

一株耐酸 L-乳酸生产菌的 Co⁶⁰ 诱变选育*

Screening of an Acid Tolerant *Lactobacillus acidophilus* strain by Co⁶⁰ Mutagenesis

李检秀, 孙 靓, 陈 东, 郭 铃, 黄艳燕, 孙菲菲

LI Jian-xiu, SUN Liang, CHEN Dong, GUO Ling, HUANG Yan-yan, SUN Fei-fei

(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)

(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)

摘要:对嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) CICC 6005 菌株进行 Co⁶⁰ 诱变, 从突变体中选育得到 1 株生长快速的耐酸突变菌株 LS-8。该菌株在 pH 值 3.6 的条件下发酵 72h, 在 pH 值 3.8 的条件下发酵 104h, L-乳酸产量分别达 9.2 g/L 和 16.5 g/L。

关键词:嗜酸乳杆菌 Co⁶⁰ 诱变 L-乳酸酸性发酵

中图法分类号: TQ921 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)04-0392-04

Abstract: Originally from *Lactobacillus acidophilus* CICC 6005, an acid tolerance mutant strain LS-8 was obtained by Co⁶⁰ mutagenesis and the selected strain had high growing speed as target. At pH value 3.6 and 3.8, the yield of L-lactic acid by fermentation of LS-8 for 72h and 104h were 9.2g/L and 16.5g/L, respectively, which revealed much higher than that of reported investigation.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, Co⁶⁰ mutagenesis, L-lactic acid fermentation

L-乳酸是一种重要的多用途有机酸, 广泛应用于食品、医药、饲料、化工、皮革、纺织、电子工业等诸多领域。以 L-乳酸为主要原料合成的聚乳酸(Polylactic acid, PLA), 由于具有无毒、无刺激、生物可降解等特性, 近年来备受关注^[1~3]。开发得到高光学纯、高产量、低成本的 L-乳酸生产技术最近几年也成为国内外研究的热点^[4]。

发酵法是目前生产 L-乳酸的主要方法, 所使用的发酵菌种主要有乳杆菌和根霉菌, 乳杆菌因具有转化效率高、产酸能力强、副产物少等优点而成为首选。然而, 该菌种的最佳产酸条件通常在中性 pH 值范围, 生产上需要对培养基进行灭菌, 然后进行纯培养发酵, 存在能耗较高的问题。利用低 pH 值条件对其它微生物的抑制作用, 实现 L-乳酸的酸性发酵生产,

可以免去对培养基的高温灭菌, 简化生产操作, 减少生产能耗, 具有显著的经济意义。此外, 乳酸的 pKa 值为 3.86。在低 pH 值, 尤其是 pH 值低于 3.8 的环境下, 溶液中的乳酸主要以游离形式存在^[5,6], 可以结合原位分离技术, 直接从发酵液中分离纯化乳酸, 能有效简化后期分离纯化工艺, 消除因使用碱性原料而带来的副产物污染并降低发酵成本^[7]。因此, 提高发酵菌株的耐酸性成为近年来改良乳酸生产菌种的一个重要发展方向。Patnaik^[8]等选育得到 1 株能够在 pH 值 3.8 条件下生长的乳酸菌, 在 pH 值 4.4 条件下发酵 40h, 乳酸产量达到 3.8g/L。王玉华^[9,10]等分别利用改造后的干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌, 在 pH 值 3.8 条件下发酵 48h, L-乳酸产量分别达到 3.8g/L 和 5.0g/L。

鉴于嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) 具有较好的耐酸性^[11], 本研究以嗜酸乳杆菌 CICC 6005 为出发菌株, 进行 Co⁶⁰ 诱变, 选育得到 1 株耐酸性较好突变株, 命名为 LS-8, 现报道如下。

收稿日期: 2011-08-09

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

* 广西科学院基本科研业务费项目(10YJ25SW11)资助。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*, CICC 6005), 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

MRS 培养基: 葡萄糖 20 g/L、酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、 $\text{AcNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.62 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.056 g/L。

MRS-3.8(L-lactic acid) 筛选培养基: 用高纯 L-乳酸将 MRS 培养基的 pH 值调至 3.8, L-乳酸浓度约为 14g/L。

1[#] 发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L、酵母粉 20 g/L、100mM/L 柠檬酸缓冲液(pH 值 4.5)。

2[#] 发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L、酵母粉 20 g/L, 用 6 mol/L HCl 调节溶液 pH 值为 3.6 或 3.8。

1.3 种子活化与培养

将甘油保藏的菌种用 MRS 平板划线培养, 挑取单菌落接入 MRS 液体培养基, 37℃ 培养过夜, 再按 1% 的接种量转接培养 10h 至对数生长中后期。

1.4 Co^{60} 诱变筛选

取生长至对数生长后期的菌液, 以转速 12 000 r/min 离心 10min, 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 收集菌体并悬浮在生理盐水中, 配成 1×10^8 /ml 菌液以用于诱变。诱变剂量分别为 0kGy、0.2kGy、0.4kGy、0.6kGy、0.8kGy、1.0kGy、1.2kGy、1.4kGy、1.6kGy、1.8kGy。各取 100 μ l 经诱变的菌液, 分别涂布于 MRS 平板, 于 37℃ 暗培养 3d。挑单菌落接入 MRS(pH 值 3.8) 筛选培养基, 在温度 37℃、转速 200r/min 的条件下培养, 选择生长速度快的菌株, 对其的 L-乳酸发酵能力进行测定, 筛选 L-乳酸产量高的突变菌株。

1.5 摇瓶发酵

将菌株活化并培养至对数生长中后期, 分别接种于 100ml 1[#] 或 2[#] 发酵培养基, 接种量 6%, 在温度 37℃、转速 200r/min 的条件下进行 L-乳酸发酵。期间定时取样检测菌体浓度、发酵液 pH 值和 L-乳酸含量等。

1.6 分析方法

用比浊法, 在 600nm 处用紫外分光光度计测定菌体浓度; 用 Denver UB-7 精密酸度计测定 pH 值; 用 SBA-40C 型葡萄糖-乳酸生物传感分析仪(山东省科学院生产)测定 L-乳酸, 按仪器的指南进行操作。

2 结果与分析

2.1 耐酸菌株的筛选

经 Co^{60} 诱变, 共获得 47 株突变菌株。将这些菌株接入 MRS 培养基培养 4d, 除 5 株生长速率低于出发菌株外, 其余菌株的生长速率均高于出发菌株的。其中 8[#] 菌株生长最快, 其菌液的 OD_{600} 达到了 0.3858(图 1), 较出发菌株 (OD_{600} 为 0.2498) 有显著提高。表明 8[#] 菌株的乳酸耐受力有所加强。将 8[#] 菌株命名为 LS-8, 并对该菌株进行进一步研究。

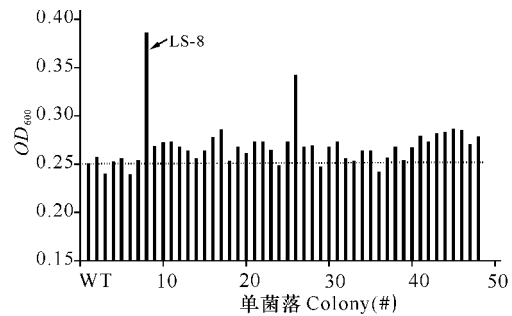


图 1 突变菌株与出发菌株在 MRS-3.8(L-乳酸) 中的生长情况

Fig. 1 Comparison of original strain and mutant strains for cell growth in MRS-3.8(L-lactic acid)

WT: 出发菌株, 2~48; 突变菌株. WT: Original strain, 2~48; mutant strain.

2.2 在 pH 值 4.5 条件下突变菌株 Ls-8 与出发菌株摇瓶发酵特征的比较

分别将突变菌株 LS-8 和出发菌株于 1[#] 发酵培养基中摇瓶发酵 96h, 每隔 8~12h 检测发酵液的菌体浓度和 L-乳酸产量。100mM/L 的柠檬酸缓冲液使发酵过程中醪液的 pH 值维持在 4.0~4.5 之间。

培养初期, 突变菌株 LS-8 和出发菌株的生长速率相差不大; 培养 32h 后突变菌株 LS-8 的生长速率显著高于出发菌株的; 发酵 48h, 出发菌株的菌体浓度几乎达到最大 (OD_{600} 为 1.9087), 而突变菌株 LS-8 的菌体浓度较出发菌株高 52.4% (OD_{600} 为 2.9097); 此后, 突变菌株 LS-8 的菌体浓度进一步提高, 培养 72h 达到最大值 (OD_{600} 为 3.6393), 菌体浓度的增大时间显著长于出发菌株的(图 2a)。两菌株的 L-乳酸产量与菌体的生长情况完全一致, 发酵最初的 24h, 两菌株的 L-乳酸产量几乎没有差异; 发酵 32h 后, 突变菌株 LS-8 产生 L-乳酸的速率显著高于出发菌株的, 而且产量逐步增高, 发酵 96h 的产量达到了最大值, 为 9.0g/L(图 2b), 较出发菌株的 5.3g/L 高 69.8%, 增产效果显著。后续的发醇试验结果

表明,100mM 的柠檬酸缓冲液一定程度上抑制了菌体的生长与产酸能力。

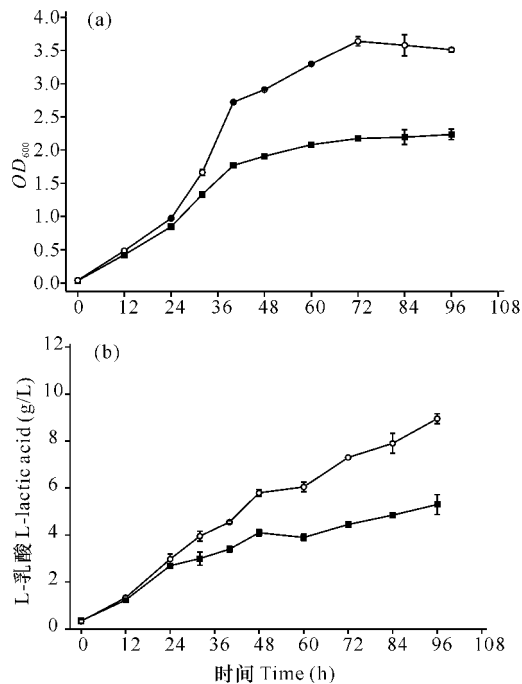


图2 LS-8与出发菌株(C6005)在 pH 值 4.5 条件下发酵的生长曲线(a)和产酸曲线(b)

Fig. 2 The curves of growth (a) and the curves of L-lactic acid (b) of LS-8 and original strain at pH value 4.5

■:6005,○:LS-8.

2.3 在低 pH 值连续发酵条件下突变菌株 LS-8 的 L-乳酸发酵情况

鉴于生产过程通常采用中途添加碱液的方法来维持发酵液 pH 值的稳定。我们将突变菌株 LS-8 活化后接入 2# 发酵培养基,发酵期间用 10mol/L 的 NaOH 调节发酵液的 pH 值,分别将发酵液 pH 值调至 3.8(图 3a)和 3.6(图 3b),使发酵过程中发酵液的 pH 值基本维持在 3.5~3.8 和 3.4~3.6。发酵过程出现多次短时间内 pH 值较低的情况,但这对菌株的生长和乳酸发酵几乎没有影响(图 2)。

在 pH 值 3.8 的条件下,发酵 0~32h,菌体的生长曲线和产乳酸曲线基本平行,表明两者为同步的。将发酵液的 pH 值进一步降低到 3.6,两曲线的平行时间减少为 24h,此后菌体的生长基本停止。在 pH 值 3.8 的条件下 L-乳酸的最高产量达到 16.5g/L, pH 值 3.6 条件下的最高产量达到 9.2g/L,说明低 pH 值条件首先抑制突变菌株 LS-8 菌体的生长,并通过抑制菌体生长的抑制导致 L-乳酸产量下降。目前一般认为,乳酸发酵的产量与菌数呈正相关关系,本实验的结果与之完全相符。

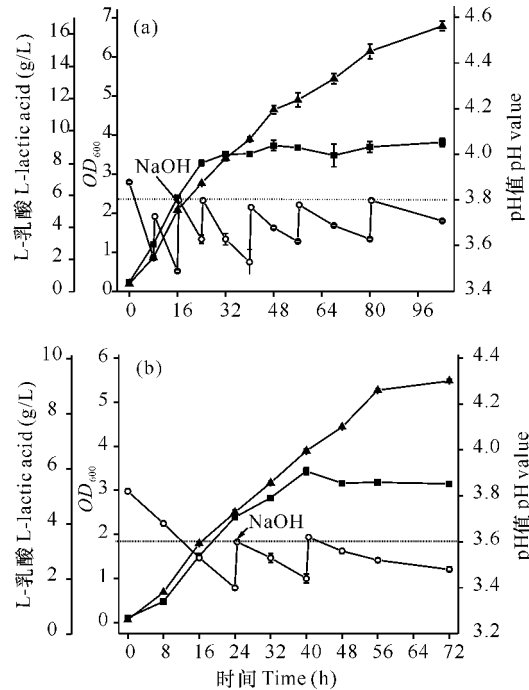


图3 LS-8 在低 pH 值条件下连续发酵生产 L-乳酸

Fig. 3 L-lactic acid fermentation of LS-8 at low pH value.

(a)pH 值为 3.5~3.8,(b)pH 值为 3.4~3.6。

(a)pH value 3.5~3.8,(b)pH value 3.4~3.6.

■: OD₆₀₀, ▲: L-乳酸,○: pH 值。■: OD₆₀₀, ▲: L-lactic acid, ○: pH value.

3 结束语

鉴于 pH 值低于 4.0 的环境可以显著抑制各种微生物的生长,在此 pH 值条件下进行 L-乳酸发酵可以免去对发酵原料的高温灭菌处理,显著降低生产能耗。因此,选育耐低 pH 值条件的 L-乳酸发酵菌株成为国内外的一个研究热点。本文采用 Co⁶⁰ 诱变的方法,选育得到 1 株突变菌株 LS-8,其耐低 pH 值的能力显著优于出发菌株。从不同 pH 值条件下菌株的生长曲线和 L-乳酸形成曲线的变化情况看,低 pH 值条件首先抑制了菌体的生长,并通过抑制发酵液的菌数而降低 L-乳酸产量。表明可将选育耐酸性好的菌株作为提高 pH 值低于 4.0 条件下 L-乳酸产量的一个有效途径。本文所选育的突变菌株 LS-8,在 pH 值 3.8 和 pH 值 3.6 条件下 L-乳酸发酵 104h 和 72h 的 L-乳酸最高产量分别达到了 16.5g/L 和 9.2g/L。这一结果显著高于同类研究报道,使我们在利用嗜酸乳杆菌实现高产 L-乳酸的酸性发酵方面向产业化靠近了一步。

参考文献:

[1] Niju N, Roychoudhury P K, Srivastava A. L(+)-lactic acid fermentation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4362 in a stirred tank reactor. Guangxi Sciences, Vol 18 No 4, November 2011

- acid fermentation and its product polymerization[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2004, 7(2): 167-179.
- [2] 江镇海. 聚乳酸的应用与市场前景[J]. 上海化工, 2010, 35(2): 37-38.
- [3] Yasuniwa M, Tsubakihara S, Lura K. Crystallization behavior of poly (L-lactic acid) [J]. European Polymer Journal, 2006(47): 7554-7563.
- [4] Angelis M D, Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review [J]. Proteomics, 2004 (4): 106-122.
- [5] 卡吉尔公司. 低 pH 乳酸发酵: 中国, 98810123. 8 [P/OL]. 2009-3-31. <http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN98810123.8&leixin=fmzl&title=低pH乳酸发酵&ipc=C12P7/56>.
- [6] Benninga H A. A history of lactic acid making [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990.
- [7] 刘勇军, 王昌禄, 曹伟锋, 等. 细菌 L-乳酸发酵的研究——耐糖高酸菌株的选育 [J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(2): 26-29.
- [8] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 707-712.
- [9] 王玉华, 李岩, 裴晓林, 等. 基因组改组提高干酪乳杆菌耐酸性生产 L-乳酸 [J]. 中国生物工程杂志, 2006(2): 53-58.
- [10] Wang Y H, Li Y, Pei X L, et al. Genome-shuffling improved acid tolerance and L-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 129: 510-515.
- [11] 赵瑞香. 嗜酸乳杆菌及其应用研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 5.

(责任编辑: 陈小玲)

以色列开发出可模拟小脑功能的电子芯片

小脑具有负责运动和协调性控制的重要作用, 小脑损伤会导致严重的行动失调。为了弄清是否能用人工智能的方法取代部分受损伤的脑组织, 以色列研究人员研发出一种可以模拟小脑功能的计算机芯片。实验中他们先教会实验鼠在听到特定声音后即眨眼睛, 然后, 使实验鼠因小脑损伤而失去这种反应能力。当研究人员将计算机芯片与实验鼠大脑连接后, 实验鼠又恢复了对特定声音的反应能力。这种可以模拟一系列自然神经活动的芯片, 具备像天然小脑那样分析传入的脑干信号和产生回应性输出的能力, 将其植入头骨外侧并通过电极与大脑连接后, 相当于接通了受损脑组织的信号输入、输出回路, 从而达到恢复小脑功能的目的。

(据科学网)