

TTC-CaCO₃ 复合平板法快速筛选丙酮酸高产菌株*

张彭湃 杨生玉** 林标声 胡晓冰

(河南大学生物工程研究所 河南大学生命科学学院 开封 475001)

摘要 :设计出一种用于快速筛选丙酮酸高产菌株的方法。这是一种理性化筛选方法。其原理是菌落产生的丙酮酸与碳酸钙反应形成可溶性的丙酮酸钙而出现透明圈,比较透明圈直径可以直观的选择出产酸较多的菌株;TTC与ADH作用而显色,颜色的深浅与ADH活性呈正比,这样可监测丙酮酸向乙醇的转化,筛选出低转化率的菌株。通过此方法,筛选出产酸多、ADH酶活力弱、发酵副产物少的目的菌株。

关键词 :TTC-CaCO₃ 复合平板法,丙酮酸,筛选

中图分类号 :TQ92 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)03-0472-03

Screening of High-pyruvate-producing Strain Using by TTC-CaCO₃ Complexes Medium*

ZHANG Peng-Pai YANG Sheng-Yu** LIN Biao-Sheng HU Xiao-Bing

(Bioengineering Institute of Henan University & College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475001)

Abstract :It designs a way that can easily screen high-pyruvate-producing strain. It is a intelligently selected method which can highly improve the efficiency of strain screening. The principle can be described as the following: On the CaCO₃ medium, a transparent ring can be exhibited based on the reaction of PYR produced by the strain and CaCO₃ in the medium for pyruvate-calcium is a kind of soluble substance, it is obviously that the high-pyruvate-producing strain has a bigger dimension of the transparent ring. On the other hand, color reaction between TTC and ADH indicate the enzyme activities which have a proportional relation with color, our object strain is a weak-ADH-enzyme-activities type with a weak metabolic flux from PYR to alcohol. So the white color strain may be the right choice.

Key words :TTC-CaCO₃ Complexes Medium, PYR, Screening

丙酮酸是代谢途径中重要的有机酸,产品用途广泛,可用于化工、制药、农用化学品和营养保健品等行业,近年来世界上对其商业需求不断增长。丙酮酸的生产方法主要有化学合成法和微生物发酵法两大类,化学合成法费时费料,而且设备损耗大,环境污染严重。而发酵法具有原料来源广泛、能耗低、污染小等优点,因此近年来发酵生产丙酮酸研究发展较快。但发酵法也有其不足,筛选到的高产菌种多易退化而使产酸能力大幅下降,最终影响生产,造成原材料的大量浪费^[1~3]。在发酵工厂中菌种复壮工作非常重要,但是工作量大,效率不高,因此选择一种省时省力的菌种筛选方法意义重大。

我们通过 TTC 与碳酸钙复合平板筛选丙酮酸

高产菌株取得了较好的效果,与未采用该方法前相比节省了大量时间和物料,而且高产菌株的遗传稳定性也较好。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

光滑球拟酵母(河南大学生物工程实验室自备)。

1.2 培养基与试剂

显色培养基(TTC培养基)^[4]:葡萄糖 5g,琼脂 20g, TTC(2,3,5-三苯基氯化四氮唑)0.5g, pH 自然,加水至 1000mL。

碳酸钙培养基:葡萄糖 40g,蛋白胨 10g,

* 河南省科技攻关项目(No. 0424270136)

** 通讯作者 Tel 0378-2866494, E-mail: yangshengyu@henu.edu.cn

收稿日期 2006-08-03,修回日期 2006-09-20

KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 金属离子液 10mL, 碳酸钙 5g, 烟酸 4mg, 盐酸硫胺素 $40\mu\text{g}$, 盐酸吡哆醇 1mg, 生物素 $30\mu\text{g}$, 琼脂 20g, pH 5.6, 加水至 1000mL。

金属离子液: CaCl_2 1g, FeSO_4 0.4g, ZnCl_2 0.1g, MnCl_2 60mg, CuSO_4 80mg 用 2mol/L 的 HCl 溶解后定容至 1L, 备用。

以上碳酸钙需要单独灭菌, 条件为 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$, 60min; 其他成分 $0.7 \times 10^5 \text{ Pa}$, 15min 灭菌。TTC 单独过滤除菌, 待培养基温度降至 50°C 后加入。

1.3 实验方法

首先制备单细胞悬液, 稀释后在碳酸钙平板上分离单菌落, 每平板上的菌落 10 个以下为宜, 30°C 培养 24h ~ 48h 后发酵产酸会使单菌落周围出现透明圈, 比较透明圈直径并结合透明圈与菌的直径比可以直观的选择产酸较多生长快的菌, 透明圈出现后在其上方覆盖一层 TTC 培养基, 30°C 避光培养 2h 之后可以呈现不同的颜色, 随后进行摇瓶发酵试验, 测定丙酮酸产量、残糖量和生物量以验证并确定筛选原则。

1.4 菌株的遗传稳定性检验

筛选出的菌种用斜面传代, 摇瓶发酵, 测定发酵液的丙酮酸质量浓度, 以鉴定其稳定性。

1.5 测定方法

生物量的测定: 菌体生长以吸光度表示, 发酵液稀释 10 倍后以培养基为对照, 测定 OD_{660} ;

丙酮酸的测定: 2, 4-二硝基苯肼法^[5];

残糖量的测定: DNS 试剂法^[6];

酒精量的测定: 比色法^[7]。

2 结果与分析

2.1 透明圈的直径与 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$

涂布菌液的碳酸钙平板培养 24h 后, 单菌落周围出现透明圈, 在同一条件下, 透明圈大小反映菌落产酸的多少, 所以 $\Phi_{\text{透明圈}}$ 成为菌种筛选的一个重要指标。经过测量, $\Phi_{\text{透明圈}}$ 平均为 12.80mm, 故所选用的菌, 其 $\Phi_{\text{透明圈}}$ 应大于此值。由图 1 可见, 平板上长出的单菌落直径略有差异, 此系其生长快慢差异造成, 菌落平均直径 4.00mm, 此值以上者为生长快的菌株, 但菌落越大, 其周围的透明圈也越大, 为比较菌落直径大于 4.00mm 时的产酸情况, 引入 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$ 的概念, 菌种筛选应选取比值较大者, 此

菌种在产酸和生长上均有优势。

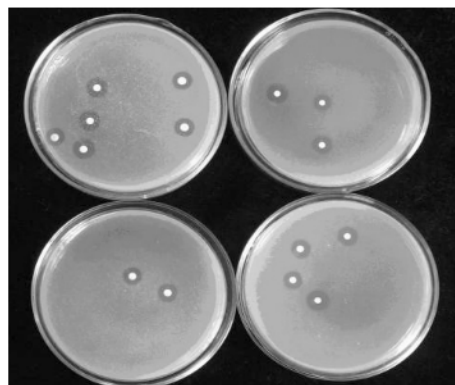


图 1 CaCO_3 平板上光滑球拟酵母产生的透明圈

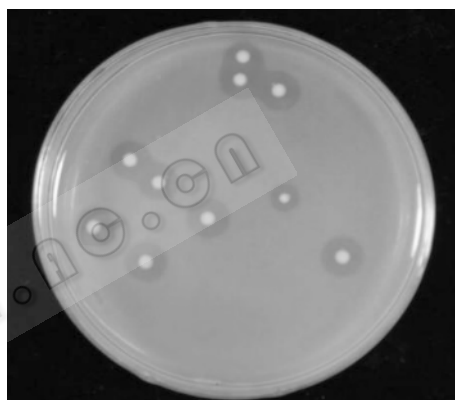


图 2 加入 TTC 上层培养基的 CaCO_3 平板

2.2 显色结果分析

TTC (2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑) 是一种显色剂, 能与乙醇脱氢酶 (ADH) 作用使其失活^[8], 同时产生红色物质。图 2 为倒过 TTC 上层培养基的 CaCO_3 平板的显色情况。

在丙酮酸通向乙醇的代谢过程中, 乙醇产量受此酶活性影响。产酒精能力强的酵母 ADH 活性强且与 TTC 作用呈深红色, 次之显粉红色, 微红色或不显色。用于发酵产丙酮酸的菌种在理论上应该是选择 ADH 酶活力较弱的, 这样可以减少丙酮酸向乙醇的转化, 发酵副产物少也有利于产品的分离提纯, 因此白色或粉红色菌株可能是我们的目的菌株。

2.3 $\Phi_{\text{菌落}}$ 、 $\Phi_{\text{透明圈}}$ 以及 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$ 对摇瓶发酵结果的影响

选取碳酸钙平板上的菌落进行发酵试验, 记录参数选取为 $\Phi_{\text{菌落}}$ 、 $\Phi_{\text{透明圈}}$ 以及 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$, 进行摇瓶发酵实验, 测定丙酮酸产量和生物量 (见表 2)。由表 2 可看出 $\Phi_{\text{菌落}}$ 、 $\Phi_{\text{透明圈}}$ 以及 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$ 与最终发

酵结果有一定关联, $\Phi_{\text{菌落}}$ 在 4.00mm 以上, $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$ 在 3.2 附近,产酸大致相等,比值越大产酸越高,反之越低。不能仅以 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$ 判断产酸,如 6 #,7 #,菌落太小,最终产酸也不高。 $\Phi_{\text{菌落}}$ 反映菌体生长快慢,由表 1 可看出, $\Phi_{\text{菌落}}$ 越小生长越慢,同期摇瓶发酵产酸也越低。

表 1 不同直径选择的发酵实验结果比较

	$\Phi_{\text{菌落}}$ (mm)	$\Phi_{\text{透明圈}}$ (mm)	$\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$	产酸 (g/L)	生物量 OD_{660}
1 #	4.00	12.80	3.20	42.10	1.005
2 #	4.15	12.53	3.02	39.78	1.120
3 #	4.50	14.40	3.21	42.36	1.428
4 #	4.05	14.58	3.6	47.10	1.020
5 #	3.85	14.27	3.71	40.20	0.942
6 #	3.10	12.56	4.05	35.67	0.785
7 #	3.00	9.30	3.10	31.56	0.726

在实际操作过程中,1 # 的平均直径、平均直径比有重要的参考价值,选取时首先选择 $\Phi_{\text{透明圈}}$ 在 12.80mm 以上者,然后选择 $\Phi_{\text{菌落}}$ 在 4.00mm 以上,在此范围内选择 $\Phi_{\text{透明圈}}/\Phi_{\text{菌落}}$ 最大的菌落为宜。

2.4 不同显色结果对摇瓶发酵结果的影响

我们对不同显色结果的单菌落进行扩培,摇瓶发酵测定丙酮酸产量和残糖量以确定颜色的取舍原则(见表 2),由表 2 可以看出,颜色对产酸的影响是:白色菌落产酸最多,其次为粉红色菌落,红色菌落产酸最少。实验结果验证了我们的预测,并且残糖量和副产物(酒精)上也是白色菌落最低,酒精量低至未能测出,说明白色菌落

表 2 不同颜色菌落对发酵的影响(g/L)

颜色	产酸	酒精量	残糖量
红色菌落	35.86	0.06	12.20
粉红色菌落	38.75	0.02	10.35
白色菌落	47.10	未测出	6.25

对原料利用率最高,节约了原料,提高了转化率,降低了副产物的积累。

2.5 菌株遗传稳定性检验

通过该方法筛选出的高产菌株经连续传代后摇瓶发酵考察,其产量变化小,遗传稳定性高,适于工业化菌种的筛选(见表 3)。

表 3 高产菌株的遗传稳定性实验

	第一代	第二代	第三代	第四代	第五代
丙酮酸(g/L)	47.12	47.05	46.86	46.60	46.68

3 讨论

该实验的顺序可根据情况灵活掌握。可先用 CaCO_3 平板使之产生透明圈,然后再用 TTC 平板筛选出产酒精较低的菌种,或先用 TTC 平板筛选出产酒精较低的菌种,然后再用 CaCO_3 平板使之产生透明圈。顺序颠倒也是一种有效的筛选方法,虽然此种方法用时间较多,但有利于菌种的挑取,并且在菌种性质(ADH 酶活力较低)恒定时,也可以省略 TTC 的使用。

总之,TTC 碳酸钙复合平板法筛选效率高、时间短,尤其适合于大量菌株的初筛。所获得的菌株产酸多,提高了原料利用率,提高了转化率,降低了副产物的积累。该法对其它工业微生物菌株的筛选也有着较高的借鉴意义。

参考文献

[1]牟奕,诸葛健.中国酿造,2000,5:1~3.
[2]李寅,陈坚,陈燕,等.工业微生物,2001,2:10~14.
[3]Li Y,Chen J,Lun SY. Appl Microbial Biotechnol,2001,57:451~459.
[4]王梅,张彭湃,帅桂兰,等.酿酒,2001,9:62~64.
[5]陈毓莹.生物化学实验方法和技术.北京:科学出版社,2002.
[6]大连轻工业学院,华东理工大学,郑州轻工业学院,等.食品分析.北京:中国轻工业出版社,1999.
[7]王亚楠,肖冬光.酿酒,2002,11:84~86.
[8]Ryssov N H. Water Res,1975,9:1179~1185.