

用蒸馏水法保藏产葡萄糖氧化酶毕赤酵母的研究

杨 晴¹, 李丕武^{1,2,*}, 王 升¹

(1. 齐鲁工业大学生物工程学院, 山东济南 250353;

2. 山东省微生物工程重点实验室, 山东济南 250353)

摘要:以斜面保藏法为对照,考察了蒸馏水保藏法对产葡萄糖氧化酶毕赤酵母基因工程菌产酶和菌体存活率的影响。采用蒸馏水法和斜面法保藏菌种*Pichia pastoris* P51 180d后:菌体存活率分别为90%和45%,蒸馏水法保藏效果远高于斜面保藏法;摇瓶发酵实验最终产酶活力分别是(22.5±0.5)U/mL和(23±0.4)U/mL,蒸馏水法对毕赤酵母基因工程菌产酶没有影响。另外蒸馏水法保藏毕赤酵母可在室温下进行、操作简便,与斜面保藏法相比具有一定的优势。

关键词:蒸馏水法,斜面保藏法,毕赤酵母

Study on the preservation of the *Pichia pastoris* recombinant producing glucose oxidase with distilled water

YANG Qing¹, LI Pi-wu^{1,2,*}, WANG Sheng¹

(1. School of Biotechnology, Qilu University of Technology, Ji'nan 250353, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Microbial Engineering, Ji'nan 250353, China)

Abstract: The effect of preservation in distilled water on production of glucose oxidase with recombinant *Pichia pastoris* was investigated in comparison with the method of slant preservation. When the strain *Pichia pastoris* P51 was preserved with methods of distilled water preservation and slant preservation for 180 days, strain survival rate reached 90% and 45%, respectively, which indicated that the effect of distilled water was better than the latter. Furthermore, the final enzyme activity reached (22.5±0.5)U/mL and (23±0.4)U/mL under methods of distilled water preservation and slant preservation in flask culture system. It showed that distilled water preservation did not reduce the yield of glucose oxidase. Besides, the distilled water preservation compared to slant preservation had some advantages such as execution at room temperature and simply operation.

Key words: distilled water preservation; slant preservation; *Pichia pastoris*

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)12-0201-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.12.034

随着毕赤酵母基因工程菌研究的不断深入,利用基因工程的方法将黑曲霉中葡萄糖氧化酶^[1]基因导入到毕赤酵母中表达葡萄糖氧化酶成为研究热点^[2]。然而对产葡萄糖氧化酶毕赤酵母的保藏方法的研究较少,大部分学者仍采用传统的斜面法和甘油管法保藏。斜面法保藏过程中培养基易失水干缩导致菌种失活,至少三个月需要转管一次,需投入较多的时间和精力,同时,传代次数增加导致的菌种退化和目的基因丢失也是不可忽视的问题。蒸馏水法自1939年Castellani首次应用于病原真菌保藏后,国内外学者先后在病原微生物^[3]、食用菌^[4]和工业微生物菌种^[5]的保藏上进行了研究,此法对于霉菌和酵母菌的保藏效果

要好于对细菌和放线菌^[6];最高保藏年限可达20年^[6];长期保藏后电镜观察,细菌会出现质壁分离现象^[7]须引起注意;在蒸馏水中添加无机盐、液体石蜡对保藏效果没有影响^[8];保藏种子可减少毕赤酵母基因工程菌和其他微生物交叉污染^[9]。本文首次采用构建的产葡萄糖氧化酶毕赤酵母为出发菌株,同时以斜面法作为对照,比较了蒸馏水法和斜面法保藏产葡萄糖氧化酶毕赤酵母180d内的干重、存活率和产酶能力。为蒸馏水法应用于基因工程菌的保藏奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) SMD1168 p51

收稿日期: 2014-09-01

作者简介: 杨晴(1987-),男,在读硕士研究生,研究方向:微生物酶技术。

* 通讯作者: 李丕武(1970-),男,博士,副教授,研究方向:微生物酶技术。

基金项目: 国家“863”课题(2012AA021504)资助。

菌株 由齐鲁工业大学微生物酶技术实验室构建(葡萄糖氧化酶外源基因序列GenBank登录号为C333175);蒸馏水:娃哈哈纯净水 杭州娃哈哈集团有限公司;种子和活化培养基(1L) 葡萄糖10g,蛋白胨10g,酵母粉5g,pH自然(固体培养基加2%琼脂);发酵培养基:BMMY培养基 见参考文献[8];辣根过氧化物酶 Sigma,C9322;4-氨基安替比林 国药集团化学试剂有限公司;苯酚 天津大茂化学试剂厂;Triton-100 生工生物(上海)有限公司。

WFG 7200型可见光分光光度计 尤尼柯(上海);HR数显恒温水浴锅 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;Eppendorf 5084R冷冻离心机 Eppendorf公司;分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶发酵方法 种子培养和摇瓶发酵按照Invitrogen公司《毕赤酵母表达手册》进行操作:在液体种子培养基中培养供试菌种至对数期(OD_{600nm} 为6左右),将菌体离心后,转入到BMMY培养基中,使用甲醇诱导,之后发酵培养基中每隔12h添加甲醇至10g/L。

1.2.2 斜面保藏法 为了与蒸馏水法相比较,斜面中加入菌种后,直接保存至4℃冰箱中。并且斜面与蒸馏水法试管中加入的菌体量相同。

1.2.3 蒸馏水保藏法 菌液的制备:按照1.2中的方法培养菌液,生物量(OD_{600nm})约等于6左右;菌液离心:取菌液10mL,4000r/min、4℃下离心10min,弃去上清液;洗涤菌体:加入10mL蒸馏水重悬菌体,洗去附着在菌体上的培养基后,4000r/min、离心10min,反复洗涤3次;保藏用蒸馏水制备:将蒸馏水加入到试样中121℃,灭菌30min。降温后尽量避免晃动试管,使试管内隔绝空气;保藏:在无菌条件下,将菌体加入到含10mL蒸馏水的离心管中并用封口膜封口,室温保藏。

1.3 测定方法

1.3.1 菌体浓度的检测 使用分光光度计,测定600nm波长下的OD表示细胞浓度。

1.3.2 干重的测量 在斜面上加入5mL蒸馏水,用玻璃棒轻轻的搅拌制成菌体悬浊液,将菌悬液倒入离心管中,再次向斜面上加入蒸馏水清洗剩余的菌体,最后将离心管定容至10mL。4000r/min离心10min,蒸馏水洗涤菌体后再次离心,弃去上清液置于80℃烤箱中烘干至恒重称量并计算干重;蒸馏水法保藏的菌种直接离心,离心、洗涤、烘干和计算方法同斜面法干重的测定。

$$\text{干重}(\text{g/L}) = \frac{m - m_0}{V} \times 1000$$

式中,m和 m_0 分别是烘干后的总质量和离心管的质量,g;V是离心管中的体积,mL。

1.3.3 菌种存活率的测定 以平板稀释法^[9]测定保藏菌种的活菌浓度,计算菌种存活率,计算公式如下:

$$\text{菌种存活率}(\%) = \frac{S}{S_0} \times 100$$

式中, S_0 和S分别是刚制备好菌种平板计数法测

定的活菌数和保藏后取样活菌数,取样时间分别是0、30、60、90、120、150、180d。

1.3.4 酶活检测 葡萄糖氧化酶活性的测定采用连续分光光度法^[10]。将分光光度计波长调至500nm,吸取2.0mL苯酚缓冲液、0.5mL底物溶液、0.5mL过氧化物酶溶液和0.1mL 4-氨基安替比林溶液至比色杯中(光程1cm),置于(37±0.1)℃水浴保温10min,放入分光光度计中,将分光光度计调零。吸取0.1mL酶液加入比色杯中并立即吹吸混合均匀,计时。加酶液同时记吸光值为零,以后每隔1min记录吸光值,连续记录5min。利用该方法测定时,酶活力单位定义为:在上述反应条件下,每分钟氧化1μmol的β-D-葡萄糖需要的酶量为一个酶活单位。酶活力计算公式如下:

$$\text{葡萄糖氧化酶活力}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\Delta A_{500}}{\Delta t} \times \frac{1}{12.88 \times 1/2} \times \frac{Dm}{0.1} \times 3.2$$

式中, ΔA_{500} :一定时间内500nm处吸光值变化(吸光值需对时间呈线性变化); Δt :吸光值变化对应的反应时间,min;12.88:生成显色物醌亚胺的毫摩尔消光系数, $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;1/2:每摩尔 H_2O_2 生成醌亚胺的摩尔数;Dm:酶溶液的稀释倍数;0.1:酶溶液的体积,mL;3.2:反应混合物的终体积,mL。

1.3.5 统计分析 数据采用Origin进行T检验,分析结果的显著性差($p < 0.05$),数值以均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 两种保藏方法对菌体量的影响

分别用蒸馏水法和斜面法进行菌种的保藏,保藏时间180d,按1.3.2测定菌体量的变化。

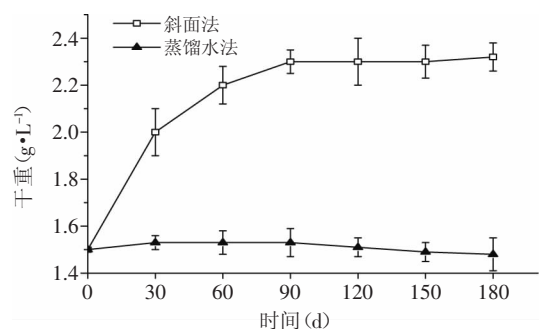


图1 蒸馏水保藏法和斜面保藏法菌体干重的比较

Fig.1 Comparison of the dry cell weight by slant preservation and distilled water preservation

结果如图1所示。至30d时,两种方法保藏的菌体干重均有增长,斜面法菌体干重达到了(2.0±0.2)g/L,约是蒸馏水法菌体干重的一倍。斜面保藏法的营养成分丰富,虽然在低温下,菌体仍出现了扩增。而蒸馏水中没有营养成分提供给菌体利用,菌体维持在休眠状态,并且菌体没有发生自溶现象。而90d以后,斜面法保藏菌种的干重开始稳定,可能是斜面营养物质的消耗有害代谢物的产生使菌体量不再增长。

2.2 两种保藏方法对菌体存活率的影响

根据1.3.3中的方法,检测保藏6个月内存活率的

变化,结果见图2。

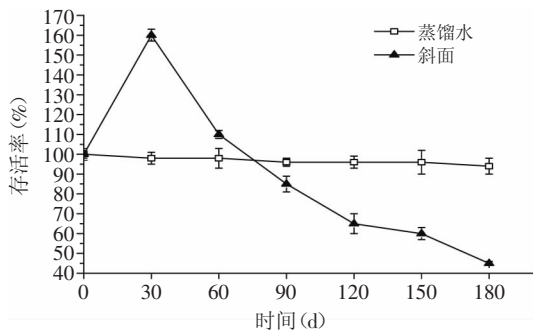


图2 蒸馏水保藏法和斜面保藏法存活率的比较

Fig.2 Comparison of the survival rate by slant preservation and distilled water preservation

由图2可知,用两种方法保藏菌种30d之后,斜面保藏法的菌种存活率为160%,大于蒸馏水保藏法的98%。毕赤酵母在斜面上存活率大于100%的原因是毕赤酵母菌在营养成分丰富的斜面培养基上,虽然温度较低,仍然出现了一定的增长,导致保藏后的存活的菌体大于刚保藏时的活菌体。而蒸馏水法保藏的结果小于100%,培养基中没有任何营养成分,刚保藏至蒸馏水中时可能会导致了菌体部分自溶或死亡。从30~180d的蒸馏水法保藏存活率稳中有降最终的存活率是90%,蒸馏水法中的蒸馏水不含营养成分,菌体这个阶段已经进入到了休眠状态,存活率的缓慢下降可能是发生了部分的自溶现象。与张沧桑^[1]采用蒸馏水长期保藏酿酒酵母菌种180d的存活率相差不多。而斜面保藏法的存活率下降至45%,这与斜面培养基营养物质的消耗、有害代谢产物的积累、pH降低以及传代次数增多有关。

2.3 两种保藏方法对毕赤酵母外源基因表达的影响

保藏效果可以通过菌种保藏后发酵最终产酶来评价。按照1.2.1方法分别对蒸馏水法和斜面法保藏的菌种进行活化。将活化后的种子接入到摇瓶发酵培养基中,每种种子的发酵做三个重复。每天取样一次,测定OD_{600nm}和酶活。

由摇瓶发酵结果图3中可知,甲醇诱导9d内两种种子的酶活都随菌体密度的增加而增加,呈明显的正相关。蒸馏水法和斜面保藏法保藏后最终发酵液中的葡萄糖氧化酶活力几乎相同,分别为(22.5±0.5)U/mL和(23±0.4)U/mL,经过T检验分析, $p>0.05$ 表明两种方法保藏的菌种发酵结果没有显著性差异。表明蒸馏水法保藏毕赤酵母基因工程菌后保持了外源基因遗传学特性。

3 结论

与其他保藏方法相比,蒸馏水法利用蒸馏水作为主要原料,操作简单、成本低,适用于大部分微生物实验室。蒸馏水法利用液体作为载体,避免了孢子或菌体在空气中的飘散,减少了不同菌种的交叉污染以及病原菌的扩散。研究结果表明,蒸馏水法可用于产葡萄糖氧化酶基因工程菌的保藏并且保藏180d后,菌体的存活率达到了90%大于斜面保藏法的45%,

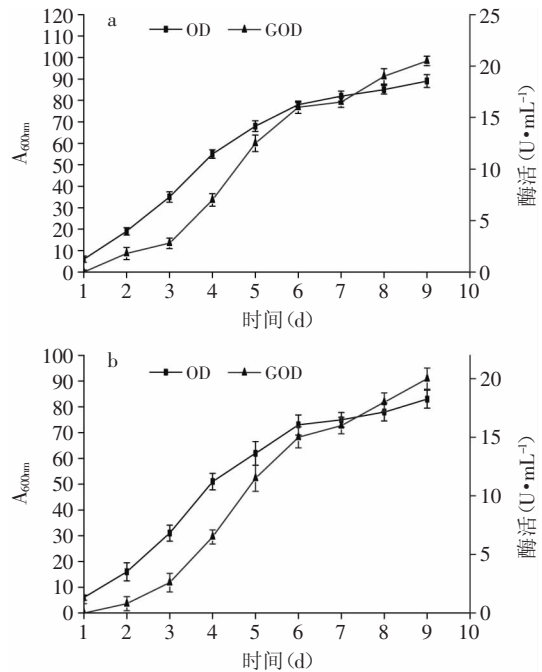


图3 毕赤酵母发酵过程曲线

Fig.3 The curve of enzyme production and OD

注:a:蒸馏水法;b:斜面保藏法。

优于斜面保藏法。而且菌体在蒸馏水中传代次数减少,保藏180d干重维持不变,而斜面法干重增加了一倍。蒸馏水法更有利于保持遗传学特性。蒸馏水法和斜面法保藏的菌种摇瓶发酵产酶分别是(22.5±0.5)U/mL和(23±0.4)U/mL,表明菌种经蒸馏水保藏后,产酶能力没有下降。本研究为蒸馏水法应用于基因工程菌的保藏奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘超,袁建国,王元秀,等. 葡萄糖氧化酶的研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(7): 285-289.
- [2] 刘瑜,李丕武. 黑曲霉葡萄糖氧化酶高产基因工程菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2013, 16(7): 12-19.
- [3] Fernández Andreu, Carlos Manuel, Díaz Suárez, et al. Preservation of high risk fungal cultures of Histoplasma and Cryptococcus[J]. Revista Cubana de Medicina Tropical, 2012, 64(3): 49-54.
- [4] Diogo, Hilda C, Sarpieri, et al. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years[M]. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2005, 80(6): 70-75.
- [5] 黄彬汉. 采用蒸馏水生理盐水保藏工业微生物菌种的初步探讨[J]. 食品与发酵工业, 1983(6): 14-20.
- [6] Iacobellis N S, Devay J E. Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 52(2): 388-389.
- [7] 侯志江,李荣春,程远辉,等. 菌种保藏条件对尖顶羊肚菌(Morchella conica)菌丝生长的影响[J]. 西南农业学报, 2012, 25(3): 1056-1060.
- [8] Higgins D R, Cregg J M. Pichia protocols[M]. New Jersey: Springer, 1998.

(下转第220页)

度大小的顺序如下:漂烫时间>漂烫温度>切分长度。各因素交互作用的响应面如图8~图10所示。

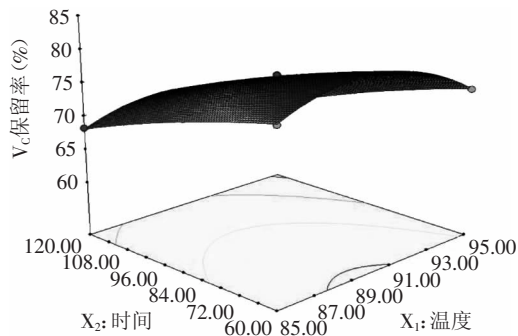


图8 漂烫温度与漂烫时间交互作用

Fig.8 Interaction of blanching temperature and blanching time of *Sedum aizoon* L.

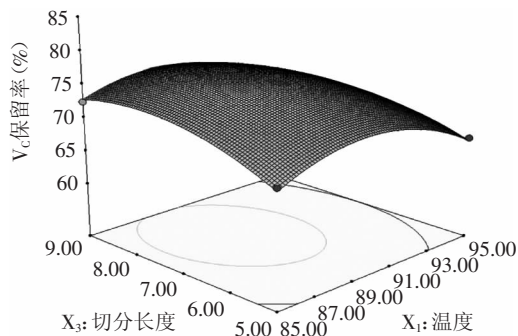


图9 漂烫温度与养心菜切分长度交互作用

Fig.9 Interaction of blanching temperature and cutting length of *Sedum aizoon* L.

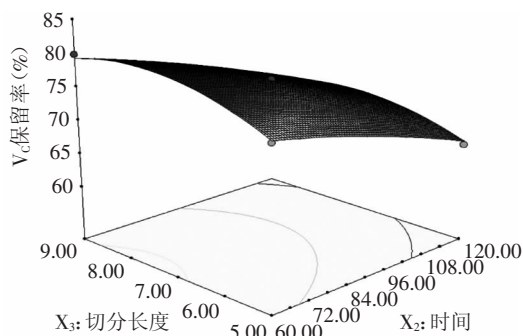


图10 漂烫时间与养心菜切分长度交互作用

Fig.10 Interaction of blanching time and cutting length of *Sedum aizoon* L.

2.5.2.2 最佳工艺条件的确定 由数学模型可知,最佳工艺条件为漂烫温度88.96℃,漂烫时间60s,切分长度7.70cm,养心菜V_c保留率的预测值为80.8453%。

采用优化工艺条件进行实际验证,考虑到实际

操作的可行性,将养心菜漂烫的工艺条件在回归方程得到的理论值基础上修正为:漂烫温度90℃,漂烫时间60s,切分长度8cm。在该工艺条件下进行3次重复实验,得到的养心菜V_c保留率为80.01%,与模拟方程的最佳预测值基本吻合,说明该模型可以用于实验结果的预测,采用该工艺可以得到V_c保留效果较好的养心菜,且在此条件下处理过的养心菜,测得过氧化物酶残余酶活仅为3.97%,齐墩果酸含量为0.412mg/g,硬度值为0.400N,色泽为鲜绿色,即各项指标均较佳。

3 结论

漂烫是果蔬加工中的一道重要工序,通过漂烫能杀灭养心菜表面附着的虫卵和微生物、破坏酶活性,防止加工后产品质量变劣。实验表明90℃下漂烫1min基本达到钝化养心菜过氧化物酶的效果。若要达到过氧化物酶完全失活,则需要100℃下漂烫3min以上,而在此条件下漂烫,养心菜的色泽、硬度都遭到破坏,齐墩果酸及V_c含量造成很大的损失。因此,在漂烫条件的选择上应避免高温长时间加热。

对养心菜的漂烫条件进行响应面优化得到最佳参数为:漂烫温度90℃,漂烫时间60s,切分长度8cm,在该工艺条件下进行实验,得到的养心菜V_c保留率为80.01%。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第3册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:721-724.
- [2] 郭素华,林珠灿. 养心草质量标准研究[J]. 中华中医药杂志,2007,22(11):761-763.
- [3] 霍文兰,范小芹,赵天聪. 超声波提取山楂果中熊果酸和齐墩果酸的工艺研究[J]. 应用化工,2013,42(10):1832-1835.
- [4] 邱金明,刘彬彬,赵婧,等. 齐墩果酸5种含量测定方法的比较研究[J]. 西北药学杂志,2013,28(5):483-486.
- [5] 陈建琴,许雪琴. 养心草中齐墩果酸的含量测定[J]. 莆田学院学报,2009,16(2):46-48.
- [6] 时政. 养心菜的营养保健成分研究[J]. 北方园艺,2013(15):36-38.
- [7] 徐礼生,高贵珍,曹稳根,等. 安徽景天属植物资源的利用与评价[J]. 湖北农业科学,2009,48(2):379-381.
- [8] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,1997:136-142.
- [9] 汪忠波,教明章. 分光光度法测定竹节参中齐墩果酸皂甙含量[J]. 安徽农业科学,2007,35(26):8094-8095.
- [10] 徐玮,汪东风. 食品化学实验和习题[M]. 北京:化学工业出版社,2008:5.
- [11] 吴有炜. 实验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002:115-154.

(上接第203页)

[9] 陈在倅,张汉珍,吴继星. 苏云金杆菌菌种保藏[J]. 中国生物防治,1999,15(1):20-23.

[10] 李丕武,刘瑜,李瑞瑞,等. 两种葡萄糖氧化酶活力测定方

法的比较[J]. 食品工业科技,2013,34(12):71-75.

[11] 张沧桑,张渝,金良媛. 无菌蒸馏水长期保藏酵母菌种的研究[J]. 啤酒科技,2004(8):25-26.