 0.8\mu\text{m}$,单生,成对,成链或成堆,革兰氏阳性,不形成芽孢,不运动。细胞形态见图1。在PYG滚管中,深层菌落为双凸透镜状,湿润,白色至土黄色,边缘整齐,有荧光,直径 $1\sim 4\text{mm}$ 。表层菌落为扩散状。

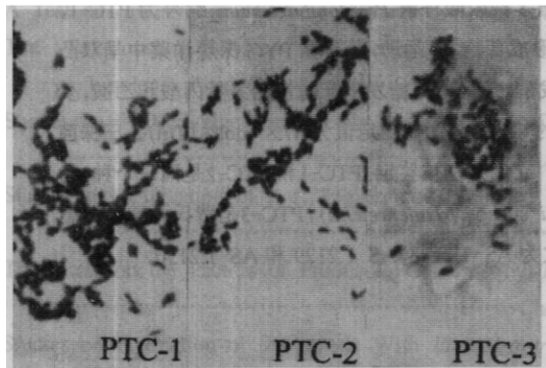


图1 在PYG培养液中 *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*(PTC-1和PTC-2)和 *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*(PTC-3)的细胞形态。(1320X)

2.2 培养特征

在PYG培养液中,PTC-1和PTC-2为颗粒状沉淀,较松散,PTC-3为块状沉淀,较紧密。发酵终pH均为4.0,在不含可发酵碳水化合物的PY培养基中弱生长。PTC-1和PTC-2是厌氧菌株,PTC-3是耐氧菌株,耐氧菌便于应用。

2.3 生理生化特性

3株菌在试验的30种糖醇中均能发酵核糖醇、赤藓醇、甘露糖、葡萄糖、甘油、肌醇、乳糖和半乳糖等8种糖醇产酸,其中后两种糖是慢发酵;在PYG中葡萄糖发酵产物是大量丙酸($3.5\sim 5.2\text{g/L}$)、乙酸($1.2\sim 1.8\text{g/L}$)、少量异丁醇(0.2g/L)、琥珀酸(0.2g/L)和 CO_2 。产物中丙酸和乙酸的比例随培养时间的增加而变动。培养两天,产物以乙酸为主,培养3.5天以丙酸为主。随着分离菌株的纯化,发酵产物中丙酸含量有改变,分纯前丙酸曾达到 6.5g/L ,分纯后降至 $3.0\sim 5.0\text{g/L}$,从这可以看出丙酸杆菌与混菌协同作用比单一的纯菌发酵能提高丙酸产量;3株菌均为触酶阳性,不液化明胶,不产生吲

哌,弱水解淀粉。PTC-1和PTC-2不凝固牛奶,还原硝酸盐;PTC-3凝固牛奶,不还原硝酸盐。DNA的GC百分含量测定,PTC-1的测定值为 $67.8\text{mol}\%$ (Tm)。提取DNA时,发现PTC-1的DNA与蛋白质结合紧密,用蛋白酶K处理两次,氯仿、异戊醇除蛋白6次而蛋白质含量仍略高,对GC百分含量的测定可能会略有影响。

2.4 菌株的鉴定

3个分离菌株的特性很接近,差别仅在于凝固牛奶和还原硝酸盐特性上。经鉴定PTC-1和PTC-2是相同的种,为费氏丙酸杆菌费氏亚种(*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*),PTC-3为费氏丙酸杆菌谢氏亚种(*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*)。它们的保藏号分别是AS 1.2128, AS 1.2129和AS 1.2130。分离菌株与手册中标准株相比,不同之处只是不发酵果糖和阿拉伯糖^[1]。

参 考 文 献

- [1] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1986, 1346~1351.
- [2] Charfreitag O, Collins M D and Stackebrandt E. *Int J of Syst Bacteriol*, 1988, 38(4): 354~357.
- [3] Pitcher D G and Collins M D. *FEMS Microbiol Let* 1991, 84: 295~300.
- [4] Bonita A G. *Features*, 1992, 58(4): 197~201.
- [5] 乐华爱,金石云,程光胜等. *微生物学报*, 1987, 27(2): 105~109.
- [6] Hungate R E. *Bacteriol Rew*, 1950, 14: 1~49.
- [7] Hungate R E. In *Methods in Microbiol.* Vol. 3B, Norris J R and Ribbons D W, New York: Academic Press Inc, 1969, 117~132.
- [8] DSM German Collection of Microorganisms and Cell Culture, *Catalogue of Strains*, 4th ed. 1993, 360.
- [9] Holdeman L V, Cato E P, Moore W E C. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed. Blacksburg, Virginia: Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977, 56~60.
- [10] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. *一般细菌常用鉴定方法*, 北京: 科学出版社, 1978.
- [11] 林万明. *细菌分子遗传学分类鉴定法*, 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [12] 金冬雁等译(Sambrook J. 等著). *分子克隆实验指南*,

第二版, 北京: 科学出版社, 1992, 930.

(Buchanan R E and Gibbons N E 编) 伯杰氏细菌鉴定

[13] 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译

手册, 第八版, 北京: 科学出版社, 1984, 876~888.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO SUBSPECIES OF *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII*

Tan Peiying Chen Min Cheng Guangsheng Ling Daiwen

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Three strains *Propionibacterium* (PTC-1, PTC-2 and PTC-3) were isolated from different dairy products by using Hungate anaerobic technology. Cells are pleomorphic rods, Gram-positive, non-spore, nonmotile. Colonies in PYG deep agar of roll tubes are lenticular, white, yellow to tan. Acids are produced from eight kinds of carbohydrates e.g. glucose, lactose and so on. Fermentation products of glucose include large amounts of propionic and acetic acid, and lesser amounts of isobutyric, succinic acids and carbon dioxide. They are anaerobic to aerotolerant. G + C content of the DNA of PTC-1 is 67.8 mol% (Tm). The characters of three strains are close, a little different lie in the natures of nitrate reduce and milk curd. They all were determined as: PTC-1 and PTC-2 are identical species, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* (AS 1.2128 and AS 1.2129 respectively), PTC-3 is *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (AS 1.2130). They are important strains in the use of the fermentation and food industries in group of classical propionibacteria.

Key words *Propionibacterium freudenreichii*, Isolation, Identification