

一株耐高温 L-乳酸高产菌的选育及其发酵特征^{*}

Breeding and Characterization of a Thermotolerant and High-yield *Lactobacillus rhamnosus* for L-Lactic acid Production

李检秀¹, 孙 靓¹, 吴军华², 郭 铃¹, 孙菲菲¹, 黄艳燕¹

LI Jian-xiu¹, SUN Liang¹, WU Jun-hua², GUO Ling¹, SUN Fei-fei¹, HUANG Yan-yan¹

(1. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007)

(1. State Key Laboratory of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007)

摘要: 对鼠李糖乳杆菌菌株 *Lactobacillus rhamnosus* JCM1553 进行紫外诱变, 选育得到一株耐高温 L-乳酸高产突变菌 GX-6。在 47℃, 分别以葡萄糖和木薯淀粉为底物, 研究 GX-6 菌株发酵生产 L-乳酸的情况并考察 GX-6 菌株的遗传稳定性。结果表明, 以葡萄糖为底物时, 发酵 56h 的 L-乳酸产量达到 117g/L, 比出发菌(100g/L)提高 17%, 糖酸转化率 68.8%; 以木薯淀粉为底物时, 发酵 72h 的 L-乳酸产量达到 138g/L, 比出发菌株(73g/L)提高 77.6%, 糖酸转化率达到 85.4%。经 16 次传代培养, GX-6 菌株的乳酸发酵性能没有发生显著变化, 具有较好的遗传稳定性。

关键词: 鼠李糖乳杆菌 紫外诱变 高温 L-乳酸发酵

中图分类号: TQ921 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0269-04

Abstract: By UV mutagenesis, a high-yield and thermostable L-lactic acid mutant strain-GX-6 was originally obtained from *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1553. At 47℃, the maximum L-lactic acid yield of GX-6 in glucose was 117g/L for 56h, which was 17% higher than that of the original strain(100g/L), with a conversation rate of 68.8%. The maximum L-lactic acid yield was 138g/L for 72h under the same condition in cassava starch, 77.6% higher than that of the original strain(73g/L) and the conversation rate reached to 85.4%. After subculture for 16 generations, the L-lactic acid production capacity of GX-6 remains unchanged, indicating that the mutant is stable.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*, UV mutagenesis, L-lactic acid fermentation at high temperature

L-乳酸是合成高分子聚乳酸(Polylactic acid, PLA)的主要原料。聚乳酸因其无毒、无刺激、生物可降解等特性, 被广泛应用于医用高分子材料、消费品、包装等领域, 备受人们关注^[1~4]。近年来, 高光学纯度、高产量、高转化率的 L-乳酸生产技术的开发成为

国内外研究的热点^[5]。

目前用于发酵生产 L-乳酸的工业微生物主要有乳杆菌属和根霉属。乳杆菌属发酵为同型发酵, 具有转化率高、产酸能力强等特点, 因而被广泛用于 L-乳酸发酵生产。理想的工业乳酸生产菌株最好能兼具热稳定性好、耐酸能力强等特点。提高发酵菌株的耐高温能力是近年来改良乳酸生产菌种的一个重要发展方向。高温下发酵有至少以下几个优点: (1) 减少杂菌污染, 降低倒罐几率。自然界微生物的生长温度大多在 45℃以内, 在高于 45℃的条件下, 微生物几乎

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 李检秀(1985-), 女, 硕士, 主要从事微生物学方面的研究。

^{*} 国家科技支撑计划项目(2007BAD75B06), 广西科学基金项目(桂科攻 0782003-4), 广西科学院基本科研业务费项目(10YJ25SW 11)资助。

不生长或生长缓慢；(2)在适宜温度范围内，较高的温度可以提高催化效率，缩短发酵周期^[6-7]；(3)在以玉米、小麦、木薯等淀粉质为原料进行发酵时，提高发酵温度一方面可以进行同步化发酵，减少原料前处理时间，缩短生产周期；另一方面同步化发酵过程中，淀粉糖化和葡萄糖消耗同时进行，可以减轻发酵起始的底物抑制，进而提高乳酸产量^[8]。

在改良乳酸菌高温耐受性方面：孟利强等^[9]通过紫外和 EMS 双重诱变选育得到一株突变株，在 50℃ 发酵 72h，L-乳酸产量达到 73.4g/L，比出发株提高了 39.8 g/L；鲁明波等^[7]利用紫外诱变结合恒化器的方法选育得到一株突变株，在 55℃ 发酵 48h，L-乳酸产量达 62.9g/L，比出发株提高了 18.1 g/L。

本研究对鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* JCM1553 进行紫外诱变，选育得到一株遗传性能稳定、耐 47℃ 高温的 L-乳酸高产突变菌株，为工业化发酵生产 L-乳酸提供了新的备选菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

鼠李糖乳杆菌 1553 (*Lactobacillus rhamnosus*, JCM 1553)，购自日本微生物保藏中心，于 -80℃ 下用甘油保存备用。

1.1.2 培养基

MRS 培养基^[9]：葡萄糖 20 g/L，酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，牛肉膏 10 g/L，CH₃COONa·3H₂O 5 g/L，K₂HPO₄·3H₂O 2.62 g/L，柠檬酸氢二铵 2 g/L，MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L，MnSO₄·H₂O 0.056 g/L。

YE 筛选培养基^[10]：葡萄糖 150 g/L、酵母粉 20 g/L、CaCO₃ 20 g/L、琼脂粉 15 g/L。

发酵培养基^[10]：葡萄糖 170 g/L 或木薯淀粉糖化液 190 g/L、酵母粉 20 g/L、CaCO₃ 80 g/L。

制备培养基时，将葡萄糖与其它成分分开配制，115℃ 灭菌 20min，冷却至 60℃，按比例混合。

1.2 方法

1.2.1 种子培养

将低温保藏的菌液融化，划线转到 MRS 固体平板，37℃ 培养直至单克隆生成。挑取单克隆至 MRS 培养液，37℃ 静置过夜培养。按 1% 的接种量转接培养至对数生长中后期。

1.2.2 紫外诱变

将按照 1.2.1 的方法培养得到的菌液，12000 r/min 离心 10min，弃上清，用生理盐水反复洗涤菌体

沉淀两次，然后制成菌数 1×10^8 /ml 菌悬液。取 10 ml 菌悬液注入直径为 5cm 的平皿中，置于磁力搅拌器上进行紫外照射。紫外灯功率 15W、照射距离 30cm、照射时间分别为 0s、15s、30s、45s、60s、90s、120s，分别涂布于 YE 筛选平板，47℃ 避光静置培养^[11]。

1.2.3 摇瓶发酵

将按照 1.2.1 的方法培养得到发酵种子液，用血球计数板计菌落数，调节接种量使发酵液起始菌密度在 1×10^7 /ml 左右。发酵试验装液 100 ml 于 250 ml 三角瓶，摇床温度 47℃、转速 200 r/min。

1.2.4 木薯淀粉糖化液的制备

木薯淀粉在 95℃ 液化 1h 后，加入糖化酶于 60℃ 糖化 2h，得到糖化至一定程度的糖化液。

1.2.5 耐高温菌株的筛选

利用 YE 固体平板进行初筛。在 47℃ 选取生长速度快、透明圈直径与菌落直径比值较大的作为复筛对象，然后按照 1.2.3 的方法进行复筛。

1.2.6 分析方法

生物量：用比浊法，在 600 nm 用紫外分光光度计测定。

L-乳酸：采用 SBA-40C 型葡萄糖-乳酸生物传感分析仪（山东省科学院生产），按照仪器的操作指南进行测定。

还原糖：用 3,5-二硝基水杨酸比色法在 540 nm 测定^[12]。

总糖：取糖化醪 10g，加 70ml ddH₂O 和 20ml 20% HCl，沸水浴 1h，冷却后用 20% NaOH 中和，12000r/min 离心 5min，取上清，参照还原糖测定方法进行测定。

糖酸转化率：糖酸转化率(%) = L-乳酸产量 / 发酵起始还原糖(葡萄糖为底物)或总糖含量(木薯淀粉为底物)。

2 结果与分析

2.1 耐高温菌株的筛选

利用 YE 固体平板对经紫外诱变的突变菌株进行初筛。选取生长速度快、透明圈直径与菌落直径比值较大的菌株进行复筛，筛选得到乳酸产量较高的突变株 GX-6，-80℃ 甘油保藏。

2.2 突变菌株 GX-6 与出发菌发酵性能的比较

2.2.1 GX-6 与出发菌发酵葡萄糖生产 L-乳酸的情况

在 47℃、170g/L 葡萄糖浓度下，摇瓶发酵 56h，GX-6 和出发菌的菌体密度、L-乳酸产量情况见图 1。

出发菌在发酵 0~24h 生长缓慢, 发酵 24h 后进入对数生长期, 发酵 48h 后生长趋于稳定。发酵 56h, 最大菌体密度达到 14.9 (OD_{600} , 下同), 此时 L-乳酸产量也达到最大(100g/L), 糖酸转化率 58.8%, 平均产酸速率 1.8g/(L·h), 最大产酸速率 3.8g/(L·h); GX-6 在发酵 0~8h 生长缓慢, 发酵 8h 后进入对数生长期, 比出发菌提前 16h, 发酵 48h 后生长趋于稳定。发酵 56h, 最大菌体密度达到 18.8, 比出发菌提高了 26.2%。L-乳酸产量最大为 117g/L, 比出发菌提高了 17%。糖酸转化率 68.8%, 平均产酸速率 2.1g/(L·h)。最大产酸速率 4.9g/(L·h), 比出发菌提高了 30%。

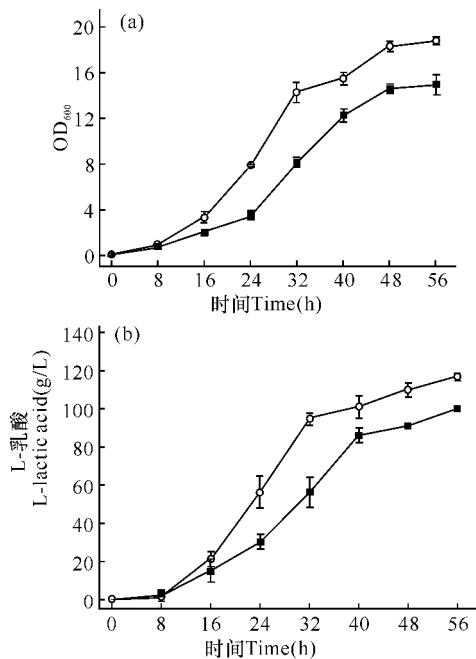


图 1 在 47℃、170g/L 葡萄糖条件下, GX-6 与出发菌 (JCM 1553) 发酵生产 L-乳酸的情况

Fig. 1 Fermentation of GX-6 and original stain in 170g/L glucose for L-lactic acid production at 47°C

(a) GX-6 与出发菌的生长曲线, (b) GX-6 与出发菌的产酸曲线。

(a) The growth curves of GX-6 and original strain, (b) The curves of L-lactic acid of GX-6 and original strain.

2.2.2 GX-6 与出发菌发酵木薯淀粉糖化液生产 L-乳酸的情况

由于较高葡萄糖浓度对菌株的生长有一定的抑制作用, 为减轻发酵起始因葡萄糖浓度过高而产生的底物抑制, GX-6 和出发菌在 47℃、190g/L 木薯淀粉糖化液条件下, 摇瓶发酵 72h, 发酵过程中菌体密度、残糖量、L-乳酸产量情况见图 2。由图 2(a) 可见, 出发菌发酵 8h 后进入对数生长期, 发酵 40h 后生长趋于稳定, 发酵 64h 达到最大菌体密度 10.8; GX-6 发酵 8h 后进入对数生长期, 发酵 40h 达到最大菌体密

度 14.2, 其后菌体密度基本保持平稳, 发酵 64h 后菌体密度略有下降。与出发菌相比, GX-6 的最大菌体密度提高了 31.5%, 而且时间提前了 24h。由图 2(b)、图 2(c) 可知, 发酵 72h, 出发菌株 L-乳酸最大产量为 78g/L, 糖酸转化率 48.3%, 平均产酸速率 1.1g/(L·h)。GX-6 的 L-乳酸最大产量达到 138.5g/L, 比出发菌株提高了 77.6%, 糖酸转化率达到 85.4%, 平均产酸速率 1.9g/(L·h)。

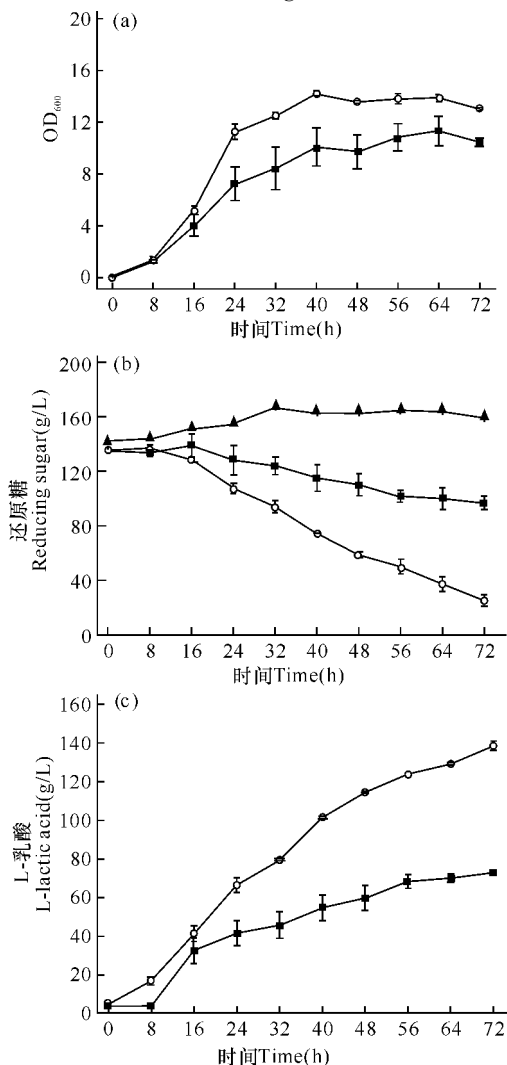


图 2 47℃、190g/L 木薯淀粉糖化液条件下, GX-6 与出发菌发酵生产 L-乳酸的情况

Fig. 2 Fermentation of GX-6 and original strain in 190g/L cassava starch for L-lactic acid production at 47°C

(a) GX-6 与出发菌的生长曲线, (b) GX-6 与出发菌的残糖量曲线, (c) GX-6 与出发菌的产酸曲线。

(a) The growth curves of GX-6 and original strain, (b) The curves of residual sugar of GX-6 and original strain, (c) The curves of L-lactic acid of GX-6 and original strain.

图 2(b) 中的空白对照为不接种菌液的发酵培养基。由于木薯糖化液未糖化完全, 因此发酵初始, 发酵液中还原糖含量仅约 140g/L。在 47℃ 的高温下,

糖化酶进一步酶解, 发酵 32h 后发酵液中还原糖含量达到最大值 167g/L。这也解释了在发酵 16h 和发酵 8h, 出发菌株和 GX-6 发酵液还原糖含量分别较前一个点不降反升的现象。因为此时发酵液中葡萄糖的生成速率大于其消耗速率。同时, 在以木薯糖化液为底物的发酵初期, 出发菌和突变菌株几乎直接进入对数生长期, 比同等条件下以葡萄糖为底物的生长速度快。说明以木薯糖化液为底物, 47 °C 高温同步发酵方式成功地解除了乳酸发酵中高浓度底物的抑制。

2.3 突变菌株的遗传稳定性

按照 1.2.1 的方法对 GX-6 进行连续传代, 第 1 代、第 6 代、第 11 代、第 16 代在 47 °C、170g/L 葡萄糖条件下, 摇瓶发酵 48h, L-乳酸产量以及残糖量如表 1 所示。GX-6 各代的产酸能力基本一致, 是一株遗传稳定性好的 L-乳酸高产突变株。

表 1 突变菌株 GX-6 连续传代实验结果

Table 1 Result of serial passage on mutant strain GX-6

传代次数 Generation	诱变菌株 Mutant strain GX-6	
	L-乳酸产量 Production of L-lactic acid(g/L)	残糖量 Reduced sugar(g/L)
T ₁	110	54
T ₆	111	53
T ₁₁	110	54
T ₁₆	109	55

3 结束语

目前, 工业上通常以玉米、小麦、木薯等淀粉质生产原料^[8, 13]来生产高纯度的 L-乳酸。但是以淀粉为原料进行两步法发酵时, 存在原料的前处理时间较长, 能耗大的问题。通常淀粉质的液化温度为 60 °C, 如果能提高菌种发酵温度, 便能进行同步化发酵, 可以在一定程度上节约原料前处理时间, 缩短生产周期。但是也有研究表明, 当发酵温度超过 50 °C, 会显著影响菌体的生长速度, 进而影响产酸量^[6, 7, 14], 因此 42 ~ 50 °C 是工业发酵生产 L-乳酸的理想温度。

本研究以 47 °C 为选育温度, 得到一株遗传性状稳定, 高产 L-乳酸的菌株 GX-6。该菌株在 47 °C 下发酵葡萄糖或木薯糖化液生产 L-乳酸的产量显著高于出发菌株。尤其是在以木薯淀粉为原料的同步化发酵中, 解除了以葡萄糖为原料发酵生产乳酸存在的高浓度底物抑制问题, L-乳酸产量最高可达 138.5g/L。利用该菌以木薯淀粉为原料生产 L-乳酸, 不仅提高了木薯的利用价值, 同时降低了 L-乳酸的生产成

本^[13, 15, 16], 因而菌株 GX-6 有望成为工业化生产 L-乳酸的菌株。

参考文献:

- [1] 梁诚. 乳酸生产、应用及市场前景[J]. 广西化工, 2000, 29(4): 37-39.
- [2] Niju N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2004, 7(02): 167-179.
- [3] 江镇海. 聚乳酸的应用与市场前景[J]. 上海化工, 2010, 35(2): 37-38.
- [4] Yasuniwa M. Crystallization behavior of poly(L-lactic acid)[J]. European Polymer Journal, 2006(47): 7554-7563.
- [5] Angelis M D, Gobetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review[J]. Proteomics, 2004(04): 106-122.
- [6] 孟利强. 嗜热 L-乳酸菌的选育及其发酵条件的优化[D]. 吉林: 吉林大学硕士毕业论文, 2008.
- [7] 鲁明波, 曾翔, 张力, 等. 紫外线诱变和恒化器培养筛选耐高温的高产乳酸菌[J]. 微生物学通报, 2010, 37(04): 520-523.
- [8] 王玉, 李政, 郝利民, 等. 产淀粉酶乳酸菌及其产酸特性的研究进展[J]. 天津农学院学报, 2010, 17(01): 33-36.
- [9] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 84-85.
- [10] 于雷. 应用基因组改组选育耐糖 L-乳酸高产菌株[J]. 食品科学, 2007, 28(09): 369-373.
- [11] 李小平, 魏玲玲, 张惠发, 等. 保加利亚乳杆菌乳酸高产菌株的紫外诱变选育[J]. 山西农业大学学报, 2010, 30(01): 88-90.
- [12] National Renewable Energy Laboratory (NREL). Measurement of cellulose activities [M] // Laboratory analytical procedure, Lap-006, NREL Golden Co, 1996.
- [13] 高年发, 石青松, 杨慧灵, 等. 细菌 L-乳酸发酵培养基的优化[J]. 中国酿造, 2003, 19: 4-9.
- [14] 崔国艳, 陈五岭. He-Ne 激光诱变选育高温乳酸菌[J]. 中外医疗, 2009, 28(11): 15-16.
- [15] 孙靓, 孙菲菲, 黄艳燕, 等. 木薯淀粉发酵生产 L-乳酸的培养条件优化[J]. 中国酿造, 2009, 7: 33-37.
- [16] 陈露, 吕宇晶, 郑丹. 广西木薯产业发展的市场前景分析[J]. 今日南国, 2009, 112(01): 88-89.

(责任编辑: 陈小玲)