DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.2013.02.007

广西科学 Guangxi Sciences 2013,20(2):152～157

一株高产乳酸鼠李糖乳杆菌的选育*

Breeding of a *Lactobacillus rhamnosus* Strain with the High Yield Fermentation of L-Lactic Acid

孙　靓[1,2],李检秀[2],孙菲菲[2],黄艳燕[2],郭　铃[2],黄日波[1,2]

SUN Liang[1,2],LI Jian-xiu[2],SUN Fei-fei[2],HUANG Yan-yan[2],GUO Ling[2],HUANG Ri-bo[1,2]

(1.广西大学生命科学与技术学院,广西南宁　530004;2.广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物炼制重点实验室,广西南宁530007)

(1. Life Science and Technology College,Guangxi University,Nanning,Guangxi,530004,China; 2. State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology,National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery,Guangxi Academy of Science,Guangxi Key Laboratory of Biorefinery,Nanning,Guangxi,530007,China)

摘要:采用紫外线和 Co^{60} 照射联合诱变鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)JCM1553 菌株,选育得到 1 株 L-乳酸高产突变株 SCT-10-10-60。经 77 代传代培养证实该菌株 L-乳酸发酵遗传稳定。在 37℃,200rpm 下,该菌株摇瓶发酵葡萄糖 60h 的发酵液乳酸浓度达到最大,为 195.67g/L,发酵糖酸转化率达到 95.33%,比出发菌株最大乳酸产量、发酵速率和糖酸转化率分别提高了 16.24%、50.13%和 17.81%。相同条件下该菌株发酵木薯淀粉 84h 的乳酸浓度达到最大值,为 203.33g/L,糖酸转化率达到 78.85%,比出发菌株最大乳酸产量和发酵速率均提高了 29.49%,糖酸转化率则提高 24.53%。该菌株发酵产物的 L-乳酸含量高达 96.75%,与出发菌株(96.97%)无统计学显著差异($P>0.05$)。该高产菌株乳酸发酵性能提高的主要原因是菌体增长速率加快。其 L-乳酸发酵性能显著优于现有的生产菌株,具有较高的潜在工业价值。

关键词:L-乳酸发酵　鼠李糖乳杆菌　诱变

中图法分类号:TQ921^{+}.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1005-9164(2013)02-0152-06

Abstract:A high yield mutant strain of lactic acid fermentation,defined as SCT-10-10-60,was selected by mutagensis of *Lactobacillus rhamnosus* JCM1553 strain with the combination of UV and Co^{60} radiation. The result of 77 generation transfer culture verified the strain had the genetic stability on lactic acid fermentation. In the shave flask fermentation with glucose as substrate under the condition of 37℃,200rpm,the lactic acid concentration of mutant strain in broth was reached to maximum of 195.67g/L at 60h of fermentation and the maximum ratio of glucose converting to lactic acid reached to 95.33%. The maximum lactic acid yield,the fermentation rate and the ratio of glucose converting to lactic acid of mutant strain were respectively 16.24%,50.13% and 17.81% higher than that of start strain. In the fermentation with enzymatic hydrant of cassava starch as substrate under the same condition,the lactic acid concentration of mutant strain was reached to 203.33g/L of maximum at 84h fermentation,with the maximum lactic acid yield and the fermentation rate of mutant strain both 29.49% higher than that of start strain(157.02g/L,84h),and the maximum ratio of glucose converting to lactic acid reached to 78.85%,24.53% higher than that of start strain(63.32%). The L-lactic acid concentration in the fermentation product of mutant strain,determined by using chiral column HPLC, was

收稿日期:2013-03-19

修回日期:2013-04-15

作者简介:孙　靓(1980-),女,助理研究员,主要从事微生物学、生物基材料和生物质能源研究。

*广西科学院基本科研业务项目(12YJ25SW06),广西科技创新能力与条件建设计划项目(桂科能 12237022)资助。

high to 96.75% and had not statistical significant difference with the start strain (96.97%), indicating that SCT-10-10-60 was a L-lactic acid high-yield strain. However, the calculation of L-lactic acid yield per cell biomass showed that the L-lactic acid yield of mutant strain was improved by enhancing the rate of cell increment. Since SCT-10-10-60 strain has more advantage features than current industrial strains in L-lactic acid fermentation, it is thought as a potential strain for L-lactic acid production.
Key words: L-lactic acid ferementation, *Lactobacillus rhamnosus*, mutagensis

乳酸，即 α-羟基丙酸，是一种重要的基础化工原料，被广泛应用于食品、医药、饲料、农药、日用化工、皮革和纺织等行业[1~3]。L-乳酸能够用于合成新型环保材料聚乳酸，基于环保理念，近年来国内外对其广泛关注[4]。L-乳酸的工业生产主要有 3 种方法，即化学合成法，酶转化法和微生物发酵法[1]。其中，微生物发酵法由于具有原料来源广泛，产品专一性高，工艺条件比较温和，成本相对较低等优势，已成为目前国内外主要的生产方法。至今所发现具有工业价值的产 L-乳酸微生物主要包括根霉菌属[4~6]的霉菌菌株和乳杆菌属、链球菌属、芽孢杆菌属等属的细菌菌株[4,7]。霉菌发酵生产 L-乳酸的产酸率和转化率均较低，分别只有 10%左右和 80%～90%，副产物（如乙酸、富马酸等）较多，导致下游产品分离工艺比较繁琐，成本较高[8]。与霉菌相比，细菌发酵生产 L-乳酸的糖酸转化率、发酵浓度和纯度均比较高，发酵时间也比较短，工业生产的发酵液 L-乳酸浓度可达 14%～19%，产品转化率最高可达 98%，而且发酵时间通常只需 50h[9,10]，这无疑可以简化后续的产品分离纯化，显著降低生产成本，提高生产效率。为此，选育和改造构建高产 L-乳酸的细菌菌株已成为最近几年 L-乳酸发酵的研究重点[11]。为了利用广西丰富的木薯资源通过发酵法生产 L-乳酸，我们在对木薯淀粉发酵生产乳酸的发酵条件进行优化[12]的基础上，进一步对发酵菌株鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）JCM1553 进行紫外和 Co^{60} 联合诱变，选育获得 1 株遗传稳定的 L-乳酸高产菌株 SCT-10-10-60。现予报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基和菌种活化

鼠李糖乳杆菌 1553 菌株（*Lactobacillus rhamnosus*, JCM 1553）购自日本微生物保藏中心（JCM），−80℃下甘油保存于本实验室。

MRS 培养基[12]含葡萄糖 20g/L，酵母粉 5g/L，蛋白胨 10g/L，牛肉膏 10g/L，$CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 5g/L，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.62 g/L，柠檬酸氢二铵 2g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L，$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.056g/L，自然 pH 值。固体平板培养基添加 20g/L 的琼脂粉。YE 培养基含葡萄糖 150 g/L、酵母粉 20 g/L、$CaCO_3$ 20 g/L、琼脂粉 15 g/L，自然 pH 值。葡萄糖发酵培养基含葡萄糖 200 g/L、酵母粉 20 g/L、$CaCO_3$ 80 g/L，自然 pH 值。木薯淀粉发酵培养基是将工业木薯淀粉配成 280g/L 的乳液，先 90℃水浴糊化，添加诺维信淀粉液化酶（Liquozyme Supra）和糖化酶（Dextrozyme DX），按酶制剂的产品说明进行进行液化和糖化。糖化液的 pH 值调节至 6.0～6.5，灭菌，添加灭菌的 20 g/L 酵母粉和 80 g/L 的 $CaCO_3$。培养基配制时葡萄糖或淀粉糖化液与其它成分分开灭菌，条件均为 115℃ 20min。

菌种活化是将低温保藏的菌种取出常温融化后划线接种到 MRS 平板培养基，37℃培养至长出单菌落，挑单菌落进行纯化后接种至 MRS 液体培养基，接种量 1%，37℃，200rpm 培养过夜活化 2 次，用于诱变和发酵实验。

1.2 诱变、传代培养和 L-乳酸发酵

诱变分紫外诱变和 Co^{60} 诱变。紫外诱变取活化菌株用上菌种活化方法接种到 MRS 液体培养基，培养 8h 至菌数 2×10^8/ml，取菌液 12 000 rpm 离心 10min，弃上清，生理盐水洗涤 2 次，收集菌体细胞，生理盐水悬浮，调整菌数至 1×10^8/ml，取 10ml 于 9cm 的平皿中，磁力搅拌下进行紫外照射。紫外灯功率 15W，照射距离 30cm，波长 200～275nm，照射时间分别为 0s、15s、30s、45s、60s、90s、120s。紫外照射在红光下进行，照射后立刻取菌液 100μl 接种到 10mlMRS 液体培养基，37℃下静置暗培养 48h[11]，然后取菌液涂布接种到 YE 筛选培养基，同样温度培养 72h，选择水解圈大的菌落接种到葡萄糖发酵培养基，筛选 L-乳酸高产菌株，或接种到 YE 液体培养基培养，用于进一步诱变。

Co^{60} 诱变同紫外诱变制备菌体细胞悬浮液，取 20ml 菌液置于 100ml 三角瓶进行 Co^{60} 照射，剂量分别为 200Gy，400Gy，600Gy，800Gy，1000Gy，1200Gy，1400Gy，1600Gy，1800Gy，2000Gy。照射后取菌液 100μl 涂布接种 YE 固体培养基，37℃培养 72h，挑选水解圈大的菌落接种葡萄糖发酵培养基进

行 L-乳酸发酵，筛选高产菌株。

传代培养是将诱变得到的高产菌株接种到 MRS 液体培养基，接种量 1%，37℃，200rpm 下培养，每天转接 1 次，记为 1 代，共转接 77 代，抽取 0 代、2 代、14 代、31 代、77 代的菌株进行 L-乳酸发酵实验，观察菌株的遗传稳定性。

L-乳酸发酵是将原始菌株和诱变菌株活化后接种到 MRS 培养基培养 8h 至对数期，菌数至 2×10^8/ml，取菌液转接发酵培养基进行 L-乳酸发酵，接种量 5%。鉴于发酵初始的菌数直接影响乳酸产量，根据种子液的菌数调整接种量，使发酵培养基的起始菌数均为 1×10^7/ml。发酵条件为 37℃，200rpm，期间每 12h 取样测定各发酵指标。

1.3 生物量、L-乳酸浓度和糖分含量测定

生物量用比浊法测定，取菌液测定 OD_{600}，以不接种的培养基调零。L-乳酸浓度测定用 SBA-40C 型葡萄糖-乳酸生物传感分析仪（山东省科学院生产）进行，利用生物膜电极专一性测定样品中的乳酸含量，操作按仪器指南。

糖分含量测定是将培养基或发酵液样品稀释 10 倍，加入 25mg/2ml 的碱性醋酸铅，摇匀，12000rpm 离心 10min，取上清按 DNS 法测定其中的还原糖含量，具体方法参照文献[12]操作，测定结果折算成葡萄糖含量。总糖测定时，样品添加碱性醋酸铅沉降离心后取样 10ml，加 70ml ddH_2O 和 20ml 20% HCl，沸水浴保温 1h，冰水冷却，加 20% NaOH 中和，定容，12000rpm 离心 5min，取上清用 DNS 法测定总糖含量。

1.4 HPLC 分析

发酵产物的光学纯度用手性柱 HPLC 进行分析。呈凝固状的发酵产物先 60℃ 水浴保温液化，12000rpm 离心 10min，取上清液上机分析。所用仪器为 Waters 600 高效液相色谱仪，waters2487UV-VIS 检测器，色谱分离柱为 Phenomenex Chirex-3126 手性柱，流动相为 2mM 硫酸铜和 5% 异丙醇溶液 1∶1 混合液，流动相流速 1.0ml/min，紫外检测波长 254nm，柱温为室温。每次分析的进样量为 20μl。

2 结果与分析

2.1 菌株诱变和筛选

将出发菌株鼠李糖乳杆菌 JCM 1553 进行紫外线诱变，随机挑取照射时间不同的 100 个单菌落接种 MRS 培养基培养活化后转接 YE 培养基进行发酵性能检测，未筛选得到高产菌株。为此，挑选 L-乳酸产量较低、居中和较高的 3 株诱变菌株进一步进行 Co^{60} 诱变，同法随机挑选 100 株突变菌株验证 L-乳酸发酵能力，对发酵产量较高的菌株利用 MRS 平板划线培养纯化 3 次，最终得到 1 株乳酸发酵高产突变菌株，命名为 SCT-10-10-60。

2.2 突变菌株的 L-乳酸发酵遗传稳定性

图 1 结果显示不同代突变株之间的乳酸产量、发酵液的残糖含量和发酵糖酸转化率均差异不大。其中，第 2 代、第 14 代、第 31 代和第 72 代突变菌株的乳酸发酵浓度分别为（130.4±2.1）g/L，（130.7±1.1）g/L，（132.1±4.0）g/L 和（130.0±5.1）g/L，发酵液的残糖含量分别为（1.23±0.03）g/L，（1.27±0.03）g/L，（1.30±0.03）g/L 和（1.18±0.01）g/L，而根据培养基的葡萄糖含量和乳酸发酵产量计算的发酵糖酸转化率分别为（86.93±0.01）%，（87.13±0.01）%，（88.07±0.03）%和（86.67±0.03）%。对菌株之间的乳酸产量、发酵液残糖含量和发酵效率进行 t 检验，显示不同代菌株之间的差异均无统计学显著意义（$P>0.05$），说明选育的 SCT-10-10-60 突变菌株的乳酸发酵性能具有遗传稳定性。

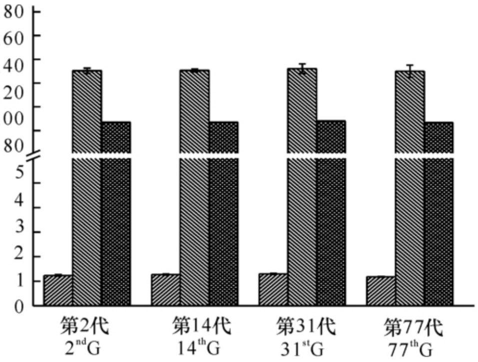

图 1 SCT-10-10-60 菌株的 L-乳酸发酵传代稳定性（结果为两次重复实验的平均值和标准差）

Fig. 1 L-lactic acid fermentation stability of SCT-10-10-60 during generation transfer（The results show the mean value and standard deviation of duplication experiments）

▨：葡萄糖；▨：乳酸；▩：糖酸转化率。

▨：Glucose(g/L)；▨：Lactic acid(g/L)；▩：Conversion ratio(%)

2.3 突变菌株的乳酸发酵性能

以葡萄糖为发酵底物时（图 2A），突变菌株 SCT-10-10-60 发酵 60h 的发酵液乳酸浓度达到最大，为（195.67±10.12）g/L，此后乳酸浓度呈水平变化。而出发菌株 JCM 1553 发酵 60h 的乳酸浓度只有（130.33±3.22）g/L，发酵至 72h 乳酸浓度才达到最大，为（168.33±0.58）g/L，此后发酵液出现凝结，发酵无法继续进行。以发酵 60h 的乳酸浓度计算，SCT-10-60 菌株的乳酸发酵速率比出发菌株高 50.13%，而发酵液的最大乳酸浓度比出发菌株高 16.24%。发酵过程中葡萄糖含量与乳酸浓度变化完全一致，含

量随乳酸浓度的上升同步下降，突变株发酵 60h 的含量降至最低值，为(13.00±0.17)g/L，随后呈水平变化。而出发菌株则在发酵 72h 后发酵液的葡萄糖含量仍高达(37.91±6.54)g/L，这与发酵液凝固发酵终止有关，突变菌株的残留葡萄糖含量较出发菌株低 65.71%。以木薯淀粉为发酵底物时(图 2B)，SCT-10-10-60 菌株发酵 84h 发酵液的乳酸含量达到(203.33±0.58)g/L，较出发菌株 JCM 1553 的(157.02±1.73)g/L 高 29.49%，此后两菌株的发酵液均出现凝固导致发酵无法继续。发酵液的总糖含量则随乳酸浓度的上升而下降，发酵至 84h，突变菌株的发酵液残留总糖浓度降低到(58.61±5.27)g/L，较出发菌株的(94.31±4.03)g/L 减少 37.85%。

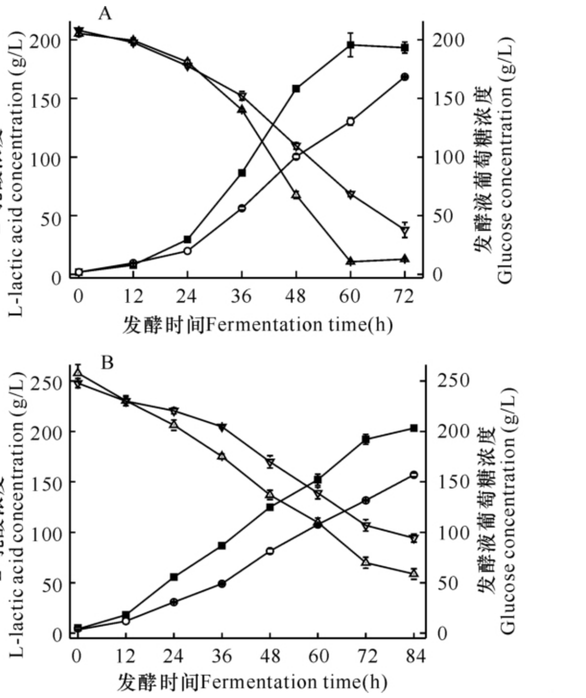

图 2　SCT-10-10-60 菌株 L-乳酸发酵曲线(结果为两次重复实验的平均值和标准差)

Fig. 2　L-lactic acid fermentation curve of SCT-10-10-60 strain(The results show the mean value and standard deviation of duplication experiments)

A：葡萄糖为发酵底物，B：木薯淀粉为发酵底物。-■-：L-乳酸，SCT-10-10-60 菌株；-○-：L-乳酸，JCM 1553 菌株；-△-：葡萄糖，SCT-10-10-60 菌株；-▽-：葡萄糖，JCM 1553 菌株。

A：Using Glucose as substrate，B：Using Cassava starch as substrate. -■-：L-lactic acid，SCT-10-10-60；-○-：L-lactic acid，JCM 1553；-△-：Glucose，SCT-10-10-60；-▽-：Glucose，JCM 1553.

根据发酵培养基的初始糖浓度和发酵液的最大乳酸含量计算两菌株乳酸发酵的糖酸转化率(图 3)，突变菌株显著高于出发菌株，分别高出 17.81%(以葡萄糖为底物)和 24.53%(以木薯淀粉为底物)，结果与图 2 的完全一致。进一步比较突变菌株和出发菌株利用葡萄糖和木薯淀粉两种原料的乳酸发酵情况发现，株利用两种原料发酵的最大乳酸浓度均差异不大，其中突变株 SCT-10-10-60 发酵葡萄糖和木薯淀粉的乳酸最大浓度分别为(195.67±10.12)/L 和(203.33±0.58)g/L，而出发菌株 JCM1553 则分别为(168.33±0.58)g/L 和(157.02±1.73)g/L。但是两菌株利用葡萄糖发酵产乳酸的速率明显高于利用木薯淀粉。突变菌株发酵葡萄糖 60h 的乳酸含量就达到最大值，(195.67±10.12)g/L，比发酵木薯淀粉相同时间的乳酸含量(152.20±5.51)g/L 高 28.56%，而出发菌株发酵葡萄糖 72h 的乳酸含量(168.33±0.58)g/L 也比发酵木薯淀粉同样时间的乳酸含量(131.67±0.58)g/L 高 27.84%。

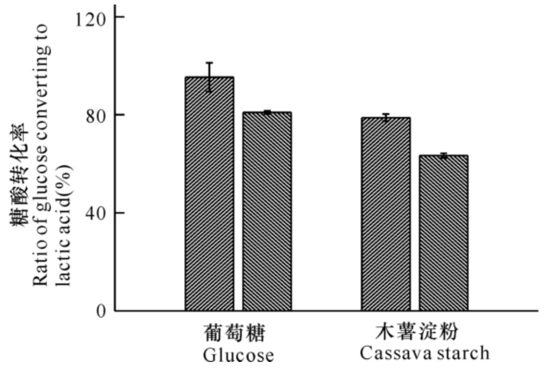

图 3　突变菌株 L-乳酸发酵的糖酸转化率(结果为两次重复实验的平均值和标准差)

Fig. 3　Glucose converting to L-lactic acid ratio of SCT-10-10-60 strain(The results show the mean value and standard deviation of duplication experiments)

▨：SCT-10-60；▧：JCM 1553

所以综合得知，选育得到的 SCT-10-10-60 菌株的乳酸发酵性能显著优于出发菌株。发酵葡萄糖产乳酸的速率显著高于发酵木薯淀粉的原因可能是淀粉中含有抑制菌株乳酸发酵的有害物。但是，突变菌株和出发菌株发酵葡萄糖和发酵木薯淀粉产乳酸的速率差异基本相同(分别为 28.56%和 27.84%)，显示诱变只是提高了菌株的乳酸发酵性能，而对菌株耐受木薯淀粉的性能并没有改变。

2.4　突变菌株的生长速率

图 4 结果显示，以葡萄糖为底物，突变菌株 SCT-10-10-60 的菌体生物量在发酵 12h 后开始显著高于出发菌株，此后差异逐渐增大。发酵至 60h，突变菌株的菌体生物量达到最大，此后基本不变，而出发菌株的菌体生物量保持增长至发酵 72h 终止，两菌株的菌体生物量的增长曲线与乳酸发酵曲线(图 2A)完全相符。突变菌株的最大菌体生物量(OD_{600} ＝31.28)

较出发菌株（ OD_{600} =28.28）高 10.61%。以木薯淀粉为底物，发酵 24h 后突变菌株的菌体生物量开始明显高于出发菌株，此后差异越来越大。菌体生物量的增长与乳酸产量完全一致。发酵至 60h，两者的菌体生物量均达到最大，此后基本保持不变。突变菌株的最大菌体生物量（ OD_{600} =33.70）较出发菌株（ OD_{600} =24.55）高 32.37%。这些结果表明以葡萄糖和木薯淀粉两种原料为发酵底物突变菌株的菌体增长速率均显著高于出发菌株。

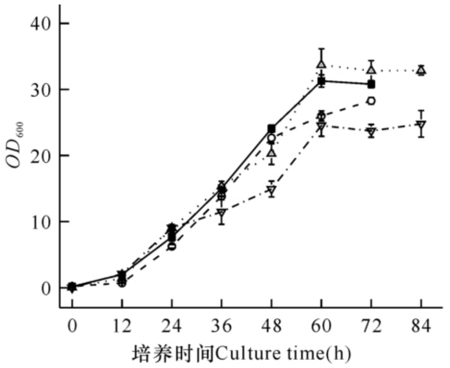

图 4 SCT-10-10-60 菌株的生长曲线（结果为两次重复实验的平均值和标准差）

Fig. 4 Growth curve of SCT-10-10-60（The results show the mean value and standard deviation of duplication experiments）

-■-：SCT-10-10-60 菌株，发酵葡萄糖；-○-：JCM 1553 菌株，发酵葡萄糖；-△-：SCT-10-10-60 菌株，发酵木薯淀粉；-▽-：JCM 1553 菌株，发酵木薯淀粉。

-■-：SCT-10-10-60 strain in glucose；-○-：JCM 1553 strain in glucose；-△-：SCT-10-10-60 strain in cassava starch；-▽-：JCM 1553 strain in cassava starch.

鉴于细菌的乳酸发酵产量与其细胞生长速率成正相关关系[8]，将发酵液的最大乳酸含量除以最大菌体生物量，以观察单位菌体生物量的乳酸产量，结果（图 5）显示，突变菌株和出发菌株发酵葡萄糖的单位菌体乳酸产量分别每 OD_{600} 是（6.06±0.31）g/L 和（5.95±0.02）g/L，发酵木薯淀粉则分别每 OD_{600} 是（6.18±0.02）g/L 和（6.33±0.07）g/L，两菌株发酵葡萄糖和木薯淀粉的单位菌体乳酸产量均差异不大，统计学 t 检验无显著意义（ $P>0.05$ ），表明突变菌株 SCT-10-10-60 乳酸发酵性能的提高主要是细胞增长速率提高所致。

2.5 L-乳酸发酵产物的光学纯度

图 6 结果显示，SCT-10-10-60 和 JCM 1553 两菌株的 L-乳酸含量分别为（96.75±0.23）%和（96.97±0.05）%，两者 t 检验无统计学显著差异（ $P>0.05$ ），显示诱变选育得到的突变菌株和出发菌株一样，进行的是 L-乳酸发酵。

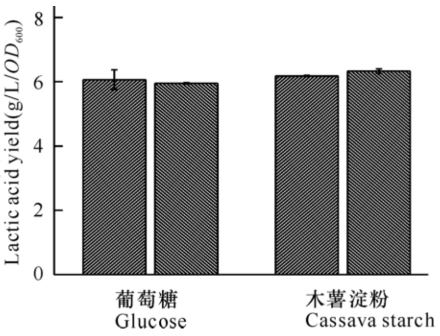

图 5 突变菌株和出发菌株单位菌体生物量的乳酸发酵产量

Fig. 5 Comparison of Lactic acid fermentation yield between SCT-10-10-60 and JCM 1553

▨：SCT-10-10-60；▩：JCM 1553

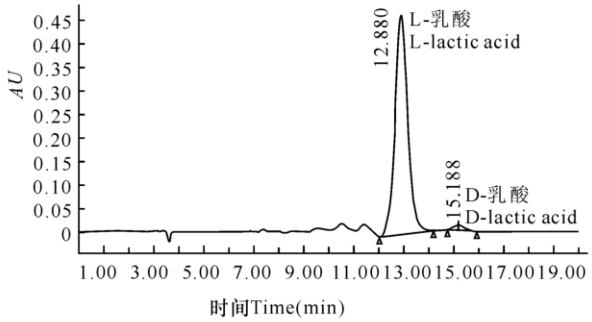

图 6 突变菌株 SCT-10-10-60 L-乳酸发酵产物的 HPLC 手性柱分析图谱

Fig. 6 HPLC chirality chromatogram of SCT-10-10-60 strain fermentation product

3 结束语

为了提高鼠李糖乳杆菌 L-乳酸的发酵性能，本研究以该菌 JCM 1553 菌株为出发菌株，经紫外线和 Co^{60} 照射联合诱变，选育得到 1 株乳酸发酵高产菌株 SCT-10-10-60。经 77 代传代培养证实菌株具有遗传稳定性。对菌株的乳酸发酵性能分析表明，该高产菌株发酵葡萄糖 60h 的发酵液乳酸浓度达到最大值，为 195.67g/L，糖酸转化率达到 95.33%，发酵的最大乳酸产量比出发菌株（168.33g/L）高 16.24%，发酵速率比出发菌株高 50.13%，糖酸转化率比出发菌株（80.92%）高 17.81%。利用木薯淀粉为底物时该菌株发酵 84h 乳酸浓度达到最大值为 203.33g/L，糖酸转化率达到了 78.85%，发酵的最大乳酸产量和发酵速率均比出发菌株（发酵 84h 为 157.02g/L）高 29.49%，糖酸转化率比出发菌株（63.32%）高 24.53%，发酵产物的 L-乳酸含量高达 96.75%，与出发菌株（96.97%）无统计学显著差异（ $P>0.05$ ），表明所选育得到的 L-乳酸发酵高产菌株。计算菌株的单位菌体乳酸产量结果表明，高产菌株乳酸发酵性能提高的主要原因是菌数增长速率加快。目前，国内外

利用鼠李糖乳杆菌发酵木薯淀粉产 L-乳酸的最高发酵浓度为 175.4g/L,糖酸转化率为 78.83%,所用菌株为 CASL[13]。与之相比,本文报道的 SCT-10-10-60 发酵木薯淀粉产 L-乳酸的最大浓度为 203.33g/L,糖酸转化率为 78.85%,指标略高于 CASL 菌株。SCT-10-10-60 菌株具有较高的潜在工业利用价值。

参考文献:

[1] 欧提库尔,穆斯塔帕,张志东,等.L-乳酸的研究进展及其应用前景[J].新疆化工,2005(3):5-18.

[2] 于雷.因组改组技术对鼠李糖乳杆菌的分子育种及其 L-乳酸的发酵[D].长春:吉林大学博士论文,2007.

[3] 王玉华.酪乳杆菌的分子育种及 L-乳酸发酵工艺研究[D].长春:吉林大学博士毕业论文,2006.

[4] Narayanan N,Roychoudhury P K,Srivastava A. L-lactic acid fermentation and its product polymerization[J]. Electronic Journal of Biotechnology,2004,7(2):167-179.

[5] 王博彦,金其荣.发酵有机酸生产与应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,2000: 337-389.

[7] Soccol C R,Stonoga V I,Reimbault M. Production of L-lactic acid by *Rhizopus species* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,1994(1):433-435.

[8] 杨洁彬.乳酸菌-生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社,1996:98-216.

[9] 钱志良,劳含章,王健,等.工业乳酸发酵的近期进展[J].生物加工过程,2005,1(1): 23-27.

[10] Linko Y Y,Javanainen P. Simultaneous liquefaction,saccharification,and lactic acid fermentation on barley starch[J]. Enzyme Microb Technol,1996,19:118-123.

[11] Gao C,Ma C Q,Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass[J]. Biotechnol Advances,2011,29:930-939.

[12] 孙靓,孙菲菲,黄艳燕,等.木薯淀粉发酵生产 L-乳酸的培养条件优化[J].中国酿造,2009(7):33-37.

[13] Wang L M,Zhao B,Liu B,et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 7895-7901.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 151 页 Continue from page 151)

信号肽分泌效率的 1.9 倍,说明信号肽的种类对木聚糖酶 B 表达量具有显著的影响。与黑曲霉菌株液体发酵相比,重组酿酒酵母的木聚糖酶产量有相当程度的下降,分析原因可能是酿酒酵母分泌蛋白质能力较差,导致木聚糖酶 B 产量降低;酶活降低也可能与菌株的性质有关,Gorgens 等发现异源木聚糖酶在营养缺陷的酿酒酵母菌株中分泌严重降低,虽然可以通过在培养基中添加相应的氨基酸来克服,但是酿酒酵母的生长速度仍然缓慢。分析原因可能是细胞既要合成氨基酸,又要分泌蛋白,导致细胞的负担加重[9]。

为解决木聚糖酶 B 在酿酒酵母中表达产量比黑曲霉菌株液体发酵产量要低的问题,下一步的研究可从以下两方面着手:一是克隆黑曲霉中其他木聚糖酶基因,在酿酒酵母中表达。由于黑曲霉中具有多种木聚糖酶基因,木聚糖酶 B 可能不是复合酶系中发挥主要作用的成分。如果克隆黑曲霉中其他木聚糖酶基因,然后进行异源表达,可能会得到较好的结果;二是更换表达宿主 ,如乳酸克鲁维酵母、粟酒裂殖酵母等。乳酸克鲁维酵母已经成功表达多种外源蛋白质,具有分泌能力超强、安全、大规模发酵特征优良、整合表达能力等优点。

参考文献:

[1] 曹云鹤,陈小玲,贺平丽,等.硫色曲霉木聚糖酶基因 *xyn* A 的克隆、表达及酶学性质分析[J].生物技术通讯,2006,17(6):878-881.

[2] 彭林才,陈元彩,付时雨,等.黑曲霉液体发酵产木聚糖酶条件的研究[J].造纸科学与技术,2008,27(3):18-21.

[3] Hartrich D,Nidetzky B,Kulbe K D,et al. Production of fungal xylanse [J]. Bioresource Technology, 1996, 58 (2):137-161.

[4] Li Y,Cui F J,Liu Z Q,et al. Improvemetn of xylanase production by Pelicillium oxalicum ZH-30 using response surface methodology[J]. Enzyme and Microbial Technology,2007,40(5):1381-1388.

[5] Nevoigt E. Progress in Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2008,72 (3):379-412.

[6] 袁洪水,李术娜,张爱莲,等.石英砂研磨法快速提取顶头孢霉染色体 DNA[J].河北农业大学学报,2007,30 (5):8-11.

[7] Horton R M,Hunt H D,Ho S N,et al. Engineering hybrid gene without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension PCR[J]. Gene, 1989, 77 (1):61-68.

[8] 吕世锋,任建伟,张满,等.黑曲霉液体发酵产木聚糖酶的研究[J].山东化工,2011,40(9):8-12,19.

[9] Gorgens J F,Planas J,Zyl W H,et al. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *S. cerevisiae* in defined medium[J]. Microbiol Revs,2004,21(14):1205-1217.

(责任编辑:邓大玉)