

米根霉乙醇脱氢酶 (ADH) 突变菌株的诱变选育*

郑 志 姜绍通** 罗水忠 李兴江 马 林

(合肥工业大学生物与食品工程学院 合肥 230009)

摘要: 米根霉发酵生产 L-乳酸过程中, 由于丙酮酸在丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶 (ADH) 催化下生成乙醇, 使得丙酮酸向乳酸转化的流量减少。采用亚硝基胍 (NTG) 诱变米根霉 AS3.3462 孢子液, 诱变剂量为 0.15 mg/mL 时, 致死率为 70%~80%。在含丙烯醇的 YPD 筛选培养基上筛选获得两株 ADH 活力降低的突变株 mut-1 和 mut-2, 检测突变株 mut-1 和 mut-2 的最大 ADH 活力分别为 35.67 和 43.09 U/mL, 是原始菌株的 41.63% 和 50.29%。发酵 72h 后, 原始菌株的乙醇与乳酸浓度分别为 28.9 g/L 和 40.31 g/L, 而 mut-1 和 mut-2 突变株的乙醇产量分别为 4.87 g/L 和 6.56 g/L, 乳酸产量为 54.45 g/L 和 44.07 g/L。在相同的发酵条件下, 米根霉 ADH 突变株 mut-1 和 mut-2 对还原糖的利用速率高于出发菌株, 其生物量积累亦高于出发菌株。

关键词: 米根霉, ADH, L-乳酸, 乙醇, 生物量

中图分类号: TQ921⁺.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0024-04

The Screening of Alcohol Dehydrogenase (ADH) Mutant of *Rhizopus oryzae**

ZHENG Zhi JIANG Shao-Tong** LUO Shui-Zhong LI Xing-Jiang MA Lin

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

Abstract: During L-lactic acid fermentation with *Rhizopus oryzae*, there existed a branch pathway by which pyruvate was transformed to ethanol catalyzed by pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH), thus decreasing the flux of pyruvate to lactic acid. In this study, the spores of *Rhizopus oryzae* AS3.3462 mutagenized with nitrosoguanidine (NTG), the appropriate dosage was 0.15 mg/mL and the lethal rate was 70%~80%. Two mutants, named mut-1 and mut-2, with decreased ADH activity were screened out by yeast peptone dextrose (YPD) agar medium containing allyl alcohol. These two mutants had decreased ADH activities of 41.63% and 50.29% compared with the parent strain. The fermentation behavior after 72h showed that the yields of ethanol produced by mut-1 and mut-2 were 4.87 g/L and 6.56 g/L respectively, while the wild type strain was 28.9 g/L, and the lactate concentrations of mut-1 and mut-2 also increased from 40.31 g/L to 54.45 g/L and 44.07 g/L, respectively. It is also found that mut-1 and mut-2 had a high reducing sugar consumption rate and biomass accumulation than its present strain.

Key words: *Rhizopus oryzae*, ADH, Allyl alcohol, Ethanol, Biomass

L-乳酸是一种重要的天然有机酸, 在食品、医药、生物降解塑料的制造上有广泛应用^[1,2]。米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 由于具备好氧发酵、可直接利用淀粉做 C 源、发酵产物 L-乳酸纯度高、易于分离等特点, 而成为目前制备高光学纯度 L-乳酸的主要菌种^[3,4], 但发酵周期长, 糖转化率低等缺点限制了其在实际生产中的广泛应用^[5]。目前国内外许多学者对米根霉发酵生产 L-乳酸中的菌种改良做了大量研究^[6-8], 但存在工作量大, 突变菌株易退化, 发酵参数不稳定等缺点。

已有的研究证明, 米根霉发酵生产 L-乳酸的代谢网络是: 葡萄糖在细胞内通过糖酵解途径 (EMP) 生成丙酮酸, 丙酮酸除了可以通过 L-乳酸脱氢酶直接生成 L-乳酸外, 还可以通过丙酮酸脱羧酶、ADH 生成发酵副产物乙醇^[9]。所以, 要提高 L-乳酸的产量, 就必须降低丙酮酸流入乙醇支路的碳流, 而通过筛选获得 ADH 活力降低的突变菌株是一条很好的思路。本研究通过筛选获得 ADH 活性降低的米根霉突变株, 并对突变菌株的

*教育部博士点基金项目 (No. 20040359008)

教育部“同步辐射博士生创新中心”研究生创新基金资助 (No. 20041216S)

**通讯作者 Tel: 86-551-2901507, E-mail: jiangst@hfut.edu.cn

收稿日期: 2006-02-20, 修回日期: 2006-06-05

代谢特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

米根霉 (*Rhizopus oryzae*) AS3.3462, 由合肥工业大学生物与食品工程学院发酵实验室保藏, 购于广州微生物研究所菌种保藏中心。

1.2 培养基

1.2.1 菌种保藏培养基: PDA 斜面培养基。

1.2.2 YPD 液体培养基: 蛋白胨 5g, 酵母浸膏 3g, 葡萄糖 20g, 定容至 1L。

1.2.3 溴甲酚绿培养基: PDA 培养基中加入 0.1% 脱氧胆酸钠和 0.1% 溴甲酚绿。

1.2.4 筛选培养基^[10]: 把 YPD 培养基灭菌后, 无菌条件下按 0.6% (v/v) 比例加入丙烯醇。

1.2.5 发酵培养基: 葡萄糖 100g, (NH₄)₂SO₄ 4g, KH₂PO₄ 0.3g, ZnSO₄·7H₂O 0.44g, MgSO₄·7H₂O 0.25g, CaCO₃ 60g, 定容至 1L。

1.3 实验方法

1.3.1 NTG 诱变致死曲线^[11]: 用无菌水洗下米根霉孢子, 无菌纱布过滤到三角瓶中, 使孢子浓度在 10⁷ 个/mL 左右, 然后按 1: 1 加入灭过菌的 YPD 培养基和玻璃珠, 在 32℃, 125r/min 的摇床上培养 2h, 使孢子萌发。把菌液倒入离心管中, 3,500r/min 离心 12min。弃去上清液后, 用无菌 pH6.0 的磷酸盐缓冲液洗涤孢子, 即为诱变孢子液, 其孢子浓度控制在 10⁶ ~ 10⁷ 个/mL。按表 1 比例在 10mL 离心管中分别加入 NTG 溶液和孢子液, 160r/min, 28℃ 下摇床培养 30min, 取出后再 3,500r/min 离心 12min, 弃去上清液, 孢子用无菌磷酸缓冲液洗涤离心 3 次, 最后将液体加到原来的体积, 分别做 10, 10², 10³, 10⁴ 倍稀释, 取 0.1mL 涂于溴甲酚绿平板, 每个梯度涂两个平板, 32℃ 培养 48h, 计算每皿菌落数, 绘制致死曲线。

表 1 诱变米根霉 NTG 溶液和孢子液加入量

编号	NTG 溶液 (mL)	孢子液 (mL)	剂量 (mg/mL)
0	0	5.000	0
1	0.125	4.875	0.025
2	0.250	4.750	0.050
3	0.500	4.500	0.100
4	0.750	4.250	0.150
5	1.000	4.000	0.200

1.3.2 ADH 突变株的筛选: 将诱变后的菌株用无

菌生理盐水洗涤后制成菌悬液, 吸取 0.1mL 涂布在含丙烯醇的 YPD 培养基上, 32℃ 培养, 每个丙烯醇浓度涂 15 个平板。待筛选平板上长出菌落, 将其挑出保藏在 PDA 斜面培养基上。

1.3.3 发酵液中乳酸、乙醇、还原糖、生物量与 ADH 活力分析: 在 250mL 的三角瓶中分别装入 50mL 发酵培养基, 按 5% 的接种量接入原始菌株和突变株的孢子悬浮液, 32℃, 200r/min 摇床培养, 按预定间隔时间取样, 发酵液用于测定其中乙醇、乳酸和还原糖含量, 菌丝体部分测其生物量, 部分破碎后测其 ADH 活力。

1.4 检测方法

1.4.1 乙醇的测定方法——气相色谱法: 1790 气相色谱仪, 配有氢火焰离子化检测器 (安捷伦科技上海分析仪器有限公司), N2000 色谱数据工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司)。色谱柱采用的是 DB-WAX 毛细管柱 (美国安捷伦科技公司进口), 柱长 30m, 内径 0.25mm, 液膜厚度 0.5μm。色谱条件: N₂ 为载气, 流速为 15mL/min, 进样器 240℃, 柱温 220℃, 检测温度 250℃, 进样量 1μL, 分流比 1: 100, 外标法定量。

1.4.2 乳酸的测定方法: EDTA 定钙法^[12]。

1.4.3 还原糖的测定: 费林氏法^[13]。

1.4.4 生物量的测定方法——干重法: 将发酵液过滤, 得菌丝体, 用稀盐酸或去离子水洗 2 ~ 3 次除去残留的 CaCO₃, 置 60℃ ~ 80℃ 的干燥箱中烘干至恒重。

1.4.5 ADH 活力的测定: 将发酵一定时间 (有大量菌丝生成) 的发酵液过滤洗净, 挤压水分, 称取一定量的湿菌体, 按湿菌体重: 缓冲液体积 = 2: 5 加入 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4), 超声波细胞破碎仪中冰浴破碎, 然后以 10,000r/min 冷冻离心 10min, 取上清液测 ADH 的活力。测定时反应体系中加入 2.3mL 磷酸盐缓冲液, 0.5mL 乙醛, 0.1mL NADH 溶液, 加盖摇匀后, 测定 340nm 下吸光度值 A, 再加入一定量的酶液 (根据酶液浓度高低而定), 摇匀后, 每隔 0.5min 测定 A 值, 连续测定 3min, 以 A 对时间作图, 取反应最初线性部分计算 ΔA 减少值。

ADH 活力单位 U 定义: 在 25℃, 以每分钟 ADH 催化消耗 1μmol NADH 的酶量为一个单位。

ADH U μmol/min

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times V}{\varepsilon \times b} \times 10^3$$

$$\text{ADH 酶活 (U/mL)} = \frac{U \times \text{稀释倍数}}{\text{酶液加入量 } (\mu\text{L})} \times 10^3$$

式中: $\Delta A_{\min-340\text{nm}}$ 处每分钟吸光度的变化值; V - 酶促反应体积 (mL); ε - NADH 的摩尔消光系数 ($6.22 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); b - 比色皿光程 (cm)。

2 结果与分析

2.1 NTG 诱变米根霉的致死曲线

由于米根霉菌丝体为多细胞核状态, 而孢子为单核, 所以针对米根霉的诱变多采用其孢子形式进行。实验先研究了不同的 NTG 浓度下的米根霉 AS3.3462 孢子的致死曲线, 结果见图 1。

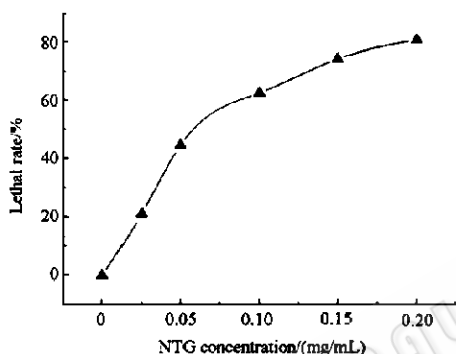


图1 NTG 对米根霉 AS3.3462 孢子致死曲线

一般情况下, 当细胞的存活率较高时, 突变率往往随诱变剂增加而增大, 但细胞的其它代谢功能可能随着诱变剂量的增加而损伤。本实验采用致死率为 70% ~ 80% 的 NTG 剂量为诱变剂量, 由图 1 中可以看出对应的浓度在 0.15 mg/mL 附近。所以, 后续的诱变实验中采用的 NTG 浓度为 0.15 mg/mL。

2.2 ADH 突变株的筛选

研究中用来筛选米根霉 ADH 活力降低突变株的培养基是在 YPD 培养基中添加了 0.6% (v/v) 的丙烯醇, 其筛选原理是培养基中的丙烯醇能在 ADH 的催化下转化为对菌体有毒害作用的丙醛, 所以在含丙烯醇的平板上, 只有 ADH 活性降低的突变菌株才能生长。本研究采用上述筛选方法, 获得两株 ADH 突变菌株, 分别命名为 mut-1 和 mut-2。

2.3 原始菌株与突变菌株产乙醇特性研究

将原始菌株和突变菌株 mut-1 和 mut-2 接到摇瓶中进行培养, 从发酵 12h 起, 每隔 12h 取样分析

发酵液中乙醇与乳酸的含量, 并检测此时菌丝体 ADH 活力, 结果见图 2、图 3 和图 4 所示。

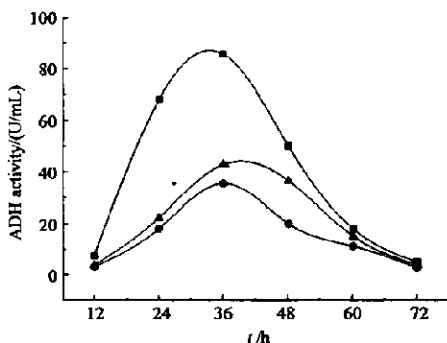


图2 原始菌株和突变株 ADH 活力比较

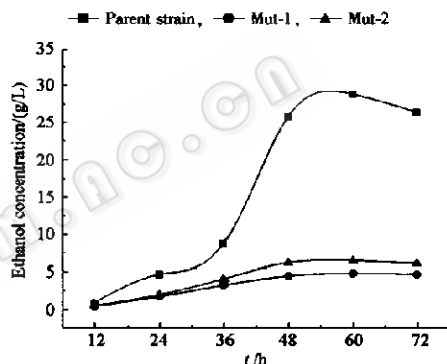


图3 原始菌株和突变株产乙醇比较

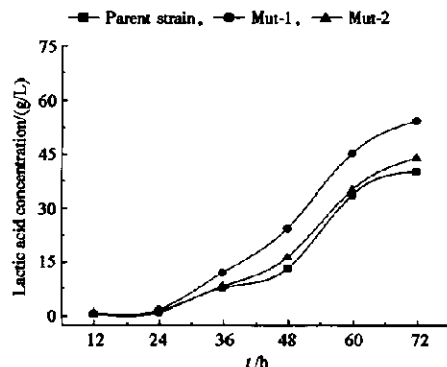


图4 原始菌株和突变株产乳酸比较

由图 2 可以看到, 米根霉 AS3.3462 诱变后的菌株 ADH 活力明显降低, 它们的最大 ADH 活力均出现在发酵 36h, 此时两株突变株的 ADH 活力分别是原始菌株的 41.63% 和 50.29%。图 3 表明了 mut-1 和 mut-2 突变株的乙醇转化量非常低, 分

别为4.87g/L和6.56g/L,而原始菌株的最高乙醇产量达到28.92g/L。从图4可以看出,mut-1和mut-2突变株的乳酸转化率均有一定的提高,其中mut-1发酵72h后发酵液中乳酸浓度为54.45g/L,mut-2为44.07g/L,而原始菌株为40.31g/L。综合图2、图3和图4的数据分析表明,米根霉由于ADH的活性降低,致使其对乙醇的转化率降低,使得节流的丙酮酸有一定量流向了产乳酸的途径。

2.4 突变菌株的生物量积累及对还原糖的利用情况

实验还研究了mut-1、mut-2突变菌株与原始菌株在发酵过程中对还原糖的利用情况及生物量的变化,结果见图5和图6所示。

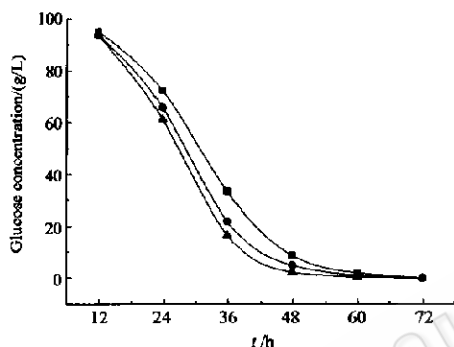


图5 原始菌株和突变株发酵中还原糖变化

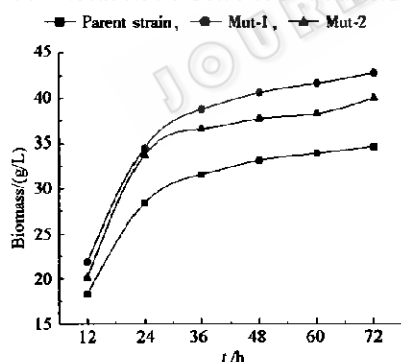


图6 原始菌株和突变株发酵中生物量

图5表明,在同样的发酵条件下,mut-1和mut-2突变菌株对糖的利用速率高于出发菌株,但其还原糖利用的变化曲线形状与原始菌株的非常相似。从图6则可以看出,发酵过程中,mut-1和mut-2突变菌株的生物量积累均高于出发菌株,这可能是由于ADH突变株中有部分碳流用于菌体生物量的增加了。实验中,在斜面培养条件下,可

以观察到米根霉 As3.3462 原始菌株生长较慢,但菌丝茂盛,菌落疏松呈棉絮状,颜色较淡;而突变菌株生长较快,菌丝低矮,紧贴在培养基表面,较早产生孢子,且由白孢子变成黑孢子的时间较短,成熟快,菌丝颜色深,呈黑色。

3 结论

通过上述研究,得出如下结论:(1)采用含丙烯醇的 YPD 培养基,可以筛选获得 ADH 活力显著降低的米根霉突变株。(2)研究筛选获得的米根霉 ADH 突变株 mut-1 和 mut-2,其最大 ADH 活力分别比原始菌株降低 58.37% 和 49.71%,最大乙醇产量分别降低 493.8% 和 340.9%。mut-1 突变菌株对乳酸的转化率比原始菌株提高了 35.1%,而 mut-2 突变菌株对乳酸的转化率提高幅度较低,仅为 9.3%。(3)在相同的发酵条件下,米根霉 ADH 突变株 mut-1 和 mut-2 对还原糖的利用速率高于出发菌株,其生物量积累亦高于出发菌株。

参考文献

- [1] 曹本昌,徐建林,匡群.食品与发酵工业,1993,19(3):56~61.
- [2] Mobley D. Plastics from Microbes. New York: Hanser/Gardner Publications Inc. 1994. 93~137.
- [3] 金其荣,张雄民,徐勤.有机酸发酵工艺学.北京:中国轻工业出版社,1997. 402~404.
- [4] 白冬梅,赵学明,李鑫钢,等.现代化工,2002,22(6):9~12.
- [5] 潘雨军,付萍,郑志,等.微生物学报,2006,24(4):586~590.
- [6] Angelika L, Jacqueline M R, James E G, et al. Fungal Genetics and Biology, 1997, 21: 30~39.
- [7] Bai D M, Zhao X M, Li X G, et al. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18: 41~48.
- [8] 古绍彬,葛春梅,汪育宏,等.工业微生物,2004,34(1):12~16.
- [9] Barbara E W, Angelika L, Jacqueline M R. Journal of Theoretical Biology, 1996, 182: 453~457.
- [10] Christopher D S, Shelby N F, Rodney J B. Biotechnology Letters, 1998, 20(2): 191~194.
- [11] 乔长晟,汤凤霞,苏建宇,等.食品工业科技,2002,23(2):35~37.
- [12] 郑志,姜绍通,潘雨军,等.食品科学,2003,26(3):102~105.
- [13] 天津轻工业学院,大连轻工业学院,无锡轻工业学院,等.工业发酵分析.北京:轻工业出版社,1980. 16~17.