

半定向选育提高单细胞蛋白 营养品质的研究

王 武

沈建华

缪振华

(无锡轻工业学院发酵系)

(南通发酵厂)

(无锡轻工业学院发酵系)

摘 要

利用酒精废醪培养假丝酵母作单细胞蛋白,对提高假丝酵母的蛋白质含量和含硫的氨基酸含量的半定向选育方法进行了摸索,使目的变异株的蛋白质含量平均提高了14%,其中一个变异株在蛋白质含量提高的同时,蛋氨酸含量提高了约40%。

主题词:酒精废水;单细胞蛋白;蛋白质;蛋氨酸

0 前 言

在利用酒精废醪培养假丝酵母作为单细胞蛋白的过程中,我们注意到除了选育具有最佳培养优势的菌株外,还从提高单细胞蛋白的营养价值出发,注意选育蛋白质含量尽可能高,必需氨基酸含量比尽可能适当的生产菌株。关于氨基酸含量比适当与否,事实上取决于不同饲喂动物的需求性,如甘氨酸是家禽的必需氨基酸,对于猪则不然,联合国食物与农业组织(FAO)在参照了全蛋的必需氨基酸含量比后,制定出单细胞蛋白必需氨基酸含量标准^[1](见表1),表1中我们将我们所筛得的假丝酵母W的必需氨基酸含量比与之进行比较,可以看出含硫氨基酸含量偏小。

表1 假丝酵母W的必需氨基酸含量比与标准比较

含量 g/100g 蛋白质 蛋白质来源	必需氨基酸	赖 氨 酸	苏 氨 酸	半 胱 氨 酸	蛋 氨 酸	缬 氨 酸	异 亮 氨 酸	亮 氨 酸	苯 丙 氨 酸	色 氨 酸
FAO参照标准		4.2	2.8	2.0	2.2	4.2	4.2	4.8	2.8	1.0
假丝酵母W		3.7	2.8	0.5	1.0	2.6	2.4	3.6	2.4	—

本文1988年11月4日收到

Reed, G^[2]亦认为以假丝酵母作为单细胞蛋白,其营养价值的限制性因素在于含硫氨酸的含量比太低,为了进一步提高假丝酵母的营养价值,我们半定向地选择紫外线作为诱变剂,并初步摸索出以碘染色法初筛蛋白质含量增高的变异株,以及以缺硫平板和硫梯度平板初筛含硫氨基酸含量增高的变异株的选育方法。实验结果表明这种选育方法是行之有效的。

1 材料与方法

1.1 菌种

假丝酵母W 假丝酵母N₆(自筛)

1.2 培养基

1.2.1 酒糟培养基A 取低温蒸煮酒精废醪离心(7000转/分)10分钟,倾出清液作培养基,若加2.5%琼脂,调pH至4.5,则可制成酒糟固体平板。

1.2.2 缺硫培养基B 葡萄糖20克,尿素2.4克,磷酸二氢钾6克,磷酸氢二钠1.8克,复合维生素B 0.05克,无硫微量元素溶液5毫升,以蒸馏水定容至1升,若加琼脂1.8%,则可制成固体培养基。

1.2.3 含硫梯度平板C在平皿中注入10毫升固体培养基B,倾斜放置,使之凝固成斜坡状,再加上含200微克硫酸钠/毫升的培养基B,将平皿平置使之凝固成水平面。

1.2 方法

1.2.1 菌体干重测定 吸假丝酵母培养液1毫升于指管中,15000转/分下离心10分钟,倾去上清液后,将指管置于80℃干燥8小时,以电光天平进行减量法称重。

1.2.2 菌体蛋白质含量测定 双缩脲法^[3]。

1.2.3 菌体各氨基酸含量测定 离心酵母菌体,洗涤细胞,重复两次,配成菌液为20毫克干重/毫升的菌悬液,吸1毫升菌液于安瓿管中,加1毫升12摩尔盐酸真空下密封安瓿管,105℃下水解24小时,真空抽去盐酸后,以蒸馏水溶解水解物,过滤,定容至100毫升用氨基酸自动分析仪测定氨基酸含量。

1.2.4 紫外线诱变处理 假丝酵母培养于培养基A中20小时后,离心收集细胞,并用0.75%的灭菌氯化钠溶液洗涤,重复两次,然后配制成 10^7 个细胞/毫升的菌体细胞悬液,取5毫升上述菌悬液置于平皿中,以15瓦紫外灯,距离40厘米照射处理,处理后,加5毫升完全培养基,34℃,保温1小时,后涂布于平板。

1.2.5 碘液染色法 在平板上小心倾注入6毫升0.2%的碘液(含碘0.2%,碘化钾0.4%),半分钟后,倒去碘液,野生型酵母菌落经染色后呈棕红色。

2 结 果

2.1 出发菌株基本特性

从自然界筛得的可利用酒精废醪的菌株中,我们选出两株比生长速率较大,蛋白质含量较高的假丝酵母N₆和W菌株作为本实验的出发株。这两个菌株培养于加有0.1%尿素的低温蒸煮工艺酒糟滤液(COD为23576毫克/升)中,它们的基本特性如表2所示。

表2 出发菌株的基本特性

菌株	得率 (g/l)	COD 去除率 (%)	酸度去除率 (%)	比生长速率	蛋白质含量 (%)	蛋氨酸含量比 (%)	半胱氨酸 含量比 (%)
N ₆	6.2	45.6	85.3	0.70	51	0.47	0.47
W	7.9	62.4	96.3	0.72	56	0.98	0.43

从表2可以看出, 菌株W的大多数指标皆优于N₆, 但是其含硫氨基酸含量比仍较低。

2.2 诱变及筛选步骤

整个诱变筛选的主要步骤见图1。从酒糟培养基A的培养液中离心分离到的菌株N₆和W细胞按上述方法接受紫外线照射60秒钟, 菌体存活率约为2.5%。菌悬液涂布于培养基B平板上, 33℃, 培养3天。由于培养基B中只含有基量无机硫源, 经诱变而出现的含硫氨基酸含量增高的变异株将因硫源不足而形成小菌落。培养结果, 菌株N₆的500个菌落中出现了18个小菌落, 菌株W的1100个菌落中出现了46个小菌落。我们进一步制备了加硫酸钠分别为0微

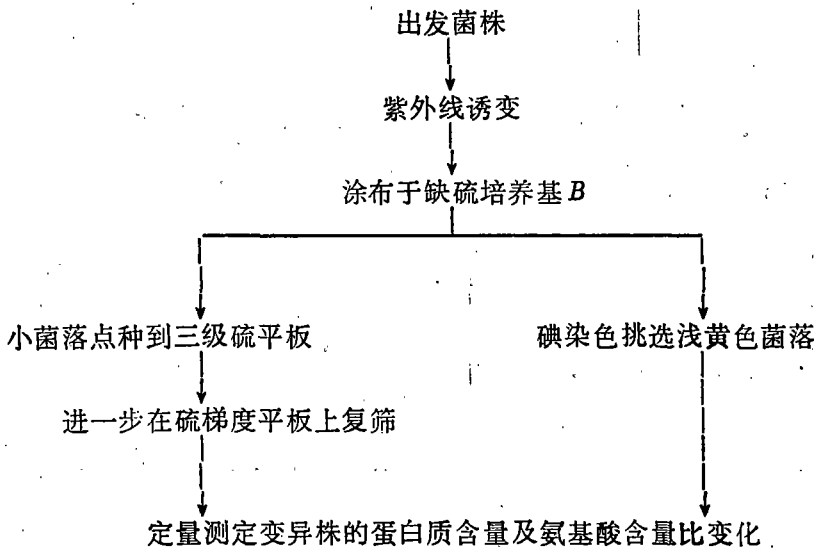


图1 诱变筛选主要步骤

克/毫升、100微克/毫升和1000微克/毫升的三级硫平板, 把上述的小菌落点种在三级硫平板上进行复筛, 发现菌株N₆的18个小菌落未能呈现出菌落大小随硫源含量的变化而变化的现象, 说明这些小菌落并非是真的需硫小菌落。而菌株W的46个小菌落中则有18个小菌落在三级硫平板上呈现出程度不同的菌落大小正向变化。进一步以硫梯度平板C复筛之, 其中的W-42号变异株的菌落大小正向变化最为明显。

为了同时选出蛋白质含量增高的变异株, 我们以0.2%的碘液对所有的紫外线诱变存活株进行染色, 结果菌株N₆的500个存活株中出现4个浅黄色菌落, 而菌株W的1100个存活株

中出现了2个浅黄色菌落。所有的浅黄色变异株经传代后再用碘液复染,其中的 N_{6-1} , N_{6-2} 和W—42变异株仍呈现出稳定的浅黄色。

2.3 变异株的蛋白质含量和含硫氨基酸含量变化

根据筛选结果,我们选出变异株 N_{6-1} , N_{6-2} , 和W—42, 与相应的出发株进行了比较。在比较菌体蛋白质含量时,考虑到菌体培养在碳氮比不同的培养基中,菌体蛋白质含量会有一些的变化,分别以酵母丰富培养基和含0.1%硫酸铵的低温蒸煮工艺酒糟培养上述的菌株。35℃培养24小时后,离心收集菌体,洗涤,再离心,然后以双缩脲法^[3]测定菌体蛋白质含量,测定后的平均数据列于表3。

表3 蛋白质含量比较

培养于酵母丰富培养基					
菌 株	N_6 (出发株)	N_{6-1}	N_{6-2}	W(出发株)	W—42
蛋白质含量 (%)	48.5	58.2	58.2	53.0	70.3
提 高 率 (%)		19.7	19.7		32.6

培养于低温蒸煮工艺酒糟滤液					
菌 株	N_6 (出发株)	N_{6-1}	N_{6-2}	W(出发株)	W—42
蛋白质含量 (%)	51	57.5	52.8	57	65.2
提 高 率 (%)		12.7	3.5		14.4

从表3中可以看出,经碘染色法复筛得到变异株培养于上述两种不同的培养基中,它们的蛋白质含量与出发株相比均有所提高。

同时也将菌株W-42与其出发株W的各种氨基酸含量比进行了分析比较,有关的氨基酸分析平均数据列于表4中。

分析结果表明,与出发株W相比,变异株W—42的蛋氨酸含量明显增加,而半胱氨酸含量则有所下降,不过含硫氨基酸总量仍提高了。另外的几种必需氨基酸中,只有苯丙氨酸的含量略有下降。

表4 菌株W-42与出发株W的氨基酸含量对比

含量g/100g 蛋白质 氨基酸	菌 株	W	W-42	提 高 率 (%)
天冬氨酸		4.91	4.38	-11
谷 氨 酸		5.81	6.89	1
丝 氨 酸		2.49	2.87	15
甘 氨 酸		1.91	2.30	20
丙 氨 酸		2.77	3.31	19
酪 氨 酸		1.77	1.67	-6
精 氨 酸		1.19	0.65	-43
组 氨 酸		1.01	1.02	1
赖 氨 酸		3.04	3.04	0
苏 氨 酸		2.63	2.72	4
缬 氨 酸		2.40	2.65	10
异亮氨酸		2.19	2.55	16
亮 氨 酸		3.39	3.64	7
苯丙氨酸		2.31	2.20	-10
半胱氨酸		0.42	0.29	-31
蛋 氨 酸		0.96	1.35	40

3 讨 论

一般情况下,欲从固体平板上直接初筛出蛋白质含量增高的变异株是较困难的。Chester^[4]曾报道,利用碘液对酵母菌落染色时,极少数糖原含量下降的变异株菌落往往呈白色或浅黄色,而正常菌落则呈棕红色。我们考虑到变异株细胞中糖原含量的减少会造成某些其他细胞组分的增多,假丝酵母中蛋白质是含量最多的细胞组分,糖原的下降也许会造成蛋白质含量增高,故利用碘染色法有可能从浅黄色菌落中间接地初筛出蛋白质含量增高的变异株。实验结果表明这一方法是可行的。传代后遗传上稳定的浅黄色变异株的蛋白质含量皆有所提高。

欲初筛含硫氨基酸含量增高的变异株也必须找到简易的方法,从酵母细胞内硫元素的分布来看,其主要存在于含硫氨基酸中(少量存在于某些维生素以及胞内游离含硫化合物中),因而对于一种细胞而言,总是存在着一个需硫基量,当硫源略低于这一基量时,细胞可因含硫氨基酸合成上的障碍,生长不良而形成小菌落。于是以这一需硫基量配制成的缺硫平板可以初步鉴别出需硫量更大的变异株。不过在缺硫平板上出现的小菌落中除了包括含硫氨基酸含量增高的变异株外,还可包括那些损伤型或呼吸缺陷型小菌落变异株。为此我们进一步以硫梯度平板进行复筛,那些在硫梯度平板上未能呈现出菌落大小梯度变化的菌株被淘汰,最后

所获得的W-42菌株经测定其蛋氨酸含量提高了40%左右。

为了一举获得蛋白质含量和含硫氨基酸含量双重提高的变异株,我们半定向地选择紫外线作为诱变剂。Chesfer^[4]表明紫外线诱变可有效地产生出糖原含量下降20%左右的变异株,可推测紫外线诱变有可能产生出蛋白质含量增高的变异株。关于通过诱变提高菌体中含硫氨基酸含量可能有两种情况,一是使含硫氨基酸合成途径中的某一酶活力提高致使相应种类的氨基酸库增大;二是使含硫氨基酸密码数增多导致蛋白质中含硫氨基酸总量增多。对于第一种情况难以预测何种诱变剂可以实现半定向诱变;然而对第二种情况则考虑选择紫外线。已知紫外线的诱变效应主要在于产生胸腺嘧啶二聚体(T-T),T-T的形成可异致其中的一个T碱基变为其他碱基。借此可估计紫外线使蛋氨酸密码($\begin{smallmatrix} \text{ATG} \\ \text{TAC} \end{smallmatrix}$)变异成其他密码的负变异的几率约为1/8(即.....NNAATG.....出现几率为1/4,其中相连的两种T中后一个T发生变异的几率约为1/2)。同时诸如 $\begin{smallmatrix} \text{TTG} & \text{AAG} & \text{ATT} \\ \text{AAC} & \text{TTC} & \text{TAA} \end{smallmatrix}$ 之类的密码变为 $\begin{smallmatrix} \text{ATG} \\ \text{TAC} \end{smallmatrix}$ 的正变异的几率也分别为1/8,加上这些密码在各基因中的分布量远大于蛋氨酸密码,可以预计蛋氨酸密码数目增多的可能性很大。同理估测半胱氨酸密码($\begin{smallmatrix} \text{TT} & \text{TGC} \\ \text{ACA} & \text{ACG} \end{smallmatrix}$)经紫外线照射后发生负变异的几率与密码 $\begin{smallmatrix} \text{TTT} & \text{TTC} \\ \text{AAA} & \text{AAG} \end{smallmatrix}$ 变为 $\begin{smallmatrix} \text{TGT} & \text{TGC} \\ \text{ACA} & \text{ACG} \end{smallmatrix}$ 的正变异几率相近,而密码 $\begin{smallmatrix} \text{TTT} & \text{TTC} \\ \text{AAA} & \text{AAG} \end{smallmatrix}$,在各基因中的分布量也大于 $\begin{smallmatrix} \text{TGT} & \text{TGC} \\ \text{ACA} & \text{ACG} \end{smallmatrix}$,推测中紫外诱变使半胱氨酸密码增多的可能性亦存在。于是可以认为,在这种情况下,紫外线是较为理想的半定向诱变剂。实验结果初步表明,所筛到变异株W-42的蛋白质和蛋氨酸含量明显提高,美中不足的是,其半胱氨酸含量则下降了一些,其原因尚有待探讨。

致 谢

本研究过程中,氨基酸分析得到了本院王树英同志大力帮助,低温蒸煮工艺酒精废醪则由李建科同志提供,特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Mateles R. J. Symp. Soc Gen Microbiol 1979; 29: 29
- [2] Reed G. Prescott and Dunn's Industrial Microbiol, 1971; 541
- [3] Herbert D. Method in Microbiology, 1971; 58: 209
- [4] Chester V E. J. Gen Microbiology, 1968; 51: 49

Improvement of SCP Nutritional Quality by Semi-directed Breeding

Wang Wu Shen Jianhua Miao Zhenghua

Abstract

Based on the research of growing candida in alcohol distillage for production, a semi-directed breeding method was used to increase the protein and methionine contents in candida cell. In the result, the protein contents of the desired mutants was increased by 14% in average, meanwhile, the methionine content in one of the mutants was increased by 40%.

Subjectwords, Alcohol Distillage, SCP, Protein, Methionine