

L-乳酸产生菌的诱变选育

陈碧娥 李旭 李文琦*

(化工与生化工程系)

摘要 米根霉 R87经紫外线和氯化锂复合诱变处理,获得一株高产、稳产 L-乳酸的变异株 R87-91. 其在10%初糖和发酵72小时,产酸达8.18%.

关键词 L-乳酸,根霉,诱变

0 引言

乳酸最早发现在发酵的牛乳中. 自1881年 Avery 首创乳酸生产后,乳酸发酵已成为较重要的工业^[1]. 乳酸除在食品中用作清凉酸味添加剂和防腐剂外,在皮革、印染、纺织、医药等方面也有广泛的用途. 乳酸有 D、L、DL 三种构型. 它作为食品添加剂时,仅有 L 型乳酸能被人体吸收. 目前国内外发酵法生产乳酸,主要采用以糖蜜、糖化淀粉等为原料,以德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbriickii*) 为菌种的方法,产物是 DL 型乳酸^[2,3]. 工业生产上需要能积累 L 型乳酸的高产菌. 早期有日本高桥、北原等对根霉产生 L-乳酸做过探索^[4],近年来国外的研究又有新进展^[5]. 本文以米根霉为出发菌,选育 L-乳酸产生菌. 报道了诱变株的选育及产物鉴定的结果.

1 材料与方法

1.1 材料

(1)菌种:米根霉(*Rhizopus oryzae*)R87,来自 AS. (2)主要试剂:(i)口服葡萄糖、玉米粉、碳酸钙等,市售;(ii)去氧胆酸钠,中国医药公司(意大利进口分装);(iii)氯化锂,上海试剂二厂,化学纯. (iv)L-乳酸钙标准品, Sigma 公司产品. (3)培养基:(i)斜面培养基,为 PDA 培养基;(ii)菌种筛选培养基,为在斜面培养基中加去氧胆酸钠0.1%,氯化锂0.2%,自然 pH;(iii)

文本1992—05—10日收到. 福建省自然科学基金资助项目.

• 李旭、李文琦系87级毕业生. 校测试中心黄进所、兰心仁同志帮助测定乳酸钙红外光谱.

发酵培养基,主要成分为葡萄糖10%或玉米粉10%.

1.2 方法

(1)发酵液中残糖的测定.用DNS比色法^[6].(2)pH测定.用PHS-2型酸度计测定.(3)发酵液中总酸的测定.发酵液过滤后,用EDTA法测定乳酸钙^[7]后乘以0.584折算为乳酸量.(4)乳酸钙的光谱分析.用KBr压片法,在PerKin-Elmer 983型红外分光光度计上测定红外光谱.(5)紫外线、氯化锂复合诱变处理.取0.1ml浓度为 10^3 个/ml的孢子悬浮液涂布在含0.2%氯化锂的筛选培养基上,用30W紫外灯距离40cm照射2min后,放在30℃恒温箱避光培养36h随机挑起单菌落移接斜面上.(6)筛选方法.逐个测定各菌株和产酸率.将挑起的菌落移接在斜面上,一个菌落一支斜面.用斜面孢子直接接种到发酵培养基,每100ml发酵培养基接种 10^6 个孢子,30℃摇瓶震荡培养72h后测定乳酸含量.

2 结果与讨论

2.1 菌种选育程序

出发菌株(R87)→纯化→性能测定(包括发酵条件及产酸能力)→自然分离4次→制成单孢子悬浮液(悬浮液进行活菌计数)→用诱变剂处理(处理前进行诱变剂量的选择)→处理后的悬浮液作活菌计数并计算存活率→涂布平板,观察变异的单菌落→挑取单菌落并移植到斜面上→摇瓶筛选(测定产酸能力)→连续传代,考察其稳定性.

2.2 抑制剂添加量的选择

根霉为丝状真菌,菌落大而蓬松.菌丝体在平板上生长旺盛,迅速地连成一片,不能获得单菌落.为使根霉在平板上形成单菌落,选用去氧胆酸钠作抑制剂.在斜面培养基中分别加入不同浓度的去氧胆酸钠倒成平板,用0.2ml的斜面孢子悬浮液进行涂布.30℃恒温培养24h后观察生长情况.结果见表1.0.10%的去氧胆酸钠为合适的抑制剂的浓度.在此浓度下,根霉菌既能形成单菌落,菌落直径又不至于太小.

表1 去氧胆酸钠浓度对菌丝生长影响

去氧胆酸钠浓度(g/100ml)	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12
菌丝生长情况	菌丝连成一片	菌丝连成一片	菌落稠密	菌落均匀	菌落小

2.3 不同诱变剂量对R87的致死作用

在用0.2%氯化锂剂量(0.2%)下,R87分别经30W紫外灯(距离40cm)照射1—5min后,放入30℃恒温箱避光培养36h后进行活菌计数,得出各剂量下的菌体细胞的存活数.用存活数算出致死率,可得到紫外线照射不同时间和菌体细胞致死率(%)的关系,即致死曲线如图1所示.诱变作用主要是由于诱变剂直接或间接作用于菌体的染色体而引起基因突变.诱变通常有一个最适的剂量,它要兼顾到细胞的存活数和诱变率.从图1可以看出,当紫外光照射2分钟时,菌体细胞的致死率为85%,我们选择该剂量为诱变剂量.

2.4 紫外线和氯化锂复合诱变对产酸的影响

挑取在致死率85%的剂量下存活的菌落250个,对其中的130株进行摇瓶测定.经复合诱变

后,菌体的产酸能力发生了变化,见图2.如以出发株 R87产酸量为100%;复合诱变后130株中有30株为正突变株,正突变率为23.1%.在同样的发酵条件下,8个正突变株与出发菌 R87的产酸水平比较见表2.突变株 R87-91产酸量达8.18%,比出发菌 R87提高10%.

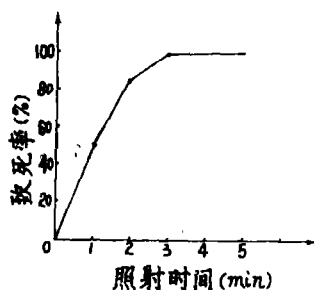


图1 紫外线照射时间和菌体细胞致死率的关系

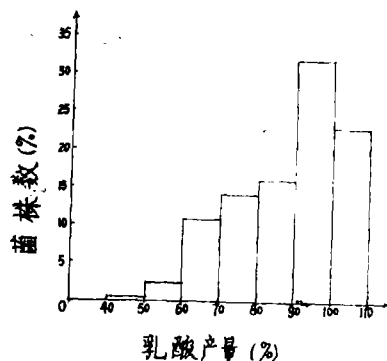


图2 复合诱变对产酸的影响

表2 诱变后8个正突变株的产酸水平

菌 号	R87	91	126	134	22	5	217	36	108
乳酸(g/100ml)	7.47	8.18	8.05	8.00	8.00	7.88	7.85	7.82	7.77

2.5 型态变异株都是负突变株

诱变后的形态突变株,菌丝短,菌落较小且致密,孢子呈墨绿色.而 R87的菌丝为白色,粗且长,菌落蓬松、孢子呈黑色.随机选取5株形态突变株进行摇瓶产酸测定,发现它们都是负突变株,而且几乎不产酸.形态突变型与产酸的关系,可以应用到菌种保藏及发酵生产,不断淘汰形态突变型,防止菌种退化.

2.6 产酸稳定性试验

从遗传学上分析,由于表型延迟,经诱变处理得的高产菌株还必须进行分离纯化、连续传代,以便得到性状稳定的优良菌株^[8].在11个月的时间里,对 R87-91连续移种7次,产酸水平是稳定的,见表3.

表3 连续传代对 R87-91产酸水平的影响

移交代数	R87-91	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7
相对产量(%)	100	97.2	93.3	94.7	103.6	90.9	98.5	102.3

2.7 R87-91菌株 L-乳酸的发酵过程

经正交法试验和综合考察不同碳源等因素对产酸的影响后,选择 R87-91的最佳发酵条件为温度30℃,葡萄糖作碳源,震荡培养.定时取样测定发酵液中乳酸、残糖的含量和 pH 值,结

果见图3. 根霉 R87-91在发酵36—48h内, 糖耗迅速, 乳酸大量积累. 在发酵过程中, 由于加入过量的碳酸钙作中和剂, 所以发酵液 pH 波动不大.

2.8 L-乳酸的鉴定

将 R87-91 发酵液经过滤、浓缩、结晶等提取工序获得乳酸钙白色结晶. 将此样品及 L-乳酸钙标准品在 983 红外光度计上测定其红外光谱. 样品的红外光谱与 L-乳酸钙标准品相符, 见图4. 图中曲线1为提纯发酵产物钙盐的红外光谱, 曲线2为 L-乳酸钙标准品的红外光谱. 可见根霉 R87-91 积累的发酵产物为 L-乳酸.

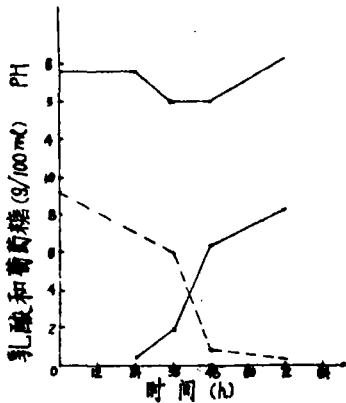


图3 R87-91 L-乳酸发酵过程

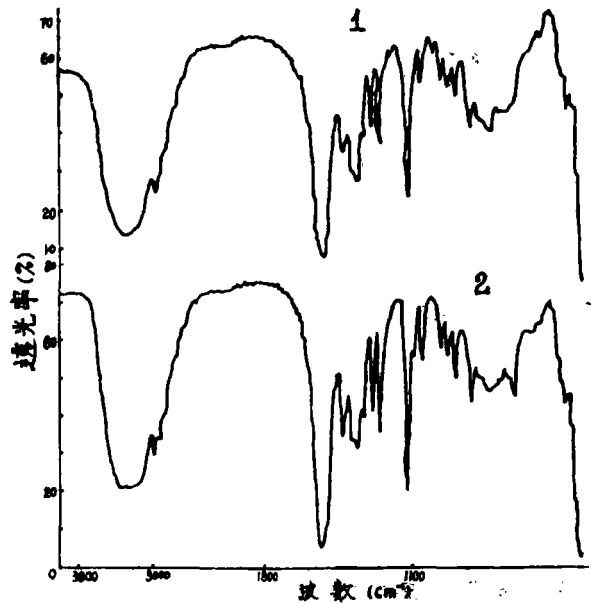


图4 乳酸钙红外光谱

由根霉 R87经紫外线及氯化锂复合诱变后获得的菌株 R87-91, 积累 L-乳酸, 不仅纯度高而且产酸水平及对糖转化率高, 是优良的 L-乳酸产生菌.

参 考 文 献

- [1] 陈陶声, 近代工业微生物学(上册), 上海科学技术出版社, (1979).
- [2] Hongo, M. et al., Applied and Environmental Microbiology, 52, (2)(1986), 314—319.
- [3] 陈义华, 微生物学通报, 3(1989), 148—150.
- [4] 木下祝郎(徐新民等译), 发酵工业, 轻工业出版社, (1985), 164—166.
- [5] Hang, Y. D. et al., Biotechnology Letters, 11, 2(1989), 119—120.
- [6] 北京大学, 生物化学实验指导, 人民教育出版社, (1979), 22—24.
- [7] 卫生部药典委员会, 中华人民共和国药典, 化学工业出版社等, (1985), 239—240.
- [8] 盛祖嘉, 微生物遗传学, 科学出版社, (1981), 109—117.

Mutation Breeding of L-Lactic Acid Producing Strain

Chen Bie Li Xu Li Wenqi

(Department of Chemical and Biochemical Engineering)

Abstract By applying ultraviolet light and lithium chloride to mutagenize *Rhizopus oryzae* R87, a mutant strain R87-91 with a higher and stable yield of L-lactic acid was selectively bred. After fermenting at 10% glucose medium for 72 hours, the mutant strain gave a l-lactic output of 8.18g/100ml, a yield 10% higher than that of the origin strain.

Key word: L-lactic acid, rhizopus, induction of mutation