

# 耐高渗透压高产甘油的一个假丝酵母新种 ——产甘油假丝酵母\*

王正祥 诸葛健 方慧英

(无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心 无锡 214036)

**摘 要** 从自然标本中分离获得一高产甘油的菌株 WL2002-5,仅发酵葡萄糖及微发酵蔗糖,能利用葡萄糖、蔗糖、乙醇生长,微利用甘油和柠檬酸,不利用肌醇、硝酸盐、赤藓醇、阿拉伯醇、甘露醇,与 DBB 显色反应为阴性,可在含 500g/L 葡萄糖或 100mL/L 醋酸的培养基中及 40℃ 下生长,可在水活度为 0.890~0.900 的培养基中生长,出芽生殖,易形成“假丝酵母菌型”假菌丝,不进行有性生殖,线粒体 DNA 的分子量为 20kb,是假丝酵母属的一个新种,定名为产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. nov.)。

**关键词** 产甘油假丝酵母,鉴定,发酵

**分类号** Q939.5 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)01-0068-74

利用耐高渗透压酵母从葡萄糖生产甘油在我国已成功实现了工业化。高产甘油菌株 WL2002-5 是目前我国用于发酵甘油工业化生产的优良菌株之一,它具有:①甘油产率高,实验室规模可达到 110-130g/L,工业化生产也已经达到 110~110g/L<sup>[1]</sup>;②耐高渗透压,可以在含 500g/L 葡萄糖的培养基中良好生长,因而发酵过程很少出现染菌,发酵条件粗旷;③菌体生长速度及发酵速度快;④转化率及耗糖转化率为世界最好水平。为此,我们对 WL2002-5 进行了系统鉴定,发现该菌株为假丝酵母属的一个新种,定名为产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. nov.)。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源

产甘油菌株 WL2002-5 由无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心分离及保藏,其余菌株由本校菌种室提供。

### 1.2 菌株的培养与生理特性鉴定

按 van der Walt 和 Yarrow 提供的方法进行<sup>[2]</sup>。除特别指明外,试验温度为 25℃。

### 1.3 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按本中心常规方法进行<sup>[3]</sup>。一般方法为:制备 0.6% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,菌株全菌蛋白经反复冻融获得,加样 20 $\mu$ L,20mA 下电泳 4 h,凝胶用 0.1% 考马斯蓝染色。

### 1.4 限制性酶切图谱

按 Hewell 等<sup>[4]</sup>介绍的方法制备染色体 DNA,用 EcoR I, Hind III(华美生物工程公司

\* 国家“九五”攻关项目

收稿日期:1997-01-31,修回日期:1998-03-12

产品)进行酶切,16V 下于 0.6% 琼脂糖凝胶电泳过夜。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

WL2002-5 在液体培养基中振荡培养 12 h 时菌体为椭圆形,有典型的芽痕(图 1),延长培养时间,部分菌体呈球形或长杆状。在玉米琼脂培养基中形成典型的假菌丝(图 2),假菌丝强烈分枝,其细胞连接处有对称分布的芽生孢子数个。假菌丝类型属“假丝酵母菌型(Candida-type)”。在 YEPD 平板上培养 48 h,菌落为圆形、隆起、边缘不整齐、粗糙型白色菌落(图 3)。

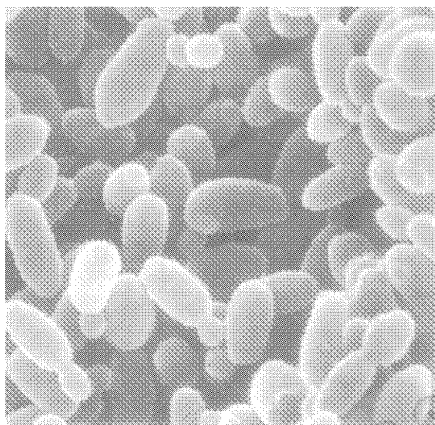


图 1 WL2002-5 菌体扫描电镜(1600X)

Fig. 1 Photograph of WL2002-5 by scanning electron microscope(1600X)

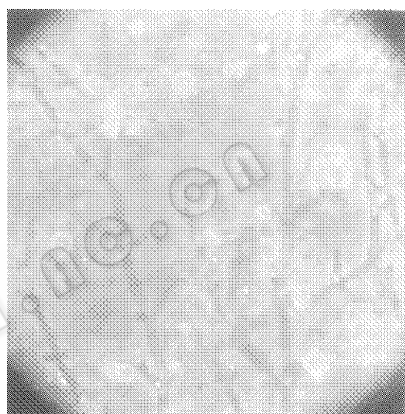


图 2 WL2002-5 的假菌丝(400X)

Fig. 2 Pseudohyphae of WL2002-5 in corn meal agar

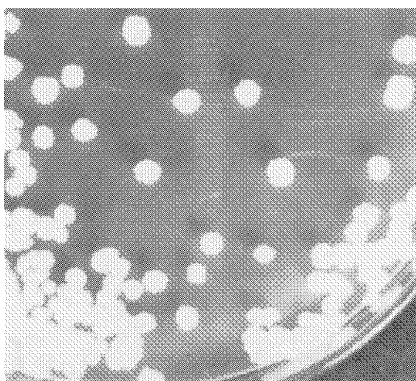


图 3 WL2002-5 的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of WL2002-5

### 2.2 生长与生理生化特性

WL2002-5 在静止液体培养时,呈现表面生长(图 4),在 YEPD 平板上延长培养时间, WL2002-5 呈扩散生长并形成典型的假菌丝(图 5),WL2002-5 行出芽增殖,不形成子囊

孢子。在 25、30、37℃ 下生长良好,在 40℃ 时生长,45℃ 时不生长;在含 500g/L 葡萄糖的培养基上生长良好,在含 600g/L 葡萄糖的培养基上不生长;在含 10mL/L 醋酸的培养基上生长;在含 0.1mg/L 及 1mg/L 放线菌酮的培养基上不生长。

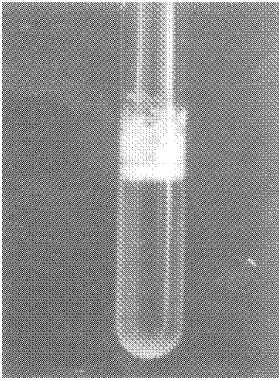


图 4 WL2022-5 在静置液体培养基中的生长特征

Fig. 4 Steady growth property of WL2022-5 in broth

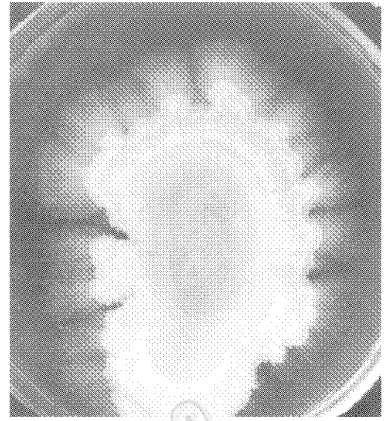


图 5 WL2022-5 巨大菌落形态

Fig. 5 Morphology of the largest colony of WL2022-5

WL2022-5 糖发酵试验及碳源利用试验结果如表 1、表 2 所示。可见, WL2022-5 仅发酵葡萄糖;在碳源利用上主要利用葡萄糖、蔗糖、乙醇、缓慢利用甘油、柠檬酸等,不利用肌醇、硝酸盐、赤藓醇、阿拉伯醇、甘露醇等。与 DBI (Fast Blue Salt B, Fluka 公司出口) 显色反应为阴性。

表 1 WL2022-5 糖发酵试验

Table 1 Sugar fermentation test by WL2022-5

糖 Sugars	结果 Results	糖 Sugars	结果 Results
发酵试验 Fermentation test		发酵试验 Fermentation test	
D-葡萄糖 D-Glucose	+ *	乳糖 Lactose	-
D-半乳糖 D-Galactose	-	纤维二糖 Cellobiose	-
麦芽糖 Maltose	-	棉籽糖 Raffinose	-
蔗糖 Sucrose	- / + **	菊糖 Inulin	-
岩藻糖 Trehalose	-	淀粉 Starch	-
蜜二糖 Melibiose	-	D-木糖 D-Xylose	-

\* 强烈发酵 Strongly fermented.

\*\* 微发酵 Very weak, with only a bubble formed in the insert tube.

表 2 WL2002-5 碳源利用特征

Table 2 The Carbon Sources utilized by WL2002-5

碳源利用试验 Carbon source utility	结 果 Results	碳源利用试验 Carbon source utility	结 果 Results
D-葡萄糖	+	菊糖	-
D-Glucose		Inulin	
D-半乳糖	-	淀粉	-
D-Galactose		Starch	
L-山梨糖	-	甘油	+***
L-Sorbose		Glycerol	
D-木糖	-	赤藓醇	-
D-Xylose		Erythritol	
L-阿拉伯糖	-	L-阿拉伯醇	-
L-Arabinose		L-Arabinitol	
L-鼠李糖	-	D-甘露醇	-
L-Rhamnose		D-Mannitol	
蔗糖	+	柠檬酸	+***
Sucrose		Citrate	
麦芽糖	+/**	硝酸盐	-
Maltose		Nitrate	
岩藻糖	+/-	甲醇	-
Trehalose		Methanol	
纤维二糖	-	乙醇	+
Cellobiose		Ethanol	
蜜二糖	-	肌醇	-
Melibiose		Inositol	
乳糖	-	糊精	-
Lactose		Dextrin	
棉籽糖	-	无维生素培养基生长	+
Raffinose		Growth on vitamin-free medium	

\*\*\*缓慢生长 Slowly growth.

\*\*\*\*弱利用 Weakly utilized.

与已知假丝酵母菌株的比较研究结果见表 3。WL2002-5 的生理生化特性与已知的假丝酵母菌株有很大的不同。

表 3 WL2002-5 的主要生理生化特征的比较研究

Fig. 3 Comparative physiological and biochemical test results of WL2002-5

	WL2002-5	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. robusta</i>
发酵试验 Fermentation test						
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	-	+	-	-	-	+
麦芽糖 Maltose	-	+	-	-	-/+*	+
蔗糖 Sucrose	-/+*	+	-	-	-	+

续表 3

碳源利用试验						
Carbon source utility						
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
D-Glucose						
半乳糖	-	+	-	+	+	+
D-Galactose						
山梨糖	-	+	-	-	-	-
L-Sorbose						
赤藓醇	-	+	-	-	-	-
Erythritol						
甘露醇	-	+	-	+	-	-
Mannitol						
甘油	+ **	+	+	+	+	-
Glycerol						
蔗糖	+	+	+	+	+	+
Sucrose						

\* 微发酵 Very weak, with only a bubble formed in the insert tube.

\*\* 缓慢生长 Slowly growth.

在不同渗透压添加剂下, WL2002-5 的生长特征如图 6 所示。可见, WL2002-5 的最适生长糖浓度在 200~300g/L 之间; 100g/L 甘油已明显影响 WL2002-5 的生长; 200g/L 甘露醇对 WL2002-5 的生长无抑制作用; 50g/L 氯化钠则显著影响 WL2002-5 的生长。WL2002-5 的最低生长水活度为 0.890—0.900。

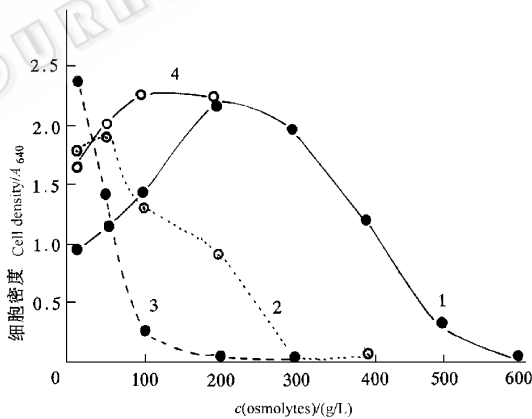


图 6 WL2002-5 在不同渗透压调节剂存在下培养 26 h 的生长特征

Fig. 6 Growth property of WL2002-5 cultured for 26 h in the broth containing different osmolytes

1. 葡萄糖 Glucose; 2. 甘油 Glycerol; 3. 氯化钠 NaCl; 4. 甘露醇 Mannitol.

### 2.3 WL2002-5 的分子生物学特征

WL2002-5 的菌体蛋白图谱如图 7 所示, 主要蛋白条带有 85000, 61000, 56000, 54000, 39000, 37000, 34000, 30000, 20000 等九条主带, 其中分子量为 85000 的蛋白条带在含 10g/L 葡萄糖的培养基中培养时不出现, 在含 20g/L 葡萄糖的培养基中培养时

开始出现。

WL2002-5 染色体 DNA 限制性酶切图谱(略), *EcoR* I 对 WL2002-5 染色体 DNA 的酶切不完全, *Hind* III 对 WL2002-5 染色体 DNA 的酶切较完全, 主要谱带片长约为 23、18、

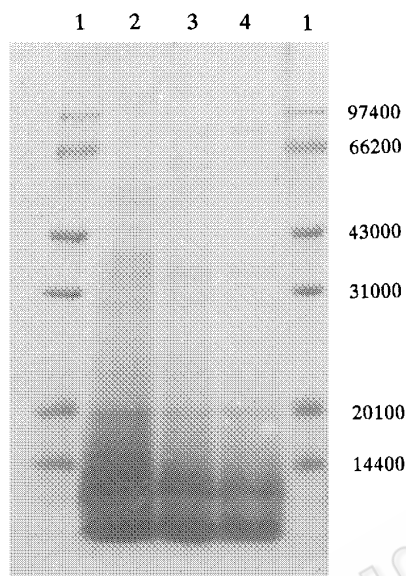


图 7 WL2002-5 菌体蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 7 SDS-PAGE profile of proteins from WL2002-5

1. Molecular weight marker: Rabbit phosphorylase B MW97 400; Bovine serum albumin MW66 200; Rabbit actin MW43 000; Bovine carbonic anhydrase MW31 000; Trypsin inhibitor MW20 100; Hen egg white lysozyme MW14 400;
2. WL2002-5 grown in the broth containing 10 g/L glucose; 3. WL2002-5 grown within 80 g/L glucose; 4. WL2002-5 grown within 160 g/L glucose.

6.5、4.5、3 及 2kb。WL2002-5 的线粒体 DNA 分子大小约为 20kb(图 8)。

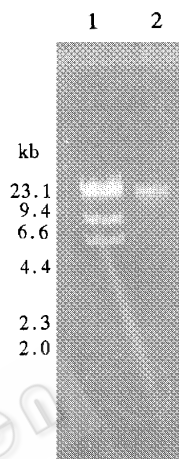


图 8 WL2002-5 线粒体 DNA 电泳图谱

Fig. 8 The profile of mitochondria DNA in 1% agarose gel

1.  $\lambda$ DNA/*Hind* III;
2. mtDNA.

### 3 讨论

从自然样本中分离获得的甘油高产菌株 WL2002-5, 其菌落为白色粗糙型, 以芽殖方式进行无性繁殖, 易形成假菌丝, 不进行有性生殖, 线粒体 DNA 分子量为 20 kb 左右, 符合假丝酵母属典型特征<sup>[2]</sup>, 因此将 WL2002-5 归属于假丝酵母属。WL2002-5 在碳源利用上主要利用葡萄糖、蔗糖和乙醇, 对甘油、柠檬酸微弱而缓慢利用, 不能同化肌醇、赤藓醇、阿拉伯醇、甘露醇及硝酸盐, 与 DBB 显色反应为阴性。据此, 可将 WL2002-5 划归假丝酵母属第七组<sup>[5]</sup>。但他还具有自己独特的生理生化特征, 除强烈发酵葡萄糖、微发酵蔗糖外不发酵其他糖类, 生长不需要外源维生素; 在 25、30、37、及 40℃ 下生长; 在含 500 g/L 葡萄糖的培养基及 10 mL/L 醋酸的培养基中生长良好, 最低生长水活度为 0.890~0.900。为此, 我们认为菌株 WL2002-5 是假丝酵母属的一个新种, 将其定名为产甘油假

丝酵母(*Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. nov.) 菌株 WL2002-5 作为该新种的模式株, 保藏于无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心, 编号为 WL2002-5。

致谢 电子显微镜观察由本校中心实验室吴亢等同志协助完成, 本中心王晓晴硕士协助完成部分工作, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 诸葛健 方慧英. 中华人民共和国专利局, 1994, CN1082608A.
- [ 2 ] van der Walt J P, Yarrow D. Methods for Isolation, Maintenance, Classification and Identification of Yeasts. In: Kreger-van Rij N J W ed. The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984. 45~104.
- [ 3 ] 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. 283~289.
- [ 4 ] Hewell S A, Anthony R M, Power E. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 22: 125~128.
- [ 5 ] Meyer S A, Ahearn D G, Yarrow D. *Candida Berkhout*. In: Kreger-van Rij N J W ed. The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984. 585~844.

## A NEW OSMOTOLERANT AND GLYCEROL-HIGHLY-PRODUCING SPECIES—*CANDIDA GLYCEROLGENESIS* ZHUGE SP. NOV.

Wang Zhengxiang Zhuge Jian Fang Huiying

(Research and Design Center of Fermentation Glycerol, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** The strain WL2002-5 isolated from natural samples and overproduced glycerol from glucose was identified systematically. The WL2002-5 fermented glucose and weakly fermented sucrose; assimilated glucose, sucrose, ethanol, weakly assimilated glycerol and citrate, did not assimilate nitrate, erythritol, arabinitol, mannitol. It grew well on the slopes containing 500 g/L of glucose or 10 mL/L acetate or at the temperature up to 40°C. The minimum water activity for its growth was 0.890. It had a negative reaction with DBB and did vegetative reproduction by budding and easily formed *Candida*-type pseudohyphae but had no sexual reproduction. The molecular weight of its mitochondrial DNA was 20 kb. We conclude that WL2002-5 is a new species of *Candida* and nominated it *Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. nov..

**Key words** *Candida glycerolgenesis*, Identification, Fermentation