

文章编号: 1001-7453(1999)02-0060-04

产甘油假丝酵母酸性磷酸酯酶突变株 的选育及其性质研究

曹 钰, 耿作献, 王正祥, 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 运用化学诱变法从高产甘油的工业生产菌株——产甘油假丝酵母 (*Candida glycerolgenesis*) WL2002-5(H) 筛选获得两类酸性磷酸酯酶突变株。一类为阻遏型酸性磷酸酯酶缺失突变株; 另一类为对磷调节不敏感的部分去阻遏调节突变株, 并研究了它们的发酵性能。

关键词: 产甘油假丝酵母; 诱变; 酸性磷酸酯酶

中图分类号: Q93-33; TQ920.1 文献标识码: A

产甘油假丝酵母 (*Candida glycerolgenesis Zhuge*) 是无锡轻工大学发酵甘油中心选育出的一株假丝酵母新种。在长期的研究和工业化过程中发现这株高产甘油的假丝酵母对培养基中的磷含量很敏感, 磷是影响甘油发酵效率的主要因素之一, 而且甘油的产量与磷源的种类无关, 仅与总磷量有关。在研究磷在该假丝酵母甘油生产过程中的作用时, 选择涉及磷输送并在产甘油途径中催化最后一步反应的酸性磷酸酯酶, 通过研究培养基中磷质量浓度对该酶的影响和该酶对这株产甘油假丝酵母产甘油过程的影响, 来阐述磷在此菌株产甘油的过程中所起的作用, 为研究该菌株高产甘油的代谢机理作初步探索。作者通过化学诱变的方法, 选育酸性磷酸酯酶的突变株, 并对其发酵性能进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

Candida glycerolgenesis Zhuge WL2002-5(H) 次黄嘌呤缺陷型菌株 由沈微等筛选获得^[1], 无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心保藏及提供。

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。

发酵培养基 (FM): 葡萄糖 250 g/L, 尿素 2 g/L, 玉米浆 5 ml/L。

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

收稿日期: 1998-10-23; 修订日期: 1999-03-15

作者简介: 曹 钰 (1971年 9月生), 女, 江苏泰兴人, 工学硕士, 助理研究员。

化学成分限定性培养基 (CDM):

硫酸铵 5 g/L, 葡萄糖 100 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 氯化钙 0.1 g/L,

硼酸 500 μ g/L, 硫酸铜 40 μ g/L, 碘化钾 100 μ g/L, 氯化铁 200 μ g/L,

硫酸锰 400 μ g/L, 钼酸铵 200 μ g/L, 硫酸锌 400 μ g/L; 磷酸二氢钾根据要求设定.

低磷 CDM: 含磷酸二氢钾 40 mg/L; 高磷 CDM: 含磷酸二氢钾 500 mg/L,

培养次黄嘌呤缺陷型菌株时补加 80 mg/L 次黄嘌呤.

1.3 酸性磷酸酯酶的测定^[2]

离心收集培养一定时间的菌体,用水洗涤 2~3 次后悬浮于 1 mL 浓度为 0.05 mol/L 的 pH4.0 的醋酸缓冲液中,测定其在 640 nm 下的吸光度.在 35 $^{\circ}$ C 预热过的反应管中加入 650 μ L 的醋酸缓冲液和 100 μ L 的菌悬液预热 10~15 min 后,加入 250 μ L 2.56 mg/mL 的对硝基苯磷酸盐 (pNPP),准确反应 10 min,加入 1% 三氯醋酸 (TCA) 2 mL 终止反应,离心取上清液 2 mL,再加入 2 mL 饱和 Na₂CO₃ 溶液调反应液的 pH 至碱性,使其显色,测定在 420 nm 下的吸光度.

酶活单位定义为每毫升菌液每分钟分解产生 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量 (μ mol / (min \cdot mL)).

1.4 酸性磷酸酯酶突变株的筛选^[3]

用于诱变的细胞在完全培养基中于 30~32 $^{\circ}$ C 摇瓶培养 16~18 h,离心收集菌体,悬浮于无菌生理盐水中,制成单细胞悬浮液,加入亚硝基胍 (NTG) 至终质量浓度为 0.1 mg/mL,诱变 40 min,离心终止诱变,稀释涂布于高磷 CDM 培养基和低磷 CDM 培养基平板,恒温培养 1~2 d.菌落长成后,滴加 50 $^{\circ}$ C 显色琼脂 (含有 5 mg/mL 的 α 磷酸萘酚盐染色液, 50 mg/mL 固蓝盐 B, 1% 琼脂,溶于 pH4.0 的 0.05 mol/L 醋酸缓冲液)并在 30 $^{\circ}$ C 保温 30~60 min.若产生酸性磷酸酯酶,菌落会变为深红色;若无酸性磷酸酯酶产生,则菌落仍为白色.由于染色并不杀死细胞,因而可以直接从染色后的平板上挑出突变株,涂布于完全平板上纯化.

1.5 糖含量、甘油浓度测定

蒽酮法测定残糖,变色酸法测定甘油含量.

1.6 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

用反复冻融法和细胞破碎仪从 18 h 的培养物制备全菌体蛋白样本,制备 10% 的分离胶及 5% 的浓缩胶,加样 20 μ L, 30 mA 下电泳 4 h,考马斯蓝染色显示结果^[4].

2 结 果

2.1 诱变剂量的确定

质量浓度为 0.1 mg/mL 的 NTG 对 *C. glycerolgensis* Zhuge (\bar{H}) 的致死作用如表 1 所示.

表 1 致死率与诱变剂 (NTG) 作用时间的关系

作用时间 /min	15	20	25	30	35	40	45
致死率 /%	13.75	67.2	89	90.3	93.8	99	100

0.1 mg/mL 的 NTG 作用 40 min 时,对 *C. glycerolgensis* Zhuge (\bar{H}) 的致死率为 99%. 选择 0.1 mg/mL 的 NTG,作用 40 min,作为诱变剂量.

2.2 目标突变株的获得

2.2.1 出发菌株酸性磷酸酯酶受培养基中磷质量浓度的影响 在含有不同磷质量浓度的

CDM 平板上点种出发菌株,滴加显色琼脂显色,其酶活变化情况见表 2

2 根据上述结果,分别选择 40 mg / L 和 500 mg / L 的磷质量浓度作为筛选突变株时用的低磷平板浓度和高磷平板浓度.

2.2.2 诱变结果 经过 NTG 诱变后获得 10 余株缺陷型突变株,结果见图 1 和图 2.

表 2 磷质量浓度对酸性磷酸酯酶活的影响

磷质量浓度 / (mg/L)	酶活 ¹⁾ / ($\mu\text{mol} / (\text{min} \cdot \text{mL})$)	显色情况 ²⁾
40	1 296. 65	深红色
100	1 063. 47	↓ 变色趋向
200	445. 35	枣红色
300	278. 74	↓ 变色趋向
400	138. 52	桔红色
500	86. 74	↓ 变浅
800	47. 71	
1200	13. 04	

注: 1) 以对应的磷质量浓度液体培养菌体,测定其酶活.
2) 未点种的平板无色透明,滴加的显色琼脂呈桔黄色

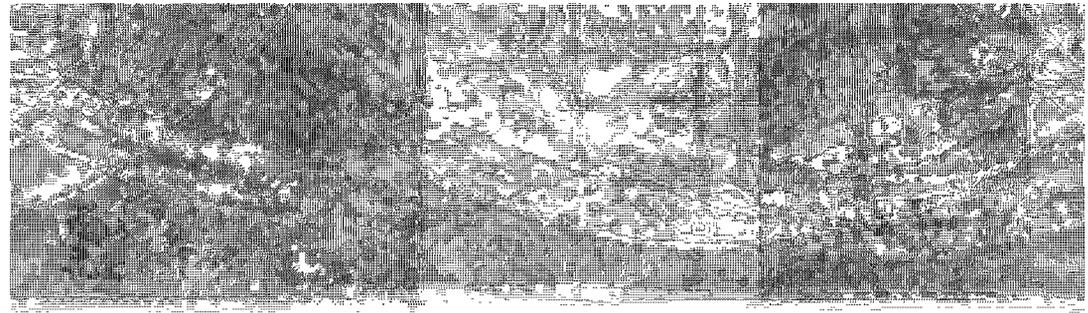


图 1 筛选所得的对磷调节不敏感的酸性磷酸酯酶突变株

图 2 筛选所得的阻遏型酸性磷酸酯酶缺失突变株

出发菌株点种于平板的下端,出发菌株在低磷平板(右)上显深红色,在高磷平板(左)上显桔红色.

从结果可以看出,所获得的突变株有两类.一类(图 1)为在高磷平板上显深红色的菌株,即在高磷平板上仍具有较高酶活,为对磷调节不敏感的突变株(M 系列);另一类(图 2)是在低磷平板上呈桔黄色的菌株,即酶活丧失,为阻遏型酸性磷酸酯酶缺失突变株.

2.3 突变株的发酵性能

选取 M 系列中对磷调节不敏感程度高的 M 8 菌株,及缺失突变株 Lc,分别在以玉米浆为磷源的发酵培养基(FM)和以磷酸二氢钾为磷源的化学限定性培养基(CDM)进行摇瓶发酵.在装有 30 mL 培养基的 250 mL 容积三角瓶中接入等量的突变株及出发菌株种子液,于 30℃, 120 r/min 的条件下振荡培养,定时取样,离心测定上清液,结果见表 3.

表 3 出发菌株 WL2002-5(H-) 和突变株

M8 Lc 的发酵性能				
菌株名称	培养基	pH	菌体(O. D. 640)	甘油产率 %
WL2002-5(H-)	CDM	2.0	1.132	5.094
	FM	4.0	1.452	7.685
M 8	CDM	2.2	1.286	4.731
	FM	4.0	1.511	7.427
Lc	CDM	2.5	1.204	1.429
	FM	4.0	1.469	4.023

从结果可以看出:

1) 在以玉米浆为磷源、口服葡萄糖为碳源、尿素为氮源的发酵培养基(FM)上发酵和在以磷酸氢二钾为磷源、分析纯葡萄糖为碳源、硫酸铵为氮源并且包含一些微量元素的化学限定性培养基(CDM)上发酵这两种情况下,出发菌株和突变株的甘油产量均表现为在 FM 上优于在 CDM 上,耗糖速度均为 CDM 慢于 FM. 这可能

与有机磷和无机磷的输送方式不同有关

2) 在相同的接种量下, FM 上各菌株的生长情况亦好于在 CDM 上的生长.

3) pH 情况则不同, 在 FM 培养基发酵, 发酵终了 pH 回升为 4.0~4.5, 而在 CDM 培养基发酵, 发酵终了 pH 维持在 2.0~2.5. 这与培养基的缓冲能力大小有关联.

4) 对磷不敏感的酸性磷酸酯酶部分受阻遏调节突变株 (M 系列) 的产甘油能力在 CDM 和 FM 上与出发菌株相比均无明显差异; 而阻遏型酸性磷酸酯酶缺失突变株 (Lc) 的产甘油能力在 CDM 上比出发菌株大幅度下降, 但在 FM 上仅略低于出发菌株.

3 讨 论

突变株 Lc 的发酵实验, 残糖量比出发菌株高出几倍到几十倍 (未列出), 但其菌体生长良好, 甚至好于出发菌株, 而甘油产量非常低, 即表现为菌体生长完成后, 不再利用葡萄糖. 推测其可能原因: 酸性磷酸酯酶与葡萄糖的输送机制相关; 或者是伴随着酸性磷酸酯酶的缺失, 葡萄糖的某一主要输送系统中的基因发生突变. 由于该菌株阻遏型酸性磷酸酯酶缺失, 导致细胞几乎不分泌酸性磷酸酯酶. 从产甘油的角度来看, 无机磷的输送需要酸性磷酸酯酶的参与, 当该酶缺失时, 胞内的磷质量浓度不够, 使酵解途径中的关键性的酶的活化受到影响甚至不能进行, 因而不能再利用葡萄糖产甘油. 而有机磷的输送可能另有途径, 因而葡萄糖的吸收和甘油的产生所受影响没有无机磷条件下那么大. 根据酸性磷酸酯酶缺失突变株在 CDM 上几乎不产甘油, 以及通过添加氨基酸使酸性磷酸酯酶酶活提高约 10 倍时甘油产量不受影响的结果 (未列出), 可以推断酸性磷酸酯酶在产甘油过程中不是一个关键限速酶.

参考文献:

- [1] 沈微. 产甘油酵母营养缺陷型的选育及原生质体融合的研究 [D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1996.
- [2] TORRANI A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatase by *E0Eschenichia coh* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1960, 38 460~ 479
- [3] Toc-e A. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Bacterial*, 1973, 113 727
- [4] 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.

Screening and Fermentation Properties of Acid Phosphatase Mutant from *Candida Glycerolgenesis* Zhuge

CAO Yu, GENG Zhuo-xian, WANG Zheng-xiang, ZHUGE Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract One specie mutants defective of repressible acid phosphatase and the other specie mutant of depressible acid phosphatase was obtained from *Candida glycerolgenesis* Zhuge (H), using chemical mutagenesis. And their fermentation properties were studied.

Key words *Candida glycerolgenesis*; mutagenesis; acid phosphatase