

文章编号: 1673 1689(2010)05-0796-05

高产 D-乳酸生产菌株的选育

于培星

(河南金丹乳酸科技有限公司, 河南 郸城 477150)

摘要: 以凝结芽孢杆菌 JD-063D 为出发菌株, 采用紫外线、硫酸二乙酯、钴 60 γ -射线辐照、微波进行复合诱变, 得到正突变菌株, 进行发酵检测和遗传稳定性试验, 最终筛选出一株 JD-76D, 该菌株产酸由出发菌株的 61 g/L 提高到 145 g/L, D-乳酸纯度由原菌株的 97.5% 增加到 98.7% 以上。

关键词: 凝结芽孢杆菌; D-乳酸; 诱变育种

中图分类号: Q 81

文献标识码: A

D-lactic Acid Production of High-Yielding Strains of Breeding

YU Peixing

(Henan Jindan Lactic Acid Tech Co., Ltd., Dancheng 477150, China)

Abstract: In the paper, the *Bacillus coagulans* JD-063 was mutagenized using UV, diethyl sulfate, cobalt 60 γ -ray and microwave; Mutant strains were carried out fermentation test and genetic stability test. Finally, we selected a strain JD-76D which had some notable features. Using the mutant strain, the amount of produced acid was increased to 145 g/L from 61 g/L using starting strain, the purity of D-lactic acid reached to 98.7% which was more than 97.5% of original strain.

Key words: *Bacillus coagulans*, D-lactic acid, mutation breeding

D-乳酸是重要的手性中间体与有机合成原料, 是多种手性物质的前体, 广泛应用于制药、化妆品和高效低毒农药及除草剂等领域的手性合成。D-乳酸市场前景广阔, D-乳酸的工业生产主要采用微生物发酵法^[1-3], 目前国外仅有 2~3 家 D-乳酸生产企业, 而我国目前尚未开展 D-乳酸制备方面的研究, 也没有工业化生产的企业, 因此研究开发 D-乳酸生产技术, 对于扩大我国乳酸产品的种类和应用领域具有十分重要的意义。微生物发酵法^[4]利用可再生的淀粉质资源为主要原料生产 D-乳酸, 具有生产成本低、产物光学纯度高、生产条件温和、污染

小等优点, 是目前生产 D-乳酸的主要方法。国外的 D-乳酸发酵生产中采用的生产菌株有德氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌和左旋乳酸芽孢杆菌^[5]等。作者选用了所产 D-乳酸纯度较高、糖酸转化率高的凝结芽孢杆菌作为出发菌株, 通过物理与化学复合诱变筛选出一株 D-乳酸光学纯度高、产酸率高的突变株, 为 D-乳酸的发酵生产奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株 JD-063D, 河南金丹乳酸科技有

收稿日期: 2009-12-16

作者简介: 于培星(1971-), 男, 河南郸城人, 高级工程师, 主要从事生物工程研究。Email: yu394@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

限公司技术中心分离选育和保藏。

1.1.2 培养基 MRS培养基:蛋白胨 10.0 g,肉浸膏 10.0 g,酵母抽提物 5.0 g,葡萄糖 20.0 g,三水醋酸钠晶体 5.0 g,柠檬酸三铵 2.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05 g, Tween 80 1.0 mL, 蒸馏水定容 1 000 mL, 调节 pH 值为 7.0, 高压 115 °C 灭菌 15 min, 固体培养基加入琼脂 15.0 g。

种子培养基: 葡萄糖 40 g, 蛋白胨 20 g, 酵母抽提物 10 g, 碳酸钙 10 g, 分装 250 mL 三角瓶, 每瓶 40 mL, 8 层纱布扎口, 高压 115 °C 灭菌 15 min。

摇瓶发酵培养基: 葡萄糖 160 g, 蛋白胨 1.5 g, 酵母粉 15.0 g, 柠檬酸三铵 2.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05 g, Tween 80 1.0 mL, 蒸馏水 1 000 mL, 高压 115 °C 灭菌 15 min。

1.1.3 试剂 酵母抽提物、蛋白胨: 英国 OXOID 公司产品; L-乳酸标样: Sigma 公司产品; L-和 D-乳酸试剂盒: 山东省科学院提供; 葡萄糖、 K_2HPO_4 等主要试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器设备 5 升发酵罐: 上海保兴生物设备工程有限公司产品; 250B 型恒温培养箱: 江苏金坛大中仪器厂产品; 752 型紫外分光光度计: 郑州市精科分析仪器有限公司产品; 数码生物显微镜: 上海光学仪器厂产品; PHS-2C 型酸度计: 上海伟业仪器厂产品; SBA-生物传感分析仪: 山东省科学院生物研究所产品; 台式离心机: 上海科学仪器厂产品; 全自动高压蒸汽灭菌器: 上海申安医疗器械厂产品。

1.2 方法

1.2.1 紫外线(UV)诱变 出发菌株经活化培养后, 制备细胞菌悬液。取 5 mL 菌悬液放置于经过灭菌的带磁力棒的培养皿(直径 90 mm)中, 培养皿放置在磁力搅拌器载物台上, 开启搅拌器, 在的紫外灯下(距离为 30 cm)边照射边搅拌, 并计时。分别在 0.5、1.0、1.5、3.0、5.0 min 各取 2 mL 菌液混合, 进行倍数稀释后, 涂布于 pH 4.2 的 YE 平板, 45 °C, 培养箱避光培养^[6-8]。

1.2.2 硫酸二乙酯(DES)诱变 向一定浓度的菌悬液中加入 1% 的 DES, 振荡 20~120 min 后立即加入质量分数 25% 的 $Na_2S_2O_3$ 溶液终止反应, 处理后的菌悬液稀释至一定浓度涂布于 pH 4.0 的 YE 平板, 45 °C, 恒温振荡培养箱培养 48 h。计算 DES 不同处理时间的致死率和形态变异率, 确定 DES 的最适处理时间。

1.2.3 钴 60 诱变 取 10 mL 菌悬液于无菌试管中, 分别以 15、10 万伦琴进行钴 60 γ -射线照射处理。

1.2.4 微波诱变 取 10 mL 菌悬液放入直径 15 cm 的平皿中, 调整微波功率为 650 W, 脉冲频率为 2 450 Hz, 辐照处理 20、40、60 s, 迅速取出作稀释处理。

1.2.5 发酵试验 将 JD-063D 和复合诱变后突变菌株于 50 °C MRS 静止过夜培养, 再接种于 MRS 培养基中, 50 °C 培养 15 h, 按体积分数 5% 接种量于 5 L 发酵罐, 3.5 L 工作体积, 转速 150 r/min, 以质量分数 25% 的 $Ca(OH)_2$ 控制发酵液 pH 值。每隔两小时取样, 测定菌体密度(A_{600})、乳酸浓度和葡萄糖质量浓度。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量分析 细胞密度用紫外分光光度计测定 A_{600} : 将发酵液离心后收集菌体, 生理盐水洗涤两次, 然后重悬于生理盐水中, 调整细胞密度 A_{600} 在 10 左右, 取 50 mL 菌体溶液于称量瓶中 105 °C 干燥至恒重, 称重并计算。每单位菌体密度相当于 0.35 g/L 菌体干重。

1.3.2 EDTA 滴定法定量分析乳酸钙 取发酵液 2 mL, 8 000 r/min, 离心 5 min, 取上清液 1 mL 于 100 mL 的蒸馏水中, 加入 1.0 mol/L 的 NaOH 10 mL, 加钙指示剂 2 滴, 用 0.05 mol/L EDTA Na_2 试剂滴定, 终点为溶液颜色变为纯蓝色。由滴定的 EDTA Na_2 体积计算乳酸钙和乳酸的含量。计算公式如下:

$$\text{乳酸钙质量浓度: } W(\text{乳酸钙}) = 218.2c \times V$$

$$\text{乳酸质量浓度: } W(\text{乳酸}) = 180c \times V$$

其中: V 为滴定消耗 EDTA Na_2 的量(mL); c 为 EDTA Na_2 的浓度(mol/L)

1.3.3 乳酸分析 发酵液中乳酸用 HPLC 方法检测^[9], 实验仪器为美国 Waters 2575 高效液相色谱仪, 检测条件如下:

色谱分离柱: SCR-101H 柱; 检测器: 1525 紫外检测器; 流动相: 0.01 mol/L

磷酸盐缓冲溶液(pH 2.5); 流动相流速: 0.8 mL/min; 紫外检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μ L。

L-和 D-乳酸采用手性色谱柱进行分离测定。

发酵液 L-乳酸采用 SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感分析仪分析^[10]。

1.3.4 葡萄糖分析 采用费林试剂法和 SBA-40C 葡萄糖-乳酸生物传感分析仪分析。

2 结果与分析

2.1 出发菌株选育

出发菌株凝结芽孢 JD-063D 在固体平板培养上培养时,形成微小圆形菌落,在 CaCO_3 -MRS 平板上培养 48 h 后,菌落呈白色,且在菌落周围能形成明显的透明圈和变色圈。将变色圈明显和透明圈大的菌落转入试管保存,并作为诱变的出发菌株。

2.1.1 出发菌株降糖曲线和产酸曲线 按照 2.1 所述方法,在发酵培养基中进行培养,JD-063D 葡萄糖发酵结果如图 1 所示。

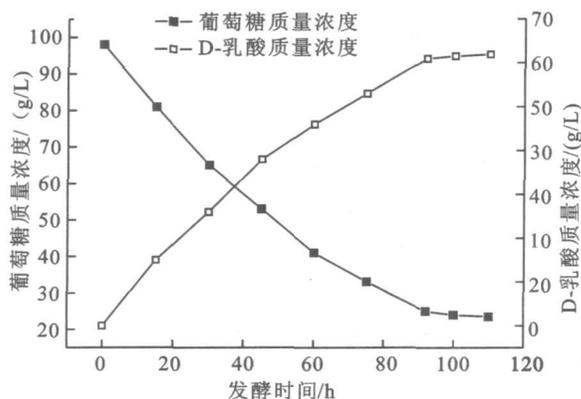


图 1 JD-063D 发酵过程中葡萄糖与乳酸的变化关系

Fig. 1 Relationship between glucose and lactic acid during fermentation using JD-063D

由图 1 可以看出 JD-063D 乳酸发酵主要代谢葡萄糖产生乳酸,随着发酵液中葡萄糖质量浓度的逐步下降,乳酸质量浓度逐渐增加,当发酵液中葡萄糖质量浓度下降到 25 g/L 以后,产酸基本停止,葡萄糖也不再被消耗,故确定最终发酵时间为 92 h,此时发酵产酸 61 g/L,葡萄糖转化率为 85.6%。

2.1.2 出发菌株 JD-063D 的生长曲线 出发菌株 JD-063D 在种子培养基中,45 °C 静止培养的生长曲线如图 2 所示。

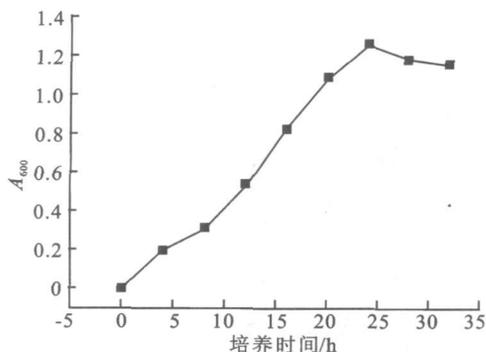


图 2 出发菌株 JD-063 的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of the starting strain JD-063D

由图可知,JD-063D 在培养 8 h 后进入对数生长期,菌体量呈现出指数增长,同时 pH 值开始下降。在 14~16 h 左右对数生长结束,转入稳定期,使 A_{600} 保持 1.2 以上,故选取培养时间为 12 h 的细胞作为诱变用菌体。

2.2 D-乳酸生产菌的诱变路线

D-乳酸生产菌的诱变路线,见图 3。

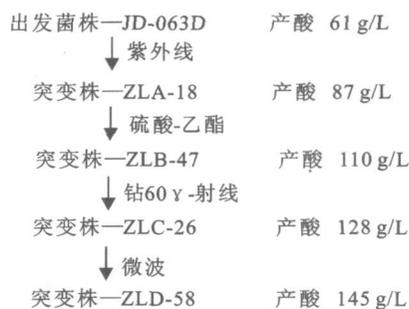


图 3 D-乳酸生产菌的诱变路线图

Fig. 3 Mutant roadmap of D lactic acid production strain

2.3 D-乳酸生产菌株诱变选育结果与讨论

以凝结芽孢杆菌 JD-063D 为出发菌株,经紫外线、硫酸二乙酯、钴⁶⁰γ-射线、微波进行交替诱变处理,其诱变结果如表 1。

从表 1 可以看出,以凝结芽孢杆菌 JD-063D 为出发菌株,采用紫外线诱变时间为 5~20 min,共挑选菌株 59 株,经发酵筛选后获得正突变株 33 株,其中 ZLA-18 产酸较高,产酸 87 g/L,较出发菌株(61 g/L)提高 42.6%,产酸提高幅度较大,效果非常明显。又以 ZLA-18 为出发菌株,用硫酸二乙酯进行不同时间的诱变处理,共挑选菌落 51 株,经发酵试验初筛获得正突变株 17 株,其中 ZLB-47 产酸较高,产酸率达到 110 g/L,较出发菌株提高 26.4%,以 ZLB-47 为出发菌株进行钴⁶⁰γ-射线辐照处理,根据经验选择剂量为 15 万、10 万伦琴,共挑选菌落 38 株,初筛后获得正突变株 17 株,其中 ZLC-26、ZLC-28 产酸较高,产酸率分别达到 128、123 g/L,较出发菌株分别提高 11.63% 和 11.18%,经重复试验,ZLC-26 重现性较 ZLC-28 好。产酸提高幅度不大的原因可能是菌株敏感度降低或钴⁶⁰γ-射线处理剂量不够造成;然后以 ZLC-26 为出发菌株,选择了微波诱变,分别处理 20、40、60 s,挑选菌株 57 株正突变 27 株,ZLD-58 产酸较高,产酸率达到 145 g/L,产酸率较出发菌株 ZLC-26 提高 13.28%,较原出发菌株 JD-063D 提高 137.7%,取得良好效果,将突变菌株 ZLD-58 命名为 JD-76D。

表 1 D-乳酸生产菌株诱变选育结果
Tab. 1 The mutation results of D lactic acid production strain

诱变剂	出发菌株	剂量	致死率	挑选菌落数(株)	正突变率/%	代表株	产酸率/(g/L)
紫外线	凝结芽孢杆菌 JD-063D	5 min	45	10	60	ZLA-01	74
						ZLA-04	68
						ZLA-08	71
		10 min	89	27	55	ZLA-14	76
						ZLA-18	87
						ZLA-22	71
						ZLA-36	80
		20 min	95	22	54	ZLA-45	73
						ZLA-47	84
						40 min	79
硫酸二 乙酯	ZLA-18	60 min	93	21	43	ZLB-23	97
						ZLB-26	101
						ZLB-38	95
		80 min	99	19	42	ZLB-43	98
						ZLB-47	110
						ZLB-50	103
钴 60 γ - 射线	ZLB-47	15 万伦琴	99.5	20	50	ZLC-16	116
						ZLC-22	120
						ZLC-26	128
						ZLC-28	123
		10 万伦琴	91	18	39	ZLC-35	115
						ZLC-39	113
						ZLC-42	122
微波	ZLC-26	20 s	79	26	58	ZLD-30	137
						ZLD-34	141
						ZLD-40	134
		40 s	92	22	47	ZLD-43	135
						ZLD-53	138
						ZLD-58	145
						ZLD-59	140
60 s	100	9	23	ZLD-61	136		

2.4 突变菌株的发酵性能试验

将复合诱变得到的突变菌株 JD-76D 与出发菌株 JD-063D 分别在含 15% CaCO₃ 的发酵培养基的摇瓶中发酵 48 h, 观察其乳酸发酵情况。结果如图

4 所示, 复合诱变的突变菌株 JD-76D 产酸率提高显著, 产酸速率提高了 59%。而多次复合诱变得到的菌株 JD-76D 的产酸速率在 1.50 g/(L·h) 左右, 比出发菌株提高 0.3 g/(L·h)。

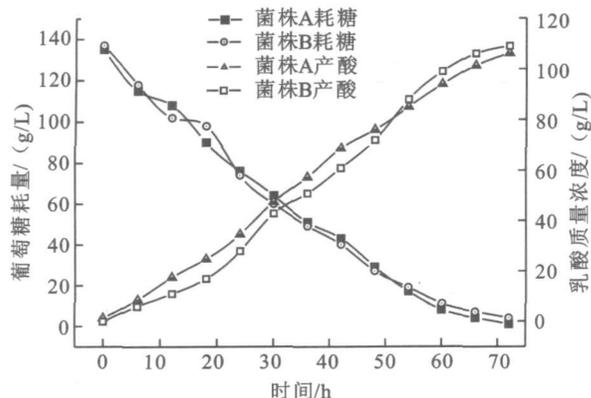


图4 复合诱变后菌株 JD 76D 的耗糖与产酸曲线

Fig. 4 The curves between glucose and lactic acid of JD 76D after multiple mutation

2.5 突变菌株的稳定性试验

为了确保筛选到的高产菌 JD-76D 的遗传稳定性,对其做了遗传稳定性考察。每代实验过程:高产菌株自然分离→单菌落→斜面→种瓶→摇瓶发酵,测 L-乳酸产量等指标。共传 10 代,每代均做 3 个平行样。突变菌株 JD-76D 产酸基本维持在 145 g/L 左右,产酸速率维持在 1.50 g/(L·h) 左右,D-乳酸纯度 98.5% 以上,其发酵产品液相色谱图见图

5,说明菌株 JD-76D 遗传稳定性较好。

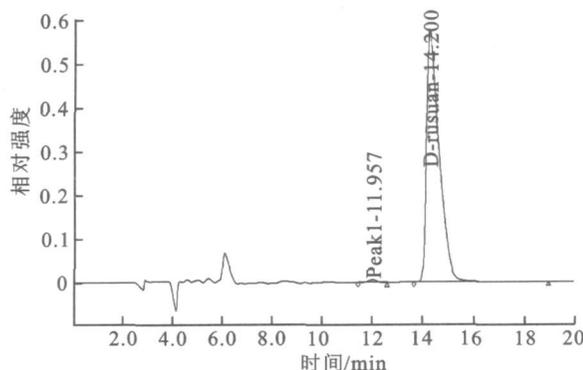


图5 菌株 ZLD 58 发酵产品液相色谱检测结果

Fig. 5 The testing results of the fermentation product of Strain ZLD 58 using liquid chromatography

3 结语

通过对出发菌株 JD-063D 进行物理化学复合诱变,筛选得到了一株高产菌株 JD-76D,产酸由出发菌株的 61 g/L 提高到 145 g/L, D-乳酸纯度由原菌株的 97.5% 增加到 98.7% 以上,该菌株通过工艺优化有着较高的工业化生产应用价值。

参考文献(References):

- [1] 金其荣,张继,徐勤. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000, 339-406.
- [2] 刘振民,骆承痒. 乳酸菌发酵制剂生物工程学[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(4): 68-72.
LIU Zher min, LUO Cheng yang. Progress in biotechnology of lactic acid bacteria starter cultures[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2000, 26(4): 68-72. (in Chinese)
- [3] 陈坚,堵国成,李寅,等. 发酵工程实验技术[M]. 化学工业出版社,2003. 230-298.
- [4] 杜连样. 乳酸菌及其发酵制品生产技术[M]. 天津科技出版社, 1999. 183.
- [5] 杨洁彬,郭兴华,凌代文,等. 乳酸菌——生物学基础及运用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996. 174-184.
- [6] 赵有玺,龚平. 雄甾烯酮转化菌的诱变育种和发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 150-154.
ZHAO You xi, GONG Ping. Mutant and optimization of androstenone translation strain mycobacterium sp. SH5[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(1): 150-154. (in Chinese)
- [7] Zhou Y, Guo X C, Yi T, et al. Two continuous spectrophotometric assays for methionine aminopeptidase[J]. **Analytical Biochemistry**, 2000, 280(1): 159-165.
- [8] Ara K, Meguro S, Hase T, et al. Effect of spore bearing lactic acid forming bacteria (Bacillus coagulans SANK 70258) administration on the intestinal environment, defecation frequency, fecal characteristics and dermal characteristics in humans and rats[J]. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 2002, 14(1): 4-13.
- [9] 凌代文,东秀珠. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [10] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工业学院,等. 工业发酵分析[M]. 北京:轻工业出版社,1994.

(责任编辑:朱明)