

酵母菌属间原生质体融合构建高温酵母菌株*

文铁桥** 赵学慧

(华中农业大学食品科技系 武汉 430070)

提 要 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) A001 和克鲁维酵母(*Kluyveromyces* sp.) Y034 属间原生质体融合构建高温酵母菌株。对制备高再生活性原生质体及融合子细胞形态、生理化特征、同工酶性质、遗传稳定性和高温发酵等方面进行了研究。结果表明,融合子 AY023 和 AY680 遗传性能稳定,表达了双亲优良性状,获得了在 45℃ 培养条件下产酒率 7.4% 的属间融合菌株,是目前已见文献报道的产酒率最高的高温(45℃)酵母菌株。

关键词 酿酒酵母,克鲁维酵母,原生质体融合,高温酒精发酵

分类号 Q939.5 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)02-0141-47

乙醇作为石油化石燃料的替代能源已日益受到世界各国的高度重视。然而世界上许多热带、亚热带国家或地区,由于地域环境温度较高,普通酵母菌难以进行正常乙醇发酵,必须配以制冷设备才能维持正常生产,增加了设备投资和运行费用^[1]。在我国南方部分省区,夏季高温季节现行所有优良酒精酵母菌株出酒率均显著下降^[2],生产不能正常,许多厂家被迫停产,即使在春、秋、冬三季,欲控制正常发酵温度(34℃ 以下),也要消耗大量冷却水和电能,因此高温菌株的选育具有重要价值。

长期以来,高温菌株的选育主要集中于高温驯化^[3]和自然界筛选^[4]。Setei 等^[5]和方霭祺等^[6]通过原生质体融合分别获得了 42℃ 条件下发酵产酒率 6.0% 和 40℃ 发酵产酒率 5.9% 的耐高温酵母。本研究通过耐高温的克鲁维酵母和产酒率高的酿酒酵母进行属间原生质体融合,获得了在 45℃ 下发酵产酒率为 7.4% 的融合子。

1 材料和方法

1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) A001,产酒率 12%,能发酵麦芽糖,但在 45℃ 条件下不能生长;克鲁维酵母(*Kluyveromyces* sp.) Y034 为呼吸缺陷型(ρ^-),产酒率 4.3%,不能发酵麦芽糖,却能在 45℃ 条件下良好生长。上述两菌株均为本室保藏菌种。

1.2 培养基

1.2.1 YPD 培养基和 TTC 上层指示培养基均同文献[7],同化碳源基础培养基同文献[8],完全高渗培养基参照文献[9]

1.2.2 发酵培养基:葡萄糖 150g,酵母粉 10g,蛋白胨 20g, KH_2PO_4 1g,加蒸馏水定容至

* 农业部资助项目(No. 85-农-05-01-05)

** 湖北大学生命科学学院 武汉 430062

收稿日期:1997-03-11,修回日期:1998-03-20

1000 mL,分装 250 mL 三角瓶(100 mL/瓶),115℃ 灭菌 30 min。

1.3 试剂

1.3.1 柠檬酸-磷酸缓冲液(CPB):pH6.0,内含 0.6 mol/L 蔗糖。

1.3.2 脱壁预处理剂(DWPG):0.6 mol/L 蔗糖,10 mmol/L MgSO₄,50 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)。

1.3.3 2% 蜗牛酶液,用 CPB 配制,0.45 μm 膜过滤除菌。

1.3.4 促融合剂:35% 聚乙二醇(MW 6 000)0.01 mol/L CaCl₂ 0.6 mol/L 蔗糖。上述各培养基和试剂(除酶液外)均于 115℃ 灭菌 30 min。

1.4 方法

1.4.1 原生质体制备:亲株 A001 和 Y034 各取活化菌种于 28℃ 200r/min 培养。A001 培养 8 h,Y034 11 h,各取 7mL 3000r/min 离心 5 min,无菌水洗两次,CPB 洗一次,加入 DWPG 1mL 28℃ 下预处理 20 min 4000r/min 离心 4 min,弃上清,加入 28℃ 预温的 2% 蜗牛酶液 3 mL 28℃,100 r/min 摇床振荡 0.5~1 h。相差显微镜镜检,当 90% 以上细胞变为原生质体后,3000 r/min 离心 8 min,CPB 洗两次,离心收集原生质体。原生质体形成率按下式计算:原生质体形成率=(A-C)/A·100%,式中 A 为破壁前菌落数,C 为破壁后无菌水稀释 20 倍,静置 20 min 后在完全培养基上生长的菌落数。

1.4.2 原生质体纯化[参照文献 10],略加修改。制备 10%、25% 和 40% 的蔗糖浓度梯度,将原生质体轻置于上层,3000 r/min 离心 10 min,不同浓度界面处有原生质体区带,分别命名为 P10、P25 和 P40 原生质体。

1.4.3 原生质体再生:将所获原生质体分别涂布高渗再生培养基,28℃ 培养 3 d,计算再生率:原生质体再生率=(B-C)/(A-C)·100%,式中 A、C 同前,B 为破壁后高渗液适当稀释后涂布高渗平板菌落数。

1.4.4 原生质体融合:两亲株原生质体(10⁶/mL)等量混合,加入促融合剂,28℃ 45 min,CPS 稀释,涂布完全高渗再生培养基,45℃ 培养 3 d,长出菌落用于融合子检出。

1.4.5 融合子筛选:向上述待检菌落平皿加入 TTC 上层指示培养基,置 28℃ 条件观察,如 2 h 内呈现红色菌落者即为融合子。

1.4.6 融合子乙醇脱氢酶同工酶 PAGE 电泳分析^[11]:收集对数生长期的融合子菌株 1 g,加少许 SiO₂,超声波处理(冰浴)8 min,冷冻离心(10000 r/min,10 min)取上清 50 μL 用于 PAGE 电泳。CS-930 双波长薄层扫描仪扫描。

1.4.7 融合子与亲株细胞形态及生理特性比较测试^[12,13]

1.4.8 融合子与亲株发酵速率和产酒率比较^[14]:酒精含量测定采用气相色谱法(气相色谱仪 GC-9A Gas Chromatograph,Shimadzu)。

1.4.9 融合子稳定性分析(1)遗传稳定性分析:将斜面上已转接 15 代的融合子活化两次,制成菌悬液,稀释后涂 YPD 平板,30℃ 培养 2 d,接入 1 mL 生理盐水,饥饿 4 h,分别取样接种于 YPD 培养基和以麦芽糖为唯一碳源的同化碳源培养基^[8],置于 30℃ 和 45℃ 培养,分析融合子的遗传稳定性。(2)发酵性能稳定性测试:将融合子在 YPD 斜面上置 45℃ 培养,每传 3 代进行 45℃ 产酒发酵,测定产酒率有无显著变化。

2 结果和讨论

2.1 预处理对原生质体形成与再生的影响

亲株 A001 和 Y034 分别培养至对数生长初期,以进行预处理对原生质体形成与再生影响的比较研究,结果如表 1 所示。

表 1 预处理对原生质体形成与再生的影响

Table 1 Effects of pretreatment on the formation and regeneration rate of protoplast

处理 Treatment	菌株 Strain			
	A001		Y034	
非预处理 Non-pretreatment	90.7 ^a	13.0 ^b	86.7 ^a	14.6 ^b
间接预处理 Indirective pretreatment	98.3	12.7	97.8	13.5
直接预处理 Directive pretreatment	12.5	1.6	3.4	2.3

非预处理:细胞经 2% 蜗牛酶液 28℃ 酶解 2 h。

Non-pretreatment: Cells were treated in 2% snailase solution, 28℃ 2 h, without any pretreatment.

间接预处理:细胞经脱壁预处理剂作 28℃ 20 min 预处理后,加 2% 蜗牛酶液 28℃ 酶解 2 h。

Indirective pretreatment: Prior to add 2% snailase solution, cells were pretreated in DWPG 28℃ for 20 min.

直接预处理:脱壁预处理剂与 2% 蜗牛酶液直接酶解细胞 28℃ 2 h。

Directive pretreatment: DWPG + 2% snailase solution, 28℃ 2 h.

a: 原生质体形成率; b: 原生质体再生率。

a: The protoplasts formation rate; b: The protoplasts regeneration rate.

对亲株进行不同预处理直接影响其原生质体的形成与再生。不经预处理,直接将 2% 蜗牛酶液处理亲株 A001 的原生质体形成率为 90.7%,明显高于 Y034 的 86.7%,而原生质体再生率则相反,这说明 Y034 细胞壁结构的抗性大于 A001,不利于原生质体制备。然而从生物学意义上分析, Y034 所具有的这一特性很可能与其耐高温性能密切相关。另一方面,原生质体再生率 Y034 又稍高于 A001,这也正是修复能力较强的显示;对双亲株直接预处理,无论是原生质体形成率还是再生率都是最低的,这可能是因为脱壁预处理剂中的 DTT 对蜗牛酶活性有一定的抑制作用,对亲株进行间接预处理原生质体形成率均达最大值。这可能是由于 DTT 打断细胞壁结构中的二硫键,随后除掉 DTT,此时再加蜗牛酶,酶活性不受影响。至于原生质体再生率虽略低于非预处理,但从形成率与再生率双重因素的最终结果分析,间接预处理再生总数高于非预处理。(表 1)

2.2 原生质体纯化与再生活性

并非形成的所有原生质体都能再生。为了获得具有高生物活性的原生质体,可通过蔗糖密度梯度离心纯化亲株 Y034 的原生质体。结果表明, P25 带原生质体再生活性最高, P10 和 P40 带原生质体再生活性都低(表 2)。另从细胞学镜检, P10 带原生质体体积最小, P25 带居中, P40 最大,这一结果表明:太小的原生质体尚未成熟,而太大的原生质体又过于老化,虽两者对原生质体形成率并无影响,但再生率都极低。

表 2 高再生活性原生质体的纯化

Table 2 Purification of high regenerative activity of protoplast

沉降带 Sedimentation bands	原生质体数 $\times 10^8/\text{mL}$ Number of protoplast	再生原生质体数 $\times 10^8/\text{mL}$ Number of regenerative protoplast	再生活性/% Regenerative activity
P10	0.12	0.01	8.33
P25	3.52	1.13	32.1
P40	0.08	0.002	2.50

2.3 融合子的鉴定与分析

2.3.1 融合子的检出 :亲株 A001 呼吸正常 ,TTC 检测为红色菌落 ,但在 45℃ 条件下不能生长。另一亲株 Y034 虽然能在 45℃ 生长 ,但为呼吸缺陷型 ,TTC 检测为白色菌落 ,因此融合子检出的条件是 :在 45℃ 下能够生长且经 TTC 检测为红色菌落者即为融合子。此种选择标记 (高温、呼吸缺陷) 的优势在于避免了由作营养缺陷型标记导致的亲株优良遗传性状的变异。同时作为融合子其线粒体只来自亲株一方更有利于其遗传的稳定性^[5]。

对检出的 746 株融合子经初筛与复筛获得 2 株优良性状的融合子 AY023 和 AY680。

2.3.2 亲株及其融合子细胞形态特征比较 :用显微测微尺分别测量亲株及融合子的大小 ,按公式 $V = 4/3\pi \cdot a/2 \cdot (b/2)^2$ 计算。表 3 可见融合子 AY680 细胞体积大于亲株 ,其他介于两亲本之间 ;另以平均轴比可以看到亲株与融合子细胞形态的变化 ,AY680 平均轴比为 0.98 ,细胞形态近圆形 ,而 AY017 为 0.66 近似杆状。需要提出的是融合子细胞体积并非为两亲株体积之和 ,而是略大或介于两亲株之间。

表 3 亲株及融合子细胞大小测定

Table 3 Comparison of the cell volume between parent strains and fusants

菌株 Strain	平均长轴 $a/\mu\text{m}$ Mean major axis	平均短轴 $b/\mu\text{m}$ Mean minor axis	平均轴比 b/a Mean axis rate	平均体积 $V/\mu\text{m}^2$ Mean volume
A001	6.71	6.34	0.944	141.12
Y034	5.00	3.90	0.780	39.79
AY017	6.59	4.39	0.666	46.45
AY023	6.10	5.37	0.880	92.04
AY624	5.49	4.27	0.777	52.37
AY680	6.71	6.58	0.980	151.95

2.3.3 乙醇脱氢酶同工酶分析 :对亲株及 AY023 乙醇脱氢酶同工酶 PAGE 电泳后进行双波长薄层扫描 (图 1) ,可见融合子 AY023 出现了双亲互补的乙醇脱氢酶类型。

2.3.4 亲株及融合子麦芽糖的同化 :对亲株及其融合子进行了麦芽糖的同化测试 ,结果列于表 4。

结果表明 ,亲株 A001 不能同化乳糖 ,Y034 不能同化麦芽糖和蜜二糖 ,融合子 AY680、AY023 均获得了同化麦芽糖、蜜二糖和乳糖的性能 ,这种能力的获得正是双亲株基因发生重组的结果。

2.4 融合子的稳定性

为了考察融合子遗传稳定性 ,排除异核体形成的可能性 ,通过连续传代 (15 代) 后 ,对

融合子 AY023 和 AY680 进行了遗传稳定性测试,结果如表 5 所示。

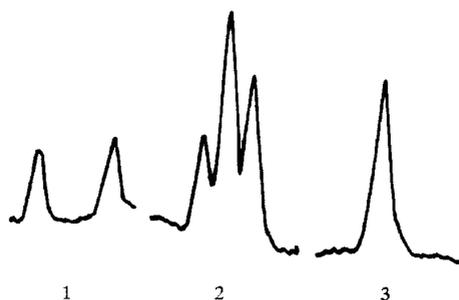


图 1 亲株及融合子乙醇脱氢酶同工酶双波长薄层扫描图谱

Fig.1 Scan curves of alcohol dehydrogenase isozyme patterns of parent strains and fusant

(1)A001 (2)AY023 (3)Y034

表 4 糖类同化作用

Table 4 The carbohydrate assimilation of parent strains and fusants

糖 类 Carbohydrate	菌株 Strain				
	A001 *	Y034	AY023	AY624	AY680
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+
棉子糖 Raffinose	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	-	+	-	+
蜜二糖 Melibiose	+	-	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	-	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	+	+
淀粉 Starch	-	-	-	-	-

* 30℃ 条件下培养,其他菌株于 45℃ 条件下培养。

* Temperature of assimilation is at 30℃, for other strains at 45℃

表 5 融合子遗传的稳定性

Table 5 Genetic stability of fusants

菌株 Strain	培养基 Medium		生长温度 t/℃ Growth temperature		TTC 检测 TTC test
	YPD	同化碳源培养基 + Mal Assimilation media	30	45	
A001	+	+	+	-	+
Y034	+	-	+	+	-
AY023	+	+	+	+	+
AY680	+	+	+	+	+

结果表明,此两株融合子均能在所试条件下生长,TTC 检测阳性(红色),说明融合子含亲株 A001 的线粒体;45℃ 下生长说明融合子获得了 Y034 耐高温性状;以麦芽糖(Mal)为

唯一碳源的培养基上生长,说明融合子获得 A001 利用麦芽糖性状,如果融合子为异核体,在连续传代过程中将出现基因分离现象,即只能在 YDP 培养基上生长,不能在以麦芽糖为唯一碳源的培养基上生长。

进一步通过高温条件(45℃)下连续传代的乙醇发酵性能研究,确证了融合子的稳定性,如表 6 所示。数理统计表明,融合子在传代过程发酵性能稳定,产酒率无显著性差异。

表 6 融合子乙醇发酵性状的稳定性

Table 6 Stability of fusants for ethanol fermentation

菌株 Strain	传代次数 Times of generation	乙醇产率/% Ethanol production	糖利用率/% Glucose utilization
AY023	1	7.32	95.48
	5	7.30	95.22
	10	7.28	94.96
	15	7.33	95.61
AY680	1	7.26	94.70
	5	7.22	94.17
	10	7.30	95.22
	15	7.28	94.96

2.5 亲株与融合子发酵速率比较

对亲株 Y034 和融合子 AY023、AY680 产酒率速率的研究表明:在发酵前期(12 h)并无明显差异,随时间延长,发酵速率的递增差异增大。发酵 72 h 时,产酒率几乎呈线性增长,随后增加微弱。亲株与融合子的产酒动力学曲线具同一性,其差异在于产酒能力的强弱。Y034 产酒率 4.30%,AY023 和 AY680 产酒率分别是 7.40% 和 7.28%,此种产酒能力的提高无疑源于亲株 A001(图 2)。

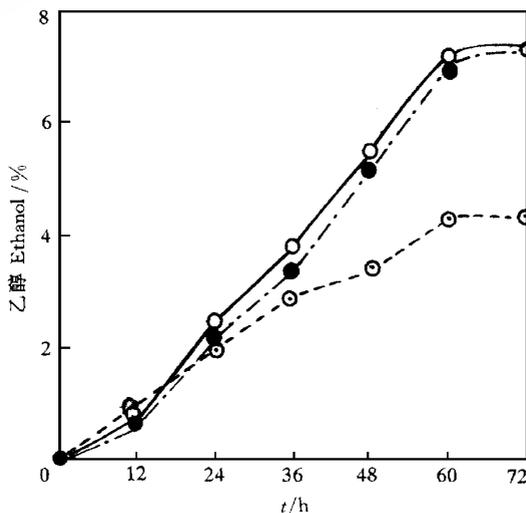


图 2 亲株 Y034 及融合子发酵速率比较

Fig. 2 Comparison between the fermentative speed and ethanol production among parent strain and fusants.

○:Y034 ●:AY680 ○:AY023

参 考 文 献

- [1] Anderson P J , McNeil K , Watson K. *Appl Environ Microbiol* , 1986 **51**(6) :1314~1320.
- [2] 陈远才 黎 平 李朝晖等 . 食品与发酵工业 ,1991 **6** :10~16.
- [3] 方心芳 汤佩松 蔡金科等 . 植物学报 ,1956 **2**(27) :137~146.
- [4] Tong D 'Amore , Graham G. *Enzyme Microb Technol* , 1987. **9** 327~340.
- [5] Seki T S , Mykga S. *Biotechnol Lett* , 1983 **5** 351~356.
- [6] 方霏祺 李绍兰 陈有为等 . 生物工程学报 ,1990 **4**(3) :224~229.
- [7] 金建中 胡乔贤 何超刚等 . 工业微生物 ,1992 **22**(2) :32~25.
- [8] Fred Sermal , Gerry F , Jim H , Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory , 1986 ,163~164.
- [9] 李桃生 陈士怡 . 生物工程学报 ,1987 **3**(2) :121~129.
- [10] 邓秀新 . 园艺学报 ,1988 **15**(2) :99~102.
- [11] 胡能书 万国贤 . 同工酶技术及应用 . 长沙 湖南科学技术出版社 ,1988 ,96~120.
- [12] Lodder T. The Yeasts : A Taxonomic Study North Holland Publishing Co. 1970 ,34~102.
- [13] 莫湘筠 黄 玲 万 宁 . 食品与发酵工业 ,1990 **1** 6~12.
- [14] 方心芳 . 应用微生物实验技术 . 北京 :中国轻工业出版社 ,1993 63~65.
- [15] Spencer J. *Current Genetics* , 1983 , **7** :159~164.

CONSTRUCTION OF THERMOTOLERANT ETHANOL-PRODUCING YEAST BY PROTOPLAST FUSION

Wen Tiejiao Zhao Xuehui

(Department of Food and Technology , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070)

Abstract Protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* A001 and *Kluyveromyces* Y034 has been studied. A001 is a high alcohol yield yeast and can ferment maltose into ethanol , but can not grow at 45°C . However , Y034 can grow above 45°C but has a lower alcohol yield and can not ferment maltose. We obtained the fusants which were tested in several aspects such as cell morphology , physiological and biochemical feature , isozyme patterns analysis , alcohol fermentation at high temperature(45°C) and so on. The fusant AY023 with the final ethanol concentration of 7.4% has been selected , which is thermotolerant yeast with the highest alcohol yield at 45°C until now.

Key words *Saccharomyces cerevisiae* , *Kluyveromyces* , Protoplast fusion , High temperature fermentation