

文章编号:1673-1689(2009)03-0347-05

利用 Biolog 系统进行乳酸生产菌 代谢能力的快速分析

柏中中, 许婷婷, 何小丹, 何冰芳*

(南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 210009)

摘要: 利用 Biolog 系统考察目标菌株对产乳酸途径相关碳源的代谢能力, 表明在厌氧条件下两自行筛选的候选菌株中 S-18 比菌株 S-44 具有更高的己糖激酶和乳酸脱氢酶等产乳酸代谢关键酶活力; 通过好氧条件下产乳酸途径及旁路相关碳源利用能力的考察, 显示在好氧条件下丙酮酸更易转向旁路代谢且 L-乳酸脱氢酶受到强烈抑制, 为乳酸发酵条件的优化与调控奠定了理论基础。利用 Biolog 系统对特定代谢途径代谢能力进行分析的方法具有快速、简便、重现性高的特点, 并适合高通量分析的目的, 可促进工业微生物代谢能力及代谢调控研究的普遍开展。

关键词: Biolog 系统; 相关碳源代谢能力; 快速分析

中图分类号: Q 493.4

文献标识码: A

Fast Analysis of Metabolic Abilities of Lactate-Producing Bacteria by Biolog System

BAI Zhong-zhong, XU Ting-ting, HE Xiao-dan, HE Bing-fang*

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: In this study, the carbon resource metabolic ability of two lactate-producer strains, S-18 and S-44, isolated from soil, were carefully investigated. Under anaerobic condition, strain S-18 exhibited higher hexokinase and lactic acid dehydrogenase activity. Moreover, the utilization of carbon source involved in the main and bypass pathway of lactate fermentation under aerobic condition also study, and the results indicated a lower lactate dehydrogenase and more carbon flux from pyruvate channeled into the pyruvate bypass and TCA cycle. Those results will be benefit for further optimization and manipulating lactate fermentation process. Furthermore, the method of metabolic ability analysis in certain pathway by Biolog system has been proven to be a fast, convenient, and reproducible ones and fit the requirement of high-throughput analysis.

Key words: Biolog system; metabolic abilities of certain carbon source; fast analysis

高效菌种的选育是发酵工程的关键^[1]。基于快速代谢能力分析的菌种筛选不仅可提供菌种中

收稿日期: 2008-04-19

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA020101)。

作者简介: 柏中中(1975-), 女, 江苏如东人, 工学硕士, 讲师, 主要从事微生物学研究。Email: zzbai123@163.com

* 通讯作者: 何冰芳(1962-), 女, 浙江黄岩人, 农学博士, 教授, 主要从事应用微生物研究。Email: bingfanghe@

njut.edu.cn

目标代谢途径的代谢程度的概貌,同时对菌种发酵工艺的优化过程具有重要的指导意义。代谢能力分析有多种^[2],其中关键酶活力测定法和中间产物检测法较直接、准确,但操作复杂、实验条件要求高;代谢通量分析根据代谢路径中各种反应的计量关系以及实验的某些底物、产物的通量及细胞组成等确定整个代谢网络的通量分布^[3],由于细胞代谢网络的复杂性,建立的质量平衡方程组常常不能得到唯一解,因此有一定的局限性^[4];而采用 Biolog 系统,通过测定微生物对目标代谢途径中不同单一碳源利用能力的强弱,可直接反映对应关键酶活力大小,从而比较直观地表现微生物特定代谢途径整体代谢能力,操作简便,分析周期短,可满足高通量筛选的需求。作者采用 Biolog 系统,快速检测目标微生物对相关碳源及中间代谢物的利用情况,并观察其动态变化规律,旨在判断两株自行筛选的高温 L-乳酸生产菌中乳酸生产代谢与旁路代谢的强弱,从而指导高效 L-乳酸高产菌的快速选育及发酵工艺的优化;同时考察 Biolog 系统用于特定代谢途径分析的利弊,为工业微生物代谢流的快速分析提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

作者所在研究室自行筛选的两株高温乳酸生

产菌^[5],经 Biolog 细菌自动鉴定系统及 16S rDNA 序列分析,确定为凝结芽孢杆菌,分别被命名为 *Bacillus coagulans* S-18 和 *Bacillus coagulans* S-44 (简称菌株 S-18 和 S-44)。

1.2 主要材料

Biolog Microstation (4.2 版本),Biolog 读数仪。

直接采用 Biolog 公司的厌氧及革兰氏阳性微生物微孔鉴定板,分别进行厌氧条件和好氧条件下的代谢能力分析,两种鉴定板的碳源组成分别见表 1 和表 2,主要包括了糖和糖的衍生物、醇类、有机酸、氨基酸类等。

1.3 Biolog 鉴定原理及操作方法

Biolog 系统是一种测定微生物对不同单一碳源利用能力的快速、简便方法,最早应用于纯种微生物的鉴定^[6-8]。Biolog 平板上的 96 个微孔中含有各不相同的有机碳源,微生物代谢碳源过程产生电子传递,引起鉴定板微孔中四唑盐染料产生还原反应呈现紫色,颜色的深浅显示微生物对相应碳源利用能力的强弱,其利用情况形成了微生物的代谢特征指纹;代谢特征指纹是微生物菌种鉴定的依据,也可用于鉴别和区分不同来源的微生物群落,或者反映微生物群落的功能变化^[9]。

Biolog 具体操作^[6]如下:将待测菌株从冻存管接至 BUG 培养基(BiologTM提供),于 45 ℃培养箱

表 1 Biolog AN 鉴定板碳源种类^[6]

Tab.1 Carbon sources in Biolog AN microplate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
水	半乳糖胺	葡萄糖胺	甘露糖胺	甘露糖胺	甘露糖胺	杏仁糖	阿拉伯糖	熊果苷	纤维二糖	环式糊精	环式糊精	糊精
B 己六醇	赤藻糖醇	果糖	海藻糖	半乳糖	半乳糖醛酸	龙胆二糖	葡萄糖胺	氨基葡萄糖胺	α-D-葡萄糖	1-磷酸葡萄糖	6-磷酸葡萄糖	
C 甘油	丙三醇磷酸	纤维醇	乳糖	乳糖	麦芽糖	麦芽三糖	甘露醇	甘露糖	松三糖	D-蜜二糖	甲基葡萄糖	
D 半乳糖苷	甲基葡萄糖	甲基葡萄糖苷	甲基葡萄糖苷	葡萄糖二糖	蜜三糖	L-李鼠糖	水杨苷	D-山梨糖	水苏四糖	蔗糖	海藻糖	
E 松二糖	乙酸	蚁酸	反丁烯二酸	乙醛酸	羟基丁酸	β-羟基丁酸	衣康酸	α-丁酮酸	α-酮戊酸	D,L-乳酸	L-乳酸	
F 甲酯乳酸	D-苹果酸	L-苹果酸	丙酸	丙酮酸	甲酯丙酮酸	葡萄糖二酸	琥珀酸	琥珀酸	琥珀酸甲酯	酒石酸	尿苷酸	
G 丙酰胺胺	L-丙酰胺	丙酰胺谷氨酸	丙氨基组氨酸	丙氨基苏氨酸	L-天冬酰胺	L-谷氨酸	L-谷氨酸盐	甘氨酸谷氨酸	甘氨酸胺	甲硫氨酸	甘氨酸脯氨酸	
H 甲硫氨酸	L-苯基丙氨酸	L-缬氨酸	L-苏氨酸	L-缬氨酸	天冬酰胺	脱氧腺苷	肌苷	胸苷	尿苷	胸苷-5'-磷酸	尿苷-5'-磷酸	

表 2 Biolog GP2 鉴定板碳源种类^[6]

Tab.2 Carbon sources in Biolog GP2 microplate

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
水	环糊精	环糊精	糊精	淀粉	葡萄糖	甘露糖	甘露糖	吐温 40	吐温 80	半乳糖胺	葡萄糖胺	苦杏仁苷
B 阿拉伯糖	阿拉伯糖	熊果苷	纤维二糖	果糖	海藻糖	半乳糖	半乳糖醛酸	龙胆二糖	葡萄糖胺	葡萄糖	肌醇	
C 乳糖	乳糖	麦芽糖	麦芽三糖	甘露醇	甘露糖	松三糖	蜜二糖	α-半乳糖苷	β-半乳糖苷	3-甲基乳糖	甲基葡萄糖苷	
D 葡萄糖苷	甘露糖苷	葡萄糖二糖	洛酮糖	蜜三糖	鼠李糖	核糖	水杨苷	景天庚酮糖	D-山梨糖	水苏糖	蔗糖	
E 塔格糖	海藻糖	松二糖	木糖醇	木糖	醋酸	α-羟基丁酸	β-羟基丁酸	γ-羟基丁酸	p-羟基苯乙酸	α-酮戊二酸	α-酮戊二酸	
F 乳酸胺	乳酸甲酯	L-乳酸	D-苹果酸	L-苹果酸	丙酮酸甲酯	琥珀酸甲酯	丙酸	丙酮酸	琥珀酸胺	琥珀酸	乳酸胺谷氨酸	
G 丙氨酸胺	丙氨酸	丙氨酸	丙氨酸甘氨酸	天冬酰胺	L-谷氨酸	甘氨酸谷氨酸	焦谷氨酸	L-丝氨酸	丁二胺	2,3-丁二醇	丙三醇	
H 腺苷	脱氧腺苷	肌苷	胸苷	尿苷	单磷酸腺苷	单磷酸胸苷	单磷酸尿苷	6-磷酸果糖	1-磷酸葡萄糖	6-磷酸葡萄糖	α-磷酸甘油	

培养 16 h(因厌氧培养箱控制温度所限,比两菌的最适生长温度下调了 7 ℃)。用无菌棉签蘸生理盐水轻轻擦下培养基上的菌落,转入无菌稀释缓冲液配置菌悬液。严格控制菌悬液浓度标准,将其以一定量分别接入厌氧菌代谢分析板及革兰氏阳性菌代谢分析板的微孔中,置于 45 ℃培养箱内培养(厌氧代谢分析板置于厌氧培养箱培养)。每隔一定时间用 Biolog 读数仪测定并记录每孔 $A_{590\text{ nm}}$ 变化。

2 结果和讨论

两株凝结芽孢杆菌是作者所在研究室自行筛选的高效乳酸生产菌,这类菌是典型的嗜热微需氧产乳酸菌,发酵类型为同型发酵,具有乳酸生产速率快、菌体生长营养要求低,可直接利用淀粉发酵产乳酸等特点^[10-12],具有较高的实际开发应用潜力。

典型的同型乳酸发酵代谢途径如图 1 所示。

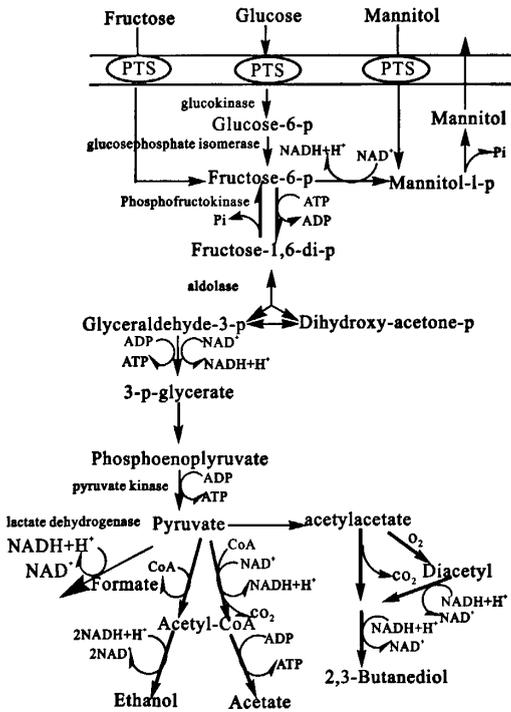


图 1 同型乳酸发酵代谢途径

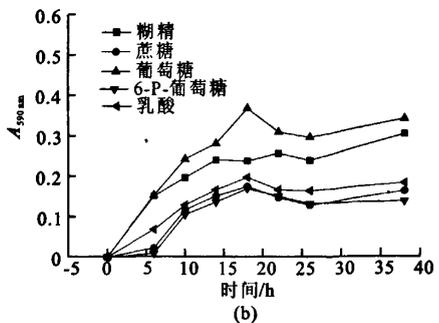
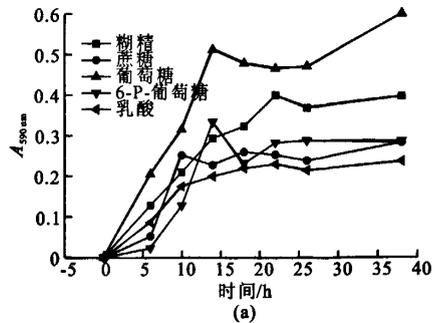
Fig. 1 Metabolic pathway of lactic acid homofermentation

黑色粗线标示出厌氧条件下产乳酸代谢的主途径,葡萄糖等碳源经糖酵解(EMP)途径生成丙酮酸,丙酮酸经 L-乳酸脱氢酶催化生成 L-乳酸,其中涉及的关键酶有己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶和 L-乳酸脱氢酶^[15],一定培养条件下,该途径

能成为唯一活跃的代谢途径;黑色细线标示的为乳酸发酵旁路代谢途径,丙酮酸脱羧生成乙酰 CoA,进而生成乙酸或乙醇等。在微氧或好氧条件下,丙酮酸的另一重要代谢流向是进入三羧酸途径,产生大量 ATP 以供菌体快速生长。

2.1 厌氧条件下两株凝结芽孢杆菌乳酸发酵相关代谢能力分析

采用 Biolog 厌氧微孔鉴定板测定 S-18 与 S-44 对各碳源的代谢情况,图 3(a)、(b)分别为菌株 S-18 和 S-44 对产乳酸主代谢相关碳源代谢曲线。由图可见,菌株 S-18 对产乳酸代谢相关碳源代谢的变化幅度均高于 S-44,其中 S-18 对葡萄糖的代谢强度约为 S-44 的 1.5 倍,尤其在反应初期, S-18 对葡萄糖的代谢极其迅速,表明 S-18 中葡萄糖进入 EMP 途径的关键酶—己糖激酶的活力明显高于 S-44; 6-P-葡萄糖经异构化变成 6-P-果糖后即可被关键酶—磷酸果糖激酶催化而进一步代谢,图中 S-18 对 6-P-葡萄糖的代谢强度约为 S-44 的 1.5 倍,表明 S-18 中 EMP 途径的另一关键酶—磷酸果糖激酶的活力也明显高于 S-44; 乳酸脱氢酶是乳酸发酵的关键酶,可催化丙酮酸与乳酸的相互转化, S-18 的乳酸代谢能力也明显高于 S-44,表明 S-18 具有更强的乳酸脱氢酶活力;此外, S-18 对糊精的代谢显著高于 S-44,表明 S-18 具有更强的淀粉酶活力,该性质有望进一步直接利用淀粉原料或不完全水解淀粉原料进行乳酸发酵,既可降低成本,又可降低高浓度糖液对菌体生长与发酵的抑制作用。



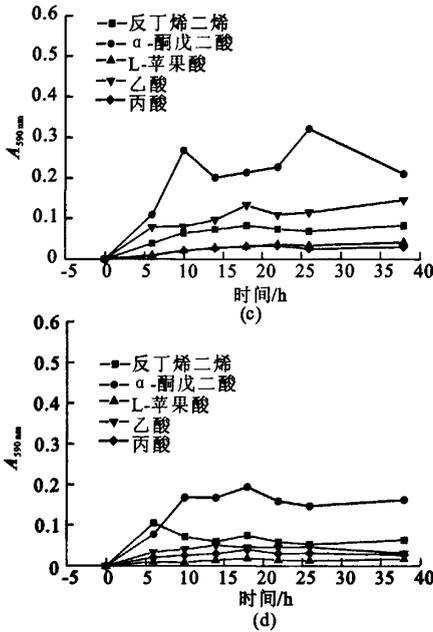


图2 厌氧条件下两株凝结芽孢杆菌产乳酸代谢相关碳源代谢曲线

Fig. 2 Metabolic curves of carbon sources related to lactic acid fermentation of two *Bacillus coagulans* strains

图2(c)、(d)分别为厌氧条件下S-18和S-44产能及旁路代谢相关碳源的代谢曲线。TCA循环是菌体产生能量的主要途径,相关碳源有反丁烯二酸、 α -酮戊二酸、L-苹果酸等。厌氧条件下,两菌中TCA途径碳源整体代谢能力低,表明两菌仅需维持一定的TCA途径的反应即可维持生长,该代谢特征是获得高发酵转化率的重要保证。两菌对乙酸、丙酸的代谢能力均很弱,表明在厌氧条件下两菌中旁路代谢处于较低水平,显示了典型的同型乳酸发酵的代谢特征。

综上分析,厌氧条件下,尽管两菌均具有较强的乳酸发酵代谢能力及高发酵转化率的代谢特征。S-18对葡萄糖、6-P-葡萄糖和乳酸的代谢能力显著高于S-44,推测S-18菌中乳酸发酵主代谢途径的关键酶己糖激酶、磷酸果糖激酶和乳酸脱氢酶活力显著高于S-44。凝结芽孢杆菌S-18具有更大的开发潜力。

2.2 好氧条件下两株凝结芽孢杆菌乳酸发酵相关代谢能力分析

目标菌S-18和S-44是典型的兼性厌氧菌。好氧条件下S-18和S-44乳酸发酵相关碳源代谢曲线分别见图3(a)、(b)和图3(c)、(d)。在好氧条件下两菌代谢速度普遍加快,对葡萄糖的代谢能力分别提高了近4~6倍;L-乳酸合成代谢减弱,推测氧对

L-乳酸脱氢酶存在抑制作用,所以乳酸发酵阶段应严格控制溶氧。对比图2(c)、(d)和图3(c)、(d)可知,好氧条件下两菌对TCA途径相关碳源和旁路代谢相关碳源的代谢能力明显增加,这进一步说明溶氧量的控制将是两株菌发酵条件优化过程中的关键点。

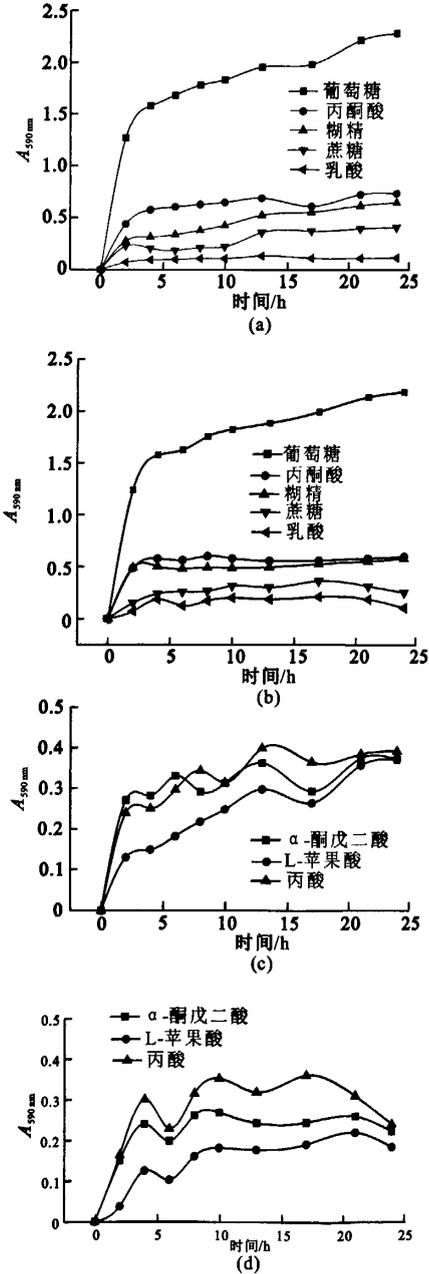


图3 好氧条件下两株凝结芽孢杆菌产乳酸代谢相关碳源代谢曲线

Fig. 3 Metabolic curves of carbon sources related to lactic acid fermentation of two *Bacillus coagulans* strains under aerobic condition

两菌在摇瓶发酵条件初步优化时由 80 g/L 葡萄糖发酵液发酵结果如图 4 所示,菌株 S-18 代谢葡萄糖产乳酸的速度及最大乳酸产量均优于 S-44,此结果与 Biolog 法分析结果吻合。图中显示后期乳酸积累反而有所下降,可能是菌体以乳酸为碳源进行代谢所致。

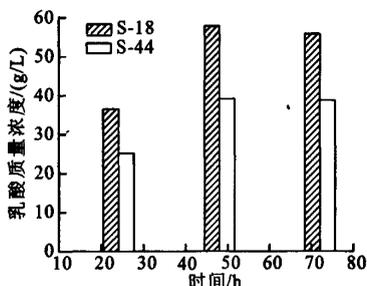


图 4 菌株 S-18 和 S-44 的产乳酸发酵

Fig. 4 L-lactic acid production by strain S-18 and S-44

3 结 语

作者首次采用 Biolog 系统快速分析了两株凝

参考文献(References):

- [1] 曹军卫, 马辉文. 微生物工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] Stephanopoulos G N, Aristidou A A, Nielsen J. 代谢工程—原理与方法 [M]. 赵学明, 白冬梅译, 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [3] 白冬梅, 付卫明, 赵学明, 等. 代谢通量分析优化米根霉 R1021 发酵生产 L(+) -乳酸过程[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2002, 21(6): 554—558.
BAI Dong-mei, FU Wei-ming, ZHAO Xue-ming, et al. Optimization of L(+) -Lactic Acid Fermentation by *Rhizopus oryzae* R1021 by Metabolic Flux Analysis[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2002, 21(6): 554—558. (in Chinese)
- [4] 魏春, 陈宁. 代谢网络定量分析研究进展[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(3): 234—238.
WEI Chun, CHEN Ning. Progress in the quantitative analysis of metabolic network[J]. *Letters in Biotechnology*, 2002, 13(3): 234—238. (in Chinese)
- [5] 许婷婷, 柏中中, 何冰芳. 嗜热 L-乳酸高产菌株的选育[J]. 化工进展, 2006, 25(10): 1178—1183.
XU Ting-ting, BAI Zhong-zhong, HE Bing-fang. Breeding of efficient L-lactic acid producing thermophiles[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2006, 25(10): 1178—1183. (in Chinese)
- [6] 程池, 杨梅, 李金霞, 等. Biolog 微生物自动分析系统—细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50—54.
CHENG Chi, YANG Mei, LI Jin-xia, et al. Biolog microbial identification system—study on the operating regulation of bacteria identification[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(5): 50—54. (in Chinese)
- [7] Klinger J M, Stowe R P, Obenhuber D C, et al. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system, 1992, 58(6): 2089—2092.
- [8] 谢家仪, 王永力. Biolog 细菌自动鉴定系统的应用与研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(5): 264—267.
ZHANG Chao-hua. Application and study of the biolog automated bacterial identification system[J]. *Microbiology*, 1996, 23(5): 264—267. (in Chinese)
- [9] 席幼英, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 138—141.
XI Jin-ying, HU Hong-ying, QIAN Y. Application of biolog system in the study of microbial community [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1): 138—141. (in Chinese)
- [10] Payot T, Chemaly Z, Fick M, et al. Lactic acid production by *Bacillus coagulans* Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 24: 192—199.
- [11] Simisker Jaan, Nurk Allan, Heinaru Ain. Thermophilic microorganism *Bacillus coagulans* strain SIM-T DSM 14043 for the production of L-lactate from fermentable sugars and their mixture. [P]. US 7183088, 2002.
- [12] Michelson T, Kask k, Talpsep E, et al. L(+) -Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-T DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 861—867.

(责任编辑: 朱明)