

利用细胞融合技术获得高产乳酸菌的研究*

黄明深, 胡尚勤

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

摘要 利用细胞融合技术将有芽孢的整肠生菌株(*Bacillus licheniformis*)与无芽孢的保加利亚乳酸杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)作为亲本, 进行细胞融合, 并对融合子产乳酸、丁二醇能力以及酸奶发酵能力进行了研究。结果表明, 在 MM 培养基内, 融合子乳酸产量为 10.104 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、丁二醇产量为 46.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 乳酸和丁二醇产量高于两亲本菌株。在 CM 培养基内, 融合子乳酸产量为 12.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其产量高于两亲本; 丁二醇产量为 69.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其产量高于保加利亚乳酸杆菌。在细胞形态上, 融合子也与亲本存在一定的差异。在酸奶发酵的过程中, 乳酸产量和 pH 值与亲本保加利亚乳酸杆菌发酵的结果一致。经过 10 次传代培养后, 其遗传稳定性保持在 99% 以上。

关键词 整肠生菌; 保加利亚乳酸杆菌; 融合; 发酵

中图分类号: Q93-33

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2006)03-0082-03

Research on Protoplast Fusant of *Bacillus Licheniformis* and *Lactobacillus Bulgaricus*

HUANG Ming-shen, HU Shang-qin

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract This paper reports the study on protoplast fusant of *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus bulgaricus*. The study showed, in MM substrate, fusant yielded lactic acid 10.104 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and butanediol 46.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The yield was higher than both its parents. In CM substrate, fusant yielded lactic acid 12.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, it was higher than both its parents and yielded butanediol 69.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ higher than *Lactobacillus bulgaricus*. In fermented of acidophilus milk, the new bacillus has the same yield of lactic acid and the same pH value with *Lactobacillus bulgaricus*. And the fusant's genetic stability was maintained over 99%.

Key words *Bacillus Licheniformis*; *Lactobacillus bulgaricus*; fusant; ferment

酸奶是目前较为流行的保健品,它不仅营养丰富,而且有多种保健功能,发展前景十分广阔,研究表明,食用含有大量乳酸菌的乳制品可以降低动物和人体的血清胆固醇^[1],但制作酸奶的保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)不能耐受胃酸及胆汁酸的作用,也不能在肠道内定殖,其有益作用受到很大限制。

整肠生菌(*Bacillus Licheniformis*)是 20 世纪 90 年代后用做微生态活菌制剂的地衣芽孢杆菌。它的特点是以菌制菌,产生抗菌活性物质以及生物夺氧功能等独特机制达到消灭致病菌,调整肠道微生态环境,达到防病治病的目的。它形成芽孢后,存活能力可以长达几年到几十年之久^[2],能延长该菌剂的

保存期。

本研究旨在采用细胞融合技术,将保加利亚乳酸杆菌和地衣芽孢杆菌两株不同的杆菌进行细胞融合,用融合子进行发酵,测定其发酵产物,选育出既能作为高产乳酸又能作为肠道微生态制剂的融合子菌株,以供市场使用。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种 整肠生菌、保加利亚乳酸杆菌、嗜热链球菌均为重庆师范大学应用微生物研究所保存菌种。

1.1.2 培养基与缓冲液 MM 培养基,CM 培养基,

* 收稿日期 2006-03-09

资助项目:重庆市教委重点课题(渝教高[2004]12号)

作者简介:黄明深(1977-)男,重庆人,硕士研究生,研究方向为现代生物教育及技术。

HCM 培养基, HMM 培养基, SMM 缓冲液: pH = 6.7^[3]。

1.1.3 溶菌酶 用 SMM 缓冲液配制为 200 ~ 400 单位/mL, 本实验配制浓度为 210 单位/mL。

1.1.4 聚乙二醇 用 SMM 配成质量分数为 30% 的溶液, 115℃ 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 乳酸标准曲线的绘制 用分光光度法测定 0 ~ 12 μg/mL 的标准乳酸溶液的 OD 值, 计算出标准乳酸溶液在 560 nm 下的回归直线方程为: $\hat{Y} = 11.655 - 3.9667X$ (其中 X 为 OD 值, Y 为乳酸含量)^[4]。

1.2.2 菌种活化培养 根据整肠生对数生长曲线^[5], 将整肠生菌株接种在 CM 培养基上, 37℃ 下培养 16 h; 将保加利亚乳酸杆菌接种在 CM 培养基上, 37℃ 下培养 18 h。

1.2.3 原生质体的制备与筛选 将整肠生菌株、保加利亚乳酸杆菌分别接种到 CM 液体培养基中, 37℃ 下振荡培养 16 h, 于 4 000 r/min 离心 15 min, 用 85% 生理盐水洗涤两次, 再于 4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用 20 mL SMM 洗涤下来, 加入溶菌酶 80 mL, 42℃ 下水浴脱壁 9 h, 当大部分菌体形成球形原生质后, 于 4 000 r/min 离心 15 min 得原生质体^[6,7]。由于原生质体在高渗液体中稳定, 在低渗溶液中会缓慢破裂在一般固体培养上无法形成菌落。同时, 原生质体为圆形可在显微镜下鉴别, 所以可用酶解前后的菌落数、血球计数器计算细胞数和平板计数法求得原生质体的形成率^[8]。

1.2.4 原生质体再生数及未脱壁细胞数检测 分别取整肠生菌株、保加利亚乳酸杆菌的原生质体亲本至无菌水中, 稀释至 10^{-5} , 取 0.1 mL 样于 HCM、CM 培养基中混匀倒平板, 37℃ 下培养 24 h。根据

公式: 原生质体再生率 = (再生平板上总菌数 - 未脱壁的菌数) / (酶解前总菌数 - 未脱壁的菌数) × 100%。

结果表明, 整肠生菌株原生质体形成率为 99.5%, 再生率为 99.5%; 保加利亚乳酸杆菌原生质体形成率为 72.7%, 再生率为 62.5%。

1.2.5 原生质体的融合 取等量的整肠生菌株、保加利亚乳酸杆菌的原生质体加入 SMM 溶液混合, 4 000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 用 4 mL 30% 聚乙二醇 SMM 缓冲液洗涤菌体, 42℃ 下水浴保温 3 min 后加入 8 mL SMM 溶液, 取 0.1 mL 于 HMM 培养基上倒平板, 37℃ 培养 24 h 后记数菌落, 计算融合率。

1.2.6 融合子的生理生化分析 采用对羟基联苯分光光度计法测定产物乳酸含量^[5]; 使用碘量法测定 2-β-丁二醇含量; 用融合子与两亲本按照工厂生产酸奶的方法, 分别将保加利亚乳酸杆菌、整肠生菌、融合子与等量的嗜热链球菌混合后, 以 5% 的接种量接种至含糖量为 8% 的市购蒙牛盒装鲜奶中, 42℃ 发酵 4 h 然后于 4℃ 冷却 4 h 后, 依据食品检验技术^[9]测定酸奶的理化指标。

1.2.7 融合子的筛选与遗传稳定性分析 用“热变性温度测定法”随机抽样测定原生质体融合后的 HMM 平板上各个菌落的 (G+C)% , 以筛选融合子; 将两亲本与融合子进行 10 次传代培养, 以其主要代谢产物检测其遗传稳定性^[10]。

2 结果与讨论

2.1 原生质体融合子的筛选

2.1.1 原生质体融合子的形态鉴定 融合子的鉴定根据伯杰细菌鉴定手册(第八版), 在显微镜下进行细胞形态鉴定见图 1、图 2、图 3。

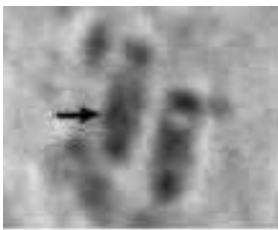


图1 整肠生菌



图2 保加利亚乳酸杆菌

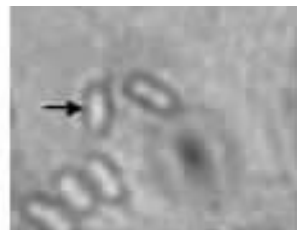


图3 融合子

从图 1 中可以看出, 亲本整肠生菌有一个明显的芽孢; 从图 2 中可以看出亲本保加利亚乳酸杆菌没有芽孢, 且菌体细长为椭圆形; 从图 3 中的融合子

看不出有芽孢, 与两亲本形态上都有明显的不同。

2.1.2 原生质体融合子与两亲本的 (G+C)% 测定 用“热变性温度测定法”测定两亲本的 (G +

C)% ,并用随机抽样法测定原生质体融合后的 HMM 平板上不同菌落的(G + C)% ,以筛选融合子 结果见表 1。

表1 融合子与两亲本的(G + C)% 比较

测定项目	遗传分析		
	保加利亚乳酸杆菌	整肠生菌	融合子
(G + C)%	51.7	46.8	48.1

由表 1 可见 ,在随机抽样的菌株中 ,融合子 DNA 的(G + C)% 为 48.1% ,位于两亲本(51.7% ~ 46.8%)之间 ,分别与两亲本的差值为 3.7%、1.3% ,由此说明该融合子与两亲本在遗传性上有一定的区别 ,是两亲本融合的结果。

2.2 原生质体融合率的计算

统计所有原生质体融合后的 HMM 平板菌落 ,菌落总数为 191 个 ,根据公式初步计算融合率为 0.088 5%。根据随机抽样检测 DNA 的(G + C)% 结果的概率 ,计算出实际融合率为 0.069 9%。

2.3 融合子的生理生化分析

分别将两亲本与融合子接种到 MM、CM 液体培养基中振荡培养 24 h ,测定其主要发酵代谢产物及其含量。结果见表 2。

从表 2 可以看出 ,融合子在 MM 培养基内产生的乳酸是保加利亚乳酸杆菌的 126.3 倍 ,整肠生菌在 MM 培养内乳酸含量无法检测出。融合子在 MM 培养基内产生的丁二醇是整肠生菌的 1.33 倍 ,而保加利亚乳酸杆菌在 MM 培养基内未产丁二醇。

融合子在 CM 培养基内产生的乳酸是保加利亚乳酸杆菌的 1.24 倍 ,是整肠生菌株的 1.30 倍。融合子在 CM 培养基内产生的丁二醇虽然比整肠生菌株低 ,但相当于保加利亚乳酸杆菌的 1.5 倍 ,丁二醇的含量介于两亲本之间。

表2 融合子与亲本主要代谢产物测定结果

测定项目	融合子	保加利亚乳酸杆菌	整肠生菌株
MM 培养基 乳酸($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10.104	0.080	—
MM 培养基 丁二醇($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	46.13	—	34.59
CM 培养基 乳酸($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	12.850	10.382	9.896
CM 培养基 丁二醇($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	69.19	46.13	92.25
革兰氏染色	G ⁺	G ⁺	G ⁺
芽孢染色	—	—	+

注：“—”表示无；“+”表示有

2.4 融合子与亲本发酵的酸奶理化指标分析

分别将混合菌种接种至盒装鲜奶中于 42℃ 发酵 4 h ,然后于 4℃ 冷却 4 h 后检测酸奶的理化指标 ,结果见表 3。

从表 3 中可以看出 ,从感官上看 ,用融合子发酵出来的酸奶和市售酸奶的口感上甜度略高而酸度略低 ;从化学分析上来看 ,融合子发酵出来的酸奶虽然暂时没有达到市售酸奶的条件 ,但从乳酸含量和 pH 值上与亲本保加利亚乳酸杆菌发酵的结果一致。

2.5 遗传稳定性检测

两亲本及融合子进行 10 次传代培养后的遗传稳定性结果见表 4。

表3 酸奶感官鉴定及化学分析结果

组别	外观	浓稠度	口感酸度	口感甜度	乳酸含量/%	pH 值
空白对照组	—	—	—	—	—	6.52
保加利亚乳酸杆菌 + 嗜热链球菌发酵液	乳白	+++	微酸	微甜	0.486	5.10
整肠生菌株 + 嗜热链球菌发酵液	乳白	+++	微酸	微甜	0.243	5.60
融合子 + 嗜热链球菌发酵液	乳白	+++	微酸	微甜	0.486	5.09

表4 两株融合子遗传稳定性检测

菌株	传代次数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
保加利亚乳酸杆菌	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
整肠生菌	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
融合子	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99.01

从表 4 可以看出 ,经过 10 次传代后 ,两亲本的遗传稳定性保持不变 ,其融合子的主要代谢产物仍然具有较高的遗传稳定性 ,分别保持在 99.01%。

本实验通过保加利亚乳酸杆菌和整肠生菌进行

细胞融合产生的菌株 ,在酸奶发酵工艺上 ,乳酸产量与亲本保加利亚乳酸杆菌相同 ,而丁二醇含量却是保加利亚乳酸杆菌的 1.5 倍 ,融合子既作为保健饮

品又作为肠道微生态制剂的前景将十分广阔。

致谢:本文得到胡尚勤教授的悉心指导,特此表示感谢。

参考文献:

- [1] KAWASE M, HASHIMOTO H, HOSODA M, et al. Effect of Administration of Fermented Milk Containing when Protein Concentrate to Rats and Healthy Men on Serum Lipids and Blood Pressure[J]. J Dairy Sci, 2002, 83: 255-263.
- [2] 李季伦. 微生物生理学[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1993. 507.
- [3] 白毓谦, 方善康. 微生物实验技术[M]. 济南:山东大学出版社, 1987.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 1997.
- [5] 刘天贵, 胡尚勤. 不同基质对地衣芽孢杆菌生长曲线的影响[J]. 重庆师范学院学报(自然科学版), 1998(4): 21-23.
- [6] 胡尚勤. 整肠生菌细胞融合子的发酵及产物分析研究[J]. 工业微生物, 2005(3): 33-36.
- [7] 陈海昌, 唐屹, 张岭花, 等. 原生质体融合技术提高啤酒酵母凝絮性的研究[J]. 微生物学通报, 1994(4): 213-217.
- [8] 辛明秀, 马玉娥. 微生物的原生质体融合及应用[J]. 微生物学通报, 1995(3): 365-370.
- [9] 靳敏, 夏玉宇. 食品检验技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2003. 166-167.
- [10] 蔡城武, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法[M]. 北京:科学出版社, 1982. 128.

(责任编辑 许文昌)