

降胆固醇植物乳杆菌的紫外诱变选育

于长青¹ 张丽娜¹ 邓旭明^{2*}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院 大庆 163319)

(2. 吉林大学畜牧兽医学院 长春 130062)

摘要: 通过对植物乳杆菌进行紫外线诱变处理, 采用胆固醇梯度平板的初筛方法和体外降胆固醇能力的测试, 结果得到二株降胆固醇能力强且性能比较稳定的植物乳杆菌突变菌株 Lp-UVs 29 和 Lp-UVs 44, 胆固醇的降解率分别为 48.7%和 44.2%, 分别比诱变前提高了 97.97%和 79.67%。

关键词: 植物乳杆菌, 紫外线诱变, 降胆固醇

Ultraviolet Mutation Screening of Cholesterol-degrading *Lactobacillus plantarum*

YU Chang-Qing¹ ZHANG Li-Na¹ DENG Xu-Ming^{2*}

(1. Foodstuff College, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

(2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract: *Lactobacillus plantarum* was treated with UV, the exhibited good stability obtained by a screening to tow mutants with cholesterol gradient plate and Cholesterol-degrading testing *in vitro*. Among which the rate of Cholesterol-degrading of Lp-UVs 29 and Lp-UVs 44 are respective 48.7% and 44.2%, which raise respectively by 97.97% and 79.67%.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Ultraviolet mutation, Cholesterol-degrading

胆固醇在人体血清中含量过高会严重威胁着人类健康^[1]。国内外大量研究表明, 许多乳酸菌具有降胆固醇的能力, 适量服用乳酸菌及其相关制品可以降低人体血清胆固醇水平, 降低心血管疾病发病率^[2,3]。因此选育降胆固醇能力较强的乳酸菌并将其应用到食品中具有重要的意义。植物乳杆菌属于乳杆菌科中的乳杆菌属, 是同型发酵乳酸菌, 具有降低血清胆固醇的能力^[4]。本试验对一株植物乳杆菌进行紫外线诱变处理, 从而选育出两株降胆固醇能力强且性能比较稳定的植物乳杆菌突变菌株。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* Lp) 为黑龙江八一农垦大学畜产品加工研究室自行分离, 培养条件为 30 ~37 °C, 24 h。

1.1.2 发酵培养基: MRS培养基 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母提取物 5 g, K₂HPO₄ 2 g, 乙酸钠 5 g, 柠檬三酸铵 1.5 g, 葡萄糖 20 g, 吐温 80 1 mL, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, MnSO₄ 0.25 g, 蒸馏水 1000 mL,

基金项目: 黑龙江省科技厅攻关项目(No. GB04B404-04); 黑龙江省自然科学基金项目(No. C2007-36); 大庆市科技局攻关项目(No. SGG2006-017)

* 通讯作者: Tel: 0431-87836150; E-mail: xumingdeng@126.com

收稿日期: 2008-02-02; 接受日期: 2008-04-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

pH值 6.2~6.8。固体添加 1.8%的琼脂。

1.1.3 试剂:胆固醇购于 Sigma 公司;牛胆盐购自北京奥博星生物技术责任有限公司;蔗糖酯购于上海伊凡尔精细化工有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 第一轮紫外诱变

1.2.1 出发菌株生长曲线的测定:菌接种于 MRS 液体培养基, 30 °C 培养 24 h, 以 MRS 为空白对照, 每 2 h 用分光光度计于 600 nm 测定 OD 值。

1.2.2 菌悬液的制备:离心收集对数生长期的菌体, 用无菌生理盐水洗涤 3 次, 最后将菌体悬浮于无菌生理盐水中, 加入玻璃珠振荡 15 min, 分散, 使形成单细胞。菌悬液浓度为 1×10^8 /mL。

1.2.3 致死率测定^[5]:取菌悬液 5 mL 于直径为 90 mm 的平板中, 开启紫外灯, 预热 20 min, 开启磁力搅拌器, 打开平皿盖, 用 20 W 紫外灯照射, 照射距离 30 cm, 分别照射 20 s、40 s、60 s、80 s、100 s 和 120 s, 适当稀释后涂布平板, 每个稀释度涂布 3 个平板, 37 °C 避光培养 72 h, 观察统计菌落数。以未经紫外处理的各稀释度菌液为对照, 计算不同诱变剂量的致死率, 制作存活曲线。

1.2.4 诱变处理^[5]:取菌悬液 5 mL 于直径为 90 mm 的平板中, 开启紫外灯, 预热 20 min, 开启磁力搅拌器, 打开平皿盖, 用 20 W 紫外灯照射, 照射距离 30 cm, 照射一段时间后, 把菌液转到无菌试管中, 0 °C 培养 1 h~2 h, 再转到液体培养基中 37 °C 避光培养 1.5 h~2 h, 适当稀释后涂布平板, 37 °C 避光培养 72 h, 挑取单菌落, 以待筛选。

1.2.5 初筛:MRSO-CHOL 选择培养基: 在 MRS 培养基中分别加入不同浓度(0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.4 mg/mL、0.55 mg/mL、0.70 mg/mL、0.85 mg/mL 和 1 mg/mL)的胆固醇胶束溶解液。

以 1000 mL 的液体培养基计, 含 1.0 mg/mL 胆固醇胶束溶液的制备^[6-8]: 准确称量胆固醇 0.1 g 放入小烧杯中, 加入 0.2 g 牛胆盐、0.1 g 蔗糖酯和 1 mL 吐温 80 搅拌均匀, 再移取 5 mL 的冰乙酸加热溶解, 把溶解液用超声波处理 15 min 后, 快速加入到配制好的液体培养基中, 边加入边搅拌, 使其形成均匀稳定的胶体溶液。

初筛方法^[9,10]: 将挑取的单菌落用涂布法接种到含 0.1 mg/mL 胆固醇的筛选培养基平板上, 在适宜

的温度下培养一定时间, 选取生长良好的菌落制成菌悬液, 再次接入含有 0.25 mg/mL 胆固醇的选择培养基上筛选, 每筛选 1 次, 胆固醇的浓度都要增加 0.15%, 5 次筛选后, 直至选择培养基中胆固醇的含量达到 1 mg/mL, 选择生长良好的菌株, 进行复筛。

1.2.6 复筛:胆固醇含量的测定采用铁矾比色法。胆固醇标准曲线的绘制见参考文献[11]。

硫酸铁铵显色剂: 溶解 4.463 g 硫酸铁铵 $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ 于 100 mL 85% 磷酸中。取 10 mL 硫酸铁铵溶解液用浓硫酸稀释至 100 mL, 将此液体放置于硅胶干燥器中备用。

复筛方法: 取复筛菌株培养液 0.2 mL, 放于离心管中, 向试管内加入无水乙醇 4.8 mL。室温放置 10 min 后, 3000 r/min 离心沉淀 5 min。另取 16 mm×150 mm 试管, 用移液枪准确移取上清液 2 mL, 再加入 2 mL 硫酸铁铵显色剂溶液, 立即摇匀后, 冷却到室温, 在 30 min~60 min 内, 于分光光度计 560 nm 波长测定吸光度值。按测得的值, 从标准曲线查得相应的胆固醇含量。从而筛选出将胆固醇能力强的菌株。

1.3 第二轮紫外诱变

将第一轮紫外诱变筛选出来的菌株接种于 MRS 液体培养基中, 按照 1.2.1 的方法绘制 5 株诱变出发菌株的生长曲线, 选取对数生长中后期的菌株制备单细胞悬浮液。

单细胞悬浮液的制备和菌株的筛选同第一轮诱变。

1.4 菌株稳定性的测定

将诱变菌株连续传代 6 次, 每传代 1 次进行降胆固醇的测定, 观察稳定性。

2 结果与分析

2.1 第一轮紫外诱变选育

2.1.1 出发菌株的生长曲线:为了保证诱变处理时具有一定的细胞浓度以增加变异细胞总数, 为此选择对数生长中后期的细胞进行诱变处理。生长曲线如图 1。

由图可知, 菌株在 10 h~16 h 时, OD 值迅速增大, 表明菌体已经进入对数生长期, 因此选用 14 h 的菌体制备菌悬液进行诱变处理。

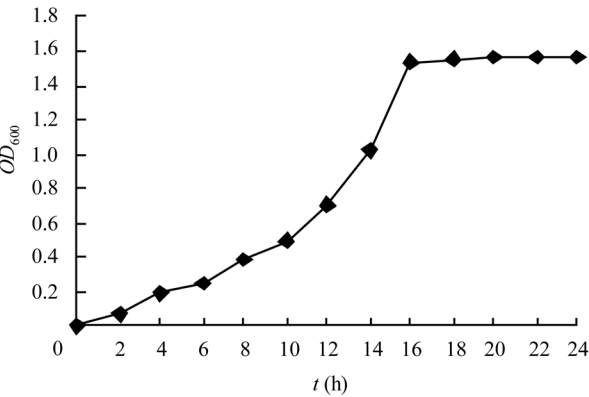


图1 出发菌株 Lp 的生长曲线
Fig.1 Growth curve of original bacterium Lp

2.1.2 紫外线诱变剂量的选择：任何诱变剂都同时具有致死和诱变的双重效应，因此需要测定植物乳杆菌经紫外照射后的存活曲线，确定最佳的诱变时间，测得其紫外照射后的存活曲线(图 2)。

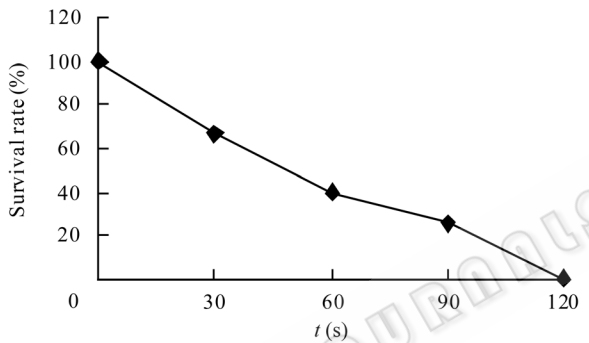


图2 紫外线照射的存活曲线
Fig.2 Surviving curve of bacterium treated with ultraviolet radiation

结果表明，紫外线对植物乳杆菌致死率很高。当一般认为紫外线致死率在 80%~90%(存活率在

10%~20%)之间，可保证菌体发生最大程度的突变。本试验采用照射时间为 100 s，存活率为 14.54%。
2.1.3 诱变筛选：以胆固醇浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线(图 3)。标准曲线回归方程为 $y=0.643x-0.0227$ ， $R^2=0.9972$ 。

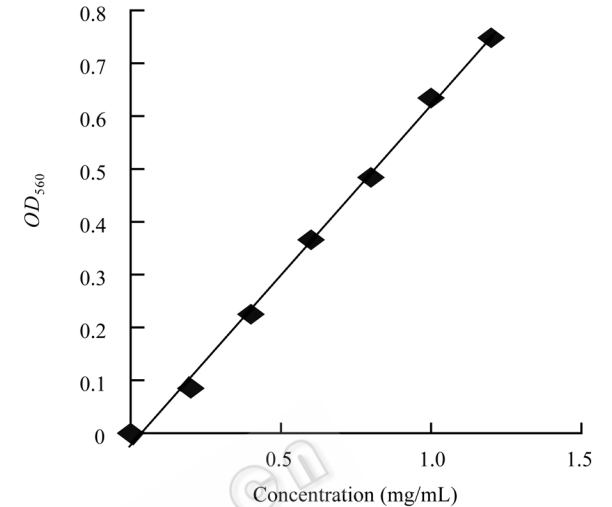


图3 胆固醇标准曲线
Fig.3 Standard curve of cholesterol

从实验结果可以看出，此法测定结果呈现了较好的线性关系，用此种方法测定菌液胆固醇含量的变化是切实可行的。测得出发菌株的胆固醇降解率为 24.6%。

紫外诱变突变株的筛选 :对初发菌株 Lp 进行紫外线诱变，经过初筛后，挑选了 50 株进行复筛，其中的 24 株诱变效果较好，其降解率结果见表 1。

由表 1 可以看出，菌体的紫外线诱变效果明显。经过第一轮紫外诱变，菌株的降解胆固醇能力明显

表 1 突变菌株降胆固醇率(第一轮)					
Table 1 Degrading-cholesterol ratio of mutation bacteria (first round)					
突变株	降解率	突变株	降解率	突变株	降解率
Mutation strain	Degradation rate(%)	Mutation strain	Degradation rate(%)	Mutation strain	Degradation rate(%)
Lp-UVf1	30.26	Lp-UVf18	29.58	Lp-UVf34	34.03
Lp-UVf2	29.64	Lp-UVf20	30.76	Lp-UVf 36	33.20
Lp-UVf5	35.61	Lp-UVf22	36.54	Lp-UVf 37	30.26
Lp-UVf7	32.16	Lp-UVf23	30.87	Lp-UVf 39	32.15
Lp-UVf8	30.89	Lp-UVf25	29.64	Lp-UVf 40	30.45
Lp-UVf9	31.58	Lp-UVf27	28.24	Lp-UVf 42	33.59
Lp-UVf13	34.29	Lp-UVf28	30.69	Lp-UVf 43	29.84
Lp-UVf17	32.03	Lp-UVf31	33.56	Lp-UVf 45	28.39

增大。从中筛选到的 Lp-UVf5、Lp-UVf13、Lp-UVf22、Lp-UVf34 和 Lp-UVf 42 的降解能力较强,比出发菌株 Lp 的降解率都提高了 36.54%以上,其中 Lp-UVf22 菌株降胆固醇能力比出发菌株 Lp 提高了 48.54%。将这 5 株菌株作为第二轮诱变的出发菌株。

2.2 第二轮紫外诱变选育

2.2.1 5 株菌的生长曲线: 5 株菌生长曲线如图 4。

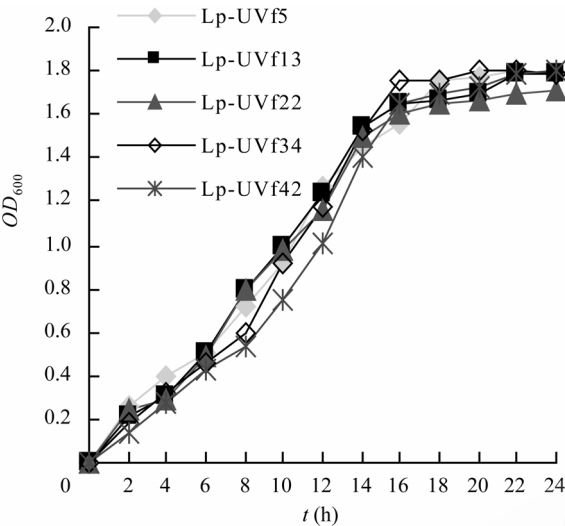


图 4 5 株菌的生长曲线
Fig. 4 Growth curve of 5 bacteria

菌株 Lp-UVf5 在 18 h 后进入平衡期,菌株 Lp-UVf13、Lp-UVf22 和 Lp-UVf34、Lp-UVf42 在 16 h 后进入平衡期。因此,选择培养 14 h ~ 15 h 的 Lp-UVf13、Lp-UVf22 和 Lp-UVf22、Lp-UVf42 菌体制备菌悬液进行第二轮诱变,选择培养 16 h~17 h 的 Lp-UVf5 菌体制备菌悬液进行第二轮诱变。

2.2.2 紫外诱变突变株的筛选: 以 Lp-UVf5、Lp-UVf13、Lp-UVf22、Lp-UVf34 和 Lp-UVf 42 为出发菌株进行紫外线诱变,经过初筛后,又挑选了 50 株进行复筛,其中的 18 株诱变效果较好,其降解率结果见表 2。

由表 2 可以看出,菌体的紫外线诱变效果明显。经过第一轮紫外诱变,菌株的降解胆固醇能力明显增大。从中筛选到的 Lp-UVs 16、Lp-UVs 29、Lp-UVs 30、Lp-UVs 37 和 Lp-UVs44 菌株的降解能力较强,比出发菌株 Lp 的降解率都提高了 79.67%以上,其中 Lp-UVs29 菌株降胆固醇能力比出发菌株 Lp 提高了 97.97%。

2.2.3 诱变菌株稳定性的测定: 将上述经过两轮紫外诱变的 5 株降解能力较强突变株连续传代培养,每 3 d 转接 1 次,共传代 6 次,通过测其将胆固醇率来测定其稳定性。结果发现 3 株突变株将胆固醇能力逐渐下降,只有 Lp-UVs 29、Lp-UVs44 能够较稳定遗传,结果见表 3。

表 2 突变菌株降胆固醇率(第二轮)
Table 2 Degrading-cholesterol ratio of mutation bacteria (second round)

突变株 Mutation strain	降解率 Degradation rate(%)	突变株 Mutation strain	降解率 Degradation rate(%)	突变株 Mutation strain	降解率 Degradation rate(%)
Lp-UVs 2	40.23	Lp-UVs 19	39.68	Lp-UVs 37	46.52
Lp-UVs 6	42.69	Lp-UVs 27	40.25	Lp-UVs 40	39.89
Lp-UVs 8	43.26	Lp-UVs 29	48.70	Lp-UVs 41	40.54
Lp-UVs 9	43.61	Lp-UVs 30	45.12	Lp-UVs44	44.20
Lp-UVs 10	44.12	Lp-UVs 31	41.37	Lp-UVs 45	39.98
Lp-UVs 16	44.32	Lp-UVs 36	42.59	Lp-UVs 49	42.28

表 3 突变株遗传稳定性试验
Table 3 Experiments for hereditary stability of mutation bacteria

突变株 Mutation strain	降胆固醇率 Degradation rate(%)					
	1	2	3	4	5	6
Lp-UVs16	44.32±0.04a	43.20±0.02a	40.96±0.03a	39.65±0.04a	38.36±0.07a	36.52±0.03a
Lp-UVs29	48.70±0.02a	48.69±0.03a	48.70±0.01a	48.70±0.02a	48.69±0.02a	48.70±0.04a
Lp-UVs30	45.12±0.03a	44.36±0.02a	43.21±0.04a	42.31±0.03a	40.68±0.01a	39.45±0.02a
Lp-UVs37	46.52±0.02a	44.39±0.04a	42.23±0.01a	40.28±0.05a	39.12±0.02a	38.69±0.03a
Lp-UVs44	44.20±0.03a	44.19±0.04a	44.20±0.02a	44.18±0.06a	44.19±0.02a	44.19±0.03a

3 讨论

紫外线是一种最常用的物理诱变剂, 其诱变效果及其稳定性受到微生物所处生理状态的影响。本研究中经诱变降胆固醇能力强的菌株 Lp-UVs16、Lp-UVs30 和 Lp-UVs37 经过连续传代 6 次, 其降胆固醇能力呈现不稳定趋势, 原因可能是: 1) 菌落不纯。在制备菌悬液时, 尽管已经用玻璃珠打散, 但由于许多微生物细胞中不止含有一个核, 其中一个核发生变异而另一个不变, 这样形成的菌落将是不纯的菌落。这些不纯菌落, 如果未经很好地分离纯化, 在经过多次移植传代, 很容易导致核分离, 使生产性状发生变化, 而且诱变因素一般只影响 DNA 双链中一个单核苷酸链, 因此单核细胞处理后也会出现不纯的菌落。2) 回复突变也可能是一个重要原因。一个菌种生长在不适应条件下, 产量很易受培养条件的影响而改变, 可能是外界环境导致菌种发生退化。3) 基因发生自发突变。微生物群体经诱变因素处理后, 一般多数不发生变异, 被处理的群体中有时也会由于自发突变出现产量较低的菌株。

参 考 文 献

[1] 肖琳琳, 董明盛. 干酪乳杆菌 KM-16 的筛选及其降胆

固醇活性研究. 中国乳品工业, 2003, 31: 7-8.

- [2] Cruenwald KK. Sera cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J Food sci*, 1982, 47(2): 2078-2079.
- [3] Lin SY, Ayres JW, Willia JR, et al. *Lactobacillus* effects on cholesterol *in vitro* and *in vivo* results. *J Dairy sci*, 1989, 72(2): 2882-2889.
- [4] 肖仔君. 植物乳杆菌的生理功能与应用. 中国食品添加剂, 2005, 6: 87-89.
- [5] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学. 北京: 科学出版社, 2003, p.75.
- [6] Buck M, Gilliland SE. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *Dairy Sci*, 1994, 43 (2): 2925-2933.
- [7] Brashears MM, Gilliland SE. Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of *Lactobacillus acidophilus* cells as influenced by the growth phase. *Dairy Sci*, 1995, 78: 2326-2335.
- [8] 刘如林. 微生物工程概论. 天津: 南开大学出版社, 1995, pp.134-139.
- [9] 李江华, 邵显辛. 碱性脂肪酶高产菌的平板筛选模型. 食品与发酵工业, 2000, 6: 11-14.
- [10] 周家春. 乳酸菌菌种的简便分离. 食品科学, 1998, 1: 39-41.
- [11] 黄伟坤. 食品检验与分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, pp.231-237.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。