

文章编号: 1673-1689(2010)03-0453-05

一株产 L-乳酸菌株的筛选、鉴定及 营养条件的初步研究

高江婧¹, 严群^{2,3}, 阮文权^{* 2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 作者对筛选的一株产 L-乳酸的菌株进行了菌种鉴定, 根据 16S rDNA 序列测定结果, 结合其形态特征及生理生化性质, 确定该菌株为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。进一步对其营养条件进行了研究, 初步确定玉米糖化液为最适碳源, 采用 1 g/dL 酵母粉与 1 g/dL 棉籽蛋白的混合氮源, L-乳酸产量不仅有所提高且成本大大降低, 金属离子 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 都可在一定程度上提高 L-乳酸的产量。

关键词: 细菌鉴定; 16S rDNA; 凝结芽孢杆菌; L-乳酸

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Screening, Identification of a Bacteria Strain for the Production of L-lactic Acid

GAO Jiang-jing¹, YAN Qun^{2,3}, RUAN Wen-quan^{* 2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A bacteria strain was isolated and identified for L-lactic acid production in this study. The isolated strain was identified as *Bacillus coagulans* based on the results of 16S rDNA, the physiological characteristics and the biochemical properties. Then the optimum nutrient conditions was determined by the single factor experiments and list as follows: 10.5 g/dL corn syrup, 1 g/dL yeast extract, 1 g/dL cotton-seed protein. Furthermore, it was found that the presence of Mn^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} in the medium can enhance L-lactic acid production.

Key words: identification, 16SrDNA, *Bacillus coagulans*, L-lactic acid

乳酸是目前世界上公认的 3 大有机酸之一, 广泛应用于食品、医药、化工、制革、纺织、环保和农业等诸多领域^[1]。特别是以 L-乳酸为原料生产的生

物可降解性塑料——聚乳酸, 对于解决日益严重的白色污染问题有重要的意义。近年来关于 L-乳酸的研究报道很多, 发酵法生产 L-乳酸的菌种主要有

收稿日期: 2009-03-12

基金项目: 江苏省科技支撑-社会发展项目(BE 2008607)。

* 通讯作者: 阮文权(1966-), 男, 上海人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事环境生物技术方面的研究。

Email: wquan@jiangnan.edu.cn。

根霉和细菌两大类。与根霉好氧发酵生产 L-乳酸相比,乳酸细菌发酵法具有糖转化率高、无通气能量消耗、成本低等优点^[2]。因此筛选 L-乳酸产生菌具有重要意义。

目前文献报道细菌乳酸发酵的较高水平有赵博等人^[3]以葡萄糖为碳源,添加豆粕水解液和玉米浆作为辅料,2 L 罐培养 120 h, L-乳酸质量浓度可达 202 g/L,糖转化率 91.3%。丁绍峰等^[4]采用指数流加发酵使总乳酸质量浓度达 210 g/L,其中 L-乳酸质量浓度达 180 g/L。虽然产量很高,但仍存在发酵周期长、生产效率低或光学纯度低等缺点。作者对实验室分离出一株产 L-乳酸的菌株进行了生理生化试验、糖发酵试验及 16S rDNA 序列测定,确定该菌株为凝结芽孢杆菌。为进一步了解该菌株发酵生产 L-乳酸的能力,对其营养条件进行了初步研究。由于乳酸细菌发酵法对氮源的要求较高,从而使生产成本偏高,因此降低氮源的成本具有很大的现实意义,作者亦在降低氮源成本方面做了尝试。

1 材料与方 法

1.1 菌种的筛选与鉴定

1.1.1 菌种的筛选 采集某奶制品企业附近离地面约 3~10 cm 的土样,样品经增殖、稀释后涂布 CaCO_3 -溴钾酚紫平板培养基,待长出菌落后,挑选可水解 CaCO_3 且变色圈大的菌株,经摇瓶发酵后,选取 L-乳酸产量高且光学纯度高的菌株并将其保藏。

1.1.2 菌体形态观察及生理生化实验 参照文献[5]。

1.1.3 糖类发酵实验 参照文献[6]。

1.1.4 分子生物学鉴定 染色体 DNA 的提取,菌株 16S rDNA 的扩增、16S rDNA 序列的测定以及 BLAST 比对均参照文献[7]。

1.2 培养基

1.2.1 分离平板培养基 CaCO_3 -溴钾酚紫平板培养基。

1.2.2 摇瓶种子培养基与摇瓶发酵培养基 参照文献[8]。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养 从培养 24 h 的斜面上挑取一环菌体接入液体种子培养基,45℃、120 r/min 摇床培养 18 h。

1.3.2 发酵培养 将培养良好的种子按体积分数 10% 接种于发酵培养基中,45℃、120 r/min 摇床培养 72 h。

1.4 分析方法

1.4.1 乳酸质量浓度 采用高效液相色谱仪 (Agilent 1100, 美国)。具体色谱条件: 色谱柱为美国 Merck 公司的 ZORBAX SB-Aq, 150 mm × 4.6 mm (直径 5 μm), 流速 0.5 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 10 μL , 柱温 30℃。

1.4.2 L-乳酸质量浓度 用 SBA-40C 生物传感分析仪测定。L-乳酸质量浓度与乳酸总质量浓度之比即为 L-乳酸的光学纯度。

1.4.3 残糖质量浓度 DNS 法。

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定结果

经初筛得到 42 株产酸圈较大的菌株,经摇瓶试验后得到菌株 ES23,其 L-乳酸产量最高,达到 47.74 g/L,且光学纯度达到 99.3%,选择该菌株做进一步研究。由图 1 可知,菌株在平板上的单菌落呈圆形,稍透明,边缘整齐,菌落呈乳白色,菌落直径约为 2.0~2.5 mm。在光学显微镜下观察可知,菌体为杆状,少数稍弯曲,单个排列,长约 3.0~5.0 μm 。细菌革兰氏染色呈阳性。在一定条件下可产生芽孢,为端生。无鞭毛,能运动,为兼性厌氧菌。

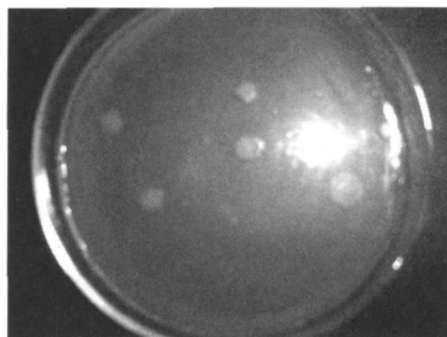


图1 菌落形态

Fig. 1 Colony shape

将试管中斜面培养保藏的菌株活化 3 代后接种到生化试验培养基中,培养后测定其生化特性。结果见表 1。菌株对不同碳水化合物的利用情况见表 2。

由表 1 生理生化特性的测定结果可知,该菌株过氧化氢酶为阳性,VP 阳性,明胶液化阴性,可分解利用淀粉。由表 2 可知,该菌株能利用大多数寡糖,包括纤维二糖和菊粉,但不能分解利用木糖和鼠李糖。同时做了产气实验,结果均不产气。此外,糖类发酵实验中添加了指示剂溴甲酚紫,若菌株能利用某种糖,培养基颜色可由紫变黄,根据变色时间的长短可判断分解某种糖的快慢程度。实验发现,该菌能迅速利用葡萄糖、麦芽糖、果糖、半

乳糖和糊精;而需要较长时间才能分解乳糖、蔗糖、纤维二糖、菊粉和淀粉。

表 1 菌株的生理生化实验结果

Tab. 1 Results of physiological and biochemical characteristics

试验名称	结论
过氧化氢酶	阳性
VP 试验	阳性
甲基红试验	阳性
明胶液化	阴性
乙酸氧化	阴性
硫化氢的生成试验	阳性
淀粉	阳性

表 2 菌株对不同碳水化合物的利用情况

Tab. 2 Utilize ability of carbon source

碳源	利用情况	碳源	利用情况	碳源	利用情况
葡萄糖	+	果糖	+	半乳糖	+
麦芽糖	+	糊精	+	乳糖	+
蔗糖	+	菊粉	+	纤维二糖	+
鼠李糖	-	木糖	-		

+ 表示可利用,- 表示不能利用

所测菌株的 16S rDNA 核苷酸序列为 1 464 bp。将所测序列从 GenBank 数据库中相关菌种进行比较,结果表明:该菌株与芽孢杆菌属 *Bacillus coagulans* 具有极高的同源性,为 99%。结合以上生理生化结果,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[9] 分析比较,其生理生化指标均相同,可确定该菌株为凝结芽孢杆菌。该菌种在利用五碳糖方面与研究报道不相一致。Milind A^[10] 报道其分离的凝结芽孢杆菌可利用分解利用木糖发酵产乳酸,而该菌株不能分解利用五碳糖。

2.2 碳源对发酵产酸的影响

实验选取葡萄糖、玉米糖化液、马铃薯淀粉糖化液,木薯糖化液,菊粉作为发酵培养基的碳源,其中初糖质量浓度为 90 g/L,氮源为酵母粉与蛋白胨。并且,玉米淀粉、马铃薯淀粉及木薯粉均采用高温淀粉酶及 α 糖化酶进行双酶水解。由图 2 可知,葡萄糖和玉米糖化液的 L-乳酸产量最高,分别为 49.62 g/L 和 49.25 g/L,其次为马铃薯淀粉糖化液、木薯糖化液和菊粉。前期研究发现,该菌株可分解利用非粮作物菊粉,但几乎不产 L-乳酸,仅可从液相图谱中检测到乙酸、琥珀酸等杂酸。由此

说明,葡萄糖是使代谢途径大量积累乳酸的最佳碳源,考虑到成本,作者选用玉米糖化液为碳源。

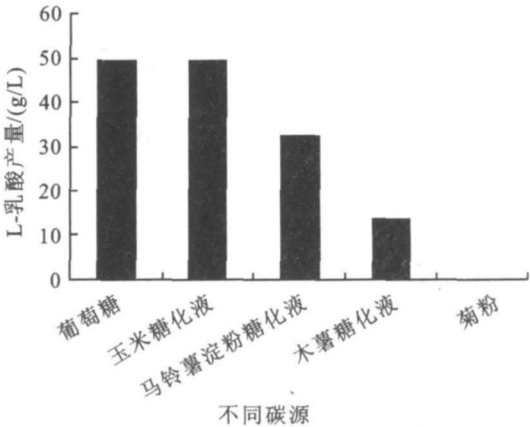


图 2 不同碳源对 L-乳酸发酵的影响

Fig. 2 Effect of different carbon sources on L-lactic acid production

为确定碳源初始水平,以玉米糖化液为碳源,考察其对该菌株发酵生产 L-乳酸的影响,结果见图 3。

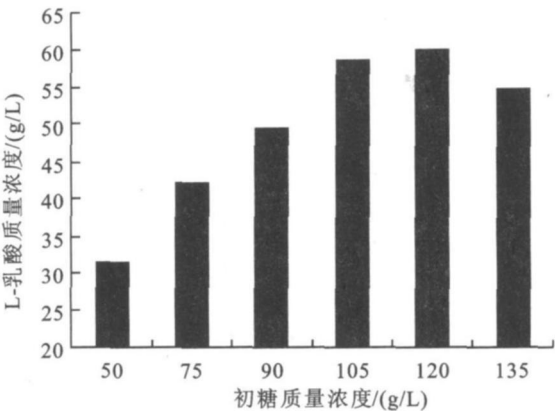


图 3 碳源质量浓度对 L-乳酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of concentration of glucose acid production on L-lactic acid production

当初糖质量浓度低于 120 g/L 时,随着初糖质量浓度的增大, L-乳酸产量依次增大;当初糖质量浓度高于 120 g/L 时, L-乳酸产量下降,较高的底物质量浓度会使培养基渗透压增大,导致菌体不能很好的生长和产酸。初糖质量浓度为 105 g/L 和 120 g/L 时,乳酸产量相差不大,分别为 58.87 g/L 和 60.07 g/L,而后者糖的转化率相对较低。因此最佳的碳源质量浓度为 105 g/L。

2.3 氮源对发酵产酸的影响

实验选取了一些常见氮源,包括酵母粉、蛋白胨、牛肉膏等优质有机氮源,还包括一些廉价氮源,有豆饼粉、麦根、玉米浆、棉籽蛋白,发酵结果见图 4。从图 4 可以看出,所有氮源中,酵母粉单独作为氮源时, L-乳酸产量最高,为 52.03 g/L,这可能

与酵母粉中富含丰富的氨基酸和维生素等生长因子有关。在廉价氮源中,玉米浆单独做氮源时 L-乳酸产量相对较高,为 18.24 g/L。用牛肉膏单独做氮源时,在所稀释范围内未检测到 L-乳酸,但从液相色谱图中可以检测到较多的丙酮酸、乙酸以及琥珀酸。由此可说明,营养环境条件的变化对该乳酸菌的代谢途径改变很大。

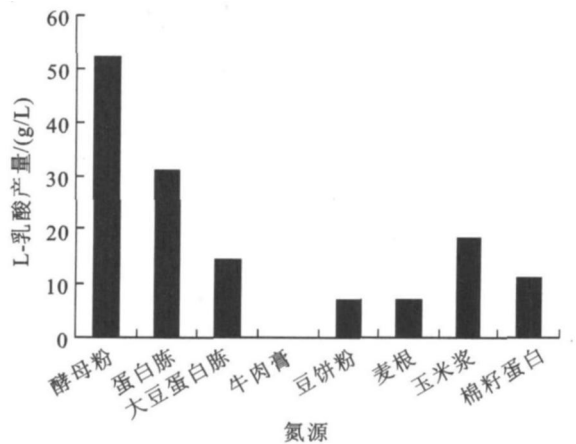


图 4 不同氮源对 L-乳酸发酵的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen source on L-lactic acid production

虽然使用酵母粉单独做碳源时 L-乳酸产量最高,但相比其他氮源来说,酵母粉价格高昂,这将严重阻碍乳酸的大规模工业化生产。为减少成本,设计了几组不同的氮源组合,将酵母粉与一些廉价氮源混合发酵,结果见表 3。

表 3 复合氮源对 L-乳酸发酵的影响

Tab. 3 Effect of mixed nitrogen sources on L-lactic acid production

不同氮源组合	L-乳酸产量/(g/L)
0.5 g/dL 酵母粉+ 2 g/dL 豆饼粉	33.88
1 g/dL 酵母粉+ 1 g/dL 豆饼粉	51.62
1 g/dL 酵母粉+ 1.5 g/dL 麦根	21.82
1 g/dL 酵母粉+ 2 g/dL 麦根	17.11
0.5 g/dL 酵母粉+ 4 g/dL 玉米浆	16.2
1 g/dL 酵母粉+ 2 g/dL 玉米浆	16.5
0.5 g/dL 酵母粉+ 1 g/dL 大豆蛋白胨	25.05
1 g/dL 酵母粉+ 0.5 g/dL 大豆蛋白胨	73.06
0.5 g/dL 酵母粉+ 1.5 g/dL 棉籽蛋白	36.48
1 g/dL 酵母粉+ 1 g/dL 棉籽蛋白	60.89

由表 3 可知,在廉价氮源中,玉米浆单独作氮源时 L-乳酸产量较高,但与酵母粉混合后产量反而降低。豆饼粉、棉籽蛋白以及大豆蛋白胨单独做氮

源时,L-乳酸产量很低,但与酵母粉混合后,产酸量都得到了较大的提高,说明这 3 种氮源的营养成分与酵母粉的生长因子起到了很好的相互补充的作用。L-乳酸产量随酵母粉添加量的增加而升高,其中大豆蛋白胨与酵母粉混合后,当酵母粉添加量由 0.5 g/dL 增加到 1 g/dL 时,L-乳酸产量增加了近 3 倍。虽然 1 g/dL 酵母粉与 0.5 g/dL 大豆蛋白胨混合后产酸量最高,为 73.06 g/L,但大豆蛋白胨价格相比豆饼粉和棉籽蛋白来说仍较高,因而氮源应选取 1 g/dL 酵母粉与 1 g/dL 棉籽蛋白,其产酸量为 60.89 g/L,此时 L-乳酸产量不仅有所提高且成本降低。

2.4 金属离子对发酵产酸的影响

微生物在生长繁殖和产物合成中都需要无机盐和一些微量元素,这些物质在较低的质量浓度时会促进菌体的生长和产酸,而在高质量浓度时常表现出显著的抑制作用。作者考察了 $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 对 L-乳酸发酵的影响。结果见表 4。由表 4 可知, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 都可在一定程度上提高 L-乳酸产量,其最佳质量浓度分别为 0.05, 0.04, 0.6 g/L。

表 4 金属离子对 L-乳酸发酵的影响

Tab. 4 Effect of metal ions on L-lactic acid production

金属离子	质量浓度/(g/L)	L-乳酸产量/(g/L)
Mn^{2+}	0	59.73
	0.01	59.88
	0.03	60.12
	0.05	63.42
	0.07	60.18
Fe^{2+}	0.01	58.12
	0.03	61.55
	0.04	63.18
	0.05	62.57
Mg^{2+}	0.2	60.54
	0.4	62.65
	0.6	65.68
	0.8	63.57

3 结 语

作者对实验室分离出一株产 L-乳酸的菌株进行了生理生化试验、糖发酵试验、16S rDNA 序列测定,确定该菌株为凝结芽孢杆菌。为进一步了解

该菌株生产L-乳酸的能力,对其营养条件进行了研究,初步确定玉米糖化液为最适碳源,其最佳质量浓度为105 g/L;复合氮源中1 g/dL酵母粉和0.5 g/dL大豆蛋白胨L-乳酸产量最高;而1 g/dL酵母粉与1 g/dL棉籽蛋白混合后产酸量虽较前者有所降低,但成本已大大降低。金属离子 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 都可在一定程度上提高L-乳酸产量。

采用该菌株发酵生产L-乳酸的产量虽不及当

前国内外所报道的产量,但该菌有很多优点,如该菌株光学纯度高,产芽孢可使保藏容易,发酵温度较高可耐高温发酵,并且培养基可以在未灭菌的条件下发酵,这将节约因灭菌而消耗的能量,从而降低发酵成本。若对该菌株进行菌种改造,或通过发酵过程优化、代谢流量控制等措施来进一步提高其合成L-乳酸的能力,那么该菌将是很有潜力的一株发酵生产L-乳酸的菌株。

参考文献(References):

- [1] 钱志良,劳含章,王健,等.工业乳酸发酵的近期进展[J].生物加工过程,2003,1(1):23-27.
QIAN Zhi-liang, LAO Han-zhang, WANG Jian, et al. Recent advances in industrial lactic acid production by microorganisms[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2003, 1(1): 23-27. (in Chinese)
- [2] 仇俊鹏,徐岩,阮文权.L-乳酸发酵的代谢调控育种及发酵影响因素的研究[J].微生物学通报,2007,34(5):929-933.
QIU Jun-peng, XU Yan, RUAN Wen-quan. The metabolic control breeding of L-lactic acid fermentation and optimization of media and cultivation conditions[J]. **Microbiology**, 2007, 34(5): 929-933. (in Chinese)
- [3] 赵博,周帅,马翠卿,等.乳杆菌 *Lactobacillus* sp. kp 发酵高产L-乳酸研究[J].生物加工过程,2005,3(4):74-77.
ZHAO Bo, ZHOU Shuai, MA Cui-qing, et al. Study on high yield L-lactic acid fermentation by a *Lactobacillus* sp [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2005, 3(4): 74-77. (in Chinese)
- [4] Ding Shao-feng, Tan Tian-wei. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different feed batch feeding strategies[J]. **Process Biochemistry**, 2006, 41: 1451-1454.
- [5] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994:170-178.
- [6] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及试验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [7] 李丹,陈丽,李富强,等.一株产低温碱性蛋白酶海洋细菌 *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407 的筛选与生长特性[J].食品与生物技术学报,2007,26(6):74-80.
LI Dan, CHEN Li, LI Fu-qiang. Isolation and physiological characterization of a marine psychrotroph *Pseudoalteromonas flavipulchra* HH407 producing cold-active alkaline protease[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(6): 74-80. (in Chinese)
- [8] 路福平,戚薇.芽孢乳酸菌产乳酸条件的研究[J].天津轻工业学院学报,1998,(2):10-14.
LU Fu-ping, QI Wei. Study on optimum process produced lactic acid by *Bacillus coagulans*[J]. **Journal of Tian Jin Institute of Light Industry**, 1998, (2): 10-14. (in Chinese)
- [9] Garrity G M, Bell J, Liubum G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(second edition)[M]. New York: Berlin Heidelberg, 2004.
- [10] Milind A Patel, Mark S. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid[J]. **American Society for Microbiology**, 2006, 72(5): 3228-3235.

(责任编辑:李春丽)