

# 一株高产胞外多糖米酒乳杆菌的诱变筛选

白丽娟<sup>1</sup>, 季中梅<sup>1</sup>, 李向东<sup>2</sup>

(1. 辽宁医学院食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121001;

2. 光明乳业股份有限公司乳业研究院, 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436)

**摘要:**通过对一株高产胞外多糖的米酒乳杆菌 BXR-5-3 在不同紫外线照射距离和时间、不同浓度亚硝基胍以及紫外线、亚硝基胍复合诱变等条件下分别诱变筛选和多糖含量测定, 获得的胞外多糖产量最高诱变菌株的条件为紫外线照射距离为 20cm, 亚硝基胍的浓度为 300 $\mu$ g/mL, 处理时间为 20min, 其多糖的产量为 339.0mg/L。

**关键词:**胞外多糖, 米酒乳杆菌, 诱变, 筛选

## Mutagenesis-screening of a high-yield exopolysaccharide of *Lactobacillus. Sake*

BAI Li-juan<sup>1</sup>, JI Zhong-mei<sup>1</sup>, LI Xiang-dong<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China;

2. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center, Bright Dairy & Food Co., Ltd, Shanghai 200436, China)

**Abstract:** It was studied that a strain of *Lactobacillus. Sake* BXR-5-3 which had high-yield of exopolysaccharides was mutagenized in different distance and time of ultraviolet ray, different concentration of nitrosoguanidine and composite mutagenesis by ultraviolet ray - nitrosoguanidine. It was showed that the best conditions for the composite mutagenesis was the distance of ultraviolet ray for 20cm, the time for 10min and the concentration of nitrosoguanidine for 300 $\mu$ g/mL, the yield of exopolysaccharides was 339.0mg/L.

**Key words:** exopolysaccharides; *Lactobacillus. Sake*; mutagenesis; screening

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)23-0195-03

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)产生的胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)是指由乳酸菌在生长过程中产生并分泌于胞外、常渗入培养基中的一种糖类化合物<sup>[1]</sup>。自20世纪40年代人们利用肠膜状明串珠菌成功开发出右旋糖苷(dextran)以来,乳酸菌EPS的研究与应用引起了更多学者的兴趣。近些年来,其独特的物理学和流变学特性以及公认的食用安全性,使其在食品和非食品工业倍受青睐。乳酸菌胞外多糖是天然的生物增稠剂,它可以替代其它目前正在应用的、来源于非食品级细菌的稳定剂或增稠剂,在发酵乳品、保健食品加工中具有重要的用途,因而在食品工业中具有广阔的市场前景<sup>[2]</sup>。然而,乳酸菌胞外多糖的产量一般来说都比较低(50~425mg/L),因此其应用也受到一定的限制。提高胞外多糖产量的研究,目前备受关注<sup>[3-4]</sup>。朱奇等选用1株酸乳生产菌——嗜热乳链球菌为出发菌株,采用紫外线和硫酸二乙酯进行复合诱变,得到EPS产量高达965mg/L的突变株,且具有良好的遗传稳定性<sup>[5]</sup>。本文通过对高产胞外多糖的米酒乳杆

菌进行诱变筛选,试图获得诱变的优良菌株,提高胞外多糖的产量,为以后工业生产使用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

米酒乳杆菌 BXR-5-3、保加利亚乳杆菌 JCM1002、嗜热链球菌 IFO13597 由辽宁医学院实验室提供;MRS 液体和固体培养基、脱脂乳培养基、TPY 液体培养基 按文献[6-7]配制;葱酮 上海化成生物有限公司;无水葡萄糖、硫酸、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、柠檬酸二铵、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O、醋酸钠 均为分析纯,济南全旺化工有限公司。

ZKSJ-1000 型超净工作台 深圳市中科圣杰净化设备有限公司;DHP-9082 型恒温培养箱 上海垒固仪器有限公司;722 分光光度计 上海分析仪器厂;LGJ-10D 型真空冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司;HH-1 型电子恒温水浴锅 上海医疗器械五厂;KX-99 型干燥箱 重庆实验设备厂一分厂;XL-90 型低温超速离心机 美国 Beckman。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种的制备 将实验室保存的菌株,接种到经灭菌的 11.5% 脱脂乳培养基中,37℃ 培养至凝乳,接种凝乳 2% 于 MRS 等合成培养基中,37℃ 培养 24~26h,4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 葡萄糖标准曲线的制备 取 0.1g/L 的葡萄糖

收稿日期:2012-05-22

作者简介:白丽娟(1979-),女,讲师,博士在读,研究方向:食品微生物研究与应用。

基金项目:辽宁医学院青年科技启动基金项目(Y2011Z019)。

溶液 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80mL,用蒸馏水补足至 1.00mL,分别加入 4.00mL 萘酚试剂,迅速浸于冰水中冷却,各管加完后一起浸于沸水浴中,管口加盖玻璃球,以防蒸发。自水浴重新煮沸起,准确煮沸 10min 取出,用自来水冷却,室温放置 10min 左右,于 620nm 比色,以同样处理重蒸水为空白,进行比色。以葡萄糖每毫升含微克数为横坐标,纵坐标为光密度值,绘制葡萄糖标准曲线,建立回归方程,求胞外多糖含量。

1.2.3 不同紫外线照射距离和时间对乳酸菌诱变后胞外多糖产量的影响 将对数生长后期的出发菌培养液离心,用无菌生理盐水将沉淀菌体稀释成  $10^8$  cfu/mL,用直径 9cm 的平皿盖装菌液 10mL,垂直置于 15W 紫外线灯管下,分别选择照射距离为 10、15、20、25、30cm 照射 1、5、10、15、20min,经初筛,复筛,利用萘酚-硫酸法测得多糖含量,选出高产胞外多糖的优良菌株,并确定不同照射时间时的最佳照射距离。

1.2.4 不同浓度亚硝基胍对乳酸菌诱变后多糖产量的影响 分别选择亚硝基胍浓度为 100、200、300、400、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对米酒乳杆菌 BXR-5-3 进行诱变,经初筛,复筛,利用萘酚-硫酸法测得多糖含量,选出高产胞外多糖的优良菌株,并确定亚硝基胍的最佳浓度。

1.2.5 紫外线、亚硝基胍复合诱变对多糖产量的影响 以 1.2.3 和 1.2.4 的实验结果为基础,选择紫外线照射距离、亚硝基胍的浓度以及处理时间为主要影响因素进行  $L_9(3^4)$  正交实验。实验设计如表 1 所示。

表 1 因素水平表

Table 1 The table of factors and levels

水平	因素		
	A 紫外线照射距离 (cm)	B 亚硝基胍的浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	C 照射时间 (min)
1	15	200	5
2	20	300	10
3	25	400	20

### 1.3 诱变菌株的筛选

将诱变后的菌液用 MRS 琼脂平板避光培养,挑选 20 个菌落较大、与出发菌株的菌落有一定差异性的菌落进行纯培养,用 MRS 琼脂斜面保存。

1.3.1 高产胞外多糖米酒乳杆菌的初筛 取上述挑选出的菌落活化并取 1mL 接入 50mL MRS 液体培养基培养 24h 后经分离纯化胞外多糖后,以葡萄糖为参照标准绘制标准曲线,采用硫酸-萘酚法测定多糖含量<sup>[8]</sup>。

1.3.2 高产胞外多糖的米酒乳杆菌的复筛 将初步筛选符合要求的菌株接种到 50mL MRS 液体培养基中 37℃ 培养 24h,将培养液 4℃、12000  $\times$  g 冷冻离心 30min,取上清液弃去菌体沉淀。按照 1:3 的料液比,95% 酒精浓度 (vol),4℃ 条件下沉淀 24h,上清液再次 4℃、12000  $\times$  g 冷冻离心 30min,将离心得到的沉淀和酒精沉淀归并,利用蒸馏水复溶<sup>[9]</sup>,透析 24h,取出透析液定容至 20mL。利用萘酚-硫酸显色法计算各诱变菌株所产生的多糖含量,找到多糖产量比较高的米酒乳杆菌诱变菌株。

### 1.4 分析方法

菌落培养及保存用 MRS 琼脂培养基;光密度采

用 722 分光光度计测定;pH 用酸度计测定;总糖含量采用硫酸-萘酚法测定,以葡萄糖作为标准<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同紫外线照射距离和照射时间对乳酸菌诱变后胞外多糖产量的影响

选择照射距离为 10、15、20、25、30cm 分别照射 1、5、10、15、20min 后,经初筛,复筛,利用萘酚-硫酸法测得多糖含量如图 1 所示。在距离为 25cm 时照射 10min 筛选到一株诱变菌株胞外多糖产量最高为 305.2mg/L,其次是距离为 20cm 时分别照射 5min 和 20min 筛选到两株诱变菌株产量为 289.5mg/L 和 285.8mg/L。而在距离为 15cm 时照射 15min 筛选到的菌株产量最高为 198.7mg/L,照射距离为 10cm 和 30cm 时菌株产量都非常低。

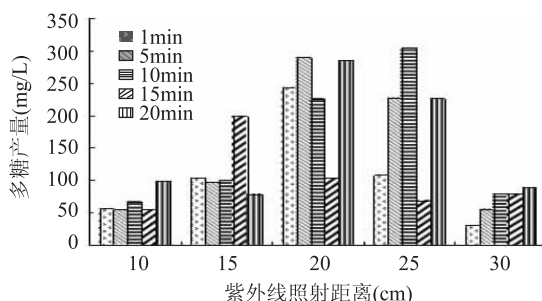


图 1 不同紫外线照射距离和照射时间诱变菌株胞外多糖的产量 (n=3)

Fig.1 Yield of exopolysaccharide in different distance and time of ultraviolet ray (n=3)

### 2.2 亚硝基胍的浓度对胞外多糖产量的影响

分别选择亚硝基胍浓度为 100、200、300、400、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对米酒乳杆菌 BXR-5-3 进行诱变,经初筛,复筛,利用萘酚-硫酸法测得多糖含量如图 2 所示,随着亚硝基胍浓度的增加,米酒乳杆菌变异菌株的胞外多糖产量也随之增多,当亚硝基胍浓度达到 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,筛选出一株胞外多糖产量达到最高的菌株,多糖产量为 322.7mg/L,随后诱变菌株胞外多糖产量开始下降。

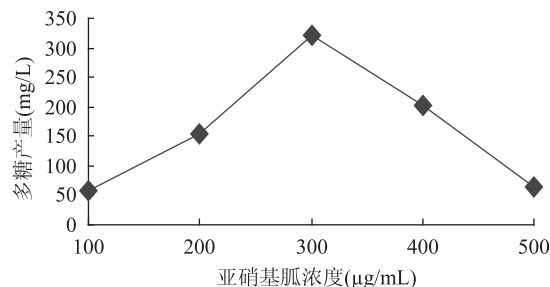


图 2 亚硝基胍的浓度对胞外多糖产量的影响 (n=3)

Fig.2 Effect of nitrosoguanidine concentration on yield of exopolysaccharide (n=3)

### 2.3 高产胞外多糖米酒乳杆菌的最佳诱变条件的选择

以 2.1 和 2.2 的实验结果为基础,选择紫外线照射距离、照射时间以及亚硝基胍的浓度为主要影响

因素进行  $L_9(3^4)$  正交实验。实验结果如表 2 所示。

表 2 紫外线、亚硝基胍复合诱变正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal test to mutagenesis by ultraviolet ray-nitrosoguanidine

实验号	A	B	C	多糖产量 (mg/L)
1	1	1	1	37.5
2	1	2	2	103.3
3	1	3	3	45.6
4	2	1	2	94.8
5	2	2	3	339.0
6	2	3	1	46.4
7	3	1	3	66.7
8	3	2	1	56.9
9	3	3	2	61.6
$K_1$	186.4	199.0	140.8	
$K_2$	480.2	499.2	259.7	
$K_3$	185.2	153.6	451.3	
$k_1$	62.1	66.3	46.9	
$k_2$	160.1	166.4	86.6	
$k_3$	61.7	51.2	150.4	
R	98.3	115.2	103.5	

从表 2 极差 R 值可以看出, 因素的主次关系为:  $B > C > A$ , 其中亚硝基胍浓度对米酒乳杆菌胞外多糖的产量影响最为明显, 其次是处理时间和紫外线照射距离。正交实验结果确定米酒乳杆菌产胞外多糖的最佳诱变条件组合为  $A_2B_2C_3$ , 即诱变剂量为  $300\mu\text{g/mL}$ , 紫外线照射距离 20cm, 处理时间为 20min, 此时米酒乳杆菌胞外多糖产量最高为  $339.0\text{mg/mL}$ 。

### 3 结论

3.1 经紫外线照射, 通过改变照射距离和处理时间, 在照射距离为 25cm, 处理时间为 10min 时, 经初筛, 复筛等操作后得到一株符合要求的高产胞外多糖的诱变菌株, 此菌株胞外多糖的产量为  $305.2\text{mg/L}$ 。

3.2 经亚硝基胍处理, 通过改变亚硝基胍溶液的浓度, 比较几组浓度处理后乳酸菌的胞外多糖产量的情况, 在浓度为  $300\mu\text{g/mL}$  的亚硝基胍诱变后, 得到一株符合要求的高产胞外多糖诱变菌株, 此菌株的胞外多糖产量为  $322.7\text{mg/L}$ 。

3.3 经紫外线-亚硝基胍对米酒乳杆菌进行复合诱变, 在诱变条件为紫外线照射距离为 20cm, 亚硝基胍的浓度为  $300\mu\text{g/mL}$ , 处理时间为 20min 得到一株

符合要求的米酒乳杆菌诱变菌株, 此时胞外多糖的产量为  $339\text{mg/L}$ 。

经实验可知紫外线和亚硝基胍分别诱变后对米酒乳杆菌胞外多糖的产量均有很大影响, 尤其是紫外线和亚硝基胍复合诱变后获得胞外多糖产量比紫外线和亚硝基胍单独诱变稍高, 并且不同诱变剂量与不同处理时间组合诱变的菌株也差别很大。

### 4 讨论

已知出发菌株米酒乳杆菌 BXR-5-3 在最适条件下最大合成量为  $78.86\text{mg/L}$ <sup>[6]</sup>, 经过紫外线和亚硝基胍复合诱变后所得菌株胞外多糖最大产量为  $339.0\text{mg/L}$ , 是原菌株产量的 4 倍多, 虽然产量提高很明显, 但是还不能满足工业化生产的需要, 可为日后的工业化生产和满足人们对于胞外多糖日益增长的需求奠定坚实的基础。近年来, 随着生物工程技术的发展, 基因工程技术已应用到菌种的改造方面, 使育种工作朝着更快捷、更高效的方向发展, 胞外多糖高产菌株的分子育种研究有待进一步开展。

#### 参考文献

- [1] 钟颜麟, 彭志英, 赵谋明. 乳酸菌胞外多糖的研究[J]. 中国乳品工业, 1999(4): 7-9.
- [2] 邓凯波. 乳酸菌胞外多糖的功能及在食品工业中的应用[J]. 食品安全导刊, 2009(7): 49-50.
- [3] 李盛钰, 曾究鹏, 杨贞耐. 提高乳酸菌胞外多糖产量的途径[J]. 食品与生物技术学报, 2009(3): 1-5.
- [4] 刘先, 康小红, 龄南. 乳酸菌发酵产生胞外多糖的研究进展[J]. 中国乳业, 2010(2): 127-130.
- [5] 朱奇, 郭善利, 陈彦, 等. 酸乳中胞外多糖(EPS)产生条件的研究[J]. 食品科技, 2004(4): 18-19.
- [6] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [7] 白丽娟, 殷文正, 李向东. 米酒乳杆菌胞外多糖 BXR-5-3 生物合成条件的研究[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 49-53.
- [8] 刘齐, 刘爱红, 孙美玲, 等. 嗜酸乳杆菌胞外多糖提取工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2011(2): 52-56.
- [9] 刘齐. 高产胞外多糖的嗜酸乳杆菌诱变筛选[J]. 中国酿造, 2010(6): 103-105.
- [10] S A Kimmel, R F Roberts, G R Ziegler. Optimization of exopolysaccharide production by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium [J]. Micro, 1998, 64: 659-664.

(上接第 194 页)

- [1] 食品研究与开发, 2003, 24(6): 3-6.
- [4] 李倬林, 邵淑娟, 李铁柱, 等. 响应面法优化微小毛霉固态发酵生产凝乳酶工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4): 248-254.
- [5] 郑丽, 王昕, 王景会, 等. 微小毛霉凝乳酶基因在毕赤酵母中的诱导表达研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 178-181.
- [6] 甘伯中, 高维东, 丁福军, 等. 微生物凝乳酶固体发酵条件的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 196-198.
- [7] 李璐, 张旭, 李杰. 农杆菌介导凝乳酶基因转化黑曲霉载体的构建[J]. 生物技术, 2011, 21(4): 8-12.

- [8] 吴进菊, 徐尔尼, 陈卫平, 等. 酒曲根霉 F34 菌株凝乳酶的初步纯化及部分酶学性质的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 135-137.
- [9] 高维东, 甘伯中, 丁福军, 等. 微小毛霉凝乳酶的酶学性质研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 185-188.
- [10] Arima K, Yu J, Iwasaki S. Milk-clotting enzyme from *Mucor Pussilus* [J]. In Methods in Enzymology Academic, 1970, 19(3): 446-460.
- [11] 金娟男, 张兰威. 微小毛霉与米黑毛霉凝乳酶的制备及其凝乳质构特性研究[J]. 中国酿造, 2007, 176(11): 17-20.