

乳酸菌低温菌株的复合诱变选育

吴慧昊¹ 牛锋^{2*}

(1. 西北民族大学 实验中心 甘肃 兰州 730030)

(2. 西北民族大学 生命科学与工程学院 甘肃 兰州 730030)

摘 要: 【目的】采用复合诱导的方法, 选育出能在低温条件下性状稳定、生长良好且具有工业生产价值的低温乳酸菌菌株。【方法】使用紫外照射和亚硝基胍处理的方法对分离的 Q1 菌株进行诱变处理, 将选育得到的低温菌株 Q1-4-6 与出发菌株 Q1 在 15 °C、20 °C、37 °C 下, 比较其生长速率、产酸量和糖降解量。【结果】从玛曲牧民自制酸奶中分离得到一株乳酸菌 Q1, 根据其形态学特征、生理生化特性, 同时结合 16S rDNA 序列分析结果, 将其鉴定为肠球菌属棉籽糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*)。经过多轮诱变选育出一株能在低温下良好生长、遗传性状稳定的菌株 Q1-4-6, 将出发菌株与诱变菌株在 15 °C、20 °C 比较其生长、产酸和糖降解量发现, 诱变菌株均好于出发菌株。在 37 °C 的自然条件下, 诱变菌株和出发菌株的生长速率差异不大, 但均略高于出发菌株。在 15 °C 培养发现, 诱变菌株生长速率、产酸量均高于购买菌株干酪乳杆菌 (CL04) 和嗜热链球菌 (CL05)。【结论】通过 UV+NTG 复合诱变, 最终选育出一株在低温下生长良好、遗传性状稳定的菌株 Q1-4-6。

关键词: 乳酸菌, 诱变, 低温, 16S rDNA, 鉴定

基金项目: 甘肃省科技厅支撑项目(No. 2GS064-A41-002-06); 甘肃省农牧厅攻关项目(No. GNSW-2007-09); 兰州市科技局产业化项目(No. 2008-1-170); 2011 年中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. zyj20111002)

*通讯作者: 信箱: niufeng1960@163.com

收稿日期: 2012-07-25; 接受日期: 2012-11-01

Selection for low temperature-resistant strain by composite mutagenesis of lactic acid bacteria

WU Hui-Hao¹ NIU Feng^{2*}

(1. Centres of Experimentation, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030, China)

(2. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: [Objective] Adopted a method of mixed induction, which can selected traits stable and growing well strains at low temperature, in order to get the low temperature-resistant strain with industrial value. **[Methods]** Mutagenized isolated Q1 by using ultraviolet irradiation and nitrosoguanidine treatment methods, put the strains Q1-4-6 and Q1 which already selected under the 15 °C, 20 °C, 37 °C, compare their growth rate, acid production and the amount of sugar degradation. **[Results]** Q1 was extracted in homemade yogurt by Maqu pastoralists, the strain was classified into *Enterococcus raffinosus* according to its morphology, the physiological and biochemical features and 16S rDNA sequence. After several rounds of mutation breeding, select a strain Q1-4-6 that can grow well at low temperatures and genetic traits stable. Compared growth, the amount of acid and sugar degradation between the original strains and mutant strains, we found mutants were better than the original strains. At 37 °C natural conditions, there are rarely differences in growth rate between the original strains and mutants strains, but both of them are a little bit higher than the original strains. The acid amount and growth rate of Q1-4-6 are better than CL04 and CL05 under 15 °C. **[Conclusion]** Through complex mutagenesis of UV+NTG, eventually bred a strain Q1-4-6 that growing well at low temperatures with stable genetic traits.

Keywords: Lactic acid bacteria, Mutation, Low temperature, 16S rDNA, Identification

乳酸菌(Lactic acid bacteria)是一群形态、代谢性能和生理学特征不完全相同的革兰氏阳性菌的统称,其DNA中G+C含量少于55% mol^[1]。乳酸菌细胞形态有球状、类球状、短杆或杆状,生理需求有好氧、厌氧或兼性厌氧,在发酵碳水化合物时主要的代谢产物为乳酸。绝大多数乳酸菌是食品、工业、农业、医药保健、医学和科研上的重要原料。

乳酸菌为人类服务已有几千年的历史了,早在公元前200年,古印度、古埃及和古希腊就用

有益于人体健康的乳酸菌制作发酵食品。乳酸菌可促进人体健康,具有一定的保健作用,近年来与乳酸菌有关的食物和微生态制品发展迅速,在食品和医药工业中占有越来越重要的地位,成为目前全球发展最快的行业之一^[2-3]。乳酸菌不仅可以提高食品的营养价值,改善食品的风味,从而提高食品保藏性和附加值^[4-7],而且近年来对乳酸菌的研究表明,乳酸菌还有许多特殊医疗保健作用,如促进营养物质的吸收、减缓乳糖不耐症、改善肠道功能、降低血清胆固醇水平和血脂浓

度、抗高血压作用、预防糖尿病、对免疫系统的调节作用、抗肿瘤作用和其他生理功能^[8-12]。

常用的诱变剂有物理诱变剂如紫外线、X射线、 γ 射线、快中子; 化学诱变剂如碱基类似物、移码突变剂、烷化剂等。周韬等通过紫外诱变的方法筛选出了耐低温的杜氏藻突变株; 韩岚等通过紫外辐照的方法筛选出了耐低温的大螺旋蓝细菌; 刘文玉等通过亚硝基胍诱变及低温驯化, 选育出低温 β -半乳糖苷酶高产菌株, 对于乳酸菌低温菌株的选育国内外未见报道。单独使用一种诱变剂, 不仅诱变效率低, 且容易发生回复突变, 而采用 UV+NTG 混合诱导的方法, 在一定程度上可降低发生回复突变的几率, 提高诱变效率。

世界性能源短缺以及温室效应是人类无法逃避的事实, 工业生产乳酸菌制品及发酵乳酸都需要提供能源来达到乳酸菌发酵所需的温度, 因此, 必然消耗大量的能源以及排出大量的温室气体。本论文拟采用混合诱导的方法, 选育出能在低温条件下性状稳定, 生长良好的菌株, 以期得到具有工业生产价值的低温乳酸菌菌株, 从而降低工业生产成本, 减少能源消耗量及温室气体的排放量。

1 材料与方法

1.1 菌种

2010年4月采自于甘肃玛曲牧民自制酸奶。干酪乳杆菌、嗜热链球菌购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要培养基

MRS 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10、牛肉膏 10、酵母粉 5、葡萄糖 20、无水乙酸钠 5、吐温-80 1 mL、柠檬酸二胺 2、磷酸氢二钾 2、硫酸镁 0.58、硫酸锰 0.25、蒸馏水 1 L, pH 6.6-6.8。 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

溴甲酚紫-碳酸钙平板培养基(g/L): 在 MRS

液体培养基基础上添加碳酸钙 20、1.6% 溴甲酚紫 1.4 mL、琼脂 17.5。 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 主要仪器和设备

MLS-3750 全自动高压灭菌器, JAPAN SANYO; TU-1900 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; GL-21M 高速冷冻离心机, 赛特湘仪离心机仪器有限公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Arium 611VF 超纯水蒸馏机, 德国赛多利斯公司; CX21FS1 光学显微镜, OLYMPUS CORPORATION TOKYO JAPAN; PCR 扩增仪, TaKaRa BIO INC; 核酸电泳仪, ADVANCE-BIO Co., Ltd; 蛋白质电泳仪, 上海天能; 电泳成像装置, Pharmacia Biotech; DNA 测序仪, Applied Biosystem。

1.4 菌种的分离、纯化及鉴定

1.4.1 菌种的分离、纯化: 参照文献[13]。

1.4.2 生理生化特性鉴定: 对分离的菌种分别进行过氧化氢酶、氧化还原酶、硝酸盐还原、明胶液化、6.5% NaCl、40% 胆盐、15 °C、45 °C 生长实验和糖发酵产酸试验。运动性检查: 采用半固体培养基穿刺法。

1.4.3 16S rDNA 扩增及序列测定方法: 提取菌株 Q1 基因组 DNA 作为模板, 使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No. D310) 进行 PCR 扩增目的片段。反应体系为菌体 DNA 1 μ L, PCR Premix 25 μ L, 27f (20 μ mol/L) 0.5 μ L, 1492r (20 μ mol/L) 0.5 μ L, 16S-free H₂O 23 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。取 5 μ L 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳。以 16S forward、16S internal 和 16S reverse 为引物进行 DNA 测序。PCR 产物测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。

提交菌株 Q1 的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行比对, 选取与之相似性最高的 15 株菌

的 16S rDNA 序列, 进行 ClustalX 比对, MEGA 软件分析, 采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次进行稳定性验证。

1.5 诱变育种

1.5.1 菌株对数生长期的测定: 将菌种活化 24 h 后, 按 2% 的接种量接种于 MRS 液体培养基中混合均匀, 37 °C 连续培养 24 h, 每隔 2 h 取样, 用分光光度计测定不同时间段培养液的 OD 值, 未接种的 MRS 液体培养基作为空白对照。以培养时间为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制生长曲线^[4]。

1.5.2 菌株的紫外诱变方法及致死率的测定: 紫外诱变的步骤: 出发菌株——前培养——制备菌悬液——紫外线照射——后培养——稀释涂平板——避光低温培养——挑选较大, 黄色的菌落 50 株——划斜面 15 °C 培养——选取生长较快的菌株 5 株(提供第二代诱变出发菌株)。

致死率的测定: 将完成后培养的菌液取出, 用移液枪分别吸取 0.2 mL 菌液涂布于溴甲酚紫碳酸钙平板, 将平板置于 37 °C 培养箱遮光培养, 培养后统计生长菌落数。用菌落计数法, 计算存活率、致死率。以致死率高于 99% 的处理时间作为以后的诱变剂量。

存活率(%)=诱变后的菌数/诱变前的菌数
×100

致死率(%)=1-存活率

1.5.3 亚硝基胍诱变及致死率的测定: 亚硝基胍诱变的步骤: 出发菌株——前培养——制备菌悬液——亚硝基胍诱变——后培养——稀释涂平板——低温培养。

致死率的测定: 在通风橱中称取 10 mg NTG 于棕色瓶中, 加入 1 mL 丙酮使其溶解, 然后用 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液配制成 1 g/L 的 NTG 溶液。在无菌离心管中分别吸取菌悬液 1 mL, 加入适量 NTG 母液和缓冲液配制成总量为 2 mL, NTG 浓度为 0.1、0.2、0.4、0.8 g/L 的悬

浮液, 将离心管置于温度为 40 °C、转速为 120 r/min 的摇床上振荡处理 30 min。8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用缓冲液洗涤菌体 2-3 次, 最后加入等体积的缓冲液悬浮沉淀, 摇匀, 适当稀释, 取 0.2 mL 菌液涂布于溴甲酚紫-碳酸钙平板, 37 °C 恒温培养, 进行菌落计数, 计算致死率。以致死率高于 99% 的处理时间作为以后的诱变剂量。

1.5.4 耐低温突变株的选育: 挑选菌落较大、较黄且比对照较早长出的菌落划斜面 15 °C 培养, 进一步选取生长较快且产酸较好的菌株(提供第二代诱变出发菌株)。

1.5.5 诱变菌株性能稳定性的测定: 将诱变菌株连续传代, 进行乳酸脱氢酶(LDH)活力的测定, 观察稳定性。

(1) 酶的分离提纯: 将待测菌株在发酵培养基中培养至待测期取出, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤菌体 2-3 次, 收集菌体, 将其配成 100 g/L 的悬液, 4 °C 下用超声波破碎 10 min, 然后 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液作为无细胞粗酶液, 滴加等体积等温丙酮, 4 °C 静置 2 h, 离心所得湿态酶沉淀物, 用缓冲液稀释, 待测酶活。

(2) 酶活力测定: 预先将丙酮酸溶液及 NADH 溶液放在 25 °C 水浴中预热。取 2 只石英比色杯, 在 1 只比色杯中加入 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 3 mL, 置于紫外分光光度计中, 在 340 nm 处将光吸收调节至 0; 另一只比色杯用于测定 LDH 活力, 依次加入丙酮酸钠溶液 2.9 mL, NADH 溶液 0.1 mL, 加盖摇匀后, 测定 340 nm 光吸收值(A)。取出比色杯加入经稀释的酶液 10 μL, 立即计时, 摇匀后, 每隔 0.5 min 测 A₃₄₀, 连续测定 3 min, 以 A 对时间作图, 取反应最初线性部分, 计算每分钟 A₃₄₀ 减少值。加入酶液的稀释度(或加入量)应控制每分钟 A₃₄₀

下降值在 0.1–0.2 之间。

LDH 活力单位(U)/mL 菌液=

$$\frac{\Delta A_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{酶液加入量}(10 \mu\text{L}) \times 10^{-3}}$$

1.6 突变株与出发株的性能比较

1.6.1 15 °C、20 °C 生长及产酸的比较: 将突变株与出发菌株分别活化 24 h 后, 按 2% 的接种量(菌液浓度为 10^8 个/mL)接种于 MRS 液体培养基中混合均匀, 分别于 15 °C、20 °C 培养 120 h, 每隔 8 h 取样, 用分光光度计测定不同时间段培养液的 OD 值及 pH 值。未接种的 MRS 液体培养基作为空白对照。以培养时间为横坐标, OD 值及 pH 值为纵坐标, 分别绘制生长及 pH 曲线。

酸度的测定: 吸取 5 mL 发酵液, 置于 250 mL 的三角瓶中, 加入蒸馏水 20 mL, 加入 1 滴 0.5% 的酚酞乙醇溶液, 小心摇匀, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定到微红色, 在 1 min 内不消失为测定终点^[15]。

$$\text{酸度}(\%) = \frac{V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times K \times 1000}{V_1}$$

其中: C_{NaOH} : NaOH 溶液浓度(mol/L);

V_{NaOH} : 发酵液消耗 NaOH 标准溶液的体积(mL);

V_1 : 液体样品的体积(mL);

K : 换算为适当酸的系数(乳酸 0.090)。

1.6.2 15 °C、20 °C 糖降解率的比较: 将菌种活化 24 h 后, 按 2% 的接种量(菌液浓度为 10^8 个/mL)接种于 MRS 液体培养基中混合均匀, 分别于 15 °C、20 °C 培养 120 h, 每隔 8 h 取样, 采用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖的含量^[16], 以还原糖含量为纵坐标, 时间为横坐标绘制降糖曲线。

结果处理: 分别在标准曲线上查出相应还原糖 mg 数, 按下式计算还原糖百分含量。

$$\text{还原糖}(\%) = [C \times (V_1/V_2)] \times 100$$

其中: C : 标准曲线求得还原糖的毫克数;

V_1 : 菌液的总体积(mL);

V_2 : 显色时吸取样品的体积(mL)。

1.6.3 37 °C 生长及产酸的比较: 将突变株和出发菌株分别活化 24 h 后, 按 2% 的接种量(菌液浓度为 10^8 个/mL)接种于 MRS 液体培养基中混合均匀, 37 °C 培养 24 h, 每隔 2 h 取样, 用分光光度计测定不同时间段培养液的 OD 值及 pH 值。未接种的 MRS 液体培养基作为空白对照。以培养时间为横坐标, OD 值及 pH 值为纵坐标, 分别绘制生长及 pH 曲线。

1.7 突变株与购买菌株在 15 °C 生长及产酸的比较

将突变株、干酪乳杆菌(CL04)和嗜热链球菌(CL05) (购自中国工业微生物菌种保藏管理中心) 分别活化 24 h 后, 按 2% 的接种量(菌液浓度为 10^8 个/mL)接种于 MRS 液体培养基中混合均匀, 于 15 °C 培养 120 h, 每隔 8 h 取样, 用分光光度计测定不同时间段培养液的 OD 值及 pH 值。酸度测定同 1.6.1。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离、纯化及鉴定

纯培养物于 MRS 培养基培养 24 h 后, 形成表面光滑、边缘整齐、中央隆起、直径约为 0.5 mm–1.0 mm 的乳白色菌落(图 1)。显微镜下观察染色结果, 菌体的形状为球形或椭圆形, 单个、成对排列, 菌体长 1.0 μm –1.5 μm 、宽为 1.0 μm –1.2 μm , 革兰氏染色阳性(图 2)。

将菌株 Q1 活化后接种于 MRS 液体培养基中, 经 24 h 恒温培养后发现, 菌株贴试管壁并沿试管壁向底部生长, MRS 液体培养基表层无菌生长, 由此说明该菌为兼性厌氧菌。菌株于半固体培养基穿刺后, 仅在穿刺线上生长, 且边缘十分清晰, 表明菌株无运动性。接触酶和氧化酶反应均为阴性。不能利用尿素, 不能产生 H_2S , 生理生化鉴定结果见表 1。



图1 划线分离的纯菌株

Fig. 1 Separation of the pure strain crossed

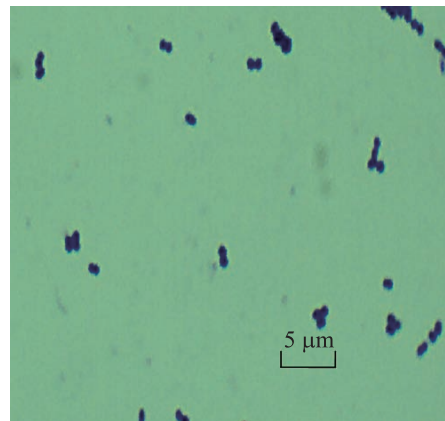


图2 革兰氏染色

Fig. 2 Gram's staining

表1 生理生化鉴定试验结果
Table 1 Physiological identification results

检测项目 Items	结果 Results	检测项目 Items	结果 Results
利用尿素 Usage of urea	-	利用果糖 Usage of fructose	+
接触酶实验 Catalase test	-	利用乳糖 Usage of lactose	+
利用山梨糖 Usage of sorbose	+	利用松二糖 Usage of turanose	+
麦芽糖水解 Maltose test	+	利用半乳糖 Usage of galactose	+
利用山梨醇 Usage of sorbierite	+	利用葡萄糖 Usage of glucose	+
利用木糖 Usage of xylose	+	利用甘露糖 Usage of mannose	+
水解淀粉 Hydrolysis of starch	-	利用蔗糖 Usage of sucrose	+
β -半乳糖苷 Usage of ONPG	+	氧化酶实验 Oxidase test	-
产生硫化氢 Production of H_2S	-	利用阿拉伯糖 Usage of arabinose	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	硝酸盐(产气) Nitrate aerosis	-
利用松三糖 Usage of melizitose	-	硝酸盐(还原) Nitrate reduction	-
6.5% NaCl 生长 Growth at 6.5% NaCl	+	15 °C 生长 Growth at 15 °C	+
4% NaCl 生长 Growth at 4% NaCl	+	45 °C 生长 Growth at 45 °C	+

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应.

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

在培养基中挑取菌体变性后离心取上清作为模板, 使用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No. D310), 进行 PCR 扩增目的片段, 结果见图 3。

将上述扩增产物用 16S forward、16S internal 和 16S reverse 为引物进行测序, 获得 Q1 菌株 16S rDNA 部分基因序列(长 1 475 bp), 在 GenBank 数据库中通过在线序列 BLAST 比对检索, 结果显示 Q1 菌株的 16S rDNA 序列与 *Enterococcus durans* strain 98D NR036922 的 16S rDNA 序列具有 100% 同源性。

使用 Neighbor-Joining 构建系统发育树(图 4)。结果显示, 系统发育树上与菌株 Q1 16S rDNA 同源性较高的均为肠球菌属(*Enterococcus durans*), 与 *Enterococcus durans* strain 98D NR036922 菌株在发育树上聚为一簇, 具有较近的进化距离。

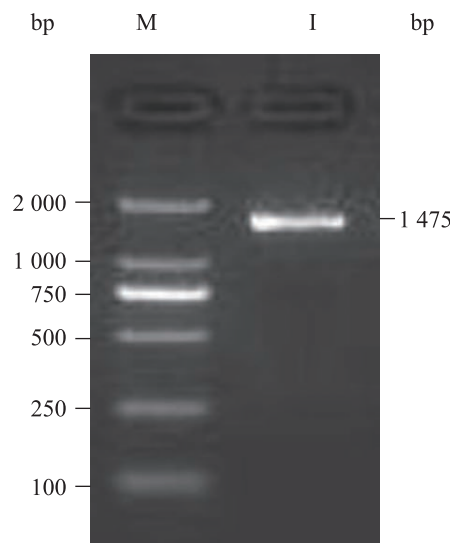


图 3 菌落 PCR 的 16S rDNA 扩增结果

Fig. 3 Colony PCR results of bacterial 16S rDNA
注: 1: 16S rDNA PCR 产物; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1: PCR product of 16S rDNA; M: DL2000 DNA marker.

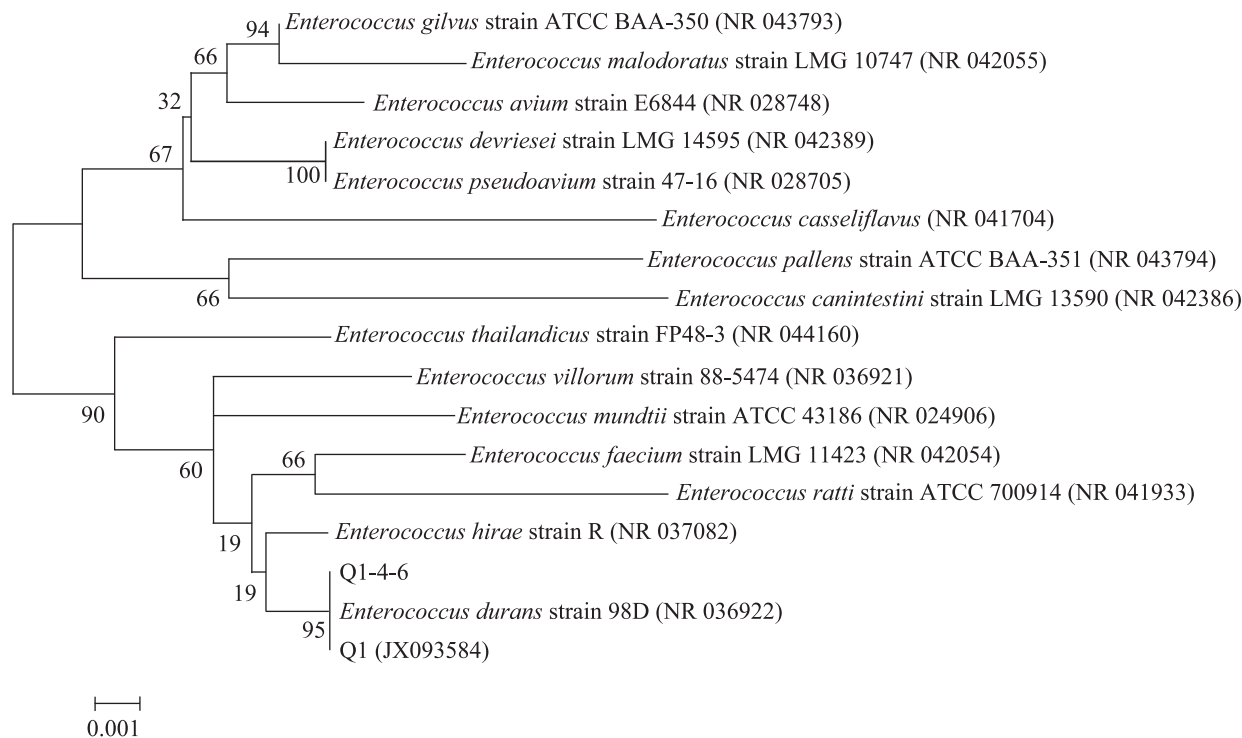


图 4 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 Q1 与相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain Q1 and related strains based on 16S rDNA

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值; 括号中的数字为序列登录号; 标尺代表 0.001 的进化距离单位。

Note: The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap. Numbers in parentheses are accession numbers of sequence in GenBank. The scale bar indicates the 0.001 evolutionary distance unit.

因此,根据以上形态特点和生理生化特征,结合《伯杰氏细菌鉴定手册》^[17]和《乳酸细菌-基础、技术和应用》^[18],将分离的菌种 Q1 (GenBank 登录号 JX093584)可鉴定为肠球菌属的棉籽糖肠球菌,将其命名为 *Enterococcus raffinosus* Q1。

2.2 诱变育种

2.2.1 菌株对数生长期的测定: 供诱变处理的细菌一般要求处于对数生长期,此时菌体生长状态比较同步,容易变异,重复性较好;同时为了保证处理时具有一定的细胞浓度,增加可能变异的细胞总数,常选用对数生长中后期的细胞供处理。因此选用培养 8 h (对数生长中后期)的菌液制菌悬液,进行诱变处理(图 5)。

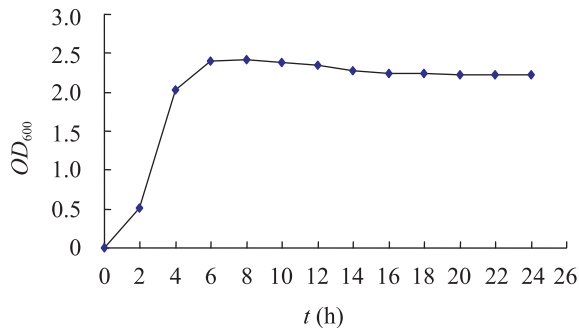


图 5 出发菌株 Q1 生长曲线
Fig. 5 The growth curve of the Q1 strain

2.2.2 紫外诱变致死率的测定: 紫外线处理微生物时,其吸收射线的剂量决定于紫外灯的功率、灯管与被照微生物的距离及照射的时间。本实验采用 15 W 紫外灯,固定照射距离为 30 cm,在此条件下,一般微生物营养体 3–5 min 即可致死,而革兰氏阳性菌只需 0.5–2.0 min 就可死亡。照射不同时间诱变的致死率如图 6 所示。

Leslie A.等^[19]和 O'donovan 等^[20]研究表明,致死率为 99.0%时,可保证菌体发生最大程度的突变,故在本实验中选择在 15 W 紫外灯,菌悬液距紫外灯管 30 cm 下,照射 60 s 为紫外诱变的剂量。

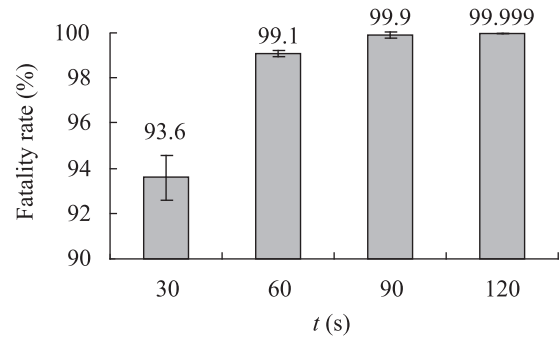


图 6 紫外照射时间与菌株致死率的关系
Fig. 6 The relation between the time of ultraviolet radiation and the lethal rate

2.2.3 紫外诱变结果: 以紫外照射 60 s 对菌株 Q1 连续进行 4 轮诱变,从初筛平板上筛选生长较大、较黄的菌落划斜面 15 °C 恒温培养,复筛生长较快的菌株培养,测定溶液的 pH,结果如表 2 所示。综合生长时间及 pH 二者因素,选择 Q1-4 进行化学诱变。

2.2.4 NTG 诱变致死率的测定: 亚硝基胍处理微生物时,其致死率主要与亚硝基胍浓度、处理时间和处理温度有关,对于细菌亚硝基胍的处理浓度一般为 0.1–1.0 g/L,处理时间一般为 20–60 min^[21]。本实验对菌株 Q1-4 分别在不同浓度的亚硝基胍作用下,于 40 °C 处理 30 min,处理后致死率如图 7 所示。本实验中选择亚硝基胍的诱变浓度为 0.4 g/L。

菌株 Strains	长出时间 Growth times (h)	pH
Q1-1	20	4.54
Q1-2	17	4.32
Q1-3	20	4.61
Q1-4	17	4.28
Q1-5	19	4.56
Q1-6	19	4.48
Q1-7	18	4.50

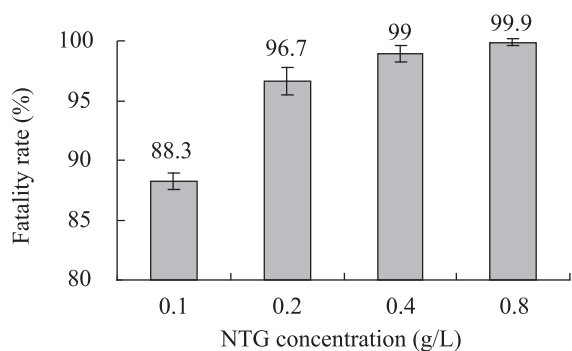


图7 NTG对菌株致死率的影响

Fig. 7 Fatal effect of NTG on strain

2.2.5 NTG 诱变: 将经过 NTG 诱变的悬液涂布在溴甲酚紫-碳酸钙平板培养基上, 待菌落长出后, 挑选较大、较黄且比对照较早长出的菌落划斜面 15 °C 培养, 进一步筛选生长较快, 产酸较好的菌株。诱变结果见表 3 所示。

由表 3 可以看出, Q1-4-6 生长最快、产酸最高, 与原始菌株相比, 长出时间加快 8 h, pH 降低了 0.42 (8.97%)。将诱变菌株在低温条件下连续传代, 测定诱变菌株的稳定性。

2.2.6 诱变菌株性能稳定性的测定: 菌株在低温条件下连续传代 10 代, 选取第 1 代、第 5 代、第 10 代菌株, 发酵 48 h 后提取粗酶液, 测定 LDH 酶活, 结果如表 4 所示。

从表 4 可以看出, Q1-4-6 菌株的第 1 代、第 5 代和第 10 代相比, 乳酸脱氢酶活性基本一致。由此可以说明, Q1-4-6 菌株具有遗传稳定性。

菌株 Strains	长出时间 Growth time (h)	pH
Q1	23	4.68
Q1-4-1	20	4.59
Q1-4-2	21	4.68
Q1-4-3	20	4.41
Q1-4-4	19	4.32
Q1-4-5	17	4.26
Q1-4-6	15	4.26

传代次数 Passage times	酶活 Enzyme activity (U/mL)
第 1 代 The first generation	2.7±0.1
第 5 代 The fifth generation	2.5±0.2
第 10 代 The tenth generation	2.6±0.1

2.3 突变株与出发株的性能比较

2.3.1 15 °C、20 °C 生长及产酸的比较: 将突变株与出发菌株分别活化 24 h 后, 分别于 15 °C、20 °C 培养 120 h, 菌株的生长及产酸情况如图 8-13 所示。

由图 8、图 9 可以看出, 在 15°C、20 °C 的低温条件下, 出发菌株的生长速率较缓慢, 诱变菌株生长速率明显高于出发菌株且菌液浓度显著高于出发菌株, 说明在低温条件下, 诱变菌株比出发菌株生长更好。15 °C 培养时, 诱变菌株很迅速地进入对数生长期, 并且对数生长期较长, 而出发菌株则经过 8 h 的潜伏期后进入对数生长期; 当出发菌株进入稳定期时, 诱变菌株还处于对数生长期; 诱变菌株的光密度值最高出现在 64 h, 为 2.404, 而出发菌株的光密度值最高出现在 48 h, 为 2.205。由此表明, 诱变菌株相对于出发菌株具有更长的生长周期。在 20 °C 条件下培养 80 h 后, 出发菌株的光密度值呈现下降趋势, 出发菌株出现了死亡。而变异菌株仍处于稳定期, OD 值保持在 2.54 左右。

由图 10、图 11 可见, 在 15 °C 的低温条件下, 出发菌株 pH 下降的总体趋势和变异菌株接近, 但 pH 下降值明显小于变异菌株, 产酸量也较突变株低, 120 h 培养结束时, Q1-4-6 酸度为 4.55, 而 Q1 仅为 3.75。在 20 °C 培养时, 变异菌株 Q1-4-6 在前 8 h pH 下降速度特别快, 培养基中 pH 由 7.0 迅速下降为 5.06, 而出发菌株 Q1 下降

较慢, 培养基中 pH 由 7.0 下降为 5.45。48 h 后, 培养基中 pH 下降趋于平缓。当培养 88 h 后, 出发菌株 Q1 的 pH 保持在 4.3 左右几乎不变, 而变异菌株 Q1-4-6 的 pH 仍处于下降趋势。酸度曲线变化二者基本一致, 但产酸量变异菌株显著高于出发菌株(图 12、图 13)。

2.3.2 15 °C、20 °C 糖降解率的比较: 由图 14 可以看出, 采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定葡萄糖标准曲线, 曲线拟合后相关性很好($R^2=0.9997$), 可用于待测菌株的降糖能力评价。

出发菌株与变异菌株在 15 °C 培养 120 h, 降糖结果如图 15 所示。由图 15 可见, 随着培养时

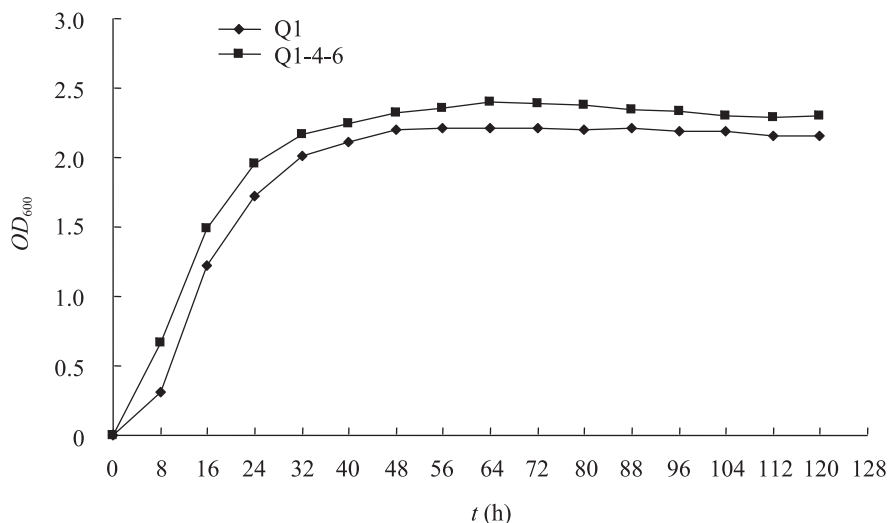


图 8 Q1-4-6 和 Q1 菌 15 °C 生长曲线

Fig. 8 The growth curve of Q1-4-6 and Q1 strains at 15 °C

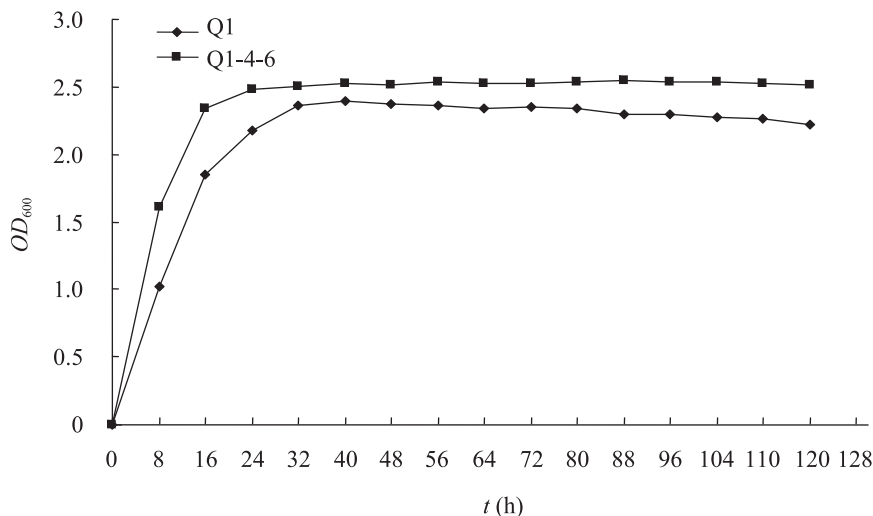


图 9 Q1-4-6 和 Q1 菌 20 °C 生长曲线

Fig. 9 The growth curve of Q1-4-6 and Q1 strains at 20 °C

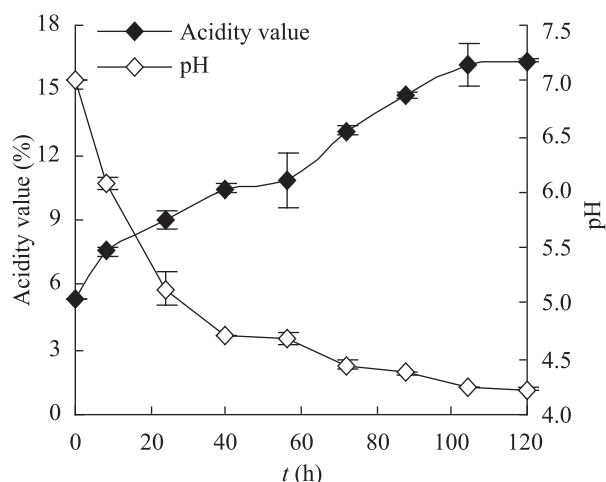


图 10 15 °C 下 Q1-4-6 在 MRS 培养基中的 pH 及酸度的变化

Fig. 10 The pH and acidity variation of Q1-4-6 in MRS at 15 °C

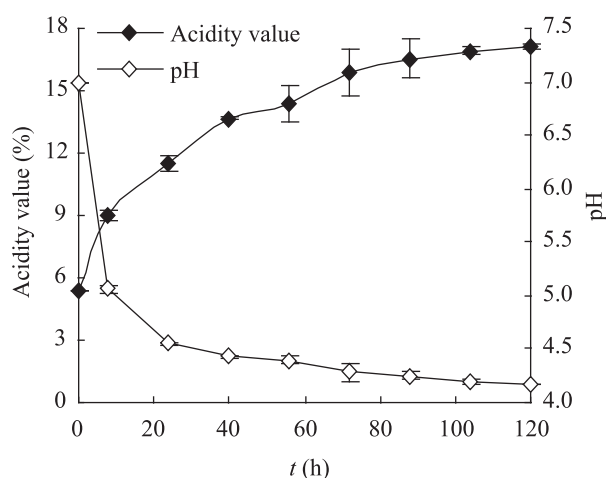


图 12 20 °C 下 Q1-4-6 在 MRS 培养基中的 pH 及酸度的变化

Fig. 12 The pH and acidity variation of Q1-4-6 in MRS at 20 °C

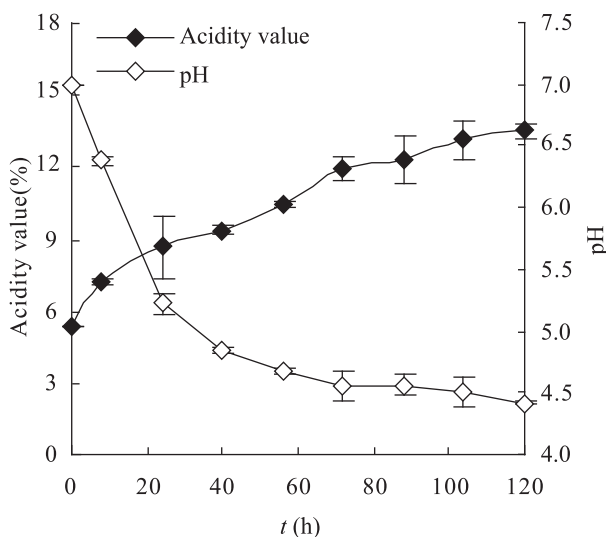


图 11 15 °C 下 Q1 在 MRS 培养基中的 pH 及酸度的变化

Fig. 11 The pH and acidity variation of Q1 in MRS at 15 °C

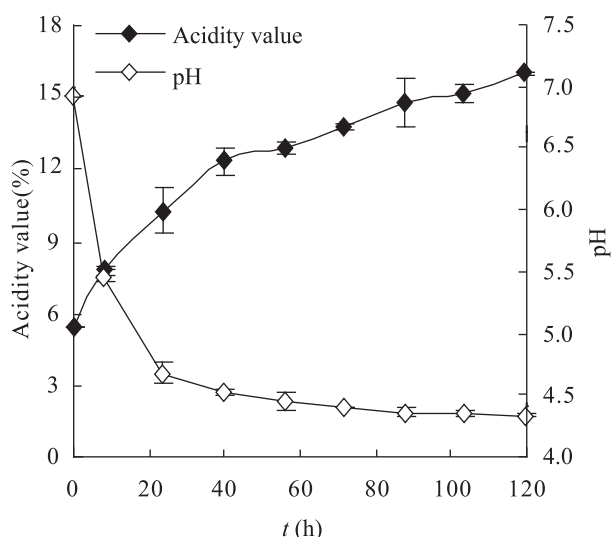


图 13 20 °C 下 Q1 在 MRS 培养基中的 pH 及酸度的变化

Fig. 13 The pH and acidity variation of Q1 in MRS at 20 °C

间的增加, 出发菌株 Q1、变异菌株 Q1-4-6 的葡萄糖含量均逐渐减少, 而变异菌株 Q1-4-6 比出发菌株 Q1 有更高的耗糖速率和糖转化率。培养 120 h 时, 变异菌株 Q1-4-6 的葡萄糖含量为 0.443 7 mg, 而出发菌株 Q1 的葡萄糖含量为 0.522 6 mg。

如图 16 所示, 出发菌株与变异菌株在 20 °C

培养时, 12 h 内变异菌株 Q1-4-6 与出发菌株 Q1 的葡萄糖含量几乎一致, 12-24 h, 变异菌株 Q1-4-6 葡萄糖含量下降很快, 由 0.643 7 mg 降为 0.583 9 mg, 葡萄糖含量下降了 0.059 8 mg, 而出发菌株 Q1 仅下降了 0.012 7 mg。培养结束时, 变异菌株 Q1-4-6 的葡萄糖含量为 0.408 7 mg, 出发

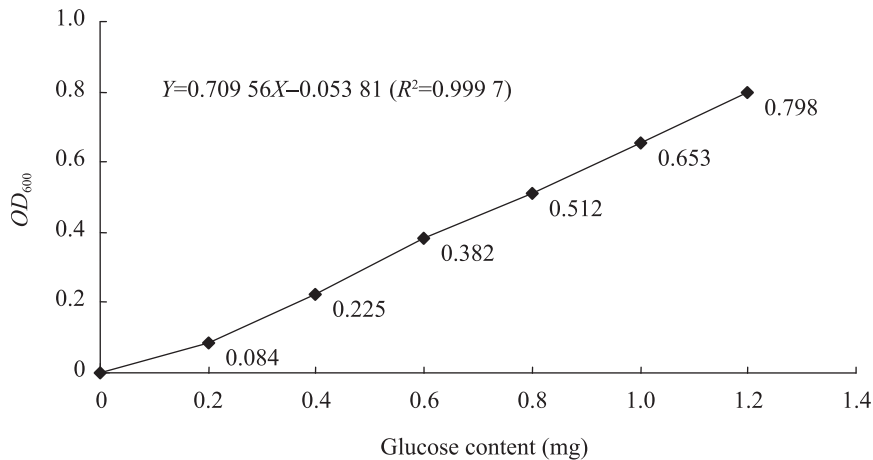


图 14 葡萄糖标准曲线

Fig. 14 The standard curve of glucose

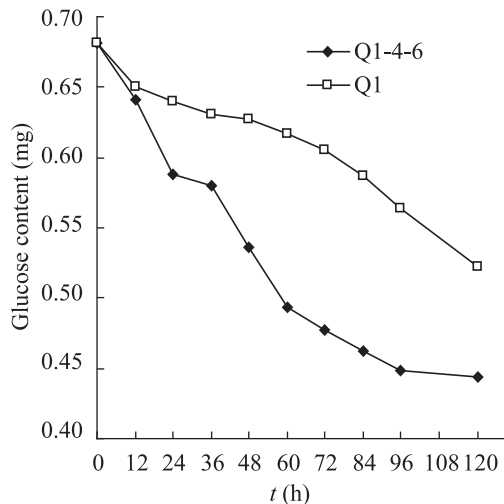


图 15 Q1-4-6 和 Q1 的 15 °C 降糖曲线

Fig. 15 The Glucose curve of Q1-4-6 and Q1 at 15 °C

菌株 Q1 的葡萄糖含量为 0.502 5 mg, 变异菌株的残糖量比出发菌株少 0.093 8 mg。

2.3.3 37 °C 生长及产酸的比较: 由图 17 可以看出, 在 37 °C 的自然条件下, 出发菌株和诱变菌株的生长速率的差异不大, 但均略低于诱变菌株。说明诱变后的菌株有了更宽的生长温度适应能力。

由图 18 可见, 出发菌株 Q1 与变异菌株 Q1-4-6 pH 值的总体下降趋势基本一致, 0-6 h 迅速下降, 之后趋于平缓。在 0-4 h, 变异菌株 pH

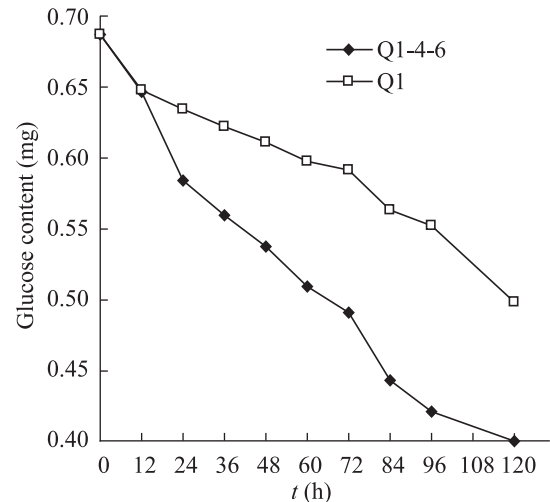


图 16 Q1-4-6 和 Q1 的 20 °C 降糖曲线

Fig. 16 The Glucose curve of Q1-4-6 and Q1 at 20 °C

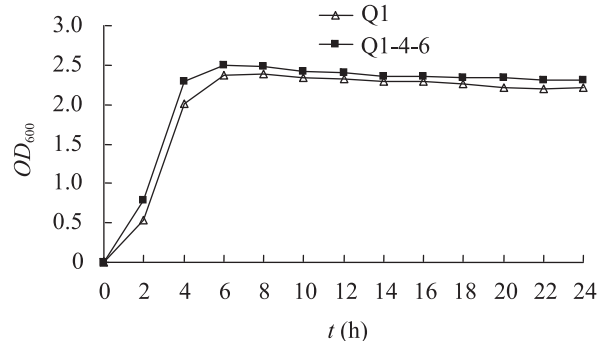


图 17 37 °C 下 Q1-4-6 和 Q1 在 MRS 培养基中的生长曲线

Fig. 17 The growth curve of Q1-4-6 and Q1 in MRS at 37 °C

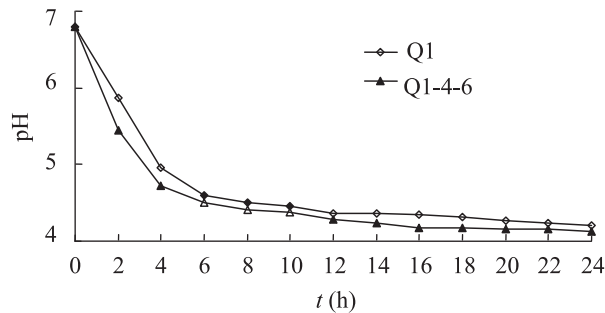


图 18 37 °C 下 Q1-4-6 和 Q1 在 MRS 培养基中的 pH 值变化

Fig. 18 The pH variation of Q1-4-6 and Q1 in MRS at 37 °C

值下降略快于出发菌株, 之后的 20 h, 两者的 pH 值差异不明显, 但出发菌株总体均略低于变异菌株。

2.4 突变株与购买菌株在 15 °C 生长及产酸比较

如图 19–21 所示, 在 15 °C 培养 120 h, 突变株生长、产酸均好于干酪乳杆菌(CL04)和嗜热链球菌(CL05)。突变株生长潜伏期短, 生长快, 产酸量高。

3 结论与讨论

(1) 从玛曲牧民自制酸奶中分离得到一株乳酸菌, 根据其形态学特征、生理生化特性, 同时结合 16S rDNA 序列分析结果, 将分离的菌种鉴定为肠球菌属(*Enterococcus*)、棉籽糖肠球菌(*E. raffinosus*)。

(2) 将分离的纯菌株经过连续的紫外诱变和亚硝基胍诱变, 最终筛选出一株在低温下生长迅速, 产酸良好的菌株, 通过乳酸脱氢酶活力测定, 证明变异菌株具有遗传稳定性, 将最终诱变成功的菌株编号为 Q1-4-6。

(3) 将出发菌株与诱变菌株在 15 °C、20 °C 比较其生长、产酸和糖降解量发现, 诱变菌株均好于出发菌株, 说明诱变菌株比出发菌株更适宜在低温条件下生长。在 37 °C 的自然条件下, 诱变菌株和出发菌株的生长速率差异不大, 但均略

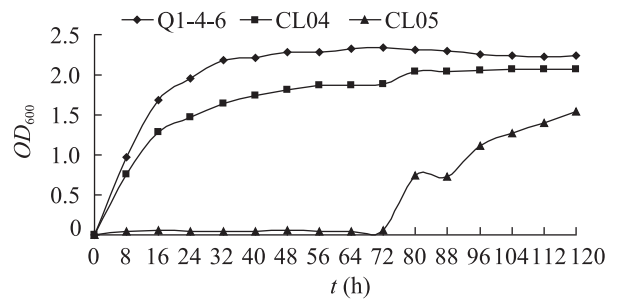


图 19 Q1-4-6、CL04 和 CL05 的 15 °C 生长曲线

Fig. 19 The growth curve of Q1-4-6, CL04 and CL05 strains at 15 °C

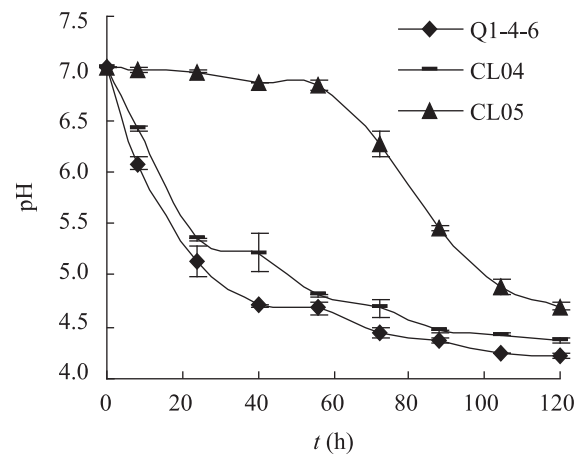


图 20 15 °C 下 3 个菌株在培养基中 pH 的变化

Fig. 20 The pH variation of Q1-4-6, CL04 and CL05 in MRS at 15 °C

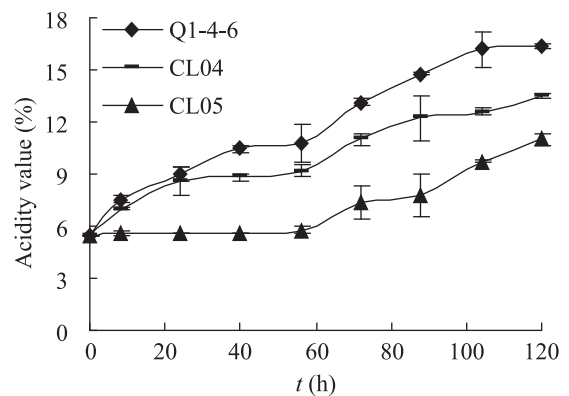


图 21 15 °C 下 3 个菌株在培养基中酸度的变化

Fig. 21 The acidity variation of Q1-4-6, CL04 and CL05 in MRS at 15 °C

高于出发菌株。说明诱变后的菌株有了更宽的生长温度适应能力。

(4) 在 15 °C 培养发现, 诱变菌株生长速率、产酸量均高于购买菌株干酪乳杆菌(CL04)和嗜热链球菌(CL05)。

近年来, 国内外对于乳酸菌的研究有了长足的发展, 对于选育高温乳酸菌、高产酸能力乳酸菌、高产 SOD 乳酸菌已有报道, 但对于乳酸菌低温菌株的诱变选育未见报道。本研究选用复合诱变的方法, 有效提高了诱变效率, 避免了单一诱变所产生的不利因素(紫外诱变易光复活), 进而形成了稳定的突变体。在诱变处理后的培养过程中添加适量的酵母膏可以提高突变率和增加变异幅度。变异菌株在低温 15 °C、20 °C 的产酸均高于出发菌株, 在 37 °C 培养时, 诱变菌株和出发菌株的生长速率差异不大, 但略高于出发菌株。由此可以说明变异菌株的遗传物质发生了改变, 但具体是由于形成嘧啶二聚体还是由于 G:C-A:T 转换或 G:C-T:A 颠换而导致突变尚不清楚, 此结果有待于进一步进行分子水平上的研究。

参 考 文 献

[1] González CJ, Encinas JP, García-Lópea ML, et al. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes[J]. Food Microbiology, 2000, 17(4): 383-391.

[2] 刘晓蓉, 邓毛程, 连晓蔚. 腌肉中乳酸菌的分离选育[J]. 中国酿造, 2009(1): 46-48.

[3] 王哲, 孟宪志, 赵伟. 优良乳酸球菌的筛选及增殖研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(11): 61-63.

[4] Katikou P, Ambrosiadis I, Georgantelis D, et al. Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances' producing ability on microbiological, chemical and sensory

changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(6): 1303-1313.

- [5] Castellano P, Vignolo G. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(2): 194-199.
- [6] Tomé E, Teixeira P, Gibbs PA. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon[J]. Food Microbiology, 2006, 23(4): 399-405.
- [7] Weiss A, Hammes WP. Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon[J]. European Food Research and Technology, 2006, 222(3): 343-346.
- [8] 刘墨, 王长文, 周海柱, 等. 乳酸杆菌的研究进展[J]. 吉林医药学院院报, 2010, 31(4): 236-238.
- [9] Koizumi S, Wakita D, Sato T, et al. Essential role of toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1⁺ cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT 84[J]. Immunology Letters, 2008, 120(1/2): 14-19.
- [10] Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria[J]. Biochimie, 2002, 84(5/6): 577-592.
- [11] O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality[J]. Biochimie, 2002, 84(5/6): 593-604.
- [12] Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, et al. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2/3): 151-161.
- [13] 葛红莲, 郭翠红, 张军令. 两株乳酸菌的分离鉴定及产酸性能的研究[J]. 周口师范学院学报, 2009, 26(2): 89-91.
- [14] 徐晶雪, 邹积宏, 袁杰利. 降胆固醇乳酸菌的筛选及应用的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(6): 570-571.

- [15] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 45-46.
- [16] 齐香君, 苟金霞, 韩成琰, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定溶液中还原糖的研究[J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(3): 17-19, 30.
- [17] 布坎南 RE, 吉布斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 660-721.
- [18] 张刚. 乳酸细菌-基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 54-76.
- [19] Leslie A, Glatz BA, Hammond EG. Mutagenesis of strains of *Propionibacterium* to produce cold-sensitive mutants[J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66(12): 2482-2487.
- [20] O'donovan GA, Kearney CL, Ingraham JL. Mutants of *Escherichia coli* with high minimal temperatures of growth[J]. Journal of Bacteriology, 1965, 90(3): 611-616.
- [21] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2003: 137-138.

科技信息摘录

Nature 新闻: 发布基因工程标准化元件

在美国国家科学基金会的资助下, BIOFAB 于 2009 年在加州成立, 该机构旨在建立标准化的 DNA 序列元件, 以便更好地控制基因表达, 推动合成生物学的发展。利用这些标准化的 DNA 序列, 生物学家们只需插入各种基因就能够进行工程改造, 获得生产药物或者执行其他任务的特殊细胞。BIOFAB 就像是一家特殊的工厂, 专门开发基因工程所需的 DNA 工具。日前, BIOFAB 推出了他们的第一批产品, 能够在大肠杆菌中精确控制基因表达的 DNA 序列元件。

人们发现, 即使是在相当成熟的表达体系中(如 *E. coli*), 插入基因的表达也并不一定符合预期, 这是目前合成生物学面临的一个关键性障碍。

基因表达包括 RNA 转录和蛋白翻译, 要想在细胞中表达目的基因, 就需要在其上游添加一些识别序列。例如, 合成 RNA 转录本需要启动子序列, 而蛋白翻译需要核糖体结合位点 RBS。过去三十年来, 科学家们积累了大量上述序列, 并利用它们来表达目的基因。不过, 有些序列能力强, 有些序列能力弱, 导致 RNA 和蛋白的合成水平并不稳定。

BIOFAB 的 Drew Endy 和 Adam Arkin 在本周的 Nature Methods 杂志上发表了两篇文章, 指出上述 DNA 元件的作用效果难以预测。他们领导研究人员将许多不同的启动子-RBS 序列组合, 插入到编码荧光蛋白的基因前, 然后检测其中的蛋白合成水平。研究显示, 其后搭配的基因不同, 各组合的作用效果也大相径庭。

文章还引用了此前的一项发现指出, 希望以特定水平表达蛋白的科学家们, 实际只有 50% 的几率获得所需产量。这种基因表达的随意性是合成生物学家们面临的主要挑战, 因为他们往往需要建立多基因表达的系统。

为此, BIOFAB 研究团队为大肠杆菌 *E. coli* 设计了不干扰下游 DNA 的启动子和 RBS 序列。这些元件的作用效果与搭配的目的基因无关, 能够帮助科学家们更严格地控制基因表达。研究显示, 采用这些元件, 大大提升了基因表达水平达到预期的几率(约 93%)。现在, 研究者们可以通过网络免费获取这些序列(见 <http://www.biofab.org/data>), Arkin 的一些同事已经开始从中受益。

此外, 研究人员还设计了一个统计学方法, 用来衡量启动子和 RBS 序列的性能可变性。这一方法也适用于合成生物学中的其他遗传学元件。科学家们可以在此基础上建立各元件的规格表, 使自己的研究和成果共享更为方便。

——摘自《中国生物技术信息网》 2013/3/26
<http://www.biotech.org.cn/information/105633>