

乳酸粪链球菌的营养要求

胡尚勤 周开孝

(重庆师范学院生物系)

乳酸菌是一类能发酵糖产生乳酸而多数不能分解蛋白质的细菌的总称。1868年, Schulze 发现酒精厂的酵母醪中混有乳酸菌。1877年, Lister 分离出乳酸链球菌^[1]。迄今为止, 已知的乳酸细菌有40多种。按 Bergey 的细菌分类法, 乳酸菌可分为五个属, 其中乳杆菌属和链球菌属使用最广。它们与人类的关系十分密切, 不仅是人体消化道中重要的有益寄生菌群, 而且是食品工业、乳制品工业、饲料加工业以及乳酸生产工业中重要的微生物。

(一) 乳酸粪链球菌的一般特性

乳酸菌类群中的粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)

属于真细菌门, 无孢子菌纲, 微球菌目, 微球菌科, 链球菌属, 粪链球菌组^[1]。

乳酸粪链球菌的形态与生理特征: 乳酸粪链球菌为人体和动物肠道中的正常菌群, 并广布于自然界。细胞形态多呈球形, 少数呈卵圆形, 或长杆状; 成双、短链或长链排列。菌落一般无色, 但有少数在一定条件下可产生黄色或砖红色色素。如在醋酸亚砷琼脂培养基上 37℃ 培养 12 小时后, 菌落中央呈红色, 有或无窄的白色边缘。其主要特征是生长温度范围大, 为 10—45℃。它能在 6.5% 的 NaCl, pH9.6, 0.1% 的美蓝液中生长, 还能抗 0.5—1 单位的青霉素^[3,4]。

表 1 两种乳酸菌所需氨基酸种类

菌名	氨基酸														胱氨酸			
	丙氨酸	精氨酸	天门冬氨酸	缬氨酸	组氨酸	甘氨酸	谷氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	赖氨酸	甲硫氨酸	脯氨酸	丝氨酸	酪氨酸		苏氨酸	色氨酸	苯丙氨酸
粪链球菌	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	(+)	+	+	-	(+)
干酪杆菌	(+)	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)	(+)	-	+	+	(+)	+	+	+

+: 不可代替, -: 可代替, (+): 刺激生长

乳酸粪链球菌为耐气性厌氧微生物。该菌进行同型乳酸发酵。有试验表明能将 1 克分子葡萄糖转化成 1.8 克分子乳酸。这说明,可能存在少量其他终产物。已知产物中乳酸为 73%,甲酸为 14%,乙醇 7%,乙酸 6%。该菌有类似于大肠杆菌类型的磷酸裂解反应。在发酵中产生的酸使发酵液 pH 下降,会抑制其它细菌的生长以及自身细胞的进一步增殖,在一定程度上有助于乳酸的积累。例如当 pH5.0 时乳酸粪链球菌利用 100 微摩尔葡萄糖产生 174 微摩尔乳酸, pH 为 7.0 时乳酸产量则只有 146 微摩尔。同型乳酸发酵菌产生的菌量两倍于异型乳酸发酵菌量^[9-11]。这也许是此菌可用来生产菌体制剂的原因之一。

乳酸粪链球菌由于不具细胞色素酶系统,为了取得能量,只能将脱氢酶在基物分解中所产生的氢给予未饱和的有机物分子,并从这种分解过程中获得少量能量。它只能在氧化还原电位较低条件下生长。乳酸粪链球菌能利用多种糖类,如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、半乳糖、麦芽糖,以及发酵山梨醇、落叶松糖和甘油产生乳酸,并能利用枸橼酸盐和丙二酸钠等。该菌不能发酵阿拉伯糖和木糖,在 50℃ 环境中不能生长,可迅速还原石蕊^[9]。有人用恒化器培养时发现,机体的高生长速度将导致产生乳酸占优势,低生长速度则促进挥发酸的形^[10,11,12]。但是,无论是生产乳酸或是生产菌体制剂,都需要使其高速生长以获得足量的菌数。

由于该菌用途广泛,所以,国内外有不少厂家用乳酸粪链球菌生产乳酶生,如我国宜昌、天津和重庆等地,但产量都不很高。根据卫生部药品标准中规定“乳酶生”片剂每克含活菌在 1000 万以上。但几十年来,这种片剂由于产量低,含菌量不高,一直是一些厂家的亏本产品,致使供应极度短缺。到目前为止,由于小型烧瓶生产均不稳定,更无从谈起大规模的罐体发酵生产。其主要原因就是对该菌的营养要求如碳素、氮素、生长因子和矿质元素的要求以及对培养条件缺乏系统的认识。因此,有必要对乳酸粪链球菌的营养需要进

行探讨。

(二) 乳酸粪链球菌的碳素、氮素营养需要

乳酸菌的生长对氮源要求较高。无机氮作氮源时,菌体生长缓慢,而且对有机氮亦有选择性^[13]。乳酸粪链球菌对有机氮中氨基酸种类的要求见表 1。

乳酸粪链球菌以葡萄糖为碳源时,每克分子葡萄糖可产生细胞量为 20 毫克,以每克分子精氨酸作碳源时只产生 10.5 毫克细胞量。培养乳酸粪链球菌的基质中碳含量高时,便产生大量乳酸,使 pH 下降,从而影响自身的生长繁殖。在利用该菌发酵生产乳酶生时,其主要目的是追求菌数指标,所以应适当增加和选择氮源,降低碳含量,或适当加入缓冲剂以获得大量菌体。

实验表明乳酸粪链球菌的最适 C/N 应在 3.35—4:1。乳酸粪链球菌的碳氮比与细胞数的相关性见表 2。乳酸粪链球菌对碳源、氮源的种类有较为严格的要求,对碳素与氮素的供给比例亦随培养目的不同而异。由于常用的氮源为蛋白质的水解产物,即胨、肽、肽和氨基酸,这些成分的比例依蛋白胨的牌号而不同,所以营养价值各异,有的适于某些细菌的生长,有的则适于某种细菌的某种生化反应的出现^[14]。

表 2 乳酸粪链球菌的增殖与 C/N 的关系

C/N	1.10:1	2.65:1	3.35:1	4.0:1	5.0:1
细胞数(亿/ml)	19.1	26.0	32.7	31.0	29.7

(三) 乳酸粪链球菌对生长因素的要求

该菌的生长需要多种生长因素。这些生长因素多属 B 族维生素^[15]。有研究指出,在乳酸菌中大部分种需要烟酸、泛酸及核黄素,很多种需硫胺素、对氨基苯甲酸及叶酸,另外一些则需吡哆醇、生物素及 B₁₂^[16]。在发酵过程中,一般将维生素或其前体以酵母萃取液或其他天然物质萃取液的方式加入之。乳酸粪链球菌对核黄素的需要很明显,并且需要量较大。有的研究指

表 3 乳酸粪链球菌的增殖与生长因素的关系

生长因素	添加量 ($\mu\text{g/ml}$)	作 用	菌 数 (亿/ml)	同时含几种生长因素 时菌数(亿/ml)
生物素	0.019	催化羧化反应的酶的辅酶	30.1	30.1
核黄素	10.00	形成辅酶 A	30.6	34.0
硫胺素	15.00	形成辅酶 B ₁	29.8	
尼克酸	7.50	形成辅酶 I	30.0	
吡哆醇	0.08	形成磷酸吡哆醛	30.0	
叶酸	200.00	组成辅酶 F	30.7	
精氨酸	50.00	刺激生长	30.2	32.0
胱氨酸		刺激生长	30.1	
酪氨酸		刺激生长	30.0	
维生素 A	0.80		28.0	28.0
维生素 C	0.80		28.1	
对 照			28.0	28.0

出,乳酸粪链球菌在含有水解酪蛋白的培养基中,需要维生素B₁₂才能生长。假若供给粪链球菌B₁₂,它可使培养基中酪氨酸脱羧,这就必需以肽的形式供给酪氨酸。但在培养基中加入D-丙氨酸时,则不需要B₁₂,而供给B₁₂时细菌生成所需的D-丙氨酸。这是因为供给B₁₂时,生长所需的D-丙氨酸可通过丙氨酸消旋酶的辅酶-磷酸吡哆醛使培养基中原来存在的L-丙氨酸变成D-丙氨酸^[11,12]。乳酸粪链球菌在生长过程中与各生长因素的关系见表3。

试验表明,乳酸粪链球菌在分别含有生物素、吡哆醇、核黄素、叶酸、胱氨酸、精氨酸的培养基中生长较好,其菌数比对照高出约7%。在同时添加几种生长因素时,生长良好,其菌数比对照高出11—12%。在添加维生素A和维生素C的培养基中与对照无明显增长。有研究指出,乳酸粪链球菌体内核黄素的含量与加入培养基中的叶酸的浓度成比例。这可能是由于叶酸是促进嘌呤合成的辅酶,而一些嘌呤有刺激核黄素合成的作用,叶酸中的喋啶也是合成核黄素的原料^[13]。因此在培养乳酸粪链球菌时,底物必须具备上述主要生长因子才能生长良好。在实际生产中,由于某些底物含生长因素较少,加之高温处理培养基时损失不少,如硫胺素经高温处理可损失83%,尼克酸损失79%,所以这是一个值得注意的实际问题。

(四) 乳酸粪链球菌对某些矿质元素的需要

培养乳酸菌时,需要在基质中添加S、P、Na、Ca、Mg、Fe等无机离子,此外,还常加入Zn、Cu、Mn等金属离子。基质中含铁量约为0.3—2.1 ppm,含钙0.01—0.5M,镁为26 ppm,钾为0.03%,磷为0.008—0.01M时,乳酸粪链球菌生长良好。

Macleod 和 Snell 制成一种含钾而NH₄和Na相对缺乏的培养基。他们发现,培养基中钾含量充足时,可使五种乳酸菌(乳酸粪链球菌,干酪乳杆菌等)生长良好。K的需要量随Na和NH₄的加入而大大增加。这些离子是否会抑制生长,决定于这些离子浓度和K的比率,而不决定于离子的绝对存在量^[14]。磷和钾的代谢都很突出,供给细胞的葡萄糖大部分以磷酸己糖的氧化作用而被消耗。因此要使乳酸粪链球菌生长旺盛必须控制各种无机盐的浓度。

(五) 乳酸粪链球菌的营养要求在分析上的应用

乳酸粪链球菌需要一定的维生素、氨基酸等才能生长。在一定范围内营养物质含量与菌体生长成比例。因此可利用它对某种营养物的特殊需要来测定未知样品中该营养物的含量。利用乳酸粪链球菌可分析九种不同的氨基酸,以及叶酸和吡哆胺与吡哆醛等。用来分析这类物质的培养基可用乳酸菌合成培养基(表4)^[15,16]。这种培养基经过适当取消某种成分后可用来分析任何种氨基酸和维生素。只要将不同量的维生素或氨基酸标准液和不同量的未知溶液分别加入基础合成培养基中,接种该菌后,因培养基中其成分不同,所以菌的生长量亦不同。生长量可以浑浊度或代谢产物或菌体干重法测量之。用标准溶液中氨基酸含量和菌体生长指标制成标准曲线,即可求出样品中被测物含量。乳酸粪链球菌的生物分析法灵敏度高,食物中极微量的成分如尼克酸亦可测出。一次可同时作多个样品。也适合于某些能抑制微生物生长的物质如抗生素等的测定^[17]。由此可见乳酸粪链球菌的营养要求比较独特和复杂。

综上所述,可明显看出,乳酸粪链球菌在对诸营养

表4 乳酸菌合成培养基

成 分	最终浓度 (ppm)
葡萄糖	10000
NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 各	2500
KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ 各	500
NaCl, FeSO ₄ , MnSO ₄ 各	5
精氨酸, 胱氨酸, 甘氨酸, 组氨酸, 羟氨酸, 脯氨酸, 色氨酸, 酪氨酸 各	200
丙氨酸, 天门冬氨酸, 谷氨酸, 异亮氨酸, 赖氨酸, 甲硫氨酸, 亮氨酸, 苯丙氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 缬氨酸 各	100
谷氨酰胺	25
腺嘌呤, 鸟嘌呤, 尿嘧啶 各	10
吡哆胺-HCl	0.4
核黄素, 硫胺素, 菸酸, 泛酸 各	0.2
对氨基苯甲酸	0.04
叶 酸	0.02
生物素	0.0002

要素的要求中, 最为严格的是必须选择适于它生长而不是适于某种生化反应出现的某些氮源, 提供它们生长所需的某些维生素和氨基酸。不然菌体的生长将受到限制。值得注意的一个实际问题是生产上提供某些底物时, 应作到既能满足上述两要素又能满足不同生产目的(如菌体或代谢产物)的碳氮比。这些问题是值得深入研究的课题。

参 考 文 献

- [1] 陈驹声: 近代工业微生物, 上册, p8, 上海科学技术出版社, 1979。
 [2] 刘自镛等译: 细菌学概论, 第 115—117 页, 山东科学技术出版社, 1981。

- [3] 中国科学院微生物研究所编写组: 菌种保藏手册, 科学出版社, 北京, 第 218 页, 1980 年。
 [4] Buchanan, R. E. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed., p. 492, 1974.
 [5] Friedeman, T. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **130**: 757—761, 1939.
 [6] Lindmark, D. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 3609, 1969.
 [7] Kagamiyama, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **245**: 2819, 1970.
 [8] Moat, A. G. et al.: *Microbiol. Physiology*, 136—139, 1979.
 [9] 中华人民共和国卫生部: 食品卫生检验方法, 技术标准出版社, 北京, 1976 年, 第 35 页。
 [10] Devries, W. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **63**: 333, 1970.
 [11] Hempling, W. P. et al.: *Bacteriol. Proc.*, The 69th Annual Meeting, p. 172, 1969.
 [12] Sin, P. M. L. and H. G. Wood: *J. Biol. Chem.*, **237**: 3044, 1962.
 [13] 王龙华等译: 微生物学的发展, 科学出版社, 北京, 1985 年, 第 4 页。
 [14] Hook, A. E. and F. N. Fabian: *Chemical and Bacteriological Studies on Peptones*, Mich. State Coll. Agric., *Exp. Sta. Bull.*, p. 185, 1943.
 [15] 徐浩译: 工业微生物学, 科学出版社, 北京, 1975 年。
 [16] Abo-Elnaga, I. G. and O. Kander: *Zener. Bacteriol. Parasitenk. Abt.*, **119**: 1, 1965a.
 [17] Kihara, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **197**: 783—807, 1952.
 [18] 张宽厚: 细菌生理学, 人民卫生出版社, 1962 年, 第 59—60 页。
 [19] Dappe, W. E. and G. H. Meade: *J. Bact.*, **76**: 48, Cappe 1952.
 [20] Macleod, R. A. and E. E. Snell: *J. Biol. Chem.*, **176**: 39, 1948.
 [21] National Dairy Research Laboratories, Inc., *Manual Amino Acids* Oakdale, L. I., New York, p. 75, 1949.
 [22] Snell, E. E.: *Advances in Protein Chem.*, **2**: 85—118, 1945.
 [23] Johnson, B. C.: *Methods of Vitamin Determination*, p. 58, 1948.