

氮离子注入选育高效发酵木糖生产 L(+)-乳酸的米根霉

杨英歌 李文 柳丹 樊永红 王冬梅 郑之明 余增亮
(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程重点实验室 合肥 230031)

摘要 为了获得能够高效发酵木糖生产 L(+)-乳酸的菌株, 采用氮离子注入诱变方法, 对出发菌株米根霉 RLC41-6 进行改良, 获得高产 L(+)-乳酸菌株 RQ4012, 发酵周期为 72h, 产酸能力达 74.37g/L, 产酸速率达 1.03g/(L·h), 比 RLC41-6 提高了 1.6 倍。经过多次传代实验证明该菌株具有较好的遗传稳定性。

关键词 离子注入, 米根霉, 木糖, L(+)-乳酸

中图分类号 TQ921.3, Q937, Q815

乳酸是世界公认的三大有机酸之一, 是食品工业的重要酸味剂和防腐剂, 主要用于食品加工、酿酒、饮料, 酱菜等生产行业, 也是医药、化工、皮革、香料等工业的重要原料^[1]。除此之外, L-乳酸的聚合物还可用于制造生物降解塑料, 生产绿色包装材料和农用薄膜, 制备抗癌药物、缓释胶囊制剂、生物植片和手术缝合线等^[2]。当今世界, 乳酸年产量已达 10 万吨以上^[3], 且其需求量还在快速增长^[4], 同时, 降低乳酸生产成本也是急需解决的问题。长期以来, 葡萄糖和淀粉广泛用于乳酸生产^[5], 但是, 植物纤维素资源当是生产乳酸的廉价原料。木糖在植物纤维素物质中的含量仅次于葡萄糖, 且易制备, 是生产乳酸的潜在原料。

离子注入是 80 年代兴起的一种表面处理技术^[6]。余增亮等率先把离子注入应用于作物品种改良和生物效应研究, 取得了令人瞩目的成果^[7]。近年来, 氮离子注入在工业微生物诱变育种中, 具有损伤轻、突变率高、突变谱广等特点, 受到广泛关注。利用此项技术, 许安等使维生素 C 的发酵水平创国内外新高^[8]; 古少彬等将辅酶 Q10 的产量提高了 4 倍^[9]。本研究曾将氮离子注入米根霉 PW352 和 RE3303, 分别使以葡萄糖为原料生产 L(+)-乳酸的能力提高 75%, 以玉米淀粉为原料生产 L(+)-乳酸的能力提高 115%^[10,11]。本研究为氮离子注入米根霉 RLC41-6^[11], 以将其应用于以木糖为原料生产 L(+)-乳酸。本工作对氮离子与微生物间的作用规律进行

了初步探索。

1 材料和方法

1.1 菌株

RLC41-6 是本实验室通过离子束生物工程技术修饰所得到的一株能利用葡萄糖和玉米淀粉高产 L(+)-乳酸的米根霉。

1.2 培养基

1.2.1 筛选培养基 1.0g 溴甲酚绿, 200g 马铃薯, 20g 木糖, 20g 琼脂, 加水至 1000mL, pH 自然。

1.2.2 斜面培养基(g/L) 600 马铃薯, 20 葡萄糖, 18 琼脂, 1000mL 自然水, pH 自然。

1.2.3 种子培养基(g/L) 100 葡萄糖, 3.0 (NH₄)₂SO₄, 0.15 ZnSO₄·7H₂O, 0.3 KH₂PO₄, 0.75 MgSO₄·7H₂O, 10 CaCO₃ (单独灭菌)。

1.2.4 发酵培养基(g/L) 100 木糖, 3.0 (NH₄)₂SO₄, 0.15 ZnSO₄·7H₂O, 0.3 KH₂PO₄, 0.75 MgSO₄·7H₂O, 60 CaCO₃ (单独灭菌)。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面培养 将接种后的斜面于 37℃ 培养 3—4d。

1.3.2 种子培养 37℃, 200r/min, 培养 12h。装液量: 250mL 三角瓶装入 50mL 液体培养基。

国家十一五重点 863 项目 (2006AA020101) 资助

第一作者: 杨英歌, 女, 1982 年 8 月出生, 2004 年毕业于烟台师范学院, 现为中国科学院等离子体物理研究所硕士研究生, 生物物理专业

通讯联系人: 郑之明

收稿日期: 初稿 2006-11-20, 修回 2007-01-04

1.3.3 发酵培养 37℃, 200r/min, 培养 72h。在 250mL 三角瓶中装入 50mL 发酵培养基, 并将培养好的种子液按 5% 的接种量接种到发酵培养基中振荡培养。

1.4 诱变方法

1.4.1 样品的制备 长好的新鲜斜面, 用 10mL 无菌生理盐水洗下斜面孢子, 用双层无菌纱布过滤得到无菌丝体孢子悬液, 取约含 10^5 个孢子的悬液 0.1mL 均匀涂布于无菌平板风干。

1.4.2 N^+ 离子诱变处理 不同剂量的 10keV 氮离子注入。

1.4.3 注入后样品的稀释、分离、培养及筛选 1mL 无菌生理盐水洗涤注入后的样品, 将洗脱液稀释到 10^{-2} — 10^{-3} 倍, 取 0.1mL 涂布于溴甲酚绿平板上, 37℃ 培养, 挑取单菌落进行初筛、复筛。

1.5 分析方法

1.5.1 pH 采用国产精密 pH 试纸和 pHS-2C 型精密酸度计。

1.5.2 孢子浓度的计算 血球计数板法。

1.5.3 发酵液中残糖的计算 采用 3,5-二硝基水杨酸比色法。

1.5.4 L(+)-乳酸的定量测定 乙二胺四乙酸二钠滴定法和 SBA-40C 生物传感器法。

1.5.5 L(+)-乳酸的定性测定 反相高效液相色谱法 uBondpak C18 3.9mm×300nm, 流动相 pH 2.5 的磷酸缓冲液, 流速 1.0mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 210nm, 仪器型号 WATERS600, 检测器 966PDA 195—400nm。

1.5.6 存活率、诱变菌株产酸率增幅的计算 已注入菌株的存活率为其在固定平板培养基生长的菌落数与同样条件下生长的对照菌株菌落数的比值。

诱变菌株产酸率的增幅 = (诱变菌株的产酸量 - 对照菌株的产酸量) / 对照菌株的产酸量。如增幅低于 -10% 为负突变; 高于 +10% 为正突变。

1.6 筛选方法

把离子注入处理过的孢子用生理盐水洗脱, 适当稀释后接种于溴甲酚绿平板上。溴甲酚绿平板可免使菌体生长过快、减少单菌落菌丝扩散混织、防止菌株混杂, 还能以菌株所产乳酸与溴甲酚绿反应形成的变色圈大小为依据, 判断菌株产酸能力, 并以此作为半定性筛选的指标。孢子在溴甲酚绿平板上倒置培养 1—2d 后, 挑取单菌落于斜面培养基上培养 3—4d, 进行进一步的摇瓶复筛。

2 结果和讨论

2.1 氮离子注入剂量对 RLC41-6 存活率的影响

根据以前的实验结果^[12], N^+ 能量为 10keV。考察了不同注入剂量下的菌株存活率(见图 1), 可见其存活曲线呈现典型的“马鞍型”, 这明显不同于传统的诱变源如 X 射线、 γ 射线及化学诱变剂。这种特有的“马鞍型”变化是质量沉积和能量沉积共同作用的结果。注入剂量达 $5.2 \times 10^{14} / \text{cm}^2$ 时, 大部分离子到达细胞膜, 细胞膜上离子的能量和质量的沉积可能破坏了细胞骨架和间接诱导了核仁的损伤^[13], 导致细胞死亡, 存活率迅速降低。离子注入剂量再高, 核仁上离子的能量和质量的沉积可能引起细胞的损伤, 从而激活了细胞修复系统^[14], 存活率相应提高。当离子注入剂量达 $1.26 \times 10^{15} / \text{cm}^2$ 时, 过多的离子能量和质量沉积破坏了细胞的修复系统, 存活率降低。

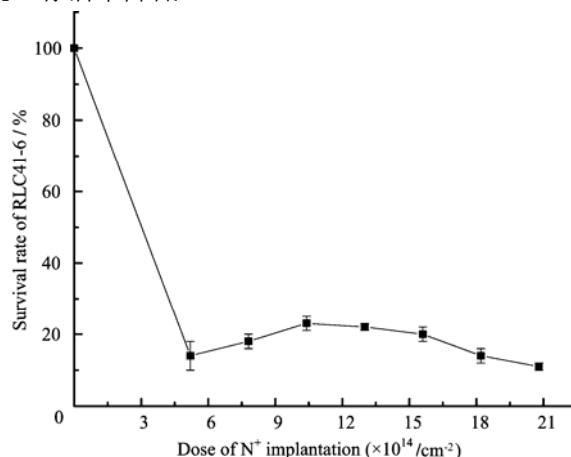


Fig.1 Effect of N^+ implantation dose on survival rate of RLC41-6

2.2 不同氮离子剂量对 RLC41-6 突变率的影响

注入剂量为 5.2×10^{14} — $2.08 \times 10^{15} / \text{cm}^2$ 的米根霉 RLC41-6 的突变率统计见图 2, 表明该诱变法有较高的突变率。其原因可能是注入离子通过能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷交换与生物体作用。离子注入对生物细胞有直接和间接作用^[15]。离子注入的动量传递会导致对细胞的刻蚀作用, 随着剂量增大, 细胞表面及内部的刻蚀损伤逐渐增大, 刻蚀面积由小变大, 刻蚀深度逐渐增加。剂量大到一定值时, 离子会穿透细胞壁、细胞膜和细胞质, 并深入到核仁, 破坏细胞膜、细胞骨架及核仁, 还可使细胞中的染色体畸变、脱氧核糖核酸链发生断裂。另外, 注入离子因能量沉积而与其周围的移位原子、本底原子和各种化学碎片发生重组化合生成新的分子和基团, 直接或间接地影响生物物质的性质, 造

成生物分子改性后沉积在生物体内,参与生物体内的新陈代谢过程,影响生物体基因表达、调控、修复和存活等生物学效应。而注入离子的电荷沉积也引起细胞负电性变化,使细胞的跨膜电位发生改变,影响活体细胞生化代谢过程中电荷的转移,并改变其生化反应的速度。由图2可见,注入剂量为 $1.04 \times 10^{15} - 1.56 \times 10^{15} / \text{cm}^2$ 的RLC41-6的正突变率最高,这恰好与“马鞍型”的存活率曲线相对应。

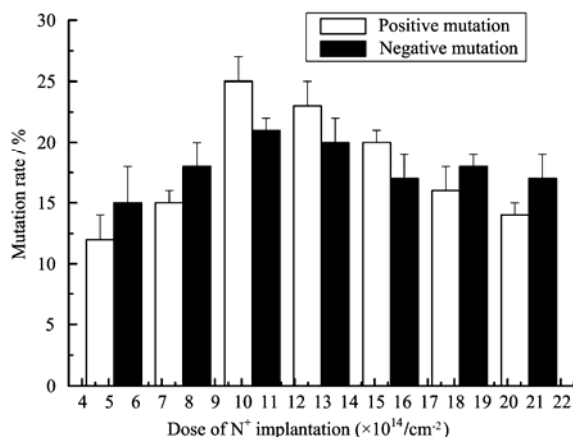


Fig.2 Relation of N⁺ implantation dose and mutation rate of RLC41-6

2.3 氮离子注入 RLC41-6 的诱变选育图谱

选取 $1.04 \times 10^{15} - 1.56 \times 10^{15} / \text{cm}^2$ 的注入剂量对菌种进行注入处理。图3是整个选育过程的诱变筛选图谱。检测诱变后的米根霉,把产酸量高于对照的菌株进行下一轮离子注入及筛选。经过反复辐照和严格筛选,我们最终筛选到RQ4012,使以木糖为原料生产L(+)-乳酸的能力比出发菌株提高1.6倍。

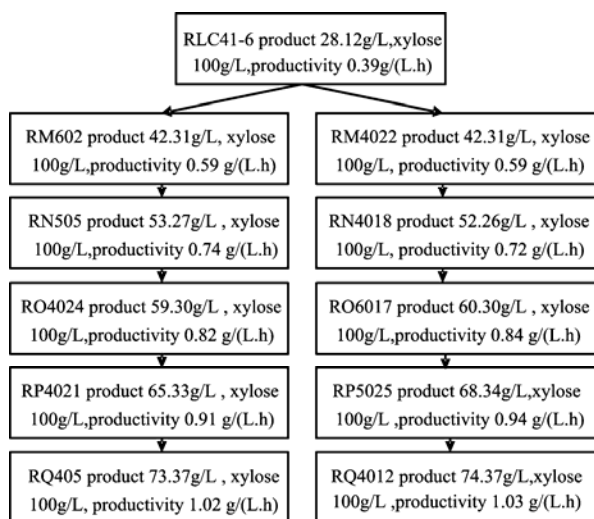


Fig.3 The flow of mutation and isolation procedure

2.4 高产突变株米根霉 RQ4012 的发酵产酸曲线

由图4可见,摇瓶发酵过程可分为三个阶段。第一阶段为产酸延迟期,在此阶段内糖的利用较慢,表明细胞生长缓慢,产酸量很少,延迟期的长短与菌种的遗传特性、菌龄以及接种前后所处的环境因素有关;第二阶段为产酸对数期,此期间细胞迅速生长,产酸量逐渐增大,同时发酵液中糖浓度迅速下降;第三阶段为产酸稳定期,糖的利用速度减慢,趋于稳定,产酸量的增长速度下降。由此可见,发酵过程中,产酸和耗糖是两个相对的过程,产酸的速率与耗糖的速率呈很好的相关性。整个发酵过程中pH基本比较稳定,在6.5左右,这主要与加入足够的中和剂碳酸钙有关,中和剂的加入对维持稳定的产酸环境,克服产物抑制有至关重要的作用。

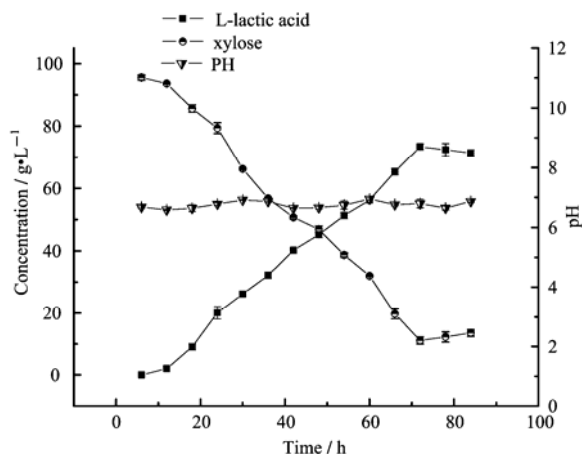


Fig.4 The curves of the fermentation of L(+)-lactic acid from xylose of the mutant RQ4012

2.5 发酵液成分的分析

在乳酸发酵过程中,产物乳酸生成的同时还有有机酸副产物释放到环境中^[16]。为考察RQ4012是否有积累杂酸的现象,我们用反相高效液相色谱法检测了该菌株发酵液中的成分。发酵液中的乳酸是以乳酸钙的形式存在,故须对发酵液进行酸解:取5mL米根霉发酵液,离心(5000r/min, 10min)除去米根霉的菌丝体和碳酸钙,加入5mL 0.01mol/L的硫酸水溶液进行酸解,离心除去硫酸钙,以0.45μm滤膜过滤,取1mL滤液进行适当稀释即得到待测液。由图5可见,该菌株具有产物L(+)-乳酸纯度高的特点,在检测波长的范围内,除观察到与标准品乳酸一样的色谱峰外,没有其它杂峰的出现。

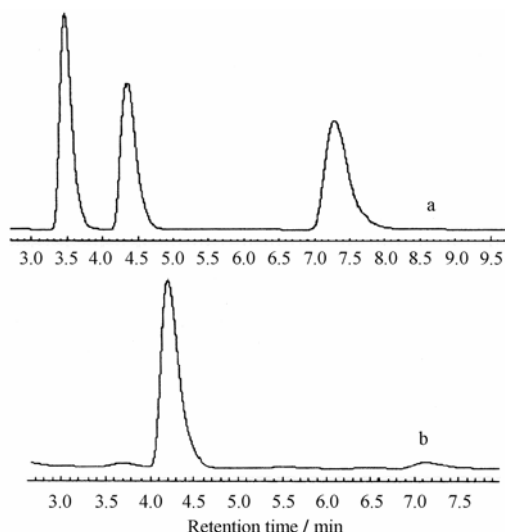


Fig.5 Chromatogram of fermentation broth of RQ4012
a. Standard samples (from left to right): malic acid; L(+)-lactic acid; fumaric acid; b. Fermentation broth sample of RQ4012

2.6 菌种稳定性测定

将米根霉 RQ4012 在斜面上连续传代, 然后进行摇瓶发酵, 测定其产酸情况, 实验流程图及结果见图 6。结果表明, 经过五次传代, 在木糖投糖浓度为 100g/L 的情况下, 米根霉 RQ4012 产酸基本上维持在 70g/L 以上, 产率在 1g/(L·h) 左右, 保持了很强的产酸能力和高的产率, 具有稳定的遗传性能。

RQ4012	Preculture	Culture	Product 74.37g/L, productivity 1.03 g/(L·h)
F1	Preculture	Culture	Product 72.36g/L, productivity 1.01 g/(L·h)
F2	Preculture	Culture	Product 73.37g /L, productivity 1.02 g/(L·h)
F3	Preculture	Culture	Product 70.35g/L, productivity 0.98 g/(L·h)
F4	Preculture	Culture	Product 74.37g/L, productivity 1.03 g/(L·h)
F5	Preculture	Culture	Product 71.36g/L, productivity 0.99 g/(L·h)

Fig.6 The genetic stability of mutant strain RQ4012

3 结论

对米根霉 RLC41-6 进行 10keV N^+ 注入诱变, 发现注入剂量为 $1.04 \times 10^{15} - 1.56 \times 10^{15} / \text{cm}^2$ 时的正突变率最高。经过大量的严格筛选, 最终得到一株能高效发酵木糖生产 L(+)-乳酸的米根霉 RQ4012, 72h 摇瓶发酵后, L(+)-乳酸产量达 74.37g/L, 产量比出发菌株提高 1.6 倍, 产率达到 1.03g/(L·h)。通过反相高效液相色谱分析, 很少有富马酸、苹果酸等杂酸产生, 只产生 L-乳酸, 形成单峰。经过多次

传代, 证明该高产菌有较好的遗传稳定性, 适合用于工业化生产。

参考文献

- 1 白冬梅, 赵学明, 代海霞. 无锡轻工大学学报, 1999, **18**(6): 6-9
BAI Dongmei, ZHAO Xueming, DAI Haixia. J Wuxi Inst Light Ind, 1999, **18**(6): 6-9
- 2 白姝, 董晓燕, 孙彦. 微生物学通报, 1996, **23**(3): 140-143
BAI Shu, DONG Xiaoyan, SUN Yan. Aviso Microbiol, 1996, **23**(3): 140-143
- 3 虞东胜, 周晓燕, 王健. 工业微生物, 2000, **30**(3): 4-7
YU Dongsheng, ZHOU Xiaoyan, WANG Jian. In Microbiol, 2000, **30**(3): 4-7
- 4 Skory C D. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, **64**: 237-242
- 5 BAI Dongmei, Li Shizhong, Lin Fangqian. Chem Res Chinese U (in China), 2004, **20**(4): 403-406
- 6 虞龙, 潘涛, 周剑. 辐射研究与辐射工艺学报, 2005, **23**(4): 233-236
YU Long, PAN Tao, ZHOU Jian. J Radiat Res Radiat Process, 2005, **23**(4): 233-236
- 7 YU Zengliang. Springer Berlin Heidelberg New York, 2006, **193**: 204-207
- 8 许安, 姚建明, 余增亮, 等. 工业微生物, 1999, **29**(2): 16-19
XU An, YAO Jianming, YU Zengliang, et al. Ind Microbiol, 1999, **29**(2): 16-19
- 9 GU Shaobin, YAO Jianming, YUAN Qipeng, et al. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **72**: 456-461
- 10 古绍彬, 葛春梅, 汪青宏, 等. 工业微生物, 2004, **34**(1): 12-16
GU Shaobin, GE Chunmei, WANG Qinghong, et al. Ind Microbiol, 2004, **34**(1): 12-16
- 11 ZHOU Xiuhong, GE Chunmei, PAN Renrui. Plasma Science and Technology (in China), 2005, **7**(5): 3078-3080
- 12 GE Chunmei, GU Shaobin, ZHOU Xiuhong, et al. J Microbiol Biotechnol, 2004, **14**(2): 363-366
- 13 WU L J, Gerhard R P, XU A, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96**: 4959-4964
- 14 Foti A M, Milano F, Tarrisi L. Nucl Instrum Meth B, 1999, **46**: 361-363
- 15 刘少友, 金湘, 曾宪贤, 等. 新疆大学学报, 2003, **20**(3): 277-279
LIU Shaoyou, JIN Xiang, ZENG Xianxian, et al. J Xinji-

- ang Univ, 2003, **20**(3): 277-279
- 16 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 337-389
- WANG Boyan, JIN Qirong. Producing and Application of Organic Acid Fermentation. Beijing: China Light Industry Press, 2000. 337-389

Breeding L(+)-lactic acid high productive mutant from xylose by nitrogen ions

YANG Yingge LI Wen LIU Dan FAN Yonghong WANG Dongmei
ZHENG Zhiming YU Zengliang

(Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

ABSTRACT In order to obtain higher L(+)-lactic acid yield strain fermentating from xylose, the original strain *Rhizopus oryzae* RLC41-6 was mutated by 10keV N⁺ ion implantation. A mutant strain RQ4012 was obtained. After 72h shake-flask cultivation, the concentration of L(+)-lactic acid reached 74.37g/L, and the productivity was 1.03g/(L.h). Its lactic acid yield was 160% higher than that of the original one, and the mutant strain has high genetic stability.

KEYWORDS Ions implantation, *Rhizopus oryzae*, Xylose, L(+)-lactic acid

CLC TQ921.3, Q937, Q815