

类细菌素高产菌 YCF10 的诱变选育及发酵条件的研究

常 峰,朱何东,梁 波,罗俊成,胡 承,王忠彦*

(四川大学生命科学学院,四川 成都 610064)

摘 要: 以布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)CF 10 为出发菌株,经紫外线照射(UV)和硫酸二乙酯(DES)多轮复合诱变,获得一株高产类细菌素的目的菌 YCF 10,发酵液相对效价较未诱变前提高了 136 %,且具有良好的传代稳定性。通过对该菌株产类细菌素发酵条件的研究发现,以 2 % 麦芽糖为碳源、1 %大豆蛋白胨加 0.5 %酵母粉为氮源,加微量 K^+ , Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 等金属离子,培养温度 37 ℃,初始 pH6.0~6.5,接种量 1 %,厌氧条件下,培养时间 48 h,YCF 10 所产类细菌素的抑菌活性最高。

关键词: 布氏乳杆菌; 类细菌素; 诱变; 发酵条件

中图分类号 Q93 ;TS261.1 文献标识码 A

文章编号 :1001-9286(2005)07-0026-03

Research on Mutation and Screening and Fermentation Conditions of YCF 10 Strain for High Productivity of Bacteriocin-like Substance

CHANG Feng, ZHU He-dong and LIANG Bo et al.

(Life Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: *Lactobacillus buchneri* CF 10 was used as start strain to screen a strain YCF 10 with high productivity of bacteriocin-like substance by UV radiation and multiple times compounding mutation of diethyl sulphate (DES).The relative titer of fermenting liquid increased by 136 % after mutation and the liquid possessed good passage stability.And the following fermentation conditions were the best for YCF to produce bacteriocin-like substance of the highest activity:2 % maltose as carbon source,1 % soybean peptone and 0.5 % yeast powder as nitrogen source, addition of minute quantities of metal irons such as K^+ , Mg^{2+} and Mn^{2+} ,culture temperature at 37 ℃ ,initial pH value as 6.0 ~6.5,1 % inoculation quantity,and 48 h culture time under anaerobic conditions. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *lactobacillus buchneri* ;bacteriocin-like substance ;mutation ;fermentation conditions

乳酸菌(Lactic acid bacteria LAB)是一类可发酵糖并产生大量乳酸的细菌统称。长期以来,乳酸菌广泛应用于乳制品、蔬菜及肉制品的发酵和防腐中^[1]。许多乳酸菌代谢除了产生乳酸、乙酸等有机酸和过氧化氢外,还能产生多种具有抑菌或杀菌生物活性的细菌素(bacteriocin),在抑制多种病原微生物和食物腐败菌等方面具有重要意义^[2]。细菌素是细菌在代谢过程中由核糖体合成的具有抑菌活性的蛋白质或多肽类物质,其抑菌谱较窄,只对有近缘关系的乳酸菌和非乳酸菌的革兰氏阳性菌有抑制作用,而对革兰氏阴性菌和真菌则无效^[3]。类细菌素是用来描述那些不符合或不完全符合细菌素定义的拮抗物质^[4],它不仅能抑制革兰氏阳性菌,而且对革兰氏阴性菌和真菌也有抑制作用^[5]。这一特性决定了

类细菌素具有比细菌素更广泛的应用前景。目前关于乳酸菌产生细菌素的研究已深入到分子水平,而对乳酸菌类细菌素的研究相对较少。关于类细菌素国外已有研究^[6-7],而在国内相关报道却很少。

笔者自酿酒副产物黄水^[8]中分离得一株产类细菌素的布氏乳杆菌 CF 10,经 UV 和 DES 多轮复合诱变选育出一株高产类细菌素且具有良好的传代稳定性的突变菌株 YCF 10,并对其发酵条件进行了相关的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原始菌株

布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)CF 10,由笔者

收稿日期 2005-01-26

作者简介:常峰,男,硕士研究生,从事工业微生物方向的研究。

* 王忠彦为通讯作者。

自黄水中分离并鉴定。

1.1.2 供试菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 本实验室保藏。

1.1.3 培养基

筛选培养基(g/L) :MRS 培养基^[9]。

供试菌培养基(g/L) :蛋白胨 10.0, 酵母膏 6.0, 葡萄糖 1.0, 牛肉膏 1.5, 琼脂 20.0, pH7.2~7.5。

发酵培养基(g/L) :MRS 液体培养基。抑菌活性检测用培养基, 采用双层平板。下层为 2.0 %水琼脂, 上层为 10 mL 供试菌培养基中加入 1.0 %供试菌悬液 (供试菌斜面于 30 ℃培养 24 h, 用 10 mL 生理盐水刮洗斜面, 制成菌悬液)。

1.2 方法

1.2.1 紫外线(UV)诱变处理

用 10 mL 无菌水洗脱新鲜的出发菌斜面, 梯度稀释制成每毫升 10^2 个细胞的菌悬液, 在紫外灯下进行诱变^[10]。紫外灯功率为 30 W, 照射距离 30 cm, 照射时间分为 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 240 s 和 300 s。移取照射后的菌悬液 0.1~0.2 mL 涂布于烘干的筛选培养基平板, 30 ℃避光培养 48 h。

1.2.2 硫酸二乙酯(DES)诱变处理

以经上述 UV 诱变后抑菌圈直径增加最显著且稳定的突变株为出发菌, 用 10 mL 无菌水洗脱其新鲜斜面, 将菌液离心, 弃去上清液, 以无菌水洗涤两次, 加入 10 mL 0.1 M pH7.0 的磷酸缓冲液制成菌悬液。取 4 mL 加入到 16 mL 生理盐水中, 加入 DES 0.2 mL, 振荡处理 60 min。加入 0.5 mL 25 %硫代硫酸钠溶液中中止反应后稀释涂皿^[11], 30 ℃避光培养 48 h。

1.2.3 多轮复合诱变处理

以经上述 DES 诱变后抑菌圈直径增加最显著且稳定的突变株为出发菌, 进行 UV 加 DES 复合诱变处理, 具体方法见 1.2.1 和 1.2.2。

1.2.4 类细菌素效价定义

由于该抗生物质尚在研究阶段, 没有标准品做参照, 故以硫酸庆大霉素作为对照, 制作硫酸庆大霉素的标准曲线, 以对大肠杆菌具有相同抑菌效果的硫酸庆大霉素标准品的效价来定义类细菌素效价^[12]。

2 结果与分析

2.1 突变株的选育

经 UV 和 DES 多轮复合诱变, 采用杯碟法检测所产类细菌素对大肠杆菌的抑菌活性, 筛选到一株高产类细菌素的突变菌株 YCF 10, 其抑菌活性较之未诱变前提高了 136 %, 且具有良好的传代稳定性。

2.2 高产类细菌素菌株 YCF 10 发酵条件的优化

2.2.1 碳源对 YCF 10 产类细菌素的影响

以发酵培养基为基础, 用 2 %不同的碳源代替葡萄糖, 接入 1 % YCF 10 菌液, 30 ℃静置培养 48 h, 取发酵

上清液测效价, 结果见表 1。由表 1 可知, 以麦芽糖为碳源产类细菌素效价最高。

表 1 碳源及氮源对 YCF10 产类细菌素的影响

碳 源	相对效价 (%)	氮 源	相对效价 (%)
麦芽糖	100	大豆蛋白胨/酵母粉	100
葡萄糖	98	大豆蛋白胨	87
乳糖	74	酵母粉	96
半乳糖	82	尿素	0
蔗糖	95	豆饼粉	0
玉米粉	0	硫酸铵	0
淀粉	0	氯化铵	0
牛肉膏	0	硝酸钠	0
空白对照	0	空白对照	0

2.2.2 氮源对 YCF 10 产类细菌素的影响

以发酵培养基为基础, 以 2 %麦芽糖为碳源, 加入 1.5 %不同氮源, 接入 1 % YCF 10 菌液, 30 ℃静置培养 48 h, 取发酵上清液测效价, 结果见表 1。由表 1 可知, 以 1 %大豆蛋白胨加 0.5 %酵母粉为氮源产类细菌素的效价最高。

2.2.3 初始 pH 值对 YCF 10 产类细菌素的影响

以 2 %麦芽糖为碳源, 以 1 %大豆蛋白胨加 0.5 %酵母粉为氮源, 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 分别调至 pH3.0~7.0, 接入 1 % YCF 10 菌液, 30 ℃静置培养 48 h, 取发酵上清液测效价, 结果见图 1。由图 1 可知, 发酵液初始 pH 值在 pH6.0 时抑菌活性最高。

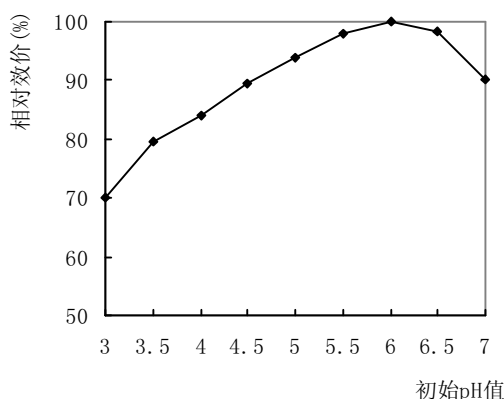


图 1 初始 pH 值对 YCF 10 产类细菌素的影响

2.2.4 培养温度对 YCF 10 产类细菌素的影响

以 2 %麦芽糖为碳源, 以 1 %大豆蛋白胨加 0.5 %酵母粉为氮源, 调 pH6.0, 接入 1 % YCF 10 菌液, 于不同温度下静置培养 48 h, 取发酵上清液测效价, 结果见图 2。由图 2 可知, 37 ℃为 YCF 10 产类细菌素的最适培养温度。

2.2.5 培养时间对 YCF 10 产类细菌素的影响

以 2 %麦芽糖为碳源, 以 1 %大豆蛋白胨加 0.5 %酵母粉为氮源, 调 pH6.0, 接入 1 % YCF 10 菌液, 37 ℃静置培养不同时间, 取发酵上清液测效价, 结果见图 3。由图 3 可知, 菌体在培养 48 h 时产生的类细菌素效价最高。

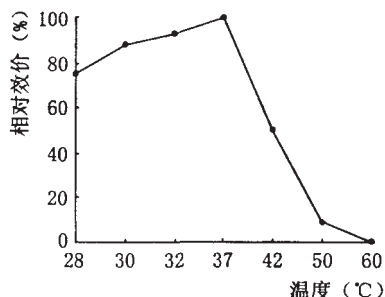


图2 温度对 YCF 10 产类细菌素的影响

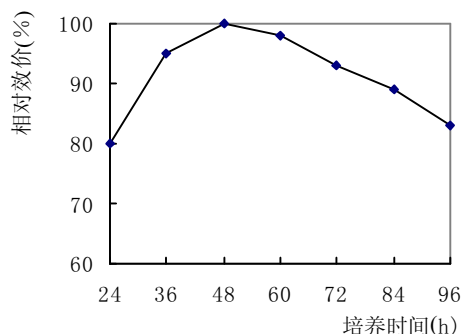


图3 培养时间对 YCF 10 产类细菌素的影响

2.2.6 接种量对 YCF10 产类细菌素的影响

以 2 % 麦芽糖为碳源, 以 1 % 大豆蛋白胨加 0.5 % 酵母粉为氮源, 调 pH6.0, 以不同的接种量接种, 37 °C 静置培养 48 h, 取发酵上清液测效价, 结果见图 4。由图 4 可知, YCF 10 产类细菌素的最佳接种量为 1 %。

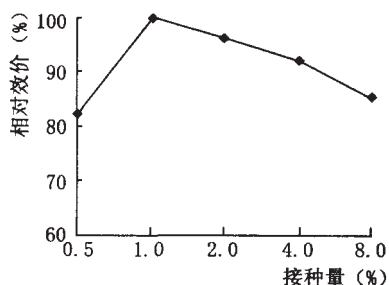


图4 接种量对 YCF 10 产类细菌素的影响

2.2.7 需氧量对 YCF10 产类细菌素的影响

以 2 % 麦芽糖为碳源, 以 1 % 大豆蛋白胨加 0.5 % 酵母粉为氮源, 调 pH6.0, 在 100 mL 三角瓶中装入不同量的培养基, 接入 1 % YCF 10 菌液, 37 °C 静置培养 48 h, 取发酵上清液测效价, 结果见图 5。由图 5 可知, 厌氧程度越高, 越有利于 YCF 10 产类细菌素。

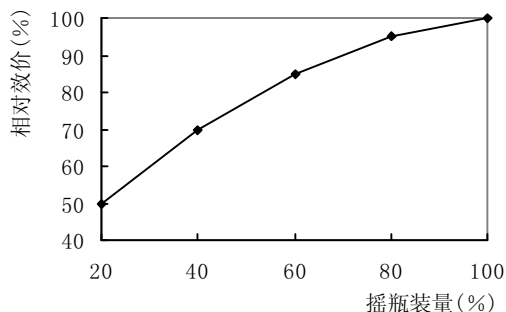


图5 需氧量对 YCF 10 产类细菌素的影响

2.2.8 金属离子对 YCF 10 产类细菌素的影响

考察 K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} 及 Ca^{2+} 等金属离子对 YCF10 产类细菌素的影响, 发现微量 K^+ , Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 的存在对类细菌素的抑菌活性有促进作用, Fe^{2+} , Cu^{2+} 和 Ca^{2+} 对类细菌素有抑制作用, 而 Na^+ 对其影响不大。

3 讨论

在类细菌素高产菌株选育过程中, 经典的诱变育种方法尽管存在很大的盲目性、随机性, 但仍是目前常用的行之有效的育种手段。但要从大量的突变菌株中筛选出正变菌株和高产菌株, 如没有有效的筛选手段, 工作量相当巨大^[13]。

笔者采用抑制大肠杆菌作为选择模板, 通过 UV 诱变→筛选培养基平板分离→杯碟法筛选→新一轮出发菌株→DES 诱变→杯碟法筛选的多轮复合诱变程序, 在较短的时间内获得了发酵液相对效价提高了 136 % 的高产菌株, 且具有良好的传代稳定性。通过对其发酵条件的研究, 最终得到了 YCF 10 产类细菌素的最适发酵条件: 以 2 % 麦芽糖为碳源, 1 % 大豆蛋白胨和 0.5 % 酵母粉为氮源, 培养基初始 pH6.0, 接种量 1 %, 厌氧条件下 37 °C 静置培养 48 h, 发酵产物的抑菌活性可达 207 u/mL。

参考文献:

- [1] Perlak F J, Dwaton R W, Armstrong TA. Insect resistant cotton plants[J]. Biotechnology, 1990, (8): 939-943.
- [2] Li X B, Mao H Z, Bai Y Y. Transgenic plants of rutabaga tolerant to pest insects[J]. Plant Cell Rep, 1995, (15) 97-101.
- [3] 徐进, 冉陆, 罗雪云. 乳酸菌细菌素的生物合成与应用[J]. 卫生研究, 2002, (3) 211-213.
- [4] Virginia S O, Aida A P, Maria E N-Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal lactobacillus salivarius strain[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, (65): 5631-5635.
- [5] Megoarty J. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1993, (6): 251-264.
- [6] Laukova A, Marekova M, Javorsky P. Lett in Appl Microbiolc [J]. 1993, (16) 257-259.
- [7] Whitford M F, Mepherson M A, Forster M F et al. Appl Environ Microbiol [J]. 2001, (67) 569-574.
- [8] 罗惠波, 张宿义, 卢中明. 浓香型白酒黄水的应用探索[J]. 酿酒, 2004, 31(2) 71-72.
- [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. 85-86.
- [10] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 106-109.
- [11] 《微生物诱变育种》编写组. 微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1973. 43-45.
- [12] 田宇, 洪芳, 王忠彦等. 类细菌素产生菌 HF08 的选育及其发酵条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 56-60.
- [13] 李淑彬, 王军, 钟英长. 多轮复合诱变选育抗真菌抗生素高产菌株及其发酵条件研究[J]. 广西科学, 2003, 10(2): 135-138.