

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A23L 1/00

A23C 9/123

C12N 15/56 C12N 15/52

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 89108729.X

[45]授权公告日 2000年7月5日

[11]授权公告号 CN 1054031C

[22]申请日 1989.11.21 [24]颁证日 2000.2.26

[21]申请号 89108729.X

[30]优先权

[32]1988.11.21 [33]US [31]274,582

[73]专利权人 吉斯特·布罗卡边斯股份有限公司

地址 荷兰地佛特

[72]发明人 斯坦利·E·麦恩泽 塞纳·尤斯特

罗宾·M·艾达姆斯-塞尔瓦

唐·V·帕罗姆拜尔

拜林·斯彻米特

[56]参考文献

US4734361 1988. 3.29

审查员 崔 军

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 辛敏忠

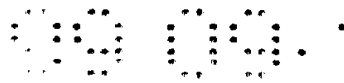
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 发酵食品产品的生产

[57]摘要

本发明公开了制作发酵食品如酸牛奶的新方法。还公开了用于制作发酵食品的新的保加利亚乳杆菌。该菌株是条件敏感的,即在发酵食品的加工条件下其将底物正常代谢成预期化合物,但在发酵食品的常规储存温度下则可减慢代谢速率或降低其活性。这些发酵食品具有较长的储存期限并可较长期保留特有风味。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1.一种制作发酵食品的方法，其包括：

a)选择适于制作发酵食品的微生物，该生物体是未见于自然界的突变微生物，其产生一种非天然存在的变异酶，该酶在正常发酵条件下参与使发酵食品中的底物代谢成所需产物的过程，但在发酵食品的储存条件下则以比由天然存在之微生物产生的、由之衍生突变酶的酶至少低 20 % 的速率代谢底物，然而在发酵食品的生产条件下，与由天然存在之微生物产生的酶相比，其至少约保留 90 % 的代谢速率；

b)向含有底物的未发酵食品中加入步骤 a)中选择的微生物，突变酶参与所需产物的代谢；以及

c)在适于生产发酵食品的条件下发酵步骤 b)的混合物。

2.根据权利要求 1 的方法，其中发酵食品是发酵乳制品。

3.根据权利要求 2 的方法，其中发酵乳制品是酸牛奶。

4.根据权利要求 1 的方法，其中变异酶是 β -半乳糖苷酶。

5.根据权利要求 1 的方法，其中变异酶是透性酶。

6.根据权利要求 1 的方法，其中突变微生物是保加利亚乳杆菌。

7.一种使用于制作发酵食品的微生物发生突变的方法，其包括：

a)选择一种适用于制作发酵食品的微生物；

b)由步骤 a)的微生物中分离编码参与将底物代谢为所需产物之酶的基因；

c)将 b)的基因插入载体中；



d)对步骤c)的许多载体进行致突变处理;

e)选择步骤d)的这些突变,即当用于转化微生物并产生变异酶时,所说的酶在发酵食品的储存条件下以由此见于自然界的该微生物产生的、由之衍生变异酶的酶至少约降低20%的活性,但在发酵食品的生产条件下,与由见于自然界的由之衍生突变酶的该微生物产生的酶相比,变异酶至少约保留其90%的活性;

f)将编码步骤e)之变异酶的选择的基因插入适于生产发酵食品的微生物内并在其中表达之。

8.根据权利要求7的方法,其中选择的微生物是适于制作发酵食品的保加利亚乳杆菌。

9.根据权利要求7的方法,其中在步骤b)中除去的基因编码一种参予将乳糖代谢为乳酸的酶。

10.一种制作酸牛奶的方法,其包括:

a)选择适于制作酸牛奶的嗜热链霉菌和保加利亚乳杆菌微生物,保加利亚乳杆菌微生物是亦见于自然界的突变的保加利亚乳杆菌,该微生物产生一种非天然存在的变异酶,其在酸牛奶的储存条件下以比由见于自然界的保加利亚乳杆菌产生的、由之衍生突变酶的酶至少约低20%的速率参予将糖代谢成乳酸的过程,但在酸牛奶的生产条件下至少约保留90%的这种代谢速率;

b)将步骤a)的微生物加到牛奶中;

c)在适于生产酸牛奶的条件下发酵步骤b)的混合物;以及

d)将步骤c)之发酵混合物的温度降至所需的储存温度。

发酵食品产品的生产

本发明涉及制作发酵食品产品，特别是发酵乳制品的新方法。另外，本发明涉及保加利亚乳杆菌（*Lactobacillus bulgaricus*）的新的突变菌株，及制得这些用于制备酸牛奶及其他发酵乳制品的突变菌株的方法。本发明还涉及新的突变基因及由这些基因转化的微生物。

全世界已经有许多食品依赖于食物制成品中的活性细菌培养物，用于改善风味、防止变质、健康补益和/或维持PH。这些食物产品的例子包括发酵蔬菜制品，如用甘蓝制作的泡菜和由黄瓜制作的酸黄瓜；发酵鱼制品如鱼糊或伯罗德洛（burongdalog）；发酵种子如咖啡或可可豆；发酵富淀粉食品制品；发酵肉制品；发酵木薯粉或发酵果汁。特别重要的是发酵乳制品如酸牛乳、酸奶油、乳脂沙司、酪乳等。这些发酵乳制品在一定程度上要依赖于微生物对乳糖的代谢作用以产生特有风味，并降低PH以保存食品。这些产品对于那些不能耐受乳糖的人，即不能或难于代谢乳糖的人是特别重要的。

酸牛奶是一种极普遍的发酶乳制品。在美国和其他许多国家，从微生物学的角度，将酸牛奶定义为用嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）和保加利亚乳杆菌的混合物对牛奶进行有节制的发酶而制得的终产品。发酶是在35-45℃，最好是大约42-45℃的温度范围内完成的。保温早期，嗜热链球菌迅速生长而控制发酶过程并降低系统的氧化还原作用。保加利亚乳杆菌在早期发酶期间生长缓慢，但可释放足够量的肽类和氨基酸，以刺激嗜热链霉菌生长，而后的生长又产生适度的乳酸、乙酸、乙醛、双乙酰和甲酸等。

当发酵混合物的 pH 低至5.5左右时，将抑制嗜热链霉菌的迅速生长，并有利于保加利亚乳杆菌的生长。据信系统中氧的消耗和存在可供利用的甲酸盐将刺激这种生长。在嗜热链霉菌成分的初始活性的帮助下，保加利亚乳杆菌产生出大部分为酸牛奶之特殊风味所必需的乳酸和乙醛。当 pH 进一步降低至5.0左右或更低时，即可将产品冷却到大约 $10^{\circ}C$ 或 $10^{\circ}C$ 以下储存。虽然在酸牛奶的正常储存条件（ $4-10^{\circ}C$ ）下乳酸的产生速率降低，但根据所用菌株和加工方法的不同，经过3或4周后不断产生的乳酸将使酸牛奶产品的味道变得很酸，以至很难吃。进一步减慢和抑制储存期间乳酸的产生，同时维持存活的生物体的尝试基本上没有获得成功。虽已试用了防腐剂，但又造成影响存活力或杀死酸牛奶发酵微生物等不期望的副作用。在使用直接诱变微生物（如通过化学或其他诱变技术）方法所作的尝试中，不仅仅产生了在低温和低 pH 下降低乳酸产生的微生物，而且这些微生物还在正常发酵温度下也成比例地减少乳酸的产生及生长速度减慢，因而产生不能令人满意的酸牛奶或者是限于由这些被突变之菌株（具有未知的作用）所产生的产品，这些微生物不能很容易地转移到新的酵母中（见Meiji Milk Products公司的美国专利4,734,361号，其中描述了一种分离天然存在的保加利亚乳杆菌突变株的方法）。这种温度敏感的微生物于 $10^{\circ}C$ 下7天产生了不到0.1%的乳酸。

根据发明的说明书，该方法是依赖于一种已存在的菌株，并且迄今已知只存在一种这样的天然分离株，即O.L.L.1074。目前还没有一种符合预期的质地和味道要求，同时在储存温度下保留长期的低代谢率、具有明确的突变位点并可转化为新的发酵剂的培养物，特别是保加利亚乳杆菌培养物。

因此有必要构建一种保加利亚乳杆菌，其可在酸牛奶的储存温度下降低乳酸的产生，并且在酸牛奶生产条件下保留合适的活性水平，其突变是明确的并可从任何一种保加利亚乳杆菌菌株转移到新的酵母中，并且在酸牛奶产品中仍是存活的。另外，还有必要使这种微生物在低于约 20 °C 或在大约 pH 5.5 或 5.5 以下时产生较少的酸，以便在生产期间有更大灵活性，并在生产后更易于处理。再者，它应有助于制造在达到一定温度和 / 或 pH 范围后即可使发酵减慢或终止，而不必使用快速冷冻来降低酸生成速率的发酵产品。

本发明的目的是提供新的微生物及得到它们的方法，这些微生物被用于制备发酵食品制品。在发酵食品的储存温度下，这些微生物的代谢率较正常代谢率低，但在发酵食品的生产条件下又能保留它的活性和存活力。

本发明的另一个目的是提供新的含活微生物的发酵食品产品，所说的微生物在发酵食品的正常储存条件下产生过多酸度或异味的速率比以前的含活微生物的发酵食品更慢。

本发明的另一个目的是提供生产发酵食品的方法。

本发明的再一个目的是提供新的微生物，该微生物在酸牛奶或其他食品产品的储存条件下具有较低的乳酸产生能力，但同时该微生物在生产和储存条件下基本上保留了它们的活性和存活力。本发明还提供了制得这些微生物的方法。

本发明的再一个目的是提供生产酸牛奶或其他食品的方法，该方法简化了产品的加工处理步骤。本发明还提供了含活微生物的酸牛奶或其他食品产品，其在约 20 °C 和 / 或约 pH 5.5 下储存是稳定的。因此，本发明包括下述的制作发酵食品制品的方法：

a) 选择一种适于制作发酵食品的微生物，该微生物为自然界没有的突变微生物，其可产生一种非天然存在的变异，这种酶在正常发酵条件下，将底物代谢转变为在发酵食品中所需的产物；但在发酵食品的储存条件下，该变异酶则以至少比由相应的天然微生物产生之酶（变异酶即是由之衍生的）低 20% 的速率代谢底物，但在发酵食品的生产条件下，与所说的由天然生物体产生的酶相比，至少能保留 90% 的这种代谢的必需速率；

b) 将步骤 a) 中选择的微生物加到未发酵的食品中，所说的食物制品中含有能被变异酶代谢成为所需产物的底物；以及

c) 在利于生产发酵食物产品的条件下将步骤 b) 得到的混合物发酵。

另外，本发明涉及包括适于生产发酵食品之自然界没有的突变微生物的新微生物，该微生物产生一种非天然存在的变异酶，用以在发酵食品的储存条件下，在发酵食品中以至少比由天然微生物产生之酶（变异酶即是由之衍生的）低约 20% 的速率将底物代谢成所需产物，同时在发酵食品的生产条件下，与天然存在之微生物产生的酶相比，至少保留约 90% 生产发酵食品所需要的代谢速率。

本发明还涉及制作酸牛奶的方法，该方法包括：

a) 选择适于制作酸牛奶的嗜热链霉菌和保加利亚乳杆菌，其中保加利亚乳杆菌是自然界没有的突变株，其可产生一种非天然存在的变异酶，它将在酸牛奶的储存条件下以比天然保加利亚乳杆菌产生的酶至少低约 20% 的速率将乳糖代谢为乳酸，但在酸牛奶的生产条件下至少保留约 90% 的这种代谢速率。

b) 向牛奶内加入步骤 a) 的微生物；

- c) 在适于生产酸牛奶的条件下将步骤 b) 的混合物发酵；以及
- d) 将 c) 之发酵混合物的温度改为所需的储存温度。

再者，本发明涉及诱变用于制作发酵食品之微生物的方法，该方法包括：

- a) 选择一种适用于制作发酵食品的微生物；
- b) 由步骤 a) 的微生物中分离编码参予将底物代谢为所需产物之酶的基因；
- c) 将 b) 的基因插入可复制的质粒中；
- d) 对步骤 c) 的大多数质粒进行突变；
- e) 选择步骤 d) 的这些突变，当其被用于转化微生物并产生一种变异酶时，所说的酶在发酵食品的储存条件下具有比由天然微生物产生之酶（突变酶即是由之衍生的）至少低约 20% 的速率的降低了的活性，但所说的变异酶在发酵食品的生产条件下，与由天然存在之微生物产生的酶（突变酶即是由之衍生的）相比，其至少保留约 90% 的活性；以及
- f) 在适于生产发酵食品的微生物中插入并表达步骤 e) 所筛选的突变基因。

该方法最好在去除相应的天然酶之后进行。

本发明还涉及包含非天然存在之活突变微生物的新的发酵食品产品，所说的微生物可产生一种非天然存在的变异酶，该酶可在发酵食品的正常储存条件下以至少比天然微生物产生之酶（变异酶即是由其衍生的）约低 20% 的速率将底物代谢为所需的产物，但其中所说的变异酶在发酵食品的生产条件下，与由天然微生物产生的所说的酶相比，至少保留约 90% 的代谢速率。

本发明还涉及一种不能用一般突变方法得到的、可由已有培养物或天然存在之微生物中分离的、适于生产酸牛奶或其他乳制品的活的突变保加利亚乳杆菌，其可在酸牛奶的储存条件下（最好低于约 20℃，特别是 4 - 10℃ 或 pH 约 5.5 或更低），以比由天然保加利亚乳杆菌（变异酶由其衍生而来）产生的酶至少约低 20% 的速率将乳糖代谢成乳酸，但在酸牛奶的生产条件下可使这种代谢的速率至少保留约 90%。

发酵食品是其中保留有活性细菌培养物的食品，其中活性细菌培养物所代谢产生的某特定底物产生预期的风味，并使其 pH 达到适于保存该食品的低 pH 值。如上面讨论过的，这类食品及生产它们的微生物是普通熟知的，例如：蔬菜制品可使用假单孢菌属、黄杆菌属、气杆菌属、芽孢杆菌属、明串珠菌属和乳杆菌属；发酵鱼制品可使用肠膜状明串珠菌、短乳杆菌（*Lactobacillus brevis*）、啤酒小球菌（*Pediococcus cerevisiae*）、胚芽乳杆菌（*Lactobacillus plantarium*）及芽孢杆菌属；发酵种子制品可使用纳豆芽孢杆菌（*Bacillus natto*）；发酵富淀粉材料可使用棒状杆菌属；发酵肉制品可使用乳杆菌属；发酵瓜制品可使用棒状杆菌属、白地霉（*Geotrichum candidum*）、明串珠菌属；发酵果汁可使用酵丝菌属（*Zyomonas*）；酱油使用曲霉属；果酒和啤酒使用酵母属。因为其他种属的细菌、酵母和真菌也用于食品生产，所以很显然它们也包括于本发明的范围内。优选的发酵食品产品是发酵乳制品，特别是酸牛奶。

本发明使用的所需底物是选择的微生物能在生成其最终化合物的代谢途径中代谢，以产生所需口味或 pH 的底物。例如，当使用保加利亚

乳杆菌生产酸奶时，所需的底物是乳糖或某种可代谢为乳酸的中间产物。

本文所说的正常储存条件是指物理条件，如人们在食用前保存食品时所要求的 pH 或温度。

以前人们为了在不影响发酵食品制作能力的情况下，改善用于制作发酵食品之食用微生物（如保加利亚乳杆菌）储存性能的努力几乎没有获得成功。试图通过传统的突变技术，如使用化学突变剂和紫外光等改变微生物如保加利亚乳杆菌的代谢途径，已作了广泛的工作，但这些方法在降低储存条件下代谢速率的同时，还伴有在生产条件下代谢速率不合适的改变，或者十分重要的是，它们仍然是不明确的或仍然不能转移到保加利亚乳杆菌的其他酵母菌株。业已预外地发现，当在体外使编码代谢途径中某一种酶的基因发生突变时，即可由微生物中除去该基因，基因的化学突变将产生一定比例的变异体，当后者在被转化的微生物内表达时，将在约 20°C 和/或约 $pH 5.5$ 下使代谢率至少降低约 20% ，但在发酵食品的生产条件下至少保留约 90% 的活性。在优选的环境中，选择的突变体基本上没有改变被修饰酶的活性。检测改变的程度是对照天然存在的原始酶进行的。当然，有可能在经过基因突变的几次连续传代后实现这些突变，这样直接比较连续突变体的代谢速率，以乎不能显示产生了所需的改变。但仍可与天然存在的生物体进行比较，以发现所需突变中发生的改变。然后可用突变的基因转化另一相似的微生物（或其他所需的微生物），以使用本领域中已知的方法获得本发明的微生物。

与本发明使用的适于制作酸牛奶或其他发酵乳制品的保加利亚乳杆菌一样，在各种商业应用中，广泛利用了天然存在的食用微生物。

如上所述，保加利亚乳杆菌是作为一种生产酸牛奶或其他发酵乳制品使用的。保加利亚乳杆菌可产生许多使乳糖转化成乳酸的酶。十分重要的是负责将乳糖转输到保加利亚乳杆菌内的透性酶和将乳糖直接代谢成为葡萄糖和半乳糖的 β -半乳糖苷酶。葡萄糖将进一步被代谢，参与该代谢途径的其他酶包括葡萄糖激酶、磷酸葡萄糖异构酶、磷酸果糖激酶、醛缩酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸甘油酸激酶、磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶、丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶（Henry R. Mahler and Eugene Cordes, In Biological Chemistry, Harper & Row, New York, 1966）。在其他生物体中的其他代谢途径，如磷酸戊糖途径或 Entner-Doudoroff 途径则可使用其他一些酶（Gerhard Gottschalk, "The Bacterial Metabolism", 1979）。透性酶和 β -半乳糖苷酶特别重要是因为它们在乳糖转变为乳酸的代谢途径中，它们是该代谢途径中仅有的两种基本上与某些其他代谢功能无关的酶。

适于突变的乳酸途径中的基因是编码乳糖透性酶基因（参见 Lactose Transport System of *Streptococcus thermophilus*: A Hybrid Protein With Homology to the Melibiose Carrier and Enzyme III of PEP-Dependant Phosphotransferase Systems from Genencor attached, B. Poolman, T. Royen, S. Mainzer and B. Schmidt., J. of Bacteriol. (印刷中) 该文列为参考文献; Molec Gen Genet. PP. 159, 239-248 (1978); Nature, Vol. 283, PP. 541-545, February 7, 1980) 和 β -半乳糖苷酶基因（参见 The Cloning, Expression

and Sequencing of the Beta-Galactosidase Gene From Lactobacillus Bulgaricus Into E. Col: , from Genencor Presented at the Second Symposium on Lactic Acid Bacteria on September 22 - 25 , 1987 , Wageningen , The Netherlands by Schmidt, B. et al. , J. of Bacteriol. (印刷中) 该文列为参考文献)。说明书和权利要求中所说的载体是指至少包括编码所选用酶之基因的基因顺序。其存在形式可以是线性 DNA 或某种类型的质粒等。载体可以是复制型的，如可被插入到染色体中复制，或者是一段基因序列，该序列必须与某些其他基因顺序或穿梭机制结合方可以复制型插入微生物内。

当生产本发明的突变生物体时，可在体外使用各种诱变剂使载体发生突变。例如实施例中举例说明的单或双链化学诱变方法。致突变的其他方法包括 α 硫醇错误掺入法 (alpha thiol misincorporation)、盒式诱变法 (cassette mutagenesis) 或定点突变等其他方法。申请人已注意到，在 1000 - 5000 个转化株中大约有 1 个似乎达到了本发明的预期结果。结果是可以再现的，关键是要筛选大量的突变体。为了在适当时间内检测如此大量的变异体，可将突变基因重新插入一可复制并可表达的载体内，如插入质粒中或整合到被试生物体的染色体中。一种适用的优选方法 (同时参见实施例) 包括使用 β - 半乳糖苷酶基因构建质粒，在体外对质粒进行诱变，然后转化一相当易于复制的微生物如大肠杆菌 (或保加利亚乳杆菌，或干酪乳杆菌)。可筛选已转化的微生物，看反应条件是否满足所要求的条件。如果该克隆正常产生了

一种与被表达者相似的酶，则可认为已从宿主体内除去了表达该相似酶的基因。该实例中，可由宿主保加利亚乳杆菌中除去天然存在的 β 半乳糖苷酶基因。

主要筛选两种类型的优选突变体：即温度敏感条件突变体（ C^S ）和 pH 敏感条件突变体（ pH^S ）；但也可选用其他参数。显然某些结合类型的突变体也是可取的。例如，用于生产酸牛奶时，温度条件突变体将表现在低于约 20°C 时乳糖的代谢率至少下降 20% ，而在加工温度下，即 $35\sim 45^\circ\text{C}$ 时，其活性只下降 10% 或不到 10% 。同样， pH 值条件突变体用于生产酸牛奶时，当 pH 约为 5.5 或更低，与野生型酶相比其所具有的活性至少降低约 20% ，而当发酵食品生产开始时的 pH 下则至少保留约 90% 活性。

一旦由变异酶中选择了适当的基因顺序，即可以一种便于其复制的方法，即通过质粒或同源基因组整合重新插入选用的微生物体内，另外，如上面已提到的，最好预先除去相应的天然基因顺序。然后可使用常规技术用本发明转化的微生物（没有引入任何外来 DNA ，因为该微生物内只有突变的酶被取代）生产改善了储存期的发酵食品。在一优选方案中，发酵食品在经过长期储存后，比不是用本发明方法制作的发酵食品有更长的储存期限、更好的味道和质地。

下列实施例旨在进一步阐述而不是限定本发明。本领域内的熟练技术人员将会看出，实验很容易再现，并因此没有寄存生物体或基因。本领域内的熟练技术人员可以在不违背本发明原则的情况下设计其他筛选方法或使用其他直接诱变技术。

β - 半乳糖苷酶基因的化学诱变

1. 双链方法

质粒构建: P K K 2 2 3 - 3 载体上的 7 K b 插入段上携带有保加利亚乳杆菌 β 半乳糖苷酶基因 (Pharmacia Molecular Biologicals, Piscataway, New Jersey 0 8 8 5 4) , 从中删除出个 BamHI 片段。所得质粒具有由 P K K 2 2 3 - 3 载体去除的 tac 启动子 (deBoer, H. A. et al., PNAS, Vol. No. 7 8 , P g . 2 1 , 1 9 8 3) , 而且现在 β 半乳糖苷酶基因位于 4 . 3 K b Hind III - BamHI 片段上。

诱变: 将溶于 1 0 m M Tris-Hcl 和 1 m M Na₂ EDTA (PH 7 . 6) 的质粒 DNA (~ 5 μ g) 加至终体积为 0 . 1 ml 含 7 μ l 1 M 磷酸钾 (PH 5 . 2) 、 2 0 μ l 3 M 乙酸钠 (PH 4 . 5) 和水的溶液中。然后向该 DNA 溶液内加入 0 . 1 ml 溶于乙二醇的 2 M 羧胺 (HA) 溶液。于 6 5 或 7 5 ° C 下保温, 并在 0 至 1 0 分钟的不同时间取出 2 0 μ l 等分样品。立即用 2 μ l 3 M 乙酸钠和 5 0 μ l 乙醇沉淀等分样品中的 DNA。将干燥的沉淀物溶解于 3 0 μ l 1 0 m M Tris-Hcl 和 1 m M Na₂ EDTA (PH 7 . 6) 中并用以转化大肠杆菌 J M 1 0 5 、 J M 1 0 8 和 J M 1 0 9 细胞 (Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., "Transformation Protocol", In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, P. 2 5 0 , 1 9 8 3) 。将转化混合物铺敷在含有 X - gal (5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吲哚基 - B - D 半乳糖苷, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) 和 5 0 μ g / ml 羧苄青霉素的 Luria 琼脂皿上。按后面讨论的方法筛选突变体。

2 . 单链方法

质粒构建: 将 4 . 3 k b Hind III - BamHI 片段上的 β 半乳糖苷

酶基因克隆到 pUC118 中。加入 M13 辅助噬菌体后由该克隆中分离单链 DNA (pUC118 载体有一个插入到 pUC118 之 Nde I 位点内的 470 bp M13 复制子)。使用寡核苷酸定点突变方法分别在核苷酸 23 和 441 处引入唯一的 Pst I 和 Xba I 位点。将该突变体中的单链 DNA 用于下述的化学诱变。

诱变：首先将 50 μ l 乙二醇加入 150 μ l 含 1 M 盐酸甲氧胺 (MA) 的 1 M 乙酸钠 (pH 5) 中。然后加入 10 μ l (\sim 5 μ g) 单链 DNA，并于 50 $^{\circ}$ C 下在暗处保温 45、60、90 或 120 分钟。加乙醇沉淀以终止反应，然后转化 JM105 细胞并按上述方法铺板。在含有 X-gal 的培养基上铺敷转化混合物并按下述方法筛选突变体。

温度条件突变体的选择

将一张硝酸纤维素滤膜置于含羧苄青霉素的 Luria 琼脂平皿上。在其上散涂转化的大肠杆菌并于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。由该主平皿制备两个硝酸纤维素复印滤膜。将一个滤膜放在 37 $^{\circ}$ C 下的 X-gal 平皿上并根据兰色菌落的显现确定 β 半乳糖苷酶活性。另一个滤膜则放在含羧苄青霉素的 Luria 琼脂平皿上，于 37 $^{\circ}$ C 培养约 20 小时后置于 4 $^{\circ}$ C 下过夜。由平皿中取出滤膜并放在 X-gal 平皿上于 4 $^{\circ}$ C 下过夜。本发明的菌落即是在 37 $^{\circ}$ C 下显兰色而在 4 $^{\circ}$ C 下显白色的菌落。

第二次诱变

由在 37 $^{\circ}$ C X-gal 平皿上显兰色的 C^S4 变异体表现型开始并使用 MA 作为诱变剂，通过第二次诱变产生另外一些突变体。

诱变结果

使用双链和单链诱变方法筛选了大约 12,000 个菌落。在一

典型实验中，总菌落中有0.1-0.2%在37℃下显白色，有2-4%在4℃时显白色。经在高和低温度下重新铺板以双重检验于37℃下显兰色、4℃下显白色之菌落的温度条件表现型。由这些菌落中分离质粒DNA并用以转化JM105和JM109大肠杆菌细胞，从而由质粒贡献一稳定的温度条件突变β半乳糖苷酶活性。为了定位突变区域，将突变体基因的各限制性片段与野生型片段交换。下面给出3种突变体的特征：

CS1和CS2：由NcoI消化野生型质粒和由该突变体中分离的质粒。然后用聚丙烯酰胺凝胶分离1282bp NcoI片段和载体片段（携带β半乳糖苷酶基因的其余部分）。将突变型1282bp片段连接到野生型载体中，并将1282bp野生型片段连接到突变载体中。具有1282bp NcoI突变型限制性片段的构建体是温度条件突变体，而另一构建体则显示野生型表型。因此，该突变体中温度条件突变位于保加利亚乳杆菌β半乳糖苷酶结构基因的核苷酸792和2074之间（NcoI片段）。

CS2：由野生型和突变质粒中除去BamHI-XbaI片段上的β半乳糖苷酶结构基因。将野生型结构基因连接到突变体启动子上，并将突变体的结构基因连接到野生型启动子上。只有含突变结构基因的构建体具有温度条件表现型。因此，该突变体中的突变是在基因的结构部分而不是在启动子区域中。

CS3：使用上述检验CS2的同样方法，证明CS3突变体中的突变也是位于结构基因内，而不是启动子区域中。

下表列出了筛选获得的27个β半乳糖苷酶突变体的结果：

β - 半乳糖苷酶突变体的表现型

突变体	质粒	诱变剂	24 小时后菌落颜色*	
			37 °C	4 °C
对照 (Wt)	pKK223-3 或 pUC118	--	兰	等
C ^S 1	pKK223-3	H A	淡兰	白
C ^S 2	pUC118	M A	兰	白
C ^S 3	pUC118	M A	兰	白
C ^S 4	pUC118	M A	兰	淡兰
C ^S 5	pUC118	M A	兰	白
C ^S 6	pKK223-3	H A	兰	淡兰
C ^S 7	pKK223-3	H A	淡兰	淡绿
C ^S 8	pKK223-3	H A	淡兰	淡绿
C ^S 11	pKK223-3	H A	淡兰	淡绿
C ^S 12	pKK223-3	H A	兰	淡兰
C ^S 13	pKK223-3	H A	淡兰	淡兰
C ^S 14	pKK223-3	H A	淡兰	淡兰
C ^S 15	pKK223-3	H A	兰	淡兰
C ^S 16	pKK223-3	H A	兰	白
C ^S 18	pKK223-3	H A	淡兰	白
C ^S 19	pKK223-3	H A	淡兰	白
C ^S 20	pKK223-3	H A	兰	淡绿
C ^S 21	pKK223-3	H A	兰	淡绿
C ^S 22	pKK223-3	H A	淡兰	淡绿

C ^S 23	pKK223-3	H A	淡兰	淡兰
C ^S 24	pKK223-3	H A	兰	白
C ^S 25	pKK223-3	H A	兰	白
C ^S 26	pKK223-3	H A	兰	白
C ^S 28	pKK223-3	H A	兰	白
C ^S 29	pKK223-3	H A	淡兰	淡绿
C ^S 31	pKK223-3	H A	兰	淡绿
C ^S 32	pKK223-3	H A	兰	淡绿

* 根据菌落在 X - g a l 平皿上呈现兰色的程度确定 β 半乳糖苷酶活性；即，兰色 = 野生型活性；白色 = 无活性或没有 β 半乳糖苷酶活性；绿色 = 中等活性。

上表中列出的所有温度条件突变体的菌落，在 X - g a l 平皿上 4 °C 培养 1 - 3 周后均变为浅或中度兰色。

PH 敏感性突变体的选择

相似地按下方法筛选同样具有 PH 敏感性的突变：

因为有节制的发酵通常是在 PH 5 . 5 或低于该值时终止，所以可以认为：在 PH 约为 5 . 5 - 6 . 0 时开始呈现预期特征（酸化速率降低）的突变体在 PH 约为 4 . 5 或更低的生产 and 储存条件下应是适用的。

将硝酸纤维素滤膜置于 Luria 琼脂 - 羧苄青霉素平皿上。在其上散涂转化的大肠杆菌并使菌落于 37 °C 下生长过夜。由该主平皿制备两个硝酸纤维素复制滤膜。用氯仿处理 3 分钟以溶解细胞。将对照滤膜在 25 ml 含 20 m M MgSO₄ (PH 7)、10 m M NaH₂PO₄、

50 mM NaOAc 的缓冲液中放置 15 分钟并移入含 0.2 ml 2% X-gal 的同种缓冲液中。另一滤膜则在一低 pH 值 (5 - 5.5) 的含 100 mM NaH_2PO_4 、2 mM MgSO_4 、50 mM NaOAc 的缓冲液中放置 15 分钟。然后移入含 X-gal 的低 pH 缓冲液中。在 pH 7 时显兰色、pH 4.5 或 5.0 时显白色的菌落即为阳性菌落。

然后删除宿主 β 半乳糖苷酶 (或透性酶) 基因并将突变基因重新掺入保加利亚乳杆菌内。操作方法是本领域内熟练技术人员已知的。如可参见 *Journal of Bacteriology*, May 1984, PP. 411-418 和 *Journal of Bacteriology*, November 1988 PP. 5102-5109 中所述的方法, 从而产生重新掺入了必要之突变基因的突变型保加利亚乳杆菌。

结果

低 pH β - 半乳糖苷酶突变体

来源: 自甲氧胺诱变的突变株 C^S 4 中分离

第一次筛选: 在 pH 5 时进行

表现型

突变体	40 分钟后		24 小时后	
	pH 5	pH 7	37 °C	4 °C
PH ^S 8-1	白	白	兰	浅绿白
PH ^S 8-2	白	兰	淡绿	淡兰
PH ^S 8-3	白	兰	兰	淡兰
PH ^S 8-4	白	兰	未测定	
PH ^S 8-5	白	兰	兰	兰

PH ^S 8-6	白	兰	兰	兰
PH ^S 8-7	白	兰	兰	兰
PH ^S 8-8	白	兰	淡兰	淡兰
对照组				
pKK223-3	淡兰	兰	兰	兰

第二次筛选：在PH 5.5 时进行

表现型

突变体	30 分钟后		24 小时后	
	PH 5.5	PH 7	37 °C	4 °C
PH ^S 2-1	白	兰	浅兰	浅兰
PH ^S 2-2	白	兰	浅兰	兰 + 白
对照组				
pKK223-2	浅兰	兰	兰	兰

突变型和野生型 β -半乳糖苷酶的纯化和特征^{确定}

可按下列程序由大肠杆菌中纯化突变型和野生型酶：

细胞溶胞产物

↓

高速离心

↓

除盐

↓

辛基琼脂糖疏水层析

↓
除 盐
↓
MonoQ 离子交换层析
↓
浓 缩
↓
Superose 12 筛分柱
↓
纯蛋白

在 10 - 40 °C 的温度变化范围下检测以该方法纯化之酶活性。