

原生质体复合诱变选育耐高温高产乙醇酵母菌株

申乃坤^{1,2,3},王青艳^{1,2,3},秦 艳^{1,2,3},王成华^{1,2,3},廖思明^{1,2,3},朱 婧^{1,2,3},黄日波^{1,2,3}

(1. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室,广西 南宁 530007; 2. 广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西 南宁 530007; 3. 广西生物炼制重点实验室,广西 南宁 530007)

摘 要: 以酿酒酵母 Ygx-5 为出发菌株,对其原生质体进行紫外线(UV)与亚硝基胍(NTG)复合诱变,经初筛和复筛,选育出 1 株耐高温、高产乙醇菌株 U-N2。在 37 ℃ 培养条件下,菌株 U-N2 产乙醇浓度最高可达 16.32 %vol,比原菌株提高 20.44 %,比只用紫外线诱变后的菌株提高 8.04 %,比只用亚硝基胍诱变后的菌株提高 6.27 %。经过 20 次传代培养,乙醇产量稳定。

关键词: 燃料乙醇; 酿酒酵母; 原生质体; 紫外线; 亚硝基胍; 复合诱变

中图分类号: Q93-3; TS262.3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)05-0023-04

Breeding of A Thermotolerant and High Ethanol-producing *Saccharomyces cerevisiae* Strain by UV-NTG Composite Protoplast Mutagenesis

SHEN Naikun^{1,2,3}, WANG Qingyan^{1,2,3}, QIN Yan^{1,2,3}, WANG Chenghua^{1,2,3},

LIAO Siming^{1,2,3}, ZHU Jing^{1,2,3} and HUANG Ribo^{1,2,3}

(1. State Key Lab of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, Nanning 530007; 2. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007; 3. Guangxi Key Lab of Biorefinery, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: In this experiment, *Saccharomyces cerevisiae* strain Ygx-5 was used as original strain and its protoplast was treated by UltraViolet(UV)-nitrosoguanidine (NTG) composite mutation to obtain thermotolerant and high ethanol-producing mutants. Through primary screening and confirmed screening, one strain designated as U-N2 was obtained. As the fermentation temperature was at 37 ℃, the final ethanol concentration produced by U-N2 strain could reach to 16.32 %vol, 20.44 % higher than original strain, 8.04 % higher than mutant underwent UV mutation only, and 6.27 % higher than mutant underwent NTG mutation only. The stable genotype with high ethanol yield had been verified through twenty times of transferring of culture.

Key words: fuel ethanol; *Saccharomyces cerevisiae*; protoplast; UV; DES; composite mutation

能源危机、环境危机日益加重,使得开发燃料乙醇作为汽油替代品已成为世界各国的共识。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是目前使用最广泛的菌种之一,具有生长旺盛、生物量大、公认安全等优良特点。传统的酿酒酵母的乙醇发酵最适温度为 28~33 ℃,一般不超过 35 ℃,这一限制因素增加了乙醇的生产成本,甚至在部分气温较高地区根本无法进行正常生产^[1]。使用耐高温酵母不仅有利于降低生产水耗、电耗,充分利用现有设备,缩短生产周期,提高生产率,而且保证了夏季的正常生产。因此,选育在高温条件下有高抗逆性、产乙醇能力强的菌种就成为实现乙醇浓醪发酵的关键之一。

紫外线是一种最常用的物理诱变因素,而亚硝基胍

(NTG)是一种化学超级诱变剂,有很强的诱变作用。将两种诱变方法结合,有效避免使用单一诱变剂产生的饱和效应,可使诱变效果远远大于独立诱变^[2]。与菌体相比,原生质体由于去除了细胞壁,对诱变剂更加敏感,有可能更容易得到优良的突变株^[3]。因此,通过对实验室筛选得到的 1 株高产乙醇酵母为出发菌株,经过紫外线与亚硝基胍复合诱变选育出在高温条件下高产乙醇的酵母突变菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划课题(2007BAD75B05);广西自然科学基金重点项目(2010GXNSFD013030);广西科学院基金(No. 10YJ25SW07)。

收稿日期:2011-01-26

作者简介:申乃坤(1980-),山东菏泽人,在读博士生,主要从事生物质能源研究。

通讯作者:黄日波,rbhuang@gxas.cn。

优先数字出版时间 2011-03-18,地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110318.1006.000.html?uid=>。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)Ygx-5, 本实验室筛选得到的高产菌株。

1.1.2 酶制剂

蜗牛酶(Snailase)购自北京欣经科生物技术有限公司, 纤维素酶(Cellulase)购自宁夏和氏璧生物技术有限公司, 液化酶(Liquozyme Supra)、糖化酶(Dextrozyme DX)购自诺维信公司。

1.1.3 培养基

①液体培养基(YPD, g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, pH 值自然(5.5 左右)。

②固体培养基(YPED): 在液体 YPD 培养基中添加琼脂 20 g/L。

③初筛培养基(高渗培养基, g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, 琼脂粉 20, TTC 0.5, KCl 52.5 g, pH 自然。

④复筛培养基: 在液体培养 YPD 基中分别添加 14 %vol、16 %vol 的乙醇。

⑤发酵培养基: 木薯粉(广西产, 淀粉含量 65.36 %)与自来水以 1:2.1 的料水比混合, 加入液化酶, 迅速加热至 85 °C, 液化 30 min, 降温至 37 °C, pH 值调整为 4.5, 加入适量糖化酶, 接种发酵^[4]。

1.1.4 相关溶液

①亚硝基胍(NTG)溶液配制: 在通风橱中称取 20 mg 亚硝基胍于棕色瓶中, 加 2.0 mL 丙酮使其溶解, 溶解后加水, 配制成 2.0 mg/mL 亚硝基胍溶液^[4]。

②生理盐水: 0.7 %的氯化钠溶液。

③PBS 溶液^[5](100 mmol/L, pH7): 磷酸缓冲液(PB)加入渗透压稳定剂(0.8 mol/L 山梨醇溶液)。

1.1.5 仪器与设备

水浴锅; 恒温培养箱; 离心机; 分光光度计; 恒温调速摇床; 磁力搅拌器; 超净工作台; 20 L 全自动发酵罐。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌原生质体制备^[6]

选用酵母菌对数生长期, 培养 9~12 h (OD_{600} 为 0.8 左右)的细胞, 取 5 mL 含有 0.2 % β -巯基乙醇 PB 缓冲液置于装有酵母泥的离心管中 30 °C 保温 10 min, 以 3000 r/min 离心 10 min 倾去上清液, 采用 1.5 %蜗牛酶和 1.0 %纤维素酶的混合酶液处理 1.5 h, 用 PBS 缓冲液 2500 r/min 离心洗去酶液, 将原生质体悬于 PBS 高渗缓冲液中, 浓度控制为 10^7 个/mL 左右备用。

1.2.2 紫外线诱变

取 10 mL 原生质体悬浮液放置在直径为 9 cm 的培养皿中, 并将其放入带有磁力搅拌器的暗箱中, 在 15 W 紫外灯(预热 30 min)下距离 30 cm 照射一定时间。然后用无菌水稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度, 分别取 0.1 mL 涂在装有初筛培养基的平皿上(为防止回复突变, 此操作在红灯下进行)。将平皿置于 37 °C 的恒温、恒湿培养箱中避

光培养 26~48 h, 以平板菌落计数法进行活菌计数, 绘制紫外致死曲线^[7]。

1.2.3 亚硝基胍诱变

将制备好的原生质体加入不同浓度 NTG 溶液, 于 35 °C 处理 1 h, 将 NTG 处理过的原生质体离心, 用 PBS 冲洗 3 次以除去 NTG 残留, 然后用无菌水稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度, 分别取 0.1 mL 涂装有初筛培养基的平皿上。将平皿置于 37 °C 的恒温、恒湿培养箱中避光培养 26~48 h, 绘制 NTG 致死曲线^[8]。

1.2.4 紫外线与亚硝基胍复合诱变

先将原生质体在紫外诱变致死率为 60 %~70 %的条件下进行处理, 然后将诱变后的菌液用一定浓度的亚硝基胍 35 °C 处理 1 h。稀释涂布于平板上, 37 °C 培养 26~48 h, 绘制紫外线与 NTG 复合诱变的致死曲线。

1.2.5 筛选过程

①选取诱变致死率为 70 %~80 %条件下的原生质体菌悬液稀释涂布在初筛高渗培养基中;

②将颜色较深的原生质体再生菌落接入装有杜氏管的复筛培养基中, 根据 96 h 内杜氏小管内气体量超过总体积的 1/4 进行计数, 实验平行重复 3 次(以下同);

③选取耐高温(37 °C)、耐高乙醇(16 %vol)菌株接入发酵培养基中进行高温发酵测定;

④对筛选得到的正突变菌株进行遗传稳定性试验, 并与出发菌株做发酵性能比较。

1.2.6 测定方法

乙醇浓度测定: 气相色谱法^[9]。

残糖浓度测定: 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[10]。

菌体个数测定: 血球计数板^[11]。

致死率的测定: 将培养后的平板单菌落计数, 以没有经过诱变处理的平板菌落数作对照, 计算致死率。

2 结果与分析

2.1 紫外线诱变致死曲线及结果

对酿酒酵母 Ygx-5 原生质体紫外线诱变的致死率进行分析, 结果见图 1。

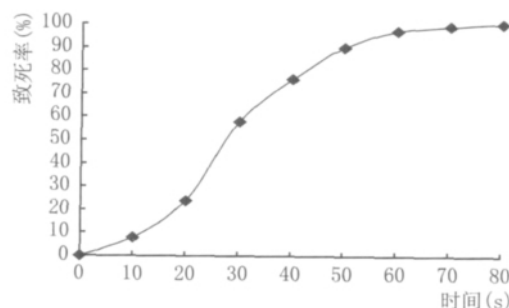


图1 酿酒酵母 Ygx-5 原生质体紫外线诱变的致死曲线

由图 1 可看出, 致死率随照射时间的延长而逐渐增加, 紫外线具有诱变和杀菌的双重功效, 诱变的剂量太

低,突变率和致死率都很低,不利于突变菌株的筛选;诱变剂量太高,致死率和负突变率大幅升高,很难筛选到正突变菌株。一般选择致死率为70%~80%的剂量,从图1中可看出,当处理时间为40 s时,致死率达到76%。

选取紫外照射时间为40 s进行紫外诱变,将诱变后的菌液适当进行梯度稀释后,涂布于初筛平板(TTC显色平板),37℃避光培养48 h。挑选颜色较深的50个菌落为初筛菌株,接种于液体培养基中,37℃、180 r/min培养12 h,按照5%的接种量转接到装有复筛培养基的试管中(内装有杜氏小管),根据72 h内杜氏小管内气体量超过总体积的1/4计数(以下试验同),结果见表1。

表1 酿酒酵母Ygx-5原生质体紫外诱变结果

培养温度(℃)	乙醇浓度(%vol)	产气菌株数	对照菌株(Ygx-5)
30	14	11	+
37	14	8	-
30	16	3	-
37	16	2	-

注: +表示杜氏管内气体体积超过1/4, -表示杜氏管内气体体积小于1/4(以下表同)。

原始出发菌株Ygx-5,在37℃条件下,乙醇浓度为14%vol的杜氏管中不产气。而经过紫外线诱变后有11株能37℃、14%vol乙醇浓度下发酵产气,为在耐高温性状方面有提高的正突变株。原始出发菌株在30℃下,16%vol乙醇浓度的液体培养基中不产气,而经紫外线诱变后有3株在30℃条件下,16%vol乙醇浓度下发酵产气,相对原始出发菌株,诱变株在耐乙醇性状方面有一定提高。而有2株菌(命名为UV1,UV2)可以耐受37℃、16%vol乙醇浓度,它们是在耐高温和耐高乙醇浓度上同时有一定提高的突变株。

2.2 NTG诱变致死曲线及结果

图2为酿酒酵母Ygx-5原生质体的NTG致死情况分析结果曲线。

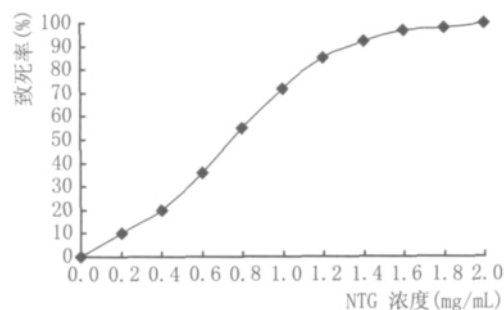


图2 酿酒酵母Ygx-5原生质体NTG致死曲线

由图2可知,酵母菌的致死率随NTG浓度的升高而增加,NTG浓度在1.0~1.2 mg/mL时,菌体致死率在70%~80%,有利于正突变的产生。

在NTG浓度在1.0 mg/mL的诱变剂量下,选取颜色较深的50个菌落进行杜氏管产气复筛实验,结果见表2。

表2 酿酒酵母Ygx-5原生质体NTG诱变结果

培养温度(℃)	乙醇浓度(%vol)	产气菌株数	对照菌株(Ygx-5)
30	14	13	+
37	14	9	-
30	16	5	-
37	16	3	-

如表2所示,经过NTG诱变后,有13株能耐受37℃、14%vol乙醇浓度,为在耐高温性状方面有提高的正突变株。有5株在35℃条件下,能耐受16%vol乙醇浓度,在耐乙醇性状方面这5株有一定的提高。而有3株菌(命名为NTG1,NTG2,NTG3)可以耐受37℃、16%vol乙醇浓度,为在耐高温和耐乙醇浓度性能上同时有一定提高的突变株。

2.3 紫外线与NTG复合诱变致死情况

现将酵母菌紫外诱变30 s(致死率约为60%),再分别用不同浓度的NTG进行处理后,稀释涂平板,结果见图3。

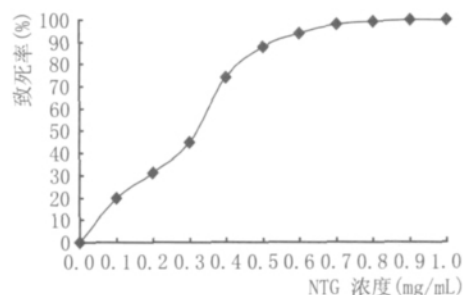


图3 酿酒酵母Ygx-5原生质体紫外线与NTG复合诱变致死曲线

由UV-NTG复合诱变的致死率曲线可知,经过紫外诱变后的菌株对NTG更敏感,NTG浓度为0.4 mg/mL时,酵母菌的致死率约为80%。

将复合诱变后的菌体进行复筛,结果见表3。

表3 酿酒酵母Ygx-5原生质体紫外线与NTG复合诱变结果

培养温度(℃)	乙醇浓度(%vol)	产气菌株数	对照菌株(Ygx-5)
30	14	19	+
37	14	14	-
30	16	12	-
37	16	7	-

如表3所示,经过紫外线与NTG诱变后有19株能耐受37℃、14%vol乙醇浓度,有12株在35℃条件下能耐受16%vol乙醇浓度,而有7株菌(命名为U-N1,U-N2,U-N3,U-N4,U-N5,U-N6,U-N7)可以耐受37℃、16%vol乙醇浓度,这些菌株为在耐高温和耐乙醇浓度性能上同时有一定提高的突变株。

2.4 耐高温、耐高乙醇正变菌株的发酵筛选

经过在不同温度下含不同乙醇杜氏管产气的筛选,得到了同时耐高温、耐高乙醇的正突变菌株。为了检验所筛选的菌株在发酵过程中产乙醇的能力,在37℃下用摇

瓶进行发酵实验,对比各个菌株发酵液中最高乙醇浓度,结果见图4。

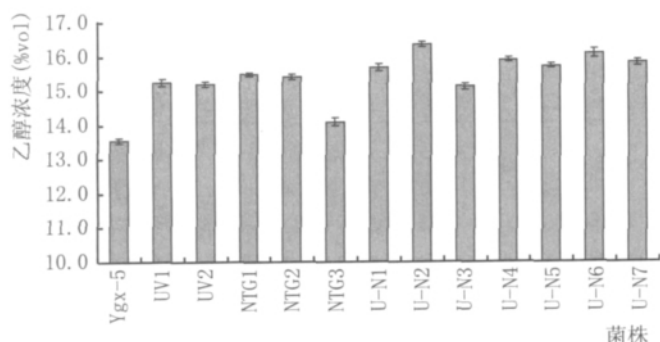


图4 不同菌株乙醇发酵结果

从图4可看出,最初的出发菌株在摇瓶发酵过程中最高乙醇浓度仅为13.55%vol,经过诱变得到的突变株发酵,发酵液中乙醇最高浓度比出发菌株的最高浓度一般都高出8%左右,而经过紫外线与NTG复合诱变得到的菌株U-N2其发酵液中乙醇最高浓度为16.32%vol,相比最初的出发菌株Ygx-5,U-N2菌株最高乙醇浓度提高了20.44%。

2.5 突变菌株遗传稳定性试验

将筛选得到的菌株U-N2经过20次传代,分别取第1、第5、第10和第20代进行木薯粉高温同步糖化发酵(37℃)试验。从实验结果(见表4)可知,获得的突变菌株在乙醇及残还原糖等发酵指标上差别不大,说明该菌遗传性状基本保持稳定。

表4 突变菌株U-N2遗传稳定性实验结果

传代次数	乙醇浓度 (%vol)	残还原糖浓度 (%, W/V)	发酵率 (%)
第1代	16.33	0.39	92.31
第5代	16.25	0.41	91.86
第10代	16.41	0.38	92.76
第20代	16.29	0.40	92.08

2.6 突变菌株U-N2与原始菌株Ygx-5发酵性能比较

将筛选得的突变菌株U-N2与原始菌株Ygx-5分别进行20L发酵罐发酵试验,搅拌转速为100 r/min,培养温度37℃,发酵初始pH4.5,接种量为10%vol,每隔4h进行取样,测定乙醇及残还原糖浓度,结果见图5。从图5可知,与出发菌株相比,突变菌株U-N2的乙醇浓度有了大幅度的提高,而残还原糖浓度有了显著降低。

3 结论

从诱变结果得知,复合诱变的菌株乙醇浓度最高可达16.32%vol,比出发菌株提高了20.44%,比只用紫外线诱变后的菌株提高了8.04%,比只用亚硝基胍诱变后的菌株提高了6.27%。经过传代,突变株U-N2进行连续传代培养测其乙醇产量稳定。结果表明,稳定性较好,已达到工业化生产基本要求,可应用于淀粉质原料高温

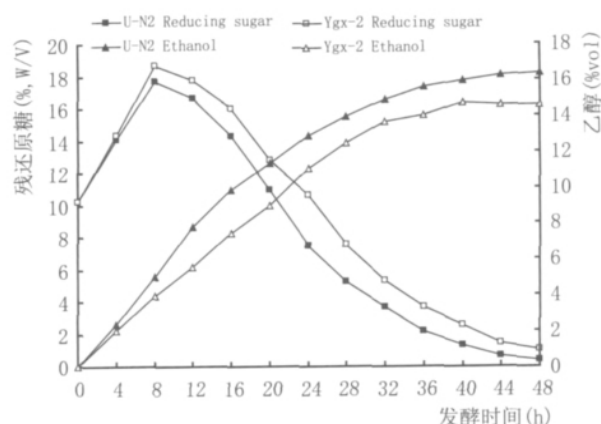


图5 突变菌株U-N2与原始菌株Ygx-5摇瓶发酵结果比较

浓醇发酵生产燃料乙醇行业,具有广阔的前景。

采用紫外线和亚硝基胍复合诱变剂比用单一诱变剂方法效果要好,因为不同诱变剂的诱变机理也不同,单一诱变技术一般具有位点特异性,紫外诱变对DNA的作用机理主要表现为相邻的胸腺嘧啶成为二聚体,NTG的作用机理主要是诱发碱基错配使GC-AT的转换^[12]。复合诱变具有协同效应,可有效避免使用单一诱变剂产生的饱和效应,分别对菌株进行紫外诱变和NTG诱变时,二者作用于DNA上的位点可能不相同,可能得到在不同位点上突变的菌株,进而筛选出理想的菌株。

参考文献:

- [1] 文铁桥,赵学慧. 酵母菌属间原生质体融合构建高温酵母菌株[J]. 微生物学报,1999,39(2):141-147.
- [2] 夏帆,张华山,顾亚婧,等. 紫外-硫酸二乙酯复合诱变选育乙醇高产菌株[J]. 酿酒科技,2008(4):42-44.
- [3] 田丰伟,程传荣,袁维涵,等. 原生质体诱变选育ε-聚赖氨酸高产菌株[J]. 微生物学通报,2010,37(10):1457-1461.
- [4] 申乃坤,王青艳,陆雁,等. 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇[J]. 生物工程学报,2010,26(1):42-47.
- [5] 张博润,蔡金科. 酵母菌属间原生质体融合获得能发酵乳糖生产酒精的融合体[J]. 微生物学报,1990,30(3):182-188.
- [6] 王明兹,施巧琴,周晓兰,等. 提高酵母菌原生质体制备与再生的方法研究[J]. 微生物学杂志,2005,25(3):10-13.
- [7] 张春玲. 紫外线与亚硝基胍复合诱变选育高产海藻糖菌株的研究[J]. 食品科学,2009,30(21):188-191.
- [8] 于鹏,张兰威,许倩,等. 亚硝基胍诱变选育丁二酮高产菌株[J]. 乳业科学与技术,2006(5):218-220.
- [9] Tao F, Miao JY, Shi GY, Zhang KC. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. [J]. Process Biochemistry, 2005 (40):183-187.
- [10] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987:13.
- [11] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1998.
- [12] 周德庆. 微生物学教程(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,2002:202-213.