

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0336 - 04

高强度产甘油假丝酵母突变株的选育及其发酵性状

郭雪娜, 诸葛斌, 邱重晏, 诸葛健

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要:以一株产甘油假丝酵母为出发菌株,采用化学诱变,通过玉米浆和外加无机磷组成的磷质量浓度为 340 mg/L 的磷源选择培养基,得到了一株发酵时间较原菌株缩短了 8 h 左右,产甘油能力(甘油产量约为 140 g/L,甘油转化率为 56%)和原菌株相似的突变株,并研究了突变株的发酵性状。

关键词:产甘油假丝酵母;诱变;突变株;发酵性状

中图分类号:TQ 923

文献标识码:A

Screening *Candida glycerolgeneses* Mutants with High Productivity and the Fermentation Performance of the Mutants

GUO Xue-na, ZHUGE Bin, QIU Chong-yan, ZHUGE Jian

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: *Candida glycerolgeneses* was mutated by NTG. The phosphorus concentration of screening medium, in which phosphorus source consists of corn steep liquor and inorganic phosphorus, was 460 mg/L. Several mutants were screened. Compared with original strain, the fermentation time was shorten by about 8 hours, and the glycerol production was equal to original strain.

Key words: *Candida glycerolgeneses*; mutate; mutant; fermentation performance

甘油的生产方法一直是以皂化法和化学合成法为主.利用微生物法生产甘油作为生产甘油的又一途径正日益受到国内外的重视.江南大学(原无锡轻工大学)发酵甘油中心利用产甘油假丝酵母好氧发酵生产甘油^[1,2],所用菌种具有耐高渗特点,在 250 g/L 葡萄糖质量浓度、2 g/L 尿素质量浓度和总磷量为 65~95 mg/L 的环境下进行发酵,甘油产量稳定在 120 g/L 以上,总糖转化率在 50%以上^[3].

作者以一株优良的产甘油假丝酵母为出发菌,进行亚硝基胍诱变,在高磷浓度的培养基条件下与原种做对比^[4],进行发酵筛选,找到了甘油产量没

有降低,而发酵速度明显提高的突变菌株,并对该突变菌株的发酵性状进行了初步研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 产甘油假丝酵母 WL2002-5,江南大学发酵甘油研究设计中心保藏.

1.1.2 种子培养基 葡萄糖 100 g/L,尿素 2 g/L,玉米浆 10 mL/L.

1.1.3 发酵培养基 葡萄糖 250 g/L,尿素 2 g/L,玉米浆 5 g/L.

收稿日期 2001-12-18; 修订日期 2002-03-15.

基金项目 国家“九五”科技攻关项目(96-C03-03-03)资助课题.

作者简介 郭雪娜(1976-),女,河北廊坊人,工学硕士.

1.1.4 筛选培养基 葡萄糖 250 g/L,尿素 2 g/L,玉米浆 2 g/L,磷酸二氢钾 130 mg/dL.

1.2 分析方法

1.2.1 葡萄糖质量浓度测定 SBA-40C 型生物传感分析仪测定.

1.2.2 甘油质量浓度测定 变色酸法^[5].

1.2.3 菌浓测定 640 nm 下测定 O.D. 值.

1.2.4 pH 测定 以精密 pH 试纸测.

1.3 产甘油假丝酵母突变株的诱变和筛选

诱变和筛选按常规方法^[7]进行.用于诱变的细胞在种子培养基中于 30 ℃ 摇瓶培养 19 h,离心收集菌体,并用 8 g/L 的氯化钠溶液洗涤,重悬,加入 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍(NTG)诱变管中,使 NTG 终质量浓度为 40 μg/mL;于 30 ℃ 振荡 30~40 min,离心终止诱变,在种子培养基中培养 4 h,离心收集菌体,用 8 g/L 的氯化钠溶液洗涤两次,稀释后涂布到种子培养基中,30 ℃ 培养.将长出的单菌落接种到斜面培养基上,再接种到筛选培养基中,摇瓶发酵,挑出与原菌株相比甘油产量没有降低,而发酵速度明显提高的突变菌株,重新在筛选培养基中发酵,验证 3 次.

2 实验结果

2.1 突变株的获得

2.1.1 筛选培养基中磷质量浓度的确定

从以往的研究和工业化生产过程中已知^[6],影响产甘油假丝酵母产甘油能力的主要因素之一是培养基中的总磷量.培养基中的总磷量偏低,菌体生长量不足,发酵能力弱,葡萄糖的消耗速度缓慢,发酵时间长,且甘油产量不高;总磷量过高,大多数的营养成分用于菌体生长,菌体量过大,单位细胞得到的氧减少,酵母细胞要维持代谢就必须利用其它的中间代谢产物作为电子受体以保持细胞氧化还原的电中性,所以葡萄糖的消耗速度虽然加快了,发酵时间也缩短了,但是甘油的产量仍然不高.作者通过提高培养基中的磷质量浓度筛选得到一株发酵时间缩短,但甘油产量没有下降的突变株.在发酵培养基中以玉米浆作为磷源,玉米浆是玉米原料的浸出物,成分复杂.为了排除较高玉米浆质量浓度中其它成分的影响,故采用部分添加玉米浆,同时添加磷酸二氢钾来提供筛选培养基中的磷质量浓度.不同磷质量浓度的发酵情况见表 1.

由表 1 可以看出,出发菌株在 340 mg/L 的磷质量浓度下甘油产量最高,随着磷质量浓度的提高,甘油产量逐渐下降,因此选择 460 mg/L 的磷质

量浓度做为诱变后筛选培养基中的磷质量浓度.

表 1 不同磷质量浓度 *Candida glycerolgeneses* 的发酵情况
Tab.1 The fermentation of *Candida glycerolgeneses* in the different phosphorous concentrations

磷质量浓度/(mg/L)	10 mL 发酵液中菌体体积/mL	发酵时间/h	残糖质量浓度/(g/L)	甘油质量浓度/(g/L)	转化率/%
300	0.55	96	15.2	126.7	50.68
340	0.58	96	10.0	141.3	56.52
380	0.60	96	8.3	132.9	53.16
420	0.65	84	11.7	115.6	46.24
460	0.70	80	11.1	109.1	43.64

2.1.2 突变株的获得 为了筛选出高磷质量浓度下发酵速度提高而甘油产量没有下降的突变株,作者采用突变株与原菌株作对照,由糖降速度快慢考察甘油产量.经过初筛、复筛,将得到的突变株进行分离纯化,并进行传代稳定性实验,得到 3 株发酵性状保持较好的突变株.它们的发酵时间约比原菌株缩短了 7 h.在 3 株突变株中挑选一株,进一步考察其发酵性能.

2.2 突变株发酵性能与原菌株比较

为了考察突变株在发酵性能上与亲株的区别,特设计了 108 h 动态发酵试验,从第 24 小时起,每隔 12 h 取样,比较两者的耗糖速度和甘油产生的情况,结果见图 1.2.

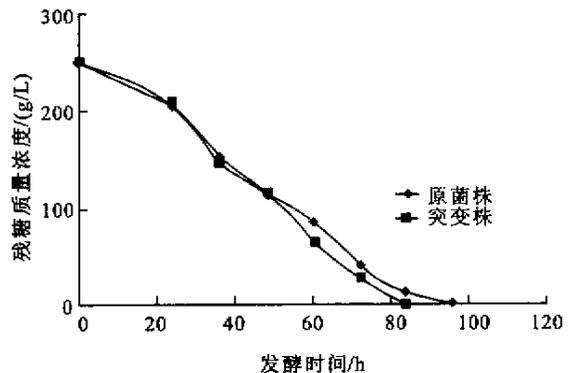


图 1 突变株和亲株耗糖速度比较

Fig.1 The comparison for the consuming speed of glucose between mutant and original species

从图 1.2 可以看出,在 108 h 动态发酵过程中,前 48 h 突变株比原菌株的降糖速度略有降低,但相差不大.进入发酵后期,突变株的降糖速度明显比原菌株快很多.由产生甘油的情况也可以得到相似的结果,在发酵的前 48 h 突变株产生的甘油量比原菌株低,在发酵后 48~96 h,突变株产甘油的速度高于原菌株,但它们的甘油峰值相差不大,均在

130 ~ 140 g/L. 葡萄糖消耗至 10 g/L 以下时, 突变株约比原菌株快 8 h 左右.

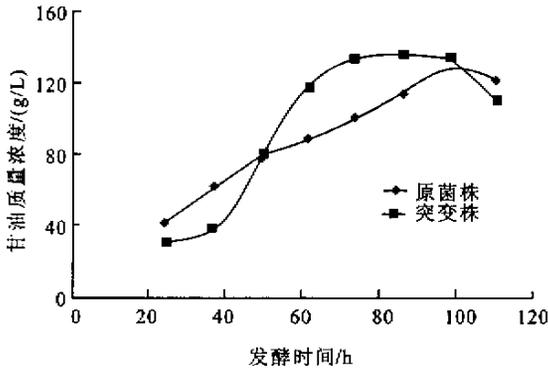


图 2 突变株和亲株甘油产生情况比较

Fig.2 The comparison for the producing glycerol between mutant and original species

2.3 突变株发酵试验

2.3.1 不同碳源试验 将突变株分别在除待测碳源外不含有其它碳源的基本培养基上划线, 其对待测碳源的利用情况见表 2. 可以看出, 葡萄糖是比较好的碳源, 原菌株利用最好的碳源也是葡萄糖, 两者没有差别.

表 2 突变株的碳源利用情况

Tab.2 The carbon sources utilized by mutant

碳 源	结 果	碳 源	结 果
葡 萄 糖	++++	淀 粉	-
半 乳 糖	-	甘 油	+
木 糖	-	乙 醇	+++
蔗 糖	+	麦 芽 糖	+

注: + + + + 表示生长 18 h 左右就形成明显隆起的边缘和不整齐的粗糙型白色菌落; + 表示生长缓慢, 30 h 以后才形成不明显的菌落; - 表示不生长, 35 h 以后仍没有明显的菌落长出.

突变株对葡萄糖的利用情况较好, 见图 3. 在葡萄糖的质量浓度梯度试验中发现, 突变株对葡萄糖的利用速度及产甘油的情况随着葡萄糖质量浓度的增加而提高 (残糖质量浓度均低于 6.0 g/L), 发酵时间也依次延长. 综合产甘油情况和发酵时间两方面因素, 发酵初始葡萄糖质量浓度定为 240 g/L 左右为宜. 原菌株发酵时的最适葡萄糖质量浓度在 230 ~ 250 g/L, 两者相差不大.

2.3.2 不同氮源试验 在培养基中(250 g/L 葡萄糖, 0.5 g/L 玉米浆)中加入不同的氮源, 摇瓶培养, 实验结果见表 3.

从突变株对氮源的利用情况可以看出, 尿素为较好的氮源; 原菌株利用最好的氮源也是尿素, 两者一样. 万方数据

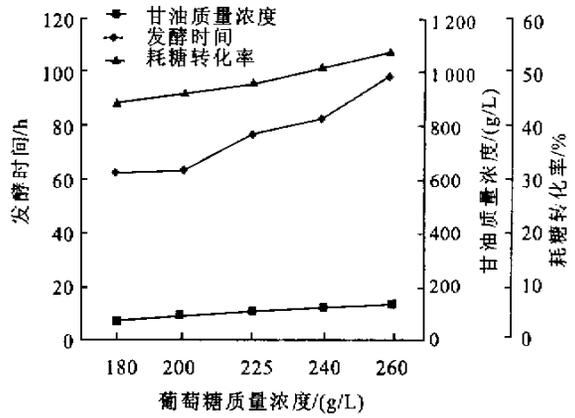


图 3 突变株在不同葡萄糖质量浓度下的发酵情况

Fig.3 Fermentation of mutant in the broth containing different glucose concentration

表 3 不同氮源浓度下突变株的甘油产量

Tab.3 The glycerol yield by mutant in different nitrogen sources

氮源	浓度/(mol/L)	甘油产量/(g/L)
硝酸钠	0.025	21.8
	0.050	23.3
	0.075	22.0
硝酸铵	0.025	47.6
	0.050	77.6
	0.075	83.9
尿素	1.5	93.5
	3.0	127.0
	4.5	116.5
豆饼粉	1.5	44.4
	3.0	53.3
	4.5	60.1

在培养基中采用不同质量浓度的尿素, 其它成分不改变, 考察突变株在不同尿素质量浓度梯度下的发酵情况, 结果见图 4. 随着尿素质量浓度的增加, 发酵液中的 pH 值也在增大, 在 4 g/L 的尿素质量浓度下, pH 值接近 5. 这可能是因为较高质量浓度的尿素培养基中, 尿素富余, 多余的尿素中和了发酵过程中产生的 H⁺, 使发酵液的 pH 值变大. 甘油的产量随着尿素质量浓度的增加, 呈抛物线形状. 在尿素质量浓度为 2 g/L 时比较好, 甘油产量达到 128 g/L 左右. 原菌株发酵时的最适尿素质量浓度在 2 g/L, 两者一样.

2.3.3 不同磷源试验 玉米浆的成分复杂, 用纯粹添加玉米浆的发酵培养基和部分添加玉米浆同时部分添加磷酸二氢钾的发酵培养基分别发酵. 从实验结果看出, 甘油的产生总体趋势一致, 并且在

甘油峰值时的磷含量相同,由此可以推断出玉米浆中的磷对甘油的产生具有较大影响.突变株对磷源的利用情况见表 4.

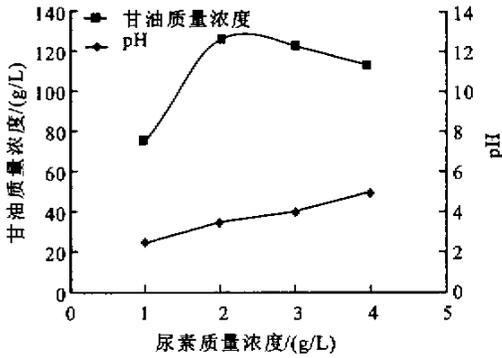


图 4 不同尿素质量浓度发酵实验

Fig.4 Fermentation of mutant in the broth containing different urea concentration

表 4 突变株不同磷源时的甘油产量

Tab.4 The glycerol yield by mutant in different phosphorus sources

磷 源	浓度(mol/L)	甘油产量(g/L)
磷酸二氢钾	0.005	47.8
	0.010	44.5
	0.015	45.5
偏磷酸钠	0.005	28.5
	0.010	27.9
	0.015	28.3
玉米浆	0.005	86.8
	0.010	120.8
	0.015	125.2

可见,玉米浆是较佳的磷源.原菌株利用最好的磷源也是玉米浆,两者一样.

由图 5 可见,随着玉米浆体积分数的增加,菌体量和发酵时间变化都很大.玉米浆体积分数仅为 3 mL/L 时,菌体量最小,发酵时间长达 108 h;当玉

参考文献:

[1] WANG Z Y , ZHUGE J , FANGH Y , et al . Glycerol production by microbial fermentation : a review [J] . *Biotechnology Advances* , 2001 , 19 (3) : 201 - 223 .

[2] ZHUGE J , FANG H Y , WANG Z X , et al . Production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerolgenesis* [J] . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2001 , 55 (6) : 686 - 692 .

[3] 王正祥 , 诸葛健 , 方惠英 . 耐高渗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 .

[4] 王正祥 , 诸葛健 , 曹钰等 . 产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究 [J] . *微生物学报* , 2000 , 40 (2) : 180 - 187 .

[5] LAMBERT M , NERSH A C . Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions [J] . *Can J Research* , 1950 , 28 : 83 - 89 .

[6] 曹钰 . 磷酸盐在产甘油假丝酵母甘油产生中的作用 [D] . 无锡 : 无锡轻工大学 , 1999 .

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

米浆体积分数提高至 9 mL/L 时,菌体量最大,发酵时间降至 70 h 左右.随着玉米浆体积分数的增加,突变株甘油产量的变化没有原菌株明显.突变株发酵时比较适宜的玉米浆体积分数为 7 mL/L,这时发酵时间约为 76 h 左右,甘油产量达到 128 g/L 左右.原菌株发酵时的最适玉米浆体积分数在 5 mL/L,突变株适宜的玉米浆体积分数比原菌株提高 2 mL/L 左右.

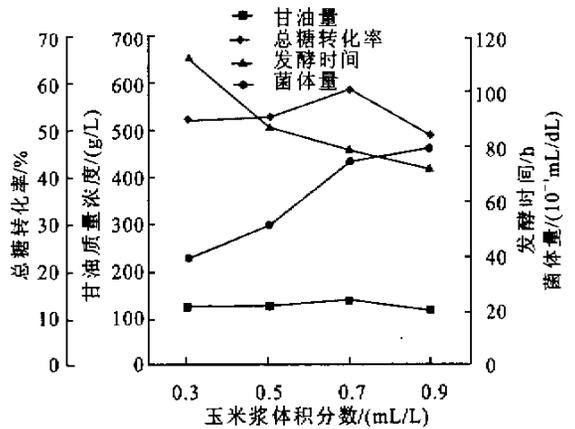


图 5 不同玉米浆体积分数的发酵实验

Fig.5 Fermentation of mutant in the broth containing different corn steep liquor concentration

3 结 论

通过化学诱变获得了一株突变株,将其与原菌株进行了对比发酵试验,发现突变株在发酵后期(48 h 以后)耗糖速度超过了原菌株,产甘油的能力也增强.对突变株的发酵条件进行初步摸索,发现突变株的最适发酵培养基组成为:葡萄糖 240 g/L,尿素 2 g/L,玉米浆 7 mL/L.与原菌株的最适发酵培养基相比,突变株的培养基中只有玉米浆的体积分数提高了 1 ~ 2 mL/L,其它营养因素没有变化.