

紫外诱变筛选 Nisin 高产菌株的研究

朱会霞^{1,2} 孙金旭^{1,2}

(1.衡水学院生命科学系,河北 衡水 053000;2.天津科技大学天津市工业微生物重点实验室,天津 300457)

摘要: 以 HS-5 乳酸链球菌为出发菌株,进行紫外线照射诱变,经初筛、复筛得到 2 株高产乳酸链球菌肽的稳定性菌株。其效价比原始菌株分别提高了 12.41 % 和 4.76 %,效价达到了 3116 IU/mL 和 2904 IU/mL。

关键词: 微生物; HS-5; Nisin; 紫外诱变

中图分类号:Q93-3 Q78 Q813 TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2008)11-0026-03

Research on the Screening of High-Nisin-yield Strains by UV mutation

ZHU Hui-xia^{1,2} and SUN Jin-xu^{1,2}

(1. Life Science Department of Hengshui College, Hengshui, Hebei 053000; 2. Tianjin Key Lab of Microbe of Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: 2 high-nisin-yield strains were screened with HS-5 lactic acid *streptococci* as starting strains by UV radiation. The titer of the two strains increased by 12.41 % (3116 IU/mL) and 4.76 % (2904 IU/mL) respectively compared with that of the starting strains. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; HS-5; Nisin; UV mutation

食品防腐剂是为了杀灭微生物或抑制微生物增殖、防止食品腐败变质而在生产过程中加入食品添加剂。我国食品行业中所使用的防腐剂品种较少,其主要是化学防腐剂。化学合成的添加剂从一定程度来说对人体产生或多或少的毒害作用,使其应用受到一定的局限,随着人们生活水平的提高,膳食结构已由量的要求向质的要求转变,使得世界公认的无毒、高效的生物防腐剂——乳酸链球菌素(Nisin)受到人们的重视^[1]。

Nisin 是乳酸链球菌产生的一种细菌素,能抑制大部分 G⁺ 菌及其芽孢的生长和繁殖,其本身易被人体消化道中的一些蛋白酶所降解,并且对食品的色、香、味等无不良影响^[2~4],因此它是一种天然的新型食品防腐剂,已被世界 50 多个国家和地区批准使用。此种生物防腐剂生产利用生物发酵法,发酵过程中存在效价低、产量低、生产成本高等问题,本实验室以 HS-5 乳酸链球菌为出发菌株,紫外诱变,经初筛、复筛,得到 2 株突变菌株,摇瓶发酵实验,突变菌株 nisin 效价提高明显。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Nisin 标准样品:sigma 产品。

1.2 菌种

基金项目 河北省科技厅资助项目,项目编号(07215547)。

收稿日期:2008-08-22

作者简介 朱会霞(1977-),女,河北景县人,博士研究生,讲师,主要从事微生物、发酵工程、食品等方面的研究。

乳酸链球菌 HS-5:本实验室筛选保藏。

1.3 主要培养基

CM1 培养基:蔗糖 10 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 10 g, KH₂PO₄ 10 g, NaCl 2 g, MgSO₄ 0.2 g, pH 6.8, 水 1000 mL。

检测培养基:蛋白胨 8 g, 酵母膏 5 g, 葡萄糖 5 g, NaCl 5g, Na₂HPO₄·12H₂O 2g, 吐温 80 10 mL、琼脂 7.5 g, pH 值 6.8, 水 1000 mL。

1.4 实验方法

1.4.1 液体种子培养条件

用接种环接一环菌种于 50 mL CM1 培养基中,于 150 r/min, 30 °C 培养 24 h。

1.4.2 Nisin 效价测定^[5~6]

取 1 g 发酵培养液加入到 9 mL 0.02 mol/L 盐酸稀溶液中,或用 0.02 mol/L 的稀盐酸将发酵液适当稀释(稀释到其抑菌圈直径在 5~100 IU/mL 的乳链菌肽标准液的抑菌圈直径之间),沸水浴加热 5 min 后, 5000 r/min 离心 10 min,取上清液,用琼脂扩散法测定其生物效价。

1.4.3 乳酸链球菌数测定

称取 0.5 g 样品置于 4.5 mL 无菌水中(无菌操作),用无菌水稀释 8~10 倍,涂布平板,30 °C 培养 24 h,数出菌落个数,换算成细胞生物干重。

1.4.4 紫外线诱变育种

紫外诱变实验法^[7]。

1.4.5 初筛方法

采用双层平板法:平板的下层倒入 15 mL 含有检测指示菌的乳链菌肽效价检测培养基,水平放置,待凝固后再倒入 5 mL 平板分离培养基,涂布一定稀释度的处理菌液后于 30 ℃ 培养 24 h,菌落周围出现透明的抑菌圈,挑取抑菌圈较大的菌落接入斜面,进行复筛。

1.4.6 突变菌株复筛方法

经初筛挑出的菌株,逐个接入发酵培养基,30 ℃ 静置培养 20~24 h 后测定发酵液的效价。经反复筛选,选出乳链菌肽效价较高的突变菌株。

1.4.7 摇瓶发酵条件

将菌株接入发酵培养基中,培养基 pH6.5,培养温度 30 ℃,接种量 2%,装液量 100 mL(500 mL 瓶)培养时间 48 h,发酵结束后测定效价。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变曲线及紫外诱变剂量的选择

以 HS-5 乳酸链球菌菌株为出发菌株,取 18 个无菌 9 cm 平皿,每个平皿分别装有新制备的 120 个/mL 的高产菌株菌悬液,用功率 20 W 紫外灯距离 30 cm 分别照射 0 s、20 s、40 s、60 s、80 s、100 s、120 s、140 s 和 160 s。然后每皿取 1 mL 适当稀释后涂布至初筛平板,用黑布包裹,避光情况下倒置在培养箱中培养,温度为 30 ℃,待平板上长出菌落后计数。每组以 2 个平皿菌落的平均值作为该组的落数,计算不同照射时间下的紫外杀菌曲线,结果见图 1。

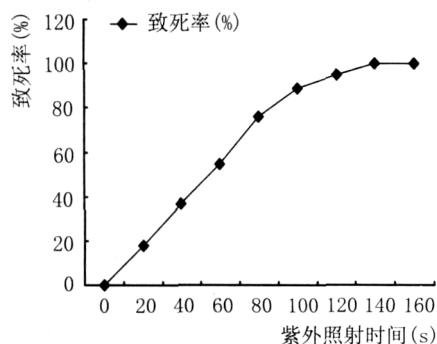


图 1 紫外照射时间对 HS-5 乳酸链球菌致死率的影响

从图 1 可看出,该菌对紫外线较为敏感,随着照射时间的延长,致死率急剧增加。140 s 照射时的致死率已为 100%,80 s 时致死率为 76%,试验选择 80 s 作为紫外诱变育种的最适剂量。

2.2 突变株的初筛

菌悬液经过紫外照射 80 s,同等倍数适当稀释后吸取 0.1 mL 依次涂布至初筛平板上,对初筛得到的 25 株

突变株进行抑菌圈实验,实验结果见表 1。

表 1 紫外诱变 80 s HS-5 乳酸链球菌突变菌株初筛结果

菌株编号	抑菌圈直径 (mm)	菌株编号	抑菌圈直径 (mm)
HS-5 原始菌株	25.7	13	24.8
1	25.2	14	28.1
2	24.6	15	29.3
3	25.4	16	26.6
4	27.0	17	28.9
5	28.5	18	27.6
6	29.1	19	25.1
7	24.7	20	26.3
8	25.3	21	27.2
9	23.3	22	22.6
10	21.9	23	28.4
11	22.8	24	26.3
12	23.6	25	27.2

由表 1 可以看出,经初筛后,5 号、6 号、14 号、15 号、17 号、23 号等 6 菌株产生的抑菌圈都很大,最大的为 29.3 mm。和原始菌株相比,抑菌圈直径增加 14.08%。

2.3 突变株复筛试验

挑取初筛实验中抑菌圈直径较高的 6 株菌(5 号、6 号、14 号、15 号、17 号、23 号)进行复筛实验,记录抑菌圈直径,结果见表 2。

表 2 HS-5 乳酸链球菌紫外诱变突变株复筛结果

菌号	初筛抑菌圈直径 (mm)	复筛抑菌圈直径 (mm)
5 号	28.52	27.73
6 号	29.10	29.16
14 号	28.10	28.12
15 号	29.27	29.32
17 号	28.89	28.92
23 号	28.38	28.12

由表 2 可知,经初筛后,复筛实验过程中,6 株突变菌株有 2 株复筛时,性能有所降低,其他 4 株菌性能较稳定,取性能较稳定的 4 株突变株进行稳定性实验,5 号和 23 号菌株被淘汰。

2.4 高产突变株性能稳定性实验

挑取复筛中抑菌圈直径较高的 4 株突变株(6 号、14 号、15 号、17 号)进行稳定性研究,分别连续传代 5 次后,记录抑菌圈直径,结果见表 3。

表 3 高产突变菌株性能稳定性实验

传代次数	4 株菌抑菌圈直径 (mm)			
	6 号	14 号	15 号	17 号
1	29.10	28.10	29.27	28.89
2	29.16	28.12	29.32	28.92
3	29.02	28.08	29.15	28.95
4	28.56	27.96	29.29	28.88
5	28.43	27.93	29.30	29.03

由表 3 可知,只有 15 号和 17 号菌株遗传性状较稳定,其他 2 株菌出现了负突变,因诱变育种时需同时考察突变株的传代稳定性,才能从中筛选出遗传性状稳定的高产菌株。所以 15 号和 17 号为所选高产突变株。

2.5 高产突变株摇瓶发酵试验

将 15 号和 17 号突变株进行摇瓶发酵实验,培养基 pH6.5,培养温度 30℃,接种量 2%,装液量 100 mL(500 mL 瓶)培养时间 48 h,发酵结束后测定效价,结果见图 2 和表 4。

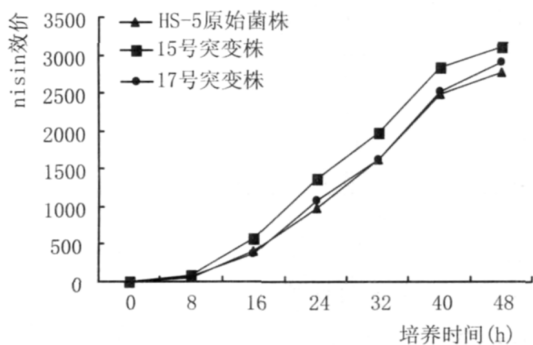


图 2 15 号、17 号突变株、原始菌株摇瓶发酵曲线

表 4 突变菌株、HS-5 原始菌株 nisin 效价对比表

项目	菌株		
	HS-5 原始菌株	15 号突变株	17 号突变株
Nisin 最高效价	2772	3116	2904
相对于原始菌株效价提高 (%)	0	12. 41	4. 76

由图 2 和表 4 可看出,发酵培养过程,15 号和 17 号突变菌株,HS-5 原始菌株随着发酵培养时间的延长,

nisin 产量不断增加,48 h 后,nisin 产量都达到最大,nisin 产量达到最大时,15 号突变株 nisin 效价为 3116,与 HS-5 原始菌株相比效价提高 12.41%,17 号突变株 nisin 效价为 2904,效价相对提高 4.76%,说明 15 号和 17 号突变菌株发酵性能优于 HS-5 原始菌株。

3 结论

以 HS-5 乳酸链球菌为出发菌株,进行紫外线照射诱变,经初筛、复筛到 2 株高产乳酸链球菌肽的稳定性菌株。其效价比原始菌株分别提高了 12.41%和 4.76%,效价达到了 3116 IU/mL 和 2904 IU/mL。

参考文献:

[1] 张百刚,张宝善.生物防腐剂在食品加工中的应用研究[J].食品研究与开发,2004,(6):127-129.

[2] Klaenhammer T R.Bacteriocins of lactic acid bacteria[J].Biochemic,1988,70:337-349.

[3] Liu W,J N Hansen.Some chemical and physical properties of nisin,a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*[J].Appl Environ Microbiol,1990,56:2551-2558.

[4] Linda J.Development in nisin research[J].Food research international,1992,25:57-66.

[5] 迟玉杰,等.管碟法测定乳链菌肽活性[J].中国乳品工业,1997,25(4):33-34.

[6] 吴琼.乳链菌肽效价测定方法的研究[J].食品科学,1999,(6):56-59.

[7] 刘慧.现代食品微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2006.123-125.

国酒茅台荣登 2007 年度白酒行业纳税榜首

本报讯 2008 年 10 月 11 日,国家税务总局发布了 2007 年度(第八届)中国纳税百强排行榜,国酒茅台以 372740 万元的纳税总额列排行榜第 62 位,位居中国白酒行业纳税榜首和贵州省纳税第一名。

2007 年,我国经济实现了平稳快速发展,国内生产总值(GDP)达到 246619 亿元,比上年增长 11.4%,全国税收收入实现 49449 亿元,同比增长 31.39%。

作为全国白酒行业的重要企业和贵州省经济发展的骨干力量,国酒茅台长期以来秉承对社会的承诺“至诚至信”,诚实经营、依法纳税,在市场经济的浪潮中,积极对企业未来发展进行战略思考与研究,努力在发展中形成新思路,在改革中寻求新突破,在各项工作中体现新举措,促进了国酒茅台核心竞争力的不断提升和效益的明显增长,1998 年以来,企业实现了连续 10 年的跨越式发展。仅 2004 年~2007 年,茅台集团共实现销售收入(含税) 244.28 亿元,利税共计 163.17 亿元,企业总资产由 68 亿多元增加至 143 亿多元,职工人均年收入也由 2.85 万元增至 4 万元。现在,公司利税率、人均创利税、人均利润率、总市值等主要经济指标稳居同行业榜首,贵州茅台股票成为沪深股市第一高价股,企业步入了可持续发展的快车道。

2007 年度中国纳税百强排行榜共推出八个榜单,分别是:中国企业集团纳税五百强排行榜、中国独立企业属地纳税五百强排行榜(总排名)、中国代扣代缴个人所得税企业百强排行榜等。国酒茅台除在中国企业集团纳税五百强排行榜榜上有名外,还上榜中国企业所得税纳税百强排行榜第 39 名、中国独立企业四十行业饮料制造业纳税百强排行榜第一名、中国企业集团十六行业纳税十强排行榜第一名。其中,在饮料制造业纳税前十强中,茅台纳税占应纳税额 1495873 万元的 24.92%,比第二名高出近 3 个百分点。(彭云 吴永丽)