

TTC 在发酵木糖高产乙醇的休哈塔假丝酵母选育中的应用

董博宇, 陈叶福, 岳瑞雪, 肖冬光

(天津科技大学天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: TTC 可以作为筛选发酵葡萄糖产酒精能力强的酵母菌的显色剂, 但发酵木糖产乙醇的酵母菌的代谢和发酵途径与之相比都有所不同, 本实验用 TTC 作为初筛显色剂筛选发酵木糖产酒精能力较强的休哈塔假丝酵母。紫外诱变后从 TTC 平板上挑取显红色菌株 150 株进行摇瓶发酵测定乙醇产量, 得到的正突变率为 29%, 负突变率为 10%; 挑取显白色菌株 100 株, 得到的正突变率为 0, 负突变率为 56%。将紫外诱变后产量已经有所提高的突变株 S28 进行氮离子注入诱变, 从 TTC 平板上挑取显红色菌株 100 株进行摇瓶发酵测定乙醇产量, 得到的正突变率为 20.05%, 负突变率为 10.14%, 其中的部分突变株的产量相比 S28 又有所提高。可见 TTC 能将乙醇产量较低的菌株淘汰, 筛选出乙醇产量高的休哈塔假丝酵母菌。

关键词: 微生物; TTC; 乙醇; 木糖; 休哈塔假丝酵母; 选育

中图分类号: Q93-3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)10-0040-04

Application of TTC in Breeding of *Candida Shehatae* Overproducing Ethanol From Xylose

DONG Bo-yu, CHEN Ye-fu, YUE Rui-xue and XIAO Dong-guang

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: TTC can screen out the yeast overproducing ethanol from glucose, but the metabolism and fermentation pathway of yeast which could produce ethanol from xylose are different. In this experiment, we screened out *Candida shehatae* overproducing ethanol from xylose with TTC as chromogenic reagent. After UV mutagenesis, we picked the red colony (150 strains) from TTC culture medium for flask-shaking fermentation to measure the yield of ethanol. Compared with initial strains, the positive mutation rate was 29% and the negative mutation rate was 10%; we picked the white colony (100 strains) for flask-shaking fermentation to measure the yield of ethanol. Compared with initial strain, the positive mutation rate was zero and the negative mutation rate was 56%. After N⁺ ion implantation to mutant S28 (ethanol yield had already increased after UV mutagenesis), we picked the red colony (100 strains) from TTC culture medium for flask-shaking fermentation to measure the yield of ethanol. Compared with S28, the positive mutation rate was 20.05% and the negative mutation rate was 10.14%, some of the new strains had higher yield of ethanol. In conclusion, TTC could eliminate *Candida shehatae* producing low yield of ethanol and screen out the strain overproducing ethanol from xylose. (Trans. by YUE Yang)

Key words: microbe; Triphenyltetrazolium chloride (TTC); ethanol; xylose; *Candida shehatae*; breeding

红四氮唑, 全称 2,3,5-氯化三苯基四氮唑, 简写 TTC, 它是一种显色指示剂, 原是无色的, 由于活菌中所含脱氢酶可将它还原成红色, 可使平板上原先看不太清楚的微小菌落染成肉眼清晰的红色菌落^[1], 且通过它呈色的深浅可判断酵母产酒精能力的高低, 产酒精能力强的酵母会显现深红色, 次之显粉红色、微红色或不显色^[2]。

TTC 可以作为酿酒酵母利用葡萄糖产乙醇能力的

收稿日期: 2008-07-25

作者简介: 董博宇(1983-), 男, 天津人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化工。

通讯作者: 肖冬光(1956-), 教授, 博士生导师, xdg@tust.edu.cn。

显色剂, 但是假丝酵母的木糖代谢产乙醇途径不同于酿酒酵母的葡萄糖代谢产乙醇途径。利用木糖的酵母的木糖代谢途径为: 首先在依赖 NADPH 的木糖还原酶作用下还原木糖为木糖醇, 随后在依赖 NAD⁺ 的木糖醇脱氢酶作用下氧化形成木酮糖, 再经木酮糖激酶磷酸化形成 5-磷酸木酮糖, 由此进入磷酸戊糖途径(ppp), ppp 途径的中间产物 6-磷酸果糖及 3-磷酸甘油醛通过酵解途径形成丙酮酸, 然后经丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶作用生

成乙醇。而酿酒酵母却是将葡萄糖经过 EMP 途径生成丙酮酸,再经过丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶作用生成乙醇^[3]。可见这两种代谢途径只是木糖和葡萄糖的酵解过程,也就是生成丙酮酸的过程不同,两种酵解过程中的脱氢酶可能不同,此后的丙酮酸生成乙醇的过程是相同的。而 TTC 是与脱氢酶进行反应的,如果与 TTC 反应是丙酮酸生成乙醇过程中的乙醇脱氢酶,则显然 TTC 也可作为检验假丝酵母发酵木糖生产乙醇的能力显色剂。但如果与 TTC 反应的是酵解过程中的脱氢酶,那么假丝酵母木糖酵解过程中的脱氢酶是否也能够如酿酒酵母葡萄糖酵解过程中脱氢酶一样使 TTC 显色就有待考察,所以 TTC 作为显色剂对于检验假丝酵母发酵木糖生产乙醇的能力是否有效,需要通过实验确定。

此外,休哈塔假丝酵母对木糖发酵是“限制供氧”条件下进行的,所谓“限制供氧”条件,实际上就是既考虑到木糖的利用率,又考虑到酒精得率的一种平衡。少量的氧气对木糖等戊糖酵母发酵是必需的,因为木糖代谢成乙醇的过程中,木糖醇氧化成木酮糖和磷酸戊糖循环两步均需要氧作为质子氢的接受体。当氧气供应不足时,木糖醇脱氢酶的辅酶 NADH 积累,抑制了木糖醇脱氢酶的活力,由此导致发酵液中木糖醇的积累。如果氧气供给过多,木糖醇脱氢酶的活力比较强,大部分木糖将转化成酵母细胞而使发酵酒精得率下降^[4~5]。也就是说当氧气供给很足时,木糖醇脱氢酶的活力比较强,作为脱氢酶也可以使 TTC 显红色,但是大部分木糖转化为菌体而未生成酒精,此时产酒精能力不一定强。这也说明 TTC 是否能够作为检验假丝酵母发酵木糖生产乙醇的能力的显色剂需要通过实验确定。

本实验将休哈塔假丝酵母 CICC 1766 进行紫外诱变,将诱变后的菌种进行 TTC 平板培养,从平板上挑取显红色菌株 150 株和显白色菌株 100 株,进行摇瓶发酵测定乙醇产量,将其与未经过诱变的菌种的摇瓶发酵的乙醇产量进行比较,计算正负突变率,以此来验证 TTC 是否可以作为筛选发酵木糖产乙醇能力强的休哈塔假丝酵母的显色剂。再将紫外诱变后的菌种进行氮离子注入诱变,将诱变后的菌种进行 TTC 平板培养,从平板上挑取显红色菌株 100 株,测定发酵后乙醇含量,将其与氮离子注入诱变前的菌种的乙醇产量进行比较,再次验证 TTC 是否可以作为筛选发酵木糖产乙醇能力强的休哈塔假丝酵母的显色剂。

1 材料与方法

1.1 菌种

休哈塔假丝酵母 CICC 1766,购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 培养基

斜面培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,酵母粉 3 g,麦芽浸膏 3 g,琼脂 20 g,水 1000 mL。

液体种子培养基为:木糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母粉 10 g,水 1000 mL,pH 值自然。

发酵培养基:木糖 60 g/L,玉米浆 0.53 % (v/v),尿素 0.22 g/L, CaCl_2 0.25 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.51 g/L, KH_2PO_4 2.5 g/L, pH 4.5。

TTC 下层培养基:木糖 10 g/L,蛋白胨 2 g/L,酵母粉 1.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, pH 值 5.5~5.7,琼脂 30 g/L,115 °C 灭菌 10 min。

TTC 上层培养基:木糖 0.5 g/L,琼脂 1.5 g/L,TTC 0.05 g/L。

1.3 培养方法

种子培养方法:斜面培养基中 30 °C 恒温,培养 36~48 h。将菌种接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,恒温 28 °C,摇床转速 160 r/min,活化培养 24 h。转入二级种子培养基中,接种量 10 %,同样条件下培养 24 h。

发酵方法:接种量 10 %,温度 28 °C,装液量 150 mL / 250 mL,转速 160 r/min。

1.4 分析方法

乙醇浓度采用快速氧化法测定^[6]。生物量测定采用细胞干重法。

1.5 实验方法

1.5.1 紫外诱变

二级种子培养 18 h 使菌种处于对数生长期中期,离心收集种子菌体并制成细胞浓度为 10^6 个/mL 的菌悬液,置于培养皿中并放入紫外诱变箱中,平皿距紫外灯距离 30 cm,在功率 15 W 的紫外灯下照射 20 s。

1.5.2 氮离子注入诱变

将经过紫外诱变的菌种培养到对数生长中期,离心收集菌体并稀释成 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL 菌悬液,涂布于无菌的玻璃片上并放入离子注入机内进行连续式注入。靶室抽真空至 10^{-3} Pa,注入能量为 10 keV,按照 30×10^{14} ions/cm² 剂量注入氮离子。

1.5.3 突变菌株筛选

以 TTC 作为酵母产酒精能力的初筛显色剂,比较平板上各菌株间的颜色深浅,从平板中挑出菌落大、颜色较深的菌株,作为复筛的出发菌株。将初筛菌株于 28 °C、160 r/min 振荡培养,发酵 72 h 后测定乙醇浓度,选择产乙醇浓度较高的菌株作为优良的突变菌株。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变后菌种的 TTC 显色平板培养

取经过紫外照射后的菌悬液,适当稀释后,取菌悬液 0.1 mL 涂布于 TTC 下层平板上,28℃培养,待长出菌落,倒入 10 mL 上层培养基,覆盖菌落,28℃下避光保温 2~3 h,比较各菌株间的菌落大小和颜色深浅,见图 1。从平板中挑出菌落大、颜色较深的菌株,共挑选突变株 150 株,随机编号 S1~S150。同时从平板中挑选 TTC 显色为白色和粉色的菌株,共 100 株,随机编号 Q1~Q100。

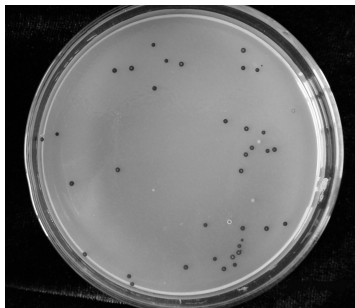


图 1 TTC 平板菌落显色情况

2.2 摇瓶发酵产量验证

2.2.1 显红色菌株的产量验证

以 *C. shehatae* CICC 1766 的产乙醇结果为对照,凡产乙醇产量比对照提高 5% 的菌株为正突变株,比对照降低 5% 的为负突变株,产量与出发菌株相同的为未突变。对 TTC 显色为红色的 150 株突变株与 *C. shehatae* CICC 1766 同时进行发酵实验,测定乙醇产量。得到正突变率为 29%,负突变率为 10%,并且筛选出乙醇产量高的菌株共 18 株。部分高产突变株筛选结果见表 1。

表 1 部分高产突变株筛选结果 (g/L)

菌号	乙醇产量	乙醇增长量
<i>C. shehatae</i> CICC 1766	20.56	0
S5	21.93	1.37
S11	22.17	1.61
S16	22.41	1.85
S17	21.82	1.26
S20	22.40	1.84
S25	22.86	2.30
S28	23.64	3.08
S32	21.84	1.28
S39	23.02	2.46
S46	22.71	2.15
S52	21.96	1.40
S64	22.09	1.53
S65	22.97	2.41
S77	21.89	1.33
S85	22.43	1.87
S98	22.14	1.58
S115	22.31	1.75
S121	22.67	2.11

从表 1 中可以发现,由于经过了诱变处理,复筛所得 18 株突变株的乙醇产量较出发菌株都有较大的提

高,其中提高较多的有 S28 和 S39,它们的乙醇产量分别增加了 3.08 g/L 及 2.46 g/L。可见 TTC 平板能够筛选出乙醇产量高的休哈塔假丝酵母突变株。

2.2.2 显白色菌株的产量验证

对初筛所得的 TTC 显色为白色和粉色的 100 株突变株与 *C. shehatae* CICC 1766 同时进行发酵实验,测定乙醇产量。得到的正突变率为 0,负突变率为 56%,筛选结果表明乙醇的产量全部下降。部分低产突变株的筛选结果见表 2。

表 2 部分低产突变株筛选结果 (g/L)

菌号	乙醇产量	乙醇下降量	菌号	乙醇产量	乙醇下降量
出发菌株	20.56	0	Q45	17.10	3.46
Q5	18.10	2.46	Q59	16.98	3.58
Q11	16.76	3.80	Q71	17.88	2.68
Q24	18.77	1.79	Q74	17.66	2.90
Q36	17.66	2.90	Q89	18.06	2.50

由表 2 的实验结果看出,复筛所得 18 株突变株的乙醇产量较出发菌株都有较大的下降,其中下降较多的有 Q11 和 Q59,其乙醇产量分别下降了 3.80 g/L 及 3.58 g/L。可见对于 *C. shehatae* 来说,TTC 平板能将乙醇产量较低的菌株淘汰。

2.3 氮离子注入诱变得到菌种的 TTC 平板筛选

采用能量 10 keV 的氮离子,以 30×10^{14} ions/cm² 为处理剂量对紫外诱变得到的高产乙醇菌株 S28 进行诱变处理,经过 TTC 平板培养后挑取 100 株显红色突变株,于 28℃、160 r/min 振荡培养,发酵 72 h 后测定乙醇浓度。与只经过紫外诱变而未经过氮离子注入诱变的 S28 菌株进行比较,部分高产突变株的结果见表 3。

表 3 部分高产突变株筛选结果 (g/L)

菌号	乙醇产量	乙醇下降量	菌号	乙醇产量	乙醇下降量
S28	23.64	0	SY43	25.37	1.73
SY7	25.22	1.58	SY49	25.19	1.55
SY11	25.25	1.61	SY58	25.58	1.94
SY16	25.19	1.55	SY69	25.13	1.49
SY20	25.27	1.63	SY77	25.24	1.60
SY24	25.35	1.71	SY95	25.28	1.64
SY25	25.29	1.65	SY126	25.39	1.75
SY32	25.25	1.61			

从表 3 中可以发现,使用 TTC 作为显色剂对经过氮离子注入诱变处理的突变株进行初筛的效果比较好,复筛所得的突变株的乙醇产量较出发菌株都有较大的提高,其中增加较多的有 SY24、SY43、SY58 和 SY126,它们的乙醇产量分别增加了 1.71 g/L、1.73 g/L、1.94 g/L 和 1.75 g/L。这说明 TTC 可以作为筛选发酵木糖产乙醇能力强的休哈塔假丝酵母的显色剂。

3 结论

对休哈塔假丝酵母进行紫外诱变,将诱变后的突变株进行 TTC 平板显色培养。从平板上挑取显红色菌株 150 株和显白色菌株 100 株,进行摇瓶发酵测定乙醇产量,将其与未经过诱变的菌种的摇瓶发酵的乙醇产量进行比较。得到结果为显红色突变株 150 株的正突变率为 29%,负突变率为 10%,显白色突变株 100 株的正突变率为 0,负突变率为 56%。显红色突变株中产量增加较多的突变株有 S28 和 S39,其乙醇产量分别增加了 3.08 g/L 及 2.46 g/L,显白色突变株中产量下降较多的有 Q11 和 Q59,其乙醇产量分别下降了 3.80 g/L 及 3.58 g/L。再将 S28 突变株进行氮离子注入诱变,将诱变后的突变株进行 TTC 平板显色培养。从平板上挑取显红色菌株 100 株,进行摇瓶发酵测定乙醇产量,将其与只经过紫外诱变未经过氮离子注入诱变的 S28 菌株的摇瓶发酵的乙醇产量进行比较。结果为 100 株显红色的突变株中部分突变株的乙醇产量较出发菌株都有较

大的提高,其中增加较多的有 SY24、SY43、SY58 和 SY126,其乙醇产量分别增加了 1.71g/L、1.73g/L、1.94g/L 和 1.75g/L。经实验验证,TTC 平板能将乙醇产量较低的菌株淘汰,并且筛选出乙醇产量较高的菌株。因此可以将 TTC 作为 *C. shehatae* 产乙醇能力的显色剂。

参考文献:

- [1] 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程[M].上海:复旦大学出版社,1993.
- [2] 王梅,张澎湃,帅桂兰.TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J].酿酒,2001,(5):62-64.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2001.
- [4] Yu S,Wayman M and Parekh S K, Fermentation to ethanol of pentose-containing spent sulphite liquor[J].Biotechnol Bioeng. 1987,29:1144-1150.
- [5] 余世袁,罗廉,李杰,等.休哈塔假丝酵母对半纤维素戊糖和己糖的同步发酵[J].林产化学与工业,1991,11(1):17-24.
- [6] 王亚楠,肖冬光.快速测定啤酒酒精度和真正发酵度的方法[J].酿酒,2002,(11):84-86.

(上接第 39 页)

- 13:4382-4389.
- [7] Ferrigno, P., F. Posas, D. Koepp, H. Saito, and P. A. Silver. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAP kinase requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1[J]. EMBO J, 1998, 17:5606-5614.
 - [8] Maeda,T.,S.M.Wurgler-Murphy,and H.Saito. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast[J]. Nature, 1994, 369:242-245.
 - [9] Mattison, C. P., and I. M. Ota. Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast[J]. Genes Dev, 2000, 14:1229-1235.
 - [10] Bilsland-Marchesan E, Arino J, Saito H, Sunnerhagen P, Posas F. Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(11):3887-95.
 - [11] Jacoby, T., H. Flanagan, A. Faykin, A. G. Seto, C. Mattison, and I. Ota. Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the

- osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1[J]. J. Biol. Chem, 1997, 272:17749-17755.
- [12] Eleutherio EC, Ribeiro MJ, Pereira MD, Maia FM, Panek AD. Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochem Mol Biol Int, 1995, 36(6):1217-1223.
 - [13] Shama SC. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 152(1):11-15.
 - [14] Norbeck J, Blomberg A. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-institigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2000, 16(2):121-137.
 - [15] Mahmoud MI. The effect of the water activity of the milieu on rates of glucose uptake by the osmophilic yeasts *Saccharomyces rouxii* and *Debaryomyces hansenii* [J]. Zentralbl Bakteriell Naturwiss, 1978, 133(7-8):726-732.

今年我国食品工业销售收入将达 4 万亿元

本刊讯:中国食品工业协会会长王文哲 2008 年 9 月 20 日在第六届中国食品安全年会上介绍,今年 1 至 7 月份,全国食品增加值增长 15.86%,全国食品工业累计实现食品工业总产值 23332.92 亿元,完成销售额 22830.89 亿元,同比增长 34.6%。预计今年我国食品工业销售收入将达 40000 亿元。

在食品工业持续快速健康发展的同时,通过各级部门通力合作和大力监管,我国食品安全状况得到改善和提高。据国家抽检结果显示,今年上半年我国粮食加工品、副食调味品、肉制品、酒类、饮料饮品、休闲食品 33 类 3288 家企业生产的 3813 种食品抽样合格率为 98.4%,同比提高 4 个百分点,比 2006 年提高近 9 个百分点。(小小)