

文章编号 :1009-038X(2000)02-0095-05

双重筛选产甘油假丝酵母营养缺陷型菌株及其发酵性能^①

陈 珏, 林 海, 王正祥, 诸葛健
(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 运用化学诱变的手段,以亚硝基胍为诱变剂,以产甘油假丝酵母 WL2002-5 为出发菌株,诱变获得 27 株尿嘧啶缺陷型突变株.并对所获菌株进行了传代稳定性试验和稳定性试验,其中 1[#]、22[#]、23[#]、25[#]、26[#] 菌株稳定性优良,适宜作为进行酵母转化的带有遗传标记的工具菌株.同时,从所获突变株中选出两株进行生长特性的研究和发酵性能的检测.研究表明,缺陷型菌株的生长速度明显慢于亲株,但其产甘油的性状并没有较大的改变.
关键词 :诱变 ;尿嘧啶缺陷型突变株 ;生长特性 ;发酵
中图分类号 :Q933 **文献标识码** :A

Screening of Ura-Mutants in *Candida glycerolgenesis*

CHEN Jun , LIN Hai , WANG Zheng-xiang , ZHUGE Jian
(School of Biotechnology , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036)

Abstract : Twenty-seven Ura auxotrophic mutants were obtained from *Candida glycerolgenesis* by chemical mutagenesis and five of them had the steady phenotype. The mutants 1[#]、22[#]、23[#]、25[#] and 26[#] had the lower growth speed than the original species did , yet the glycerol yield dropped unremarkably.
Key words : mutagenesis ; Ura auxotroph ; growth property ; fermentation

无锡轻工大学发酵甘油中心成功地用耐高渗透酵母发酵生产甘油,实现了工业化,取得了较好的经济效益和社会效益^[1].研制开发的这株耐高渗透酵母为假丝酵母属酵母,经过对菌种形态、生长、生理生化、遗传等特征的鉴定,确定为新种^[2],定名为产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis* Zhuge).该菌株耐高渗,在糖质量浓度 250 g/L,尿素质量浓度

2 g/L,总磷量为 65~95 mg/L 的培养条件下发酵,发酵时间控制在 72~96 h,甘油产量稳定在 120 g/L 以上,总糖转化率 50% 以上.在甘油合成途径中,胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶是催化磷酸二羟基丙酮到 3-磷酸甘油的特异性酶,研究表明,它不仅在甘油合成代谢途径中起重要作用,同时其活性又与细胞对

① 收稿日期 :1999-01-28 ;修订日期 :1999-11-03.
基金项目 :国家“九五”科技攻关项目资助课题(96-C03-03-03).
作者简介 :陈珏(1974 年 5 月生),女,江苏无锡人,工学硕士.
万方数据

环境渗透压的耐受性有关^[3,4]。为了进一步研究产甘油假丝酵母 3-磷酸甘油脱氢酶在甘油生成途径的作用以及生产菌株的进一步改良,不可避免地要利用分子克隆的手段,将该酶的编码基因转入产甘油假丝酵母中,增强其表达,以观察 3-磷酸甘油脱氢酶对甘油的产生的作用,进而为菌种改良提供理论依据。在酵母基因操作中,最常用的遗传标记是 Ura 和 Leu,针对酵母细胞大多数克隆载体,使用 Ura 或 Leu 作为选择性标记。因此,选育营养缺陷性突变株是进行分子克隆和质粒转化的前期工作,也是菌种性能改良的初步探索。为此,本研究利用化学诱变的方法,选育出 Ura⁻ 突变株并对所获菌株发酵性能进行初步研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株

产甘油假丝酵母,由无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心保藏并提供。

1.2 培养基

基本培养基(MM):酵母氮基(Difco)6.7 g/L,葡萄糖 20 g/L;

完全培养基(CM):葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 20 g/L,酵母膏 10 g/L;

补充培养基(SM):MM+Ura 60 mg/L;

五氟乳清酸培养基(FOASM):SM+5-FOA 500 mg/L;

种子培养基:葡萄糖 100 g/L,尿素 2 g/L,玉米浆 10 g/L,脲嘧啶 60 mg/L;

发酵培养基:葡萄糖 250 g/L,尿素 2 g/L,玉米浆 5 g/L,脲嘧啶 60 mg/L。

1.3 产甘油假丝酵母脲嘧啶缺陷型突变株的筛选

按常规方法进行^[5],用于诱变的细胞在 YEPD (酵母完全培养基)培养基中于 31℃ 摇瓶培养 16~18 h,离心收集菌体并用 pH 8.0 的 Tris 缓冲液洗涤,重悬,加入 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(NTG)至终,质量浓度为 0.1 mg/mL,诱变 40 min,离心终止诱变,在 CM 中后培养 3 h,用 MM 培养基洗涤 2 次,再转入 MM 中饥饿培养 4~6 h,加入制霉菌素使其终质量浓度达 50 μg/mL,培养 2 h 后,离心收集菌体,以 Tris 缓冲液洗涤 2 次,稀释涂布于 FOASM 平板,31℃ 培养。将长出的单菌落分别点种于 MM 和 SM,在 MM 平板不长而在 SM 平板生长的即为突变株。在 CM 上划线分离,点种验证,重复 3 次。

万方数据

1.4 脲嘧啶缺陷型突变株的稳定性实验

为研究突变菌株的传代稳定性,将 27 株突变株用斜面进行传代稳定性试验,采用 3 d 转接一代的方法,每代菌体均采用 MM 和 SM 平板点种,对照验证,检验其标记是否丢失。

将经验证的缺陷型菌株接入 30 mL YEPD 液体培养基中,摇瓶培养 48 h 以上,使其菌浓达到 10⁷~10⁸ 个/mL,将此菌液洗涤后涂布于 MM 平板,31℃ 培养 3 d 以上,对 MM 平板上长出的菌落计数,以计算其回复突变率。

1.5 突变株生长特性

将突变株和亲株接入 30 mL CM 液体培养基,31℃,110 r/min 摇瓶培养原种和突变株,定时取样,在 640 nm 处测定其吸光值。

1.6 发酵性能实验

将菌种从斜面接接入 30 mL 种子培养基,31℃,110 r/min 摇瓶 18 h,接入发酵培养基,31℃,110 r/min 振荡培养,从 24 h 起,每隔 12 h 定时取样,测 pH 值、残糖、甘油、菌浓。

1.7 分析方法

1.7.1 葡萄糖浓度 蒽酮法^[5]。

1.7.2 甘油浓度 变色酸法^[5]。

1.7.3 菌浓测定 比色法,640 nm 测消光度,以 OD 值表示。

1.7.4 pH 测定 以精密 pH 试纸测。

2 实验结果

2.1 诱变剂的选择和诱变时间的确立

本实验采用亚硝基胍作为诱变剂。质量浓度为 0.4 mg/mL 的 NTG 对 *Candida glycerolgenesis* Zhuge 的致死作用如图 1 所示。0.4 mg/mL 的 NTG 作用 40 min 时,*C. glycerolgenesis* 的致死率为 99%,故选择 0.4 mg/mL NTG 作用 40 min 作为诱变剂量。

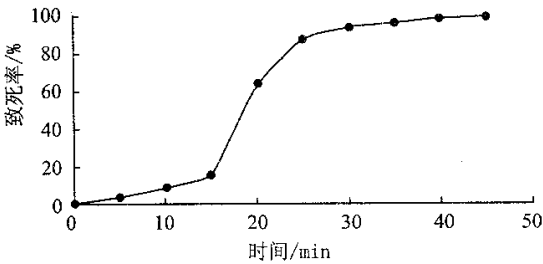


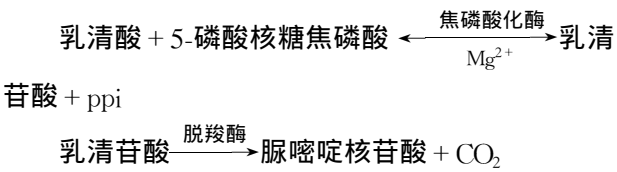
图 1 NTG 作用下致死率与时间的关系

Fig.1 Lethality rate of *C. glycerolgenesis* by NTG mutagenesis

2.2 5-FOA 平板筛选模型的确立

由于基因突变机率小,平板检出的方法需要点种数千个菌落才有可能找到目的菌株,工作量大,偶然性大,效果不理想.实验前半程采用 MM 和 SM 平板点种的方法,从 5~6 次诱变菌体中均未找到 Ura⁻ 突变株.

乳清酸是合成脲嘧啶核苷酸的重要中间产物,它生成脲嘧啶核苷酸的反应包括两个步骤^[7]



其中, *ura3* 和 *ura5* 分别是编码焦磷酸化酶和脱羧酶的基因,在营养缺陷型细胞中,该代谢途径被打断,无法生成脲嘧啶核苷酸,必须补加 Ura 才能满足其生长的需要.5-FOA 是乳清酸的结构类似物,它可以参与到上述代谢途径中,生成对细胞具有毒害作用的 5-氟脲嘧啶核苷酸^[8,9].因此,在补加了 5-FOA 的培养基中,原养型菌株不能生长,而 Ura⁻ 突变株由于 *ura3* 或 *ura5* 基因的缺失,该代谢途径被打断,不生成具有毒性的 5-氟脲嘧啶核苷酸.因而,可以用补加 Ura 的 5-FOA 的平板作为筛子,筛选脲嘧啶缺陷型突变株.

2.3 Ura⁻ 突变株的获得

在本次研究工作中,经过 10 余次诱变和筛选,共得到 27 个 Ura⁻ 突变株,图 2 为突变株 1[#] 在 MM 和 SM 上点种对照的照片,其余突变株点种情况与之类似.

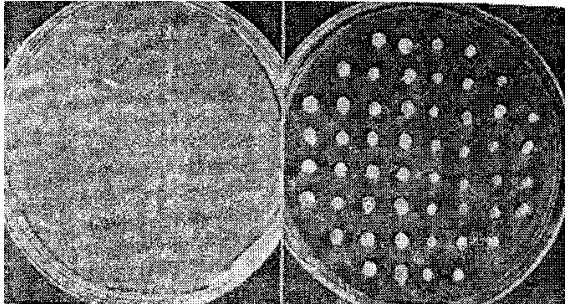


图 2 1[#] 菌株在 MM 和 SM 上点种对照
Fig.2 Comparison of inoculation of mutant 1[#] on MM and SM

图 2 中,左边为 MM,右边为 SM.可以看出,突变株在 MM 上培养一周后仍没有肉眼可辨的生长情况,而在 SM 上 3 d 以后长成正常菌落.

2.4 稳定性试验

为研究突变菌株的传代稳定性,将 27 株突变

株用斜面进行传代稳定性试验,采用 3 d 转接一代的方法,每代菌体均采用 MM 和 SM 平板点种,对照验证,检验其标记是否丢失,结果见表 1.

表 1 传代稳定性试验结果

Tab.1 Genetic stability by test-tube culture										
菌株编号	传 代 数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	-			
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	+	+	+	-		
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: + 表示标记未丢失; - 表示标记丢失

从表 1 可以看出,稳定性最好的菌株有 1[#]、22[#]、23[#]、25[#]、26[#] 共 5 个.

摇瓶稳定性实验结果见表 2.

2.5 突变株的发酵性能及生长特性与亲株的比较

从筛选出的 27 株 Ura⁻ 突变株中挑选出稳定性最好的两株 1[#]、22[#],以亲株作对照,挑取满环菌体分别接入摇瓶,每隔 2 h 取样,测其 OD 值,绘制生长曲线.结果如图 3、图 4 所示.可以看出,在补加了 Ura 的发酵培养基中,突变株的生长明显慢于亲株,但本实验的目的是为产甘油假丝酵母获得营养缺陷型的标记,得到用于转化的工具菌株,因此,生长缓慢并无大碍,反而提供了检测转化是否成功的另一标准——看其生产速度是否回复到与亲株相近.

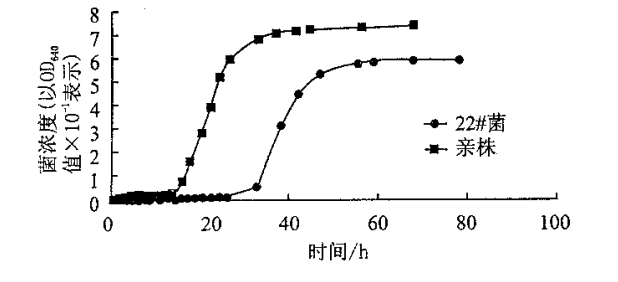


图 3 突变株 22[#]与亲株生长曲线的比较

Fig.3 Comparison of growth curve between mutant 22[#] and parent strain

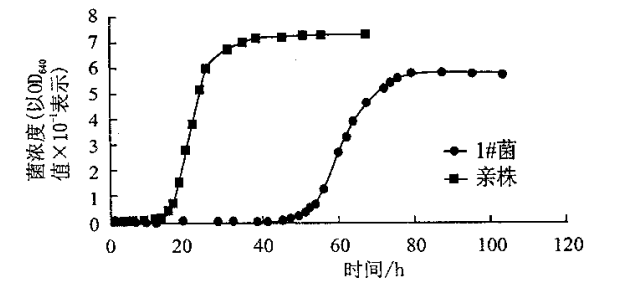


图 4 突变株 1[#]与亲株生长曲线的比较

Fig.4 Comparison of growth curve between mutant 1[#] and parent strain

表 2 稳定性试验结果

Tab.2 Genetic stability by shaking flask culture

突变株编号	菌浓度/(个/mL)	平板上总菌数	MM 上生长的菌落数	回复突变率
1	4.5×10^8	9×10^7	0	0
2	4.0×10^8	8.2×10^7	不可计	—
3	5.2×10^8	1.04×10^7	210	2.02×10^{-6}
4	5.3×10^8	1.06×10^7	不可计	—
5	3.5×10^8	7×10^7	219	3.13×10^{-6}
6	3.85×10^8	7.7×10^7	不可计	—
7	3.65×10^8	7.3×10^7	80	1.09×10^{-6}
8	3.6×10^8	7.2×10^7	51	7.08×10^{-7}
9	3.75×10^8	7.5×10^7	不可计	—
10	3.9×10^8	7.8×10^7	71	9.1×10^{-7}
11	4.25×10^8	8.5×10^7	不可计	—
12	3.85×10^8	7.7×10^7	25	3.2×10^{-7}
13	4.1×10^8	8.2×10^7	不可计	—
14	4.5×10^8	9×10^7	不可计	—
15	3.75×10^8	7.5×10^7	不可计	—
16	3.6×10^8	7.2×10^7	222	3.08×10^{-6}
17	3.85×10^8	7.7×10^7	268	3.48×10^{-6}
18	4.25×10^8	8.5×10^7	247	2.9×10^{-6}
19	5.0×10^8	1×10^7	不可计	—
20	4.1×10^8	8.2×10^7	50	6.9×10^{-7}
21	3.65×10^8	7.3×10^7	186	$2.52.02 \times 10^{-6}$
22	4.5×10^8	9×10^7	0	0
23	3.65×10^8	7.3×10^7	6	8.2×10^{-8}
24	4.3×10^8	8.6×10^7	121	1.4×10^{-6}
25	4.1×10^8	8.2×10^7	0	0
26	3.7×10^8	7.4×10^7	1	1.3×10^{-8}
27	4.2×10^8	8.4×10^7	113	1.3×10^{-6}

2.6 突变株的发酵性能与亲株的比较

由于突变株生长比亲株慢,这样就有可能造成突变菌株在发酵的过程中菌浓和甘油的峰值滞后于亲株,以及糖降的速度减慢等情况.为验证这一设想,特设计了 120 h 动态发酵实验,从 24 h 起,每隔 12 h 取样,测定其菌浓度、pH 值、甘油产量和残

万方数据

糖,实验结果如图 5~7 所示.可以看出,在 120 h 的发酵过程中,甘油的产量 1[#] 菌株的则未出现峰值,22[#] 菌株的则峰值不明显,但其趋势是随时间的增长而上升,且其最大值仅略小于亲株,故可以得出结论:突变株的产甘油性状并没有消失,Ura 缺陷型这一遗传标记对亲株产甘油能力没有大的影响.此外,突变株生长缓慢,造成发酵过程延长,产甘油的

峰值滞后,残糖含量高于亲株,此结果与预期结论相吻合.

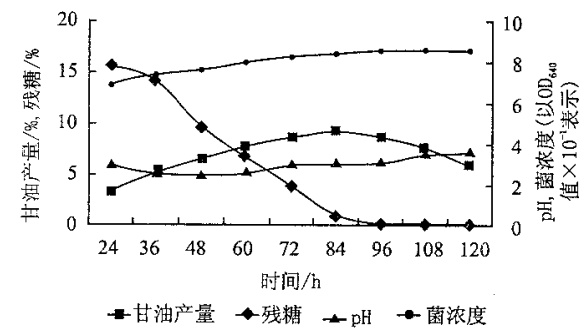


图 5 亲株发酵性能曲线

Fig.5 Fermentative ability of parent strain

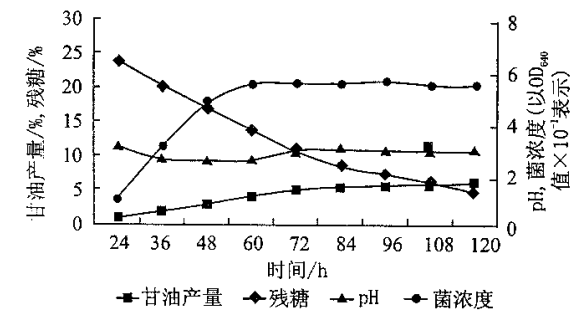


图 6 突变株 1[#] 发酵性能曲线

Fig.6 Fermentative ability of mutant 1[#]

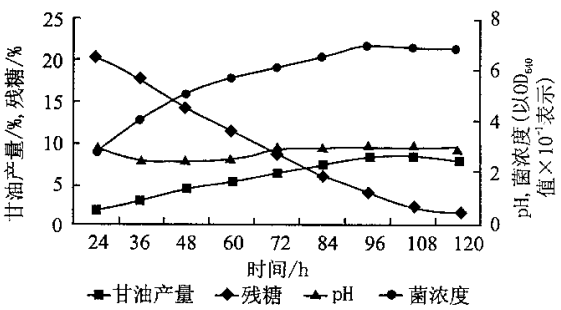


图 7 突变株 22[#] 发酵性能曲线

Fig.7 Fermentative ability of mutant 22[#]

3 讨 论

从实验工作中发现,产甘油假丝酵母 Ura^- 的获得十分艰难,这与其突变发生的几率直接相关,据文献报道^[8],在分离得到的 183 株营养缺陷型菌株中,都无法得到 Ura^- 表型的菌株.通过使用 5-FOA 和 Ura 的双重选择方案,成功地得到了目的菌株,说明这种方法是有效的.假丝酵母是一种无性的二倍体酵母,目前对它的遗传背景还不是很清楚,本研究是一个有益的探索.

参考文献

[1] 诸葛健,方慧英. 发酵法生产甘油的研究进展[J]. 食品与发酵工业,1994(4) : 65 ~ 74

[2] 王正祥,诸葛健,方慧英. 耐高渗透压高产甘油的一个假丝酵母新种——产甘油假丝酵母[J]. 微生物学报,1999,39(1) : 68 ~ 74

[3] ANDERS BLOMBERG LENNART ADLER. Roles of Glycerol and Glycerol - 3 - Phosphate Dehydrogenase (NAD^+) in Acquired Osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(2) : 1087 ~ 1092

[4] ELKE NEVOIGT, ULF STAHL. Reduced Pyruvate Decarboxylase and Increased Glycerol - 3 - phosphate Dehydrogenase [NAD^+] Levels Enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1996, 12 : 1331 ~ 1337

[5] 诸葛健,王正祥编著. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京 : 中国轻工业出版社,1994.

[6] 沈同,王镜岩主编. 生物化学(第二版) [M]. 北京 : 高等教育出版社,1991.

[7] MARTIN A G GLEESON, LISA O C HAAS, JAMES M CREHG. Isolation of *Candida tropicalis* Auxotrophic Mutants[J]. *American Society for Microbiology*, 1990, 56(8) : 2562 ~ 2564

[8] JEF D BOEKE, FRANCOIS LACROUTE, GERALD R FINK. A positive selection for mutants lacking orotidine - 5' - phosphate decarboxylase activity in yeast : 5 - fluoro - orotic acid resistance[J]. *Mol Gen Genet*, 1984, 197 : 345 ~ 346

(责任编辑 : 秦和平)