

紫外线诱变和恒化器培养筛选耐 高温的高产乳酸菌

鲁明波^{1,2} 曾翔^{1,2} 张力^{1,2} 卢正东^{1,2} 余龙江^{1,2*}

(1. 华中科技大学分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074)

(2. 华中科技大学生命科学与技术学院资源生物学与生物技术研究所 湖北 武汉 430074)

摘要: 本文探讨了利用紫外线诱变结合恒化器富集筛选耐高温高产乳酸菌的方法。首先以一株鼠李糖乳杆菌为出发菌种,并用紫外线的方法进行诱变,然后通过恒化器培养的方法在55°C下进行了耐高温高产菌株的富集。最终获得了9株耐高温菌株,其在高温下的产酸能力较出发菌株有了较大提高,其中一株突变株HT1发酵48 h后L-乳酸产量达到了62.9 g/L,比出发菌株提高了18.1 g/L。本方法比一般平板筛选方法的效率高,大大减轻了复筛的工作量。

关键词: 乳酸菌, 紫外线诱变, 耐高温, 恒化器富集

Ultraviolet Mutagenesis Combined Chemostat Enrichment Method to Screen High-temperature Resistant and High-yield Lactic Acid Bacteria

LU Ming-Bo^{1,2} ZENG Xiang^{1,2} ZHANG Li^{1,2} LU Zheng-Dong^{1,2} YU Long-Jiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

(2. Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: This paper discusses the use of ultraviolet mutagenesis combined chemostat enrichment method to screen high-temperature resistant and high-yield lactic acid bacteria. Firstly, treated a strain of *Lactobacillus rhamnosus* with ultraviolet rays as mutagen, and then, before plate screening, used the chemostat continuous culture method to enrich high-temperature resistant and high-yield strains at 55°C. At last we obtained nine high-temperature strains. When fermented at 55°C, the highest production of L-Lactic acid was 62.9 g/L in 48 hours, which was 18.1 g/L higher than the starting strain. It was found that this method was more efficient than direct plate screening method by a comparing experiment, greatly reducing the workload of re-screening.

Keywords: Lactic acid bacteria, Ultraviolet mutagenesis, High-temperature resisted, Chemostat Enrichment

乳酸是目前世界上公认的三大有机酸之一, 其广泛应用于食品、医药、化工、制革、纺织、环保和农业等诸多领域^[1]。随着白色泡沫污染日益严重, 聚乳酸产品因为其可生物降解的特性, 也越来越受到人们的青睐^[2]。目前化学合成法生产乳酸均为 DL 型, 无法达到聚乳酸的要求^[3], 然而, 用微生物发酵法可以得到符合聚乳酸生产要求的 L-乳酸, 因而近年来受到学者们的广泛关注^[4-5]。

普通乳酸细菌最适发酵温度在 37°C–42°C, 提高发酵温度后, 其产量会大幅度减少^[6]。主要是由于细菌体内的蛋白质在高温下容易变性所致^[7]。然而提高乳酸菌的发酵温度可以大大减少工厂生产中冷却水的消耗, 降低发酵成本; 同时, 发酵温度的提高可以减少杂菌污染的机会, 提高乳酸的纯度, 减少倒罐几率^[8-9], 所以如何改良细菌的高温耐受性逐渐引起了许多国内外研究者的关注。例如, 崔国艳^[10]等用 He-Ne 激光成功诱变选育高温乳酸菌, 选育出一株耐高温且产酸能力强的菌株 TL1, 70°C 培养下突变株生物量是原菌株的 12 倍, 生物量多达 1.275×10^9 个/mL, 且其具有良好的遗传稳定性。孟利强^[11]等通过紫外诱变和 EMS 双重诱变的方法使菌株在 50°C 下产酸能力有了较大的改善, 72 h L-乳酸的产量达到了 73.4 g/L, 比出发菌株提高了 39.8 g/L。

恒化器作为一种经典的实验方法, 可以有效的在逆境中富集、筛选某些具有抗逆性的菌株, 但利用恒化器进行富集、筛选耐高温菌却未见报道。在本实验中, 以一株鼠李糖乳杆菌为原始出发菌株, 利用紫外诱变的方法联合采用恒化器在 55°C 下进行富集筛选耐高温乳酸菌, 获得了 9 株耐高温菌株, 其在高温下的产酸能力较出发菌株有了较大提高, 其中一株突变株 HT1 发酵 48 h 后 L-乳酸产量达到了 62.9 g/L, 比出发菌株提高了 18.1 g/L。

1 材料与方 法

1.1 菌种

本实验采用的原始菌株为鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*), 由实验室保存。

1.2 培养基

种子培养基: MRS 培养基^[12]。

发酵培养基: A 液: 酵母粉 15.0 g, 500 mL 蒸

水; B 液: 葡萄糖 100.0 g, CaCO₃ 50.0 g, 500 mL 蒸馏水。A 液和 B 液分别于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 冷却至 50°C 时 1:1 混合备用。

摇瓶发酵培养基: 酵母粉 15.0 g, 葡萄糖 100.0 g, 蒸馏水 1000 mL, 于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.3 菌种活化

将保存于灭菌脱脂乳试管中的菌种, 隔月传代 1 次, 使用前将菌种转移至 MRS 培养基中, 42°C 过夜培养, 达到活化目的。

1.4 生长曲线的测定

将保存的鼠李糖乳杆菌活化后取 1% (V/V) 种子液接种于 MRS 培养基中, 42°C 下静置培养。每 2 h 取样, 培养 24 h 后测定 OD₆₀₀。以时间为横坐标, OD 值为纵坐标做图, 得到该菌株的生长曲线。

1.5 紫外线(UV)诱变

开启紫外灯预热 20 min, 取 42°C 培养 10 h 的菌液 10 mL 于培养皿中, 在磁力搅拌下, 打开皿盖进行紫外线照射, 分别照射 15、30、45、60、75、90、105 和 120 s, 进行适当稀释后涂布于 MRS 平板上, 42°C 恒温培养箱中避光培养 48 h, 计算每皿菌落数, 获得最适诱变剂量。

1.6 恒化器培养

利用恒化器, 在 55°C 下培养诱变过的菌株, 以一定的稀释率不断加入新鲜培养基, 同时以相同速率排出发酵液。连续培养 7 d 后, 保存菌种。

1.7 分析方法

L-乳酸、葡萄糖的定量分析采用 SBA-40D 型葡萄糖-乳酸生物传感分析仪(山东省科学院)进行测定。

生物量的测定采用比浊法, 将发酵液稀释后, 利用分光光度计(Cary-5 紫外光谱仪, 美国瓦里安技术有限公司)测定 OD₆₀₀。

2 结果与讨论

2.1 生长曲线的绘制

为了了解该菌种的生长情况以及为紫外诱变做准备。按照 1.4 的方法, 绘制生长曲线。由图 1 可以看出, 接种后的前 4 h 为延滞期, 从 6 h 到 20 h 为对数生长期, 20 h 后为稳定期。由于紫外诱变在菌种的对数生长初期效果最明显, 所以选取培养 10 h 的乳酸菌作为诱变菌种。

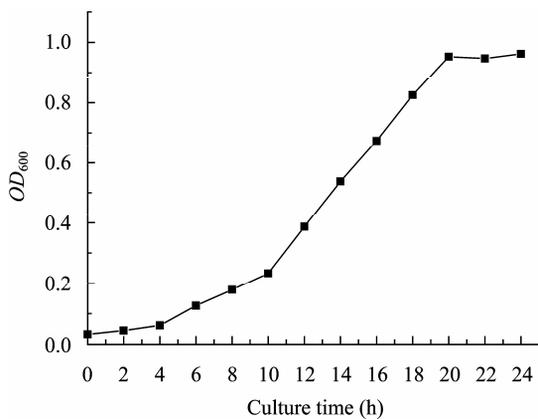


图1 鼠李糖乳杆菌的生长曲线
Fig. 1 Growth curve of *Lactobacillus rhamnosus*

2.2 致死率曲线的绘制

按照 1.5 的方法制作致死率曲线, 结果见图 2。可以看出, 随着诱变时间增加, 致死率逐渐上升。诱变剂存在最适剂量, 近年来的研究发现, 诱变剂量稍低有利于正向突变的发生, 目前一般采用致死率 70%–80% 的剂量。由图 2 可知, 紫外线处理时间为 45 s 时, 致死率为 76%, 故取 45 s 为诱变时间。

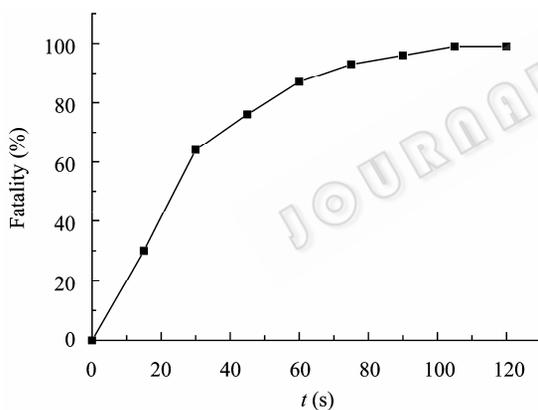


图2 鼠李糖乳杆菌的致死曲线
Fig. 2 Lethality rate curve of *Lactobacillus rhamnosus*

2.3 诱变菌种复筛方法比较

2.3.1 一般方法: 将诱变过的菌悬液稀释、涂平板, 于 55°C 下避光培养 72 h。将其中生长较快、菌落较大的菌落挑出, 进行摇瓶复筛。由图 3 看出, 挑选的 13 株菌中, 其中有 5 株菌较出发菌在高温下产量有明显提高; 5 株菌较出发菌无明显变化; 3 株菌比出发菌产量稍低。由此可看出, 此种方法筛选效率偏低, 约为 38% 左右。这可能是由于突变株的耐热性有所提高, 但产酸能力并没有提高, 甚至有所下降所致。

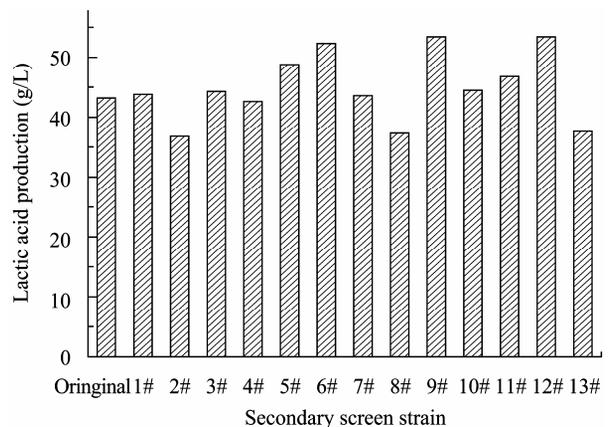


图3 筛选菌株在 55°C 下发酵 48 h L-乳酸产量
Fig. 3 L-Lactic acid production of the screen strains which fermented at 55°C in 48 hours

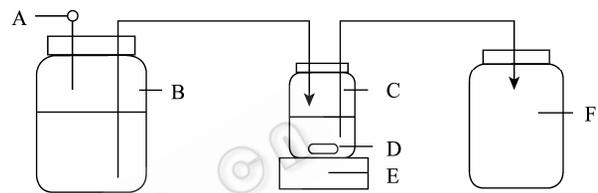


图4 恒化器示意图
Fig. 4 Block diagram of chemostat culture

注: A: 空气过滤器; B: 补料罐; C: 发酵罐; D: 搅拌子; E: 恒温磁力搅拌器; F: 储罐。

Note: A: Air Filter; B: Feeding tank; C: Fermenter; D: Magnetic stirrer; E: Thermostatic magnetic stirrer; F: Tank.

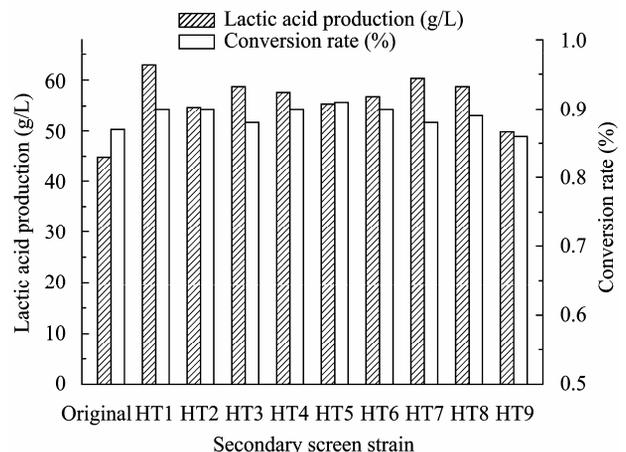


图5 经过恒化器富集得到的菌株在 55°C 下发酵 48 h L-乳酸产量

Fig. 5 L-Lactic acid production of the strains enriched by chemostat which fermented at 55°C in 48 hours

2.3.2 恒化器筛选: 将经过诱变后的菌液接入恒化器装置中于 55°C 下培养, 20 h 后以一定速率不断加入新鲜培养基, 同时以同样速率排出发酵液(稀释率为 0.1)。培养 1 周后, 将恒化器中的菌液适当稀释,

涂平板。55°C 下培养, 约 36 h 后可观察到菌落。

由图 5 可以看出, 经过恒化器筛选得到 9 株菌株, 高温下产酸能力都较出发菌株高, 筛选效率达到 100%。其中突变株 HT1 发酵 48 h 的 L-乳酸产量达到 62.9 g/L, 比出发菌株提高了 18.1 g/L。

结果显示, 经恒化器富集培养后, 平板筛选获得正性突变的几率大幅度上升, 这是因为只有在高温下有快速生长能力的菌株, 才能在恒化器中生存, 否则被洗出。同时, 乳酸细菌合成乳酸是与其生长部分相关的, 这意味着菌体生长越旺盛, 乳酸合成能力就越强^[13]。所以, 通过这种方法可以得到既耐高温又能快速产酸的优良菌株。

3 结论

通过紫外诱变和恒化器相结合富集筛选耐高温菌, 最终得到了 9 株耐高温突变株, 其中突变株 HT1 在高温下发酵时 L-乳酸产量比出发菌株提高了 18.1 g/L。同时采用此种方法筛选耐高温的高产菌株, 其筛选效率达到了 100%, 较一般平板筛选方法的效率高出约 62%。恒化器是一种简单有效的筛选耐高温菌的方法。

参 考 文 献

- [1] 梁诚. 乳酸生产、应用及市场前景. 广西化工, 2000, 29(4): 37-39.
[2] Niju N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L(+)-lactic acid

fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2004, 7(2): 167-179.

- [3] 王立梅, 齐斌. L-乳酸应用及生产技术研究进展. 食品科学. 2007, 28(10): 608-612.
[4] Datta R, Tsai SP, Bonsignore P, *et al.* Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev*, 1995, 16(2/3): 221-231.
[5] Lorenzo MLD. Crystallization behavior of poly (L-lactic acid). *European Polymer Journal*, 2005(41): 569-575.
[6] 于雷, 裴晓林, 雷霆. 耐糖鼠李糖乳杆菌发酵生产 L-乳酸的研究. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 84-87.
[7] Angelis MD, Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 2004(4): 106-122.
[8] Ohara H, Yahata M. L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. *Ferment Bioeng*, 1996, 81(3): 272-274.
[9] Heriban V, Sturdik E, Zalibera L, *et al.* Process and metabolic characteristics of *Bacillus coagulans* as a lactic acid producer. *Lett Appl Microbiol*, 1993(16): 243-246.
[10] 崔国艳, 陈五岭. He-Ne 激光诱变选育高温乳酸菌. 中外医疗, 2009, 28(11): 15-16.
[11] 孟利强. 嗜热 L-乳酸菌的选育及其发酵条件的优化. 吉林大学硕士毕业论文, 2008.
[12] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 84-85.
[13] Kwon S, Yoo IK, Lee WG, *et al.* High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 73(1): 25-34.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。