

耐高渗透压是产甘油假丝酵母甘油高产的基础*

王正祥 方慧英 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

摘要 运用化学诱变法从产甘油假丝酵母获得 19 株渗透压突变株。对其生理及发酵性能的研究结果显示,所有渗透压敏感突变株的甘油产率皆显著降低并且大多数渗透压敏感突变株的糖利用速度减慢,耐渗透压性能提高突变株的糖利用率几乎与亲株相同而甘油发酵性能改变呈现多样性,突变株如 WL-OsmD、WL-OsmF 以及 WL-OsmH 甘油转化率极度降低而突变株 WL-OsmB 的甘油耗糖转化率接近亲株。

关键词 产甘油假丝酵母, 渗透压突变株, 发酵, 甘油, 耐高渗透压

分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-24-26

THE OSMOTOLERANT PROPERTY IS BASE FOR *CANDIDA GLYCEROLGENESIS* OVERPRODUCING GLYCEROL

Wang Zhengxiang, Fang Huiying, Zhuge Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Osmotolerance is one of the most important physiological characteristics that *Candida glycerolgenesis* has. To make clear what role the osmotolerance plays on the over-synthesis of glycerol, we screened out 10 strain of osmosensitive mutants and 9 strain of more osmotolerant mutants from *Candida glycerolgenesis* by chemical mutagenesis. Cultured the osmotic mutants in the broth containing different concentration of glucose, glycerol or sodium chloride, osmosensitive mutant WL-Osm5 showed more sensitive to the decrease of water activity but osmotolerant mutant WL-OsmB did the same as the parent. All the osmosensitive mutants decreased their glycerol productivity greatly but the change of glycerol productivity of osmotolerant mutants varied from near the same glycerol yield as the parent the mutant WL-OsmB showed to remarkable decrease the mutants WL-OsmD, WL-OsmF and WL-OsmH showed.

Key words *Candida glycerolgenesis*, Osmotic mutant, Fermentation, Glycerol, Osmotolerance

对酿酒酵母的渗透压胁迫的研究结果表明,真核微生物酿酒酵母对外环境渗透压胁迫的应答受高渗甘油应答途径(HOG途径)的调控^[1]。将HOG途径的靶基因GPD1基因在酿酒酵母中高效表达使胞内3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)酶活水平提高可极大地提高甘油的产量^[2],由此也表明GPDH是酵母细胞甘油合成关键酶。同样,从粟酒裂殖酵母中克隆出的GPD1基因是一种渗透压调节基因,与细胞耐高渗透压相关^[3]。

产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)是一株能够在含550g/l葡萄糖或含120g/l氯化钠的培养基中生长的高产甘油的耐高渗透压假丝酵母,耐高渗透压是其最重要的生理特征之一^[4]。但其特性及机理以及耐高渗透压性质在甘油产生中的作用和地位不清楚。为此,我们用诱变手段,选育耐高渗透压缺陷型突变株并对其

* 国家“九五”攻关项目

1998-03-02收稿,1998-05-25修回

生长特性、发酵性能进行研究,发现产甘油假丝酵母的耐高渗透压性能是其甘油高产的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

Candida glycerolgenesis Zhuge WL2002-5 由无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心保藏及提供^[4]; 次黄嘌呤缺陷型突变株 *C. glycerolgenesis* (H^-) 经化学诱变筛选获得。

1.2 培养基

培养次黄嘌呤缺陷型突变株时培养基中补充 80mg/L 次黄嘌呤。

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

1.2.2 低渗完全培养基 (CM1): 葡萄糖 20g/L, 酵母膏 10g/L, 蛋白胨 20g/L

1.2.3 高渗完全培养基 (CM2): 葡萄糖 20g/L, 酵母膏 10g/L, 蛋白胨 20g/L, 氯化钠 80g/L

1.2.4 发酵培养基: 葡萄糖 250g/L, 尿素 2g/L, 玉米浆 5ml/L

1.3 渗透压突变株的筛选

按本中心常规方法用亚硝基胍化学诱变法进行突变株的筛选^[5]。其中,渗透压敏感突变株的筛选用制霉菌素富集诱变后培养物,适当稀释后涂布 CM1 平板,待长出菌落后分别点种 CM1 和 CM2 平板,将在 CM2 平板上不能生长而在 CM1 上生长的菌落进行划线分离鉴定。耐渗透压性能提高突变株的选育中将诱变菌体稀释至适当浓度后涂布含 130g/L 氯化钠的 YEPD 平板,30℃ 培养 48~72h。生长菌落进一步作划线分离和鉴定。

1.4 发酵试验

在 250mL 三角烧瓶中装入 30mL 发酵培养基,接种后于 110r/min, 30℃ 发酵 72h, 取样分析葡萄糖和甘油浓度。葡萄糖含量测定用蒽酮法^[6]; 甘油浓度测定用亚砷酸盐法^[7]。

2 结果

2.1 渗透压突变株的获得

经 NTG 诱变后获得 10 株渗透压敏感突变

株和 9 株耐渗透压性能提高突变株。渗透压敏感突变株在含 80g/L 氯化钠的培养基中几乎不生长,而出发菌株生长良好,我们将这类突变株命名为 WL-Osm1、WL-Osm2 等。耐渗透压性能提高突变株可以在含 130g/L 氯化钠的培养基上生长良好,而出发菌株不生长,我们将这类突变株命名为 WL-OsmA、WL-OsmB 等。

选择渗透压敏感突变株 WL-Osm5 和耐渗透压性能提高突变株 WL-OsmB 分别在含不同浓度的葡萄糖、甘油、氯化钠的培养基中振荡培养 24h 后的生长情况,见图 1、图 2、图 3。可以看出,渗透压敏感突变株 WL-Osm5 对培养环境水活度的降低显得更敏感,最适生长糖浓度降低至 100g/L 及在甘油及氯化钠的培养基中生长速度降低且对后者的影响更为敏感(图 1、图 2、图 3); 而 WL-OsmB 所表现出来的生长性能与亲株相似。

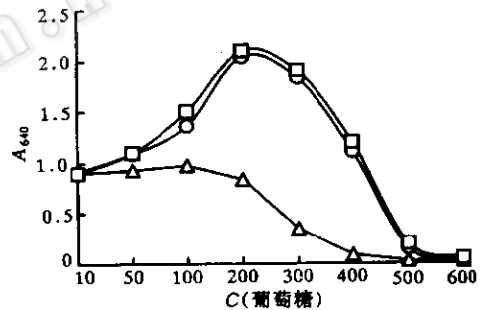


图 1 葡萄糖浓度对产甘油假丝酵母渗透压突变株生长的影响

—○— *C. glycerolgenesis*(H^-), —△— WL-Osm5, —□— WL-OsmB

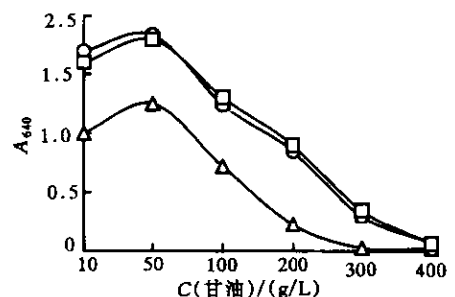


图 2 甘油浓度对产甘油假丝酵母渗透压突变株生长的影响

—○— *C. glycerolgenesis*(H^-), —△— WL-Osm5, —□— WL-OsmB

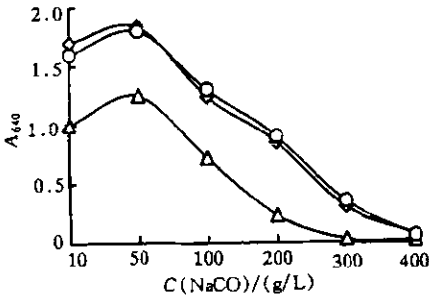


图3 氯化钠浓度对产甘油假丝酵母渗透压突变株生长的影响

—○— *C.glycerolgenesis*(H⁻), —△— WL-Osm5, —□— WL-OsmB

2.2 渗透压突变株发酵性能

在装有30ml发酵培养基的250ml三角烧瓶中接入等量的渗透压突变株及亲株种子液,于30℃、120r/min振荡培养,结果如表1所示。可以看出,所有渗透压敏感突变株的甘油产率皆显著降低。大多数渗透压敏感突变株的糖利用速度减慢,残糖较高。耐渗透压性能提高突变株的糖利用率几乎与亲株相同而甘油发酵性能变化多样,突变株如WL-OsmD、WL-OsmF以及WL-OsmH甘油转化率极度降低而突变株WL-OsmB的甘油耗糖转化率接近亲株。

表1 渗透压突变株的甘油产率与糖利用率

菌株	残糖(g/l)	甘油转化率(%)
WL2002-5(H ⁻)	18	46.4
WL-Osm1	74	29.6
WL-Osm2	75	25.9
WL-Osm4	89	41.1
WL-Osm5	106	40.4
WL-Osm7	74	36.4
WL-Osm8	43	30.0
WL-OsmB	11	44.8
WL-OsmD	22	14.0
WL-OsmF	35	11.6
WL-OsmG	7	35.0
WL-OsmH	20	12.6
WL-OsmI	18	38.0

3 讨论

在对酿酒酵母的研究中发现,编码酵母肌动蛋白ACT1的转录和翻译易受外环境水活度变化的影响并发现含有单拷贝ACT1基因的二倍体酵母细胞对渗透压敏感,即在高渗环境中

不能生长^[8,9],而这种影响存在浓度相关性,即分裂素的胞内浓度影响或决定细胞对外环境渗透压的敏感程度。我们筛选获得的10株渗透压敏感突变株无论是在高渗培养基中还是在低渗培养基中生长,其生长速率皆显著降低,提示耐高渗性能可能与细胞的生长相关联。

在真核微生物特别是酵母中,胞内多元醇池尤其是甘油决定了细胞耐受外环境高渗压的程度^[10]。因此,产甘油假丝酵母渗透压敏感性突变很可能是由于突变后其合成或胞内积累甘油能力的降低所致并从总体上反映出产甘油假丝酵母的耐高渗压性能为其高产甘油所必需。

产甘油假丝酵母耐渗透压性能提高突变株的产甘油能力出现多种变化,根据上述相同的机理,此类突变株胞内合成和积累甘油的能力提高。从发酵试验结果可以看出产甘油假丝酵母耐渗透压性能提高突变株的甘油产率并未提高甚至明显降低,提示此类突变株的胞内甘油的积累能力提高而甘油合成和分泌能力可能下降,因此,在对产甘油假丝酵母进行任何改良时,维持其原有的耐高渗压性能是十分重要的,为此,我们正对产甘油假丝酵母的甘油合成关键酶进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Brewster J L, De Valoir T, Dwyer, et al. Science, 1993, 259:1760~1763.

[2] Nevoigt E, Stahl U. Yeast, 1996, 12:1331~1337.

[3] Ohmiya R, Yamada H, Nakashima K, et al. Mol Microbiol 1995, 18:963~973.

[4] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. 微生物学报, 1999, 39(1): 68~74.

[5] 诸葛健 王正祥 编著. 工业微生物实验技术手册. 第一版. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.

[6] Miller G L, Blum R, Glennon W E, et al. Anal Biochem, 1960, 2:127~132.

[7] Lambert M, Neish A C. Can. J. Microbiol, 1950, 28:83~89.

[8] Novick P, Botstein D. Cell, 1985, 40:415~426.

[9] Chowdhury S, Smith K W, Gustin M C, J Cell Biol, 1992, 118:561~571.

[10] Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H. Nature (London) 1994, 369:242~245.