

生物素对地衣芽孢杆菌生长和乳酸形成的影响

胡尚勤

(重庆师范学院生物系 重庆 630047)

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是我国 90 年代首次从正常待产阴道拭子分离出来的一个无毒新菌株。现在国内已经用它来生产“整肠生”活菌剂。它是一种对胃肠道疾病有特殊疗效的微生态制剂。目前从国内外检索的医学文献和微生物文献中,对该菌剂几乎全部都只限于临床治疗效果方面的观察试验。至今仍缺乏对这一新菌株及其代谢产物的系统研究。特别是生物素对地衣芽孢杆菌比生长速率和乳酸形成影响的研究尚无报道。本文旨在探讨生物素对地衣芽孢杆菌生长速率和乳酸形成的关系,为更好地应用该菌提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌种及培养基

1.1.1 菌种:地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)由重庆师范学院应用微生物研究室提供。

1.1.2 培养基(%):(1)斜面培养基:牛肉膏 0.3,蛋白胨 1.0,NaCl 0.5,琼脂 2.0,水 100,pH7.0,0.1MPa 蒸汽灭菌 30min。(2)液体培养基:葡萄糖为碳源,用 L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、D-丙氨酸、L-天冬氨酸、DL-大门冬酰氨、L-赖氨酸、酪氨酸、L-苏氨酸、白氨酸、组氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、L-胱氨酸、DL-异戊氨酸、L-脯氨酸,根据本课题第一阶段对氨基酸需要的“营养要求的研究”结果确定,将各种氨基酸等量混合为氮源,最终按 C/N=4:1,准确称量配成,pH 为 7.0,此培养基作为对照组 A,分装于 250ml 三解瓶中,每瓶 100ml,0.05MPa 蒸汽灭菌 30min。(3)生物素培养基:将上述(2)号培养基分别加入 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%的生物素,配成 5 种液体培养基,分别为 B、C、D、E、F 组,分装于 250ml 三角瓶中,每瓶 100ml,0.05MPa 蒸汽灭菌 30min。

1.2 培养方法

将地衣芽孢杆菌接种到(1)号培养基上 37℃ 活化培养 18h,制成菌悬液(12×10^7 /ml)作菌种。按 1% 接种到上述 6 种液体中,每种 9 个重复,共两批 144 组。37℃ 振荡培养(转速 60~80r/min)24h。

1.3 分析测试方法

每小时取样,10 倍稀释后,取样培养,用光电菌落计数器计活菌数。同时采用对羟基联苯分光光度计法和色谱法测定乳酸含量^[1]。

2 结果与分析

2.1 生物素对地衣芽孢杆菌比生长速率的影响

在其他条件相同情况下,生物素浓度的改变对地衣芽孢杆菌比生长速率的影响见图 1。生物素对地衣芽孢杆菌生长有明显影响。培养基加生物素与不加生物素其菌体增长量差别较大。特别是当生物素添加量为 0.3%、0.4%、0.5% 时,培养时间为 13h,菌数达到最高峰值,分别为 6.31×10^7 /ml、 6.87×10^7 /ml、 6.85×10^7 /ml。分别是对照组 A 最高峰值(14h 时, 1.07×10^7 /ml)时的 5.89 倍、6.42 倍、6.40 倍。曲线 EF 几乎完全重合,并且数据表明在添加 0.1%~0.5% 生物素培养时,地衣芽孢杆菌比对照组 A 提前 1h,即 在 5h 时,已进入了代数生长期。从而可知,B 组至 F 组的世代时间 G 分别为 28.32、26.53、26.43、26.42 和 25.86min。根据 $\int_{N_0}^{N_t} \frac{dN}{N} = \int_0^t \mu dt$ ^[2,3] 求得 B 组至 F 组的比生长速率 μ 分别为

0.025, 0.026, 0.027, 0.027, 0.027。而对照组 A 的 $G = 33.33\text{min}$, $\mu = 0.021$ 。结果表明, 当加入生物素时, 比生长速率有所增加, 加入 0.3%~0.5% 时比生长速率最高, 菌数最多。

2.2 生物素对地衣芽孢杆菌乳酸形成的影响

在添加不同量生长素的培养基中培养地衣芽孢杆菌 24h, 其代谢产物乳酸生成量明显不同, 见图 2。

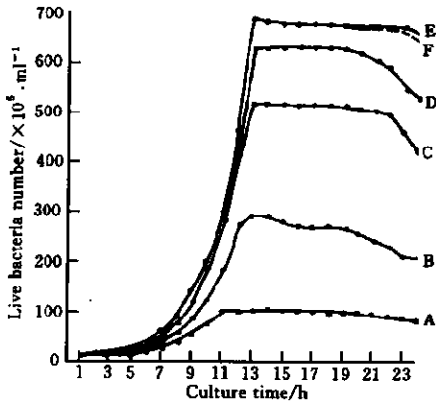


图 1 生物素对地衣芽孢杆菌生长的影响

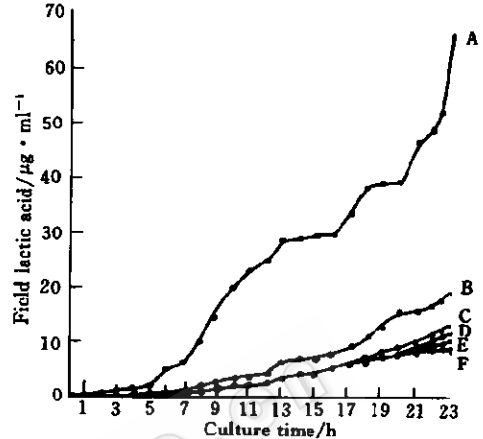


图 2 生物素对地衣芽孢杆菌乳酸产量的影响

从图 2 可以看出, 乳酸含量随添加生物素浓度的增加而减少。当生物素加入量分别为 0.1%~0.5% 时, 乳酸最高含量分别为 19.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、13.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、12.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、11.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。分别是对照组 A 最高含量(66.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 28.94%、19.85%、18.18%、17.42%、16.52%。这表明地衣芽孢杆菌的产乳酸量在一定范围内与生长素浓度成反比, 而菌体增殖与之成正比(图 1)。

其比生长速率(μ)值与之近似成正比关系, 因此菌体数增殖较快, 世代时间越来越短。这表明在应用地衣芽孢杆菌生产微生态制剂时, 选择适合浓度的生物素, 对提高菌数质量指标有重要作用。

参 考 文 献

- 1 蔡定域.《酿酒工业分析手册》, 北京:轻工业出版社, 1988, p. 54
- 2 程皆能.《微生物生理学》, 上海:复旦大学出版社, 1987, p. 21
- 3 Delle H W. Bacteria Metabolism, Academic Prees, 1975, pp. 37~77

Studies on the Formation of Lactic Acid and Growth of the *Bacillus licheniformis* by Biotin Variation

Hu Shangqin

(Department of Biology Chongqing Teachers' College, Chongqing 630047)

Abstract The effect of the biotin variation on the specific growth rate of *Bacillus licheniformis* and the formation of lactic acid were studied by using vibration culture. The results show that, when the biotin was 0.3%, 0.4%, 0.5%, the average specific growth rate(μ) is 0.027 that is 1.23 time as much as comparasion($\mu = 0.021$). The highest yield of lactic acid was 12.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 11.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, that was 18.18%, 17.42%, 16.52%, as much as comparasion(66.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). These results show that the relationship between formation of lactic acid, specific growth rate of *B. licheniformis* and biotin content, which is a meaningful guide for further fermentation production of this reagent using the bacterium.

Key words *Bacillus licheniformis*, lactic acid, biotin