

文章编号:1001-5132(2008)02-0174-04

高产共轭亚油酸植物乳杆菌的诱变选育

王 璟, 吴祖芳, 翁佩芳

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用人工诱变方法选育高产共轭亚油酸生产菌株, 以实验室保藏的植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* A(简称为 *L.plan* A) 为出发菌株, 经紫外线, 硫酸二乙酯的依次处理, 结合高浓度亚油酸平板(0.1%)的筛选和进一步摇瓶复筛, 最终得到一株共轭亚油酸高产菌株 *Lactobacillus plantarum* H3-1(简称为 *L.plan* H3-1), 其共轭亚油酸产量高达 $30.67 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 比出发菌株 *L.plan* A 提高了 264.5%。传代实验中突变株 *L.plan* H3-1 的遗传特性较稳定。实验结果证明该诱变方法对提高植物乳杆菌 *L.plan* A 的共轭亚油酸产量效果比较显著。

关键词: 共轭亚油酸; 诱变; 筛选

中图分类号: Q933

文献标识码: A

共轭亚油酸(Conjugated Linoleic Acid, 简称为 CLA)是一种具有抗癌、抗动脉硬化、抗糖尿病, 降低体脂等多种生理活性的脂肪酸。目前, CLA 主要是通过化学法和生物转化法合成。化学法中的碱法异构化, 其活性成分 c9, t11-18:2 在 CLA 异构体中所占质量分数低于 40%^[1]。Lin 等^[2]报道了几株乳酸菌具有转化亚油酸(Linoleic Acid, 简称为 LA)成为 CLA 的能力, 且活性成分占了 CLA 异构体中的大部分, 说明生物转化法与化学法相比具有选择性合成生物活性 CLA 的优点。因此, 若能筛选到一株 CLA 转化能力较高的乳酸菌, 必将会有较大的生产应用前景。

LA 是作为微生物转化生成 CLA 的底物, 但经研究发现 LA 的存在对 G^+ 细菌的生长有抑制作用, 限制了 CLA 产量的提高。本文利用紫外线和硫酸二乙酯依次作为诱变因子, 结合高浓度 LA 平板筛

选方法, 以期得到一株转化能力强、遗传稳定性好、能够耐受高浓度 LA 的 CLA 生产菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

原始菌株为植物乳杆菌, 命名为 *L.plan* A, 从一种直投式酸奶发酵剂中分离得到, 在生命学院食品生物技术实验室保存。种子培养基、斜面 and 计数培养基: MRS 液体或固体培养基^[3]; 发酵培养基: 含 0.1% LA 的 MRS 液体培养基; 平板筛选培养基: 含 0.1% LA 的 MRS 固体培养基。

1.2 主要试剂

LA 乳化液(10%)配制方法见文献[4]; 硫酸二乙酯(DES); 磷酸缓冲液配制方法见文献[5]; 诱变终止液: 浓度为 2% 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 溶液; 甲酯化试剂:

三氯化硼-甲醇溶液.

1.3 操作流程

原始菌株活化→菌悬液制备→紫外线诱变处理→初筛→复筛→挑出产量最高的菌株→DES化学诱变→用同样方法筛选→菌种保藏.

1.4 诱变及筛选方法

诱变具体方法见文献[4]. 紫外诱变时间为15 s, 30 s, 45 s, 60 s. DES诱变浓度为1%, 2%, 3%, 4%, 37 处理5 min后终止诱变. 取不同剂量处理的菌液, 用平板菌落计数法测定细胞致死率.

初筛: 高浓度LA平板(0.1%)结合摇瓶筛选(1株1瓶). 发酵液用正己烷萃取, 233 nm处测定其紫外吸收值^[6]. 复筛: 发酵液用氯仿/甲醇萃取, 气相色谱检测, 1株3瓶.

1.5 培养条件

活化筛选得到的菌株, 接种到发酵培养基(接种量为2%), 同时加入0.1%的LA, 在37 , 120 r·min⁻¹摇瓶发酵24 h.

1.6 CLA提取和分析

CLA提取方法: 发酵液用氯仿/甲醇(v/v:2/1)萃取, 无水硫酸钠干燥, 30 减压浓缩, 对浓缩后的提取物进行快速甲酯化^[7], 1 mL正己烷定容后气相色谱备检.

气相色谱检测条件: 岛津GC-2010; 毛细管柱SPB-5(30 m×0.25 mm); FID氢火焰离子化检测器; 气化室温度: 220 ; 柱温: 200 ; 检测器温度: 230 ; 载气为He, 流速3.0 mL·min⁻¹, 燃气为H₂, 流速40 mL·min⁻¹, 进样量1 μL, 分流比为100:1.

2 结果与分析

2.1 诱变剂量的筛选

不同剂量紫外线、DES处理与菌体致死率的关系见图1和图2.

由图1和图2可见, 在0~45 s范围内, 菌体致死率随着紫外线照射时间增加而迅速升高. 而

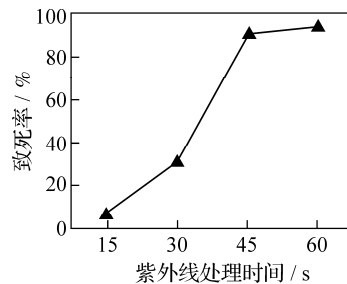


图1 紫外线照射时间与致死率关系

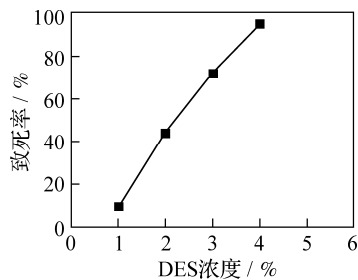


图2 DES浓度与致死率关系

在化学诱变中, 随着DES浓度的增大, 菌体致死率同样迅速升高. 有资料表明, 用小剂量进行诱变处理时, 致死率在50%~80%之间, 单位存活细胞中正突变株数量较多^[8]. 因此, *L.plan A*最适合采用的诱变剂量为: 紫外诱变时间40 s(致死率约70%), DES诱变浓度3%(致死率约60%).

2.2 诱变结果

经过不同诱变处理获得的所有正突变菌株由表1列出. 紫外线诱变筛选的20株菌株中, 正突变菌株为6株, 正突变率为30%. 在DES诱变筛选的15株菌株中, 正突变菌株为4株, 正突变率为26.67%. 这表明实验选定的诱变剂量获得了较高的正突变率, 有利于筛选工作.

表1 不同诱变处理条件下所得正突变菌株

诱变方法	出发菌株	诱变剂量	筛选所得正突变菌株
紫外线 UV	<i>L.plan A</i>	40 s	<i>L.plan</i> 40-9
			<i>L.plan</i> 40-11
			<i>L.plan</i> 40-12
			<i>L.plan</i> 40-13
			<i>L.plan</i> 40-16
			<i>L.plan</i> 40-19
DES	<i>L.plan</i> 40-16	3%(v/v)	<i>L.plan</i> 3-1
			<i>L.plan</i> 3-6
			<i>L.plan</i> 3-7
			<i>L.plan</i> 3-8

表2 紫外线诱变正突变菌株的转化性能比较

菌种编号	发酵液中CLA/(mg·L ⁻¹)	LA消耗率/% ⁽¹⁾	CLA产率/% ⁽²⁾	CLA产量的提高幅度/% ⁽³⁾
<i>L.plan</i> A(出发)	8.41	29.82	4.00	-
<i>L.plan</i> 40-9	9.10	26.46	4.32	8.20
<i>L.plan</i> 40-11	9.11	26.80	4.33	8.32
<i>L.plan</i> 40-12	9.31	26.65	4.42	10.70
<i>L.plan</i> 40-13	9.05	26.34	4.30	7.61
<i>L.plan</i> 40-16	14.16	35.42	6.73	68.37
<i>L.plan</i> 40-19	10.50	22.14	4.98	24.85

注:(1)LA消耗率=(发酵前加入的LA总量-发酵结束发酵液中LA含量)/发酵前加入的LA总量;(2)CLA产率=发酵结束后发酵液中CLA含量/发酵前加入的LA总量;(3)产量提高幅度=(突变株的CLA产量-出发菌株的CLA产量)/出发菌株的CLA产量。

表3 DES化学诱变正突变菌株的转化性能比较

菌种编号	发酵液中CLA/(mg·L ⁻¹)	LA消耗率/% ⁽¹⁾	CLA产率/% ⁽²⁾	CLA产量的提高幅度/% ⁽³⁾
<i>L.plan</i> 40-16(出发)	14.16	35.42	6.73	-
<i>L.plan</i> 3-1	30.67	76.05	14.58	116.60
<i>L.plan</i> 3-6	26.04	73.35	12.38	83.90
<i>L.plan</i> 3-7	24.66	68.57	11.72	74.15
<i>L.plan</i> 3-8	26.10	70.46	12.40	84.32

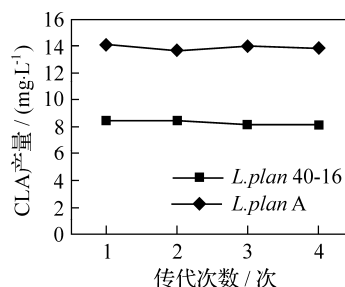
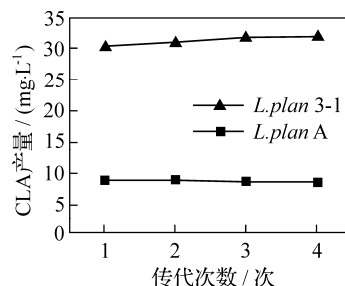
注:(1)、(2)、(3)含义同表2。

紫外线诱变和DES化学诱变筛选得到的所有正突变菌株各自的产量见表2和表3。

原始菌株*L.plan* A经紫外线诱变筛选得到的所有正突变菌株中,*L.plan* 40-16的CLA产量最高,达到了14.16 mg·L⁻¹,比原始菌株提高了68.4%。又以*L.plan* 40-16为出发菌株,进行DES化学诱变,从表3可以看出,化学诱变得到的正突变菌株中,*L.plan* 3-1的CLA产量最高,达到30.67 mg·L⁻¹,比*L.plan* 40-16提高了116.6%,比原始菌株*L.plan* A提高了264.5%。另外,由表2和表3中不同突变株的LA消耗率和CLA产率2组数据的关系中可以看出,两者并不存在明显的相关性,推测其原因,消耗掉的LA只是部分转化成为CLA,其余的参与到了另外的代谢途径中,而对于不同突变株,这两者之间的分配关系相异。

2.3 突变株的遗传稳定性

L.plan 40-16、*L.plan* 3-1菌株,用4保存菌株斜面,在摇瓶发酵条件下,传代了4次,每次发酵CLA的产量结果见图3和图4。突变株*L.plan* 40-16和*L.plan* 3-1的产量性状在传代过程中基本保持稳定,甚至还有一定的提高。

图3 传代次数对*L.plan* 40-16产量稳定性影响图4 传代次数对*L.plan* 3-1产量稳定性影响

3 小结

对于高产CLA微生物的选育方法,国内文献报道较多的是用物理和化学诱变的方法。周艳等人^[9]用紫外线和亚硝基胍单独处理、复合处理嗜酸乳杆菌

菌PB1,经发酵条件优化,获得的U-N-f34可生产CLA达 $42.05\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本文将出发菌株*L.plan A*通过紫外线诱变→筛选→DES化学诱变→筛选一系列过程,最终获得的突变株*L.plan 3-1*,虽然其CLA绝对产量比同类文献报道的产量低,但相对于出发菌株*L.plan A*,它的产量提高幅度较大,提高了264.5%,而且产量性状遗传稳定性较好。如按此方法继续诱变,CLA产量将逐步提高。

通过研究不同浓度LA对植物乳杆菌*L.plan A*生长情况的影响可知,当MRS平板中的LA浓度为0.1%时,有93%的菌株生长受到抑制。此事实证明了高浓度的LA对植物乳杆菌*L.plan A*有抑制作用。因此,我们选用了含高浓度LA(0.1%)的MRS平板作为筛选平板,筛选出了能够耐受高浓度LA的高产CLA突变株。

高产CLA突变株的初筛工作,由于缺乏准确性高、效果明显易见的平板筛选方法,而必须依靠发酵后产量检测,使得筛选CLA高产菌株的工作量大而繁琐。今后应研究出一种简易的初筛方法

来提高筛选效率。

参考文献:

- [1] 周凌华,张灏,陈卫,等.生物合成共轭亚油酸菌种的筛选与鉴定[J].无锡轻工大学学报,2004,23(5):53-57.
- [2] Lin T Y, Lin C W, Lee C H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by latic cultures and added linoleic acid[J]. Food Chemistry, 1999, 67:1-5.
- [3] 张帆,王建华,刘立恒,等.嗜酸乳杆菌的培养条件及其生物学特性[J].食品与发酵工业,2005,3(3):43-45.
- [4] 张中义.植物乳杆菌转化亚油酸生成共轭亚油酸的研究[D].北京:中国农业大学,2004.
- [5] 李如亮.生物化学实验[M].武汉:武汉大学出版社,1998.
- [6] 柴秋儿,张中义,刘萍,等.植物乳杆菌转化生成CLA的研究[J].食品科技,2005,4:9-12.
- [7] 余珠花.气相色谱法中油脂脂肪酸衍生化方法及选择[J].粮食加工,2004,6:64-66.
- [8] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学[M].2版.北京:科学出版社,2003.
- [9] 周艳,张兰威.共轭亚油酸高产菌株选育及其发酵条件的研究[J].食品与发酵工业,2004,30(6):28-31.

Mutation Breeding of Conjugated Linoleic Acid Producing Strain with *Lactobacillus plantarum*

WANG Jing, WU Zu-fang, WENG Pei-fang

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A mutant of high yield of conjugated linoleic acid (CLA) was obtained by inducing mutation methods. A parent strain of *Lactobacillus plantarum A(L.plan A)* was treated by UV and chemical mutagen ethyl sulfate in an alternate fashion, and combined with the method of high concentration(0.1%) substrate of linoleic acid screening. A strain named *Lactobacillus plantarum H3-1(L.plan 3-1)*, overproducing conjugated linoleic acid, was obtained by shaking flask fermentation. The yield of CLA reached $30.67\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ with the mutant, which was 264.5% higher than parent strain. Pass-generation test indicate that the hereditary properties of the mutant are stable. Experimental results demonstrate that the abundant production of CLA of the mutant can be realized by applying such proposed mutation methods.

Key words: conjugated linoleic acid; induced mutation; screening

CLC number: Q933

Document code: A

(责任编辑 史小丽)