

有淀粉糖化酶活性的耐高温酿酒酵母的构建研究

曾云中 张冬妮 吴雪昌 朱晓平 陈士怡

(杭州大学生物系, 杭州)

通过诱导HU-TY-1(耐高温酿酒酵母)产孢及单孢分离得到的单倍体株HU-TY-1-A(*Saccharomyces cerevisiae*)与具有STA1, STA2, STA3(淀粉糖化酶)遗传因子的酵母(*S. diastaticus*)单倍体和纯合二倍体进行相同交配型的种间原生质体融合, 融合率为 3.3×10^{-6} — 8.7×10^{-6} 。融合子的细胞形态、大小、DNA含量、生长和发酵特性等方面均不同于亲株。融合株BA-2, BA-3, CA-18, DA-2, CCA-30, 其细胞体积与DNA含量为亲株之和, 30℃生长速率与生物量为亲株的2—3倍, 40℃生长速率与生物量为亲株HU-TY-1-A的1.3—1.6倍, 能够利用淀粉, 并且在40℃高温葡萄糖发酵酒精产率比糖化酵母高, 比HU-TY-1-A低, 是一些有淀粉糖化酶、耐高温的酿酒酵母新菌株。

关键词 糖化酵母; 耐高温酿酒酵母; 原生质体融合; 融合株

在酿酒酵母工业发酵菌株的遗传改良上, 构建具有淀粉糖化酶活性的酿酒酵母新菌株, 是逐步实现从淀粉直接生产酒精的新途径〔1〕。

酿酒酵母缺乏分解淀粉所需的酶, 不能直接水解淀粉〔1〕, 而与酿酒酵母亲缘关系很近的糖化酵母(*S. diastaticus*)具有利用淀粉的能力, 由三个等效异位基因STA1、STA2、STA3产生淀粉糖化酶(Amyloglucosidase)〔2—5〕。但是该基因的表达受到杂合型a/a的强烈抑制〔6〕, 因此, 采用传统的杂交育种法构建能利用淀粉的酿酒酵母菌受到了限制。

鉴于原生质体融合育种能避开有性过程, 又能比体外重组导入更多的基因, 因而重组频率高, 类型多, 易选到优良多性状的重组子〔7〕。所以, 将耐高温酿酒酵母〔8〕的单倍体作为亲株, 与糖化酵母单倍体和纯合二倍体进行种间原生质体融合, 试图从中筛选具有较大生产潜力的酿酒酵母新菌株; 同时, 也为进一步研究糖化基因的表达及高温耐受性的遗传分析提供各种融合重组体。

材料与 方法

(一) 菌株

1. *S. cerevisiae* HU-TY-1(a/a): 本实验室以酒精生产菌株K氏酵母选育获得的耐高温酿酒酵母〔8〕。HU-TY-1-A(a)是HU-TY-1经诱导产孢, 单孢分离后获得的单倍体菌株, 具耐高温生长发酵特性, 不利用淀粉。

2. *S. diastaticus* 5101-7C(a arg4 STA1)、5102-1B(a arg4 STA2)、5103-14D(a leu1 met1 his1 STA3)系日本H. Tamaki教授赠送, 分别具淀粉发酵基因STA1、STA2、STA3。

3. *S. diastaticus* CC-1(a/a arg4 STA1/STA1)是本实验室由7C经融合得到的二倍体菌株, 具加倍的淀粉水解基因。

(二) 培养基

1. 完全培养基(YEPD): 参照文献

本文于1991年8月23日收到。

浙江省自然科学基金资助课题。

〔9〕

2. 基本培养基(MMI): 参照文献

〔10〕

3. 基本选择培养基(MMII): 用3%可溶性淀粉代替MMI中2%的葡萄糖, 其它成份同MMI。

4. 完全高渗培养基(YEPDS): YEPD + 0.7mol/L KCl。

5. 基本高渗选择培养基(MMIIS): MMII + 0.7mol/L KCl。

6. 产孢培养基(SPM): 0.1%葡萄糖, 0.25%酵母抽提物, 1%醋酸钾(KAc), 0.005mol/L KH_2PO_4 , 2%琼脂, pH6.0。

7. 葡萄糖发酵培养基(YEPGF): 12%葡萄糖, 0.25%酵母抽提物, 0.5%蛋白胨, 0.025% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2% KH_2PO_4 , 0.2% $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

8. 淀粉发酵培养基(YEPSF): 用3%可溶性淀粉代替YEPGF中12%的葡萄糖, 其它成份同YEPGF。

以上各培养基不加琼脂即为液体培养基, 均在0.8kg/cm²灭菌20 min。

(三) 试剂

1. 柠檬酸-磷酸缓冲液(CPB), pH6.0, 内含0.7mol/L KCl。

2. 0.01mol/L β -巯基乙醇(BME), 用CPB配制, 内含50 mmol/L EDTA- Na_2 。

3. 1%蜗牛酶, 2%蜗牛酶, 3%纤维素酶: 使用前用CPB配制, 0.45 μm 滤膜抽滤灭菌。

4. 35% PEG (MW = 4000) - 0.01mol/L CaCl_2 , 使用前用CPB配制, 0.45 μm 滤膜抽滤灭菌。

*5. 0.5 mol/L HClO_4 , 二苯胺试剂, DNA标准液, 按文献〔10〕中所述配制。

以上试剂除注明*号外, 一律0.8kg/cm²灭菌30min。

(四) 单倍体制备

HU-TY-1是从工业生产发酵菌选育获得, 其产孢能力较弱。酵母菌的产孢受许多因素影响〔23,24〕, 我们在Mcclary产孢培养基〔9〕基础上, 对HU-TY-1进行诱导产孢。参照文献〔12—15〕, 用正交试验法对温度、pH值、葡萄糖浓度、无机盐浓度四因素进行四因子三水平实验, 以产孢率为指标, 选择HU-TY-1的最佳产孢培养基与培养条件。

(五) 原生质体融合

将亲株在29℃, YEPD斜面上活化后, 接种一环于含20ml YEPD液体培养基的150ml的三角瓶中, 29℃振荡培养(THZ 82型往复式摇床, 130r/min)11h(酿酒酵母)或13h(糖化酵母)后收获细胞, 取 10^7 cells/ml用0.01mol/L BME、30℃水浴处理10min(酿酒酵母省略此步), 离心后加1%(酿酒酵母)或2%(糖化酵母)的蜗牛酶、30℃处理40min、用0.4mol/L CaCl_2 离洗二次, 0.7mol/L KCl离洗一次后, 将二亲株的原生质体1:1混合均匀, 加入等体积的35%PEG-0.01mol/L CaCl_2 30℃水浴40min, CPB离心洗涤二次, 适当稀释涂YEPD, YEPDS, MMIIS平板, 30℃培养4天, 计数, 并随机挑取融合子进行鉴定、分析。

原生质体融合率(%) =

$$\frac{\text{融合子数}}{\text{平均两亲本再生的原生质体数}} \times 100\%$$

(六) 融合株鉴定、分析

1. 融合株稳定性测定: 随机选取各种类型融合子在MMII上连续传代15次以上, 转接YEPD斜面, 29℃培养1天, 制成菌悬液, 适当稀释后涂YEPD平板, 随机挑选每个融合子100—200个单菌落, 分

别点接于MMII和YEPD平板对照培养1—2天, 观察生长情况, 确定所获得融合株的稳定性。

2. 营养要求测定: 参照文献[16]

3. 细胞体积大小测定: 参照文献[17]

$$V = (\pi/6) \times \overline{a} \times \overline{b}^2 (\mu\text{m}^3)$$

a——长轴
b——短轴

4. DNA含量测定: 参照文献[12, 18-19]进行。

5. 亲株和融合株生长速率测定: 参照文献[20]稍加改进, 即将待测菌株分别在30℃与40℃振荡培养后, 于650nm测定OD值。

6. 亲株和融合株生物量测定: 参照文献[21]稍加改进, 即将待测菌株分别在30℃与40℃振荡培养后, 测定干重。

7. 淀粉水解能力测定: 将待测菌株于YEPD斜面活化二次, 以相同种量接入装有6ml YEPSF杜氏管中, 每株菌接3管于33℃, 40℃静止培养, 每隔24h观察记录气体产生情况。

8. 葡萄糖发酵效率测定: 将待测菌株于YEPD斜面活化二次, 以相同种量接入250ml三角瓶装100ml YEPD液体培养基中, 30℃培养14—16h, 然后以10%的种量接入500ml三角瓶装200ml的YEPGF液体培养基中, 30℃培养4h, 然后移至33℃培养4h, 把待测菌株分别在33℃, 40℃继续静止培养至72h, 参照文献[22]测CO₂失重和产酒精率。

9. 融合株交配型测定及产孢能力测定: 参照文献[14]进行。

结果与讨论

(一) HU-TY-1单倍体制备

正交实验结果表明四个考察因素对产

孢率的影响程度顺序为 pH 值 > 温度 > 葡萄糖浓度 > 无机盐浓度; 并且用SPM(成份见前), 25℃培养, 产孢率最高, 可达39.72%。产孢后, 通过单孢分离和交配型测定, 选出HU-TY-1-A(交配型为a型)作下面融合实验中耐高温酿酒酵母单倍体亲株。它具有耐高温生长发酵特性, 不水解淀粉。

(二) 菌龄、菌体预处理、酶处理对酵母原生质体形成与再生的影响

不同的酵母菌株, 其原生质体形成与再生的条件差别很大。对融合亲株的实验结果表明取对数生长期中期的细胞, 用0—0.01mol/L的BME处理10min, 1—2%的蜗牛酶处理40min, 可得到较高活力的原生质体。图1—4是14D的实验结果。从图1可以看到在对数生长期菌体代谢旺盛, 活性高, 对酶敏感, 所以易于形成原生质体, 原生质体也易再生。而从图2—4可见, BME因为能还原细胞壁上的蛋白质二硫键, 打开分子链, 从而松动细胞壁以利于酶对细胞壁的降解, 但随着浓度的增高与处理时间的增长将导致BME作用于膜蛋白, 造成细胞损伤, 影响再生率[25]; 同理蜗牛酶是高效的酵母脱壁酶, 它含有纤维素酶, 蛋白水解酶, 果胶酶等是一种

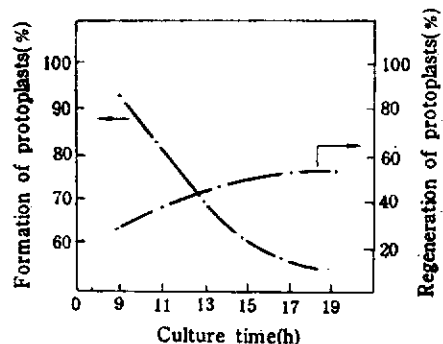


图1 菌龄对原生质体形成与再生的影响

Fig.1 Effect of culture time on protoplast formation and regeneration

混合酶，随着酶量的增加，原生质体形成率上升而再生率下降。

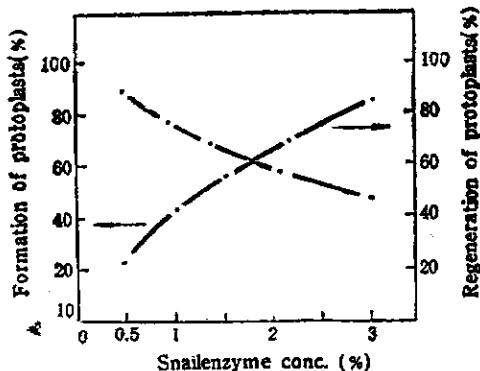


图 2 蜗牛酶浓度对原生质体形成与再生的影响

Fig.2 Effect of concentrations of snail enzyme on protoplast formation and regeneration

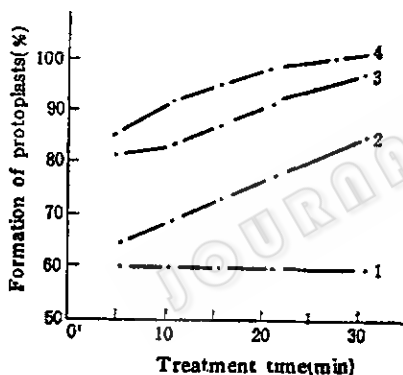


图 3 BME对原生质体形成的影响

Fig.3 Effect of 2-mercaptoethanol (BME) on protoplast formation

1, 0; 2, 0.01mol/L; 3, 0.05mol/L; 4, 0.1mol/L

(三) 原生质体融合及融合率的测定

将耐高温酿酒酵母单倍体HU-TY-1-A与具有不同STA基因的糖化酵母单倍体(7C、1B、14D)及纯合二倍体(CC-1)进行相同交配型的种间原生质体融合及融合率测定，结果见表1。

表中融合率测定结果为三次实验之平均值。从四种融合实验的融合株中各随机

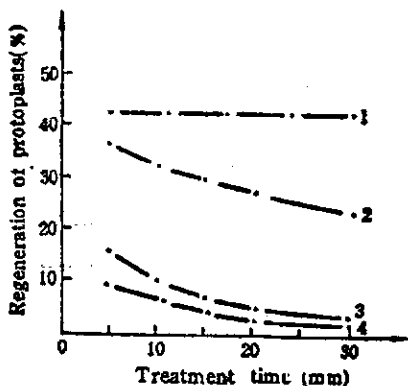


图 4 BME对原生质体再生的影响

Fig.4 Effect of 2-mercaptoethanol (BME) on protoplast regeneration

1. 0; 2. 0.01mol/L; 3. 0.05mol/L; 4. 0.1mol/L

表 1 HU-TY-1-A与7C、1B、14D、CC-1融合率测定

Table 1 Interspecific protoplast fusion of *S.cerevisiae*(HU-TY-1-A) and *S. diastaticus*(7C,1B,14D,CC-1)

Parents	HU-TY-1-A 5101-7C	HU-TY-1-A 5206-1B	HU-TY-1-A 5301-14D	HU-TY-1-A CC-1
Fusion frequency	7.3×10^{-6}	8.6×10^{-6}	8.7×10^{-6}	3.3×10^{-6}
Random sampling	CA 1-30	BA 1-30	DA 1-30	CCA1-30

选出30株作下面的鉴定分析，其编号为CA1-30, BA1-30, DA1-30, CCA1-30。

(四) 融合株鉴定、分析

对上面融合实验中获得的一系列融合株进行了稳定性、营养要求，交配型、DNA含量，高温生长特性及淀粉水解能力等方面的测定与分析。

1. 融合株稳定性测定：将随机挑取的融合株在MMII上连续传15代以上，每个融合株各挑取的约150个单菌落均能在MMII上生长，无基因分离现象。排除异

核体, 证实融合株是稳定的。

2. 融合株交配型测定: 通过融合株与标准 α 型(Y30)株杂交, 我们发现哑铃型细胞, 并在SPM上产孢良好, 结果见图版 I -2-3。而融合株与标准 α 型株杂交, 却无此现象。

3. 营养要求测定: 亲株HU-TY-1-A不能利用淀粉, 而亲株7C, 1B, 14D, CC-1均为氨基酸营养缺陷型, 在MMII上它们均不能生长; 而融合株按营养互补原则, 能在MMII上生长。从表2的结果(重复三次)可以看到, 融合株是亲株的原养型。

表 2 亲株及融合株营养要求测定

Table 2 The nutrition requirement of parents and fusants

Media Strains	MMI	MMII	MMII + Arg	MMII + His	MMII + Leu	MMII + Met	MMII + His + Met + Leu
HU-TY-1-A	+	-	-	-	-	-	-
5101-7C	-	-	+	-	-	-	-
5206-1B	-	-	+	-	-	-	-
5301-14D	-	-	-	-	-	-	+
CC-1	-	-	+	-	-	-	-
CA-4	+	+	+	+	+	+	+
CA-18	+	+	+	+	+	+	+
BA-2	+	+	+	+	+	+	+
BA-3	+	+	+	+	+	+	+
DA-2	+	+	+	+	+	+	+
DA-20	+	+	+	+	+	+	+
CCA-30	+	+	+	+	+	+	+

+ 生长Growth

- 不生长No growth

4. 细胞体积大小与DNA含量测定: 胞体积明显大于亲株细胞, DNA含量约为两亲株之和。从表3与图版 I -4-7, 可以看到融合株细

表 3 亲株与部分融合株细胞体积大小和DNA含量测定

Table 3 Cell volume and DNA content of parents and fusants

strains	cell size(μm)	cell volume(μm^3)	DNA content($\mu\text{g}/10^8$ cells)	*ploidy
HU-TY-1-A	4.5×4.7	49.80	3.3±0.1	n
5101-7C	3.2×5.1	27.33	2.9±0.3	n
5206-1B	3.3×5.1	29.07	3.1±0.1	n
5301-14D	3.2×5.0	26.79	3.1±0.1	n
CA-4	4.5×6.0	63.59	4.6±0.1	1.7n
CA-18	4.8×6.3	75.96	6.5±0.3	2n
BA-2	4.7×6.5	75.14	6.5±0.1	2n
BA-3	4.9×6.1	76.65	6.4±0.1	2n
DA-2	4.2×6.7	61.58	6.4±0.1	2n
DA-20	4.5×6.0	63.59	6.1±0.3	1.9n
CCA-30	5.2×7.1	100.47	9.2±0.1	3n

*倍数从DNA含量计算所得。Calculated from the DNA content

5. 30℃与40℃生长速率与生物量的测定: 从图5—8, 我们可以清楚地看到,

通过耐高温酿酒酵母HU-TY-1-A与不耐高温的糖化酵母的种间融合，得到的融合株30℃时生物量为亲株的两倍，生长速率比亲株高，40℃时生物量是亲株HU-TY-1-A的1.3—1.6倍，生长速率比亲株HU-TY-1-A高，同时大大高于不耐高温的糖化酵母单倍体与纯合二倍体，具有耐高温生长特性。

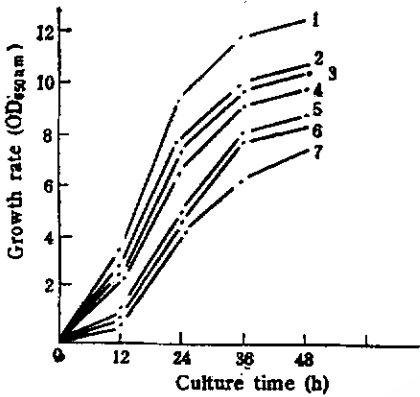


图 5 部分亲株与融合株30℃生长速率比较
Fig.5 Growth rate of some parents and fusants at 30℃

1. CCA-30; 2. CA-18; 3. BA-2; 4. CC-1; 5. 1B; 6. 7C; 7. HU-TY-1-A

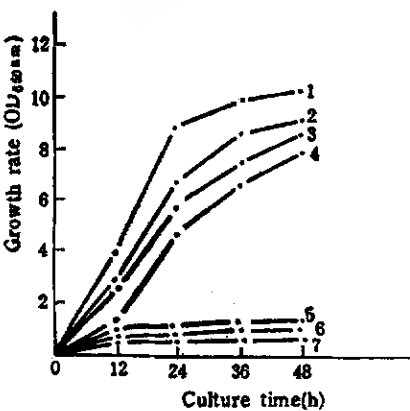


图 6 部分亲株与融合株40℃生长速率比较
Fig.6 Growth rate of some parents and fusants at 40℃

1. CCA-30; 2. CA-18; 3. BA-2; 4. HU-TY-1-A; 5. CC-1; 6. 7C; 7. 1B

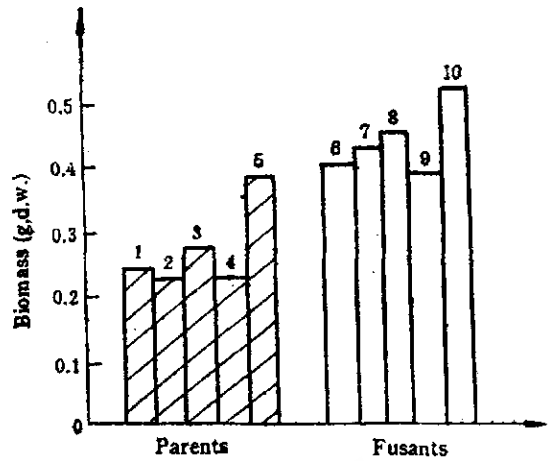


图 7 部分亲株与融合株30℃生物量比较

Fig.7 Biomass of some parents and fusants at 30℃

1. 7C; 2. 14D; 3. 1B; 4. A; 5. CC-1; 6. CA18; 7. BA2; 8. BA3; 9. oA2; 10. CCA30

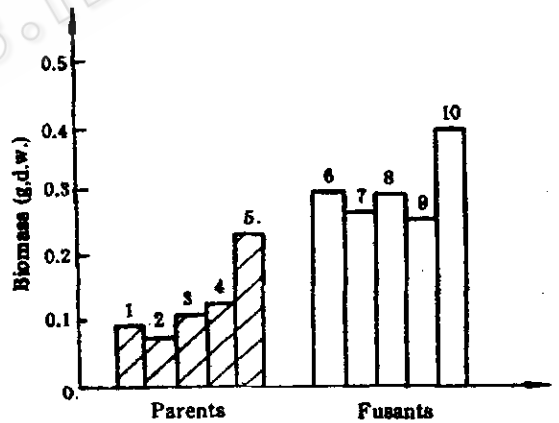


图 8 部分亲株与融合株40℃生物量比较

Fig.8 Biomass of some parents and fusants at 40℃

1. 7C; 2. 14D; 3. 1B; 4. CC-1; 5. A; 6. CA18; 7. BA2; 8. BA3; 9. DA2; 10. CCA30

6. 融合株33℃与40℃淀粉水解能力测定：测定融合株的淀粉水解能力的结果见表4。每株接3支杜氏管。从表中我们看到33℃时融合株，如BA-2，其开始水解的天数与结束的天数均比亲株1B早一

天。40℃时BA-2的水解时间与强度亦均解能力,而且高温淀粉水解能力亦有提高。比亲株好。所以,融合株不仅具有淀粉水

表 4 亲株和部分融合株在33℃、40℃淀粉水解能力

Table 4 Comparative test of soluble starch fermentation of the parents and some fusants at 33℃ and 40℃ respectively

Strains	33℃		40℃		
	The initial time(day)	The terminate time(day)	The initial time(day)	The terminate time(day)	CO ₂ production(ml×V)
HU-TY-1-A	—	—	—	—	—
5206-1B	3	5	5	17	1/2
5101-7C	3	6	6	19	1/5
5301-14D	4	8	7	20	1/5
CC-1	2	4	6	18	1/4
BA-2	2	4	4	16	2/3
BA-3	2	5	4	18	1/5
CA-18	2	6	6	20	1/6
DA-2	3	9	7	20	1/8
CCA-30	2	7	6	17	1/4

*33℃小管中气体量所有菌株(除HU-TY-1-A)均为1(ml/V)

*CO₂ production of the parents and fusants(except HU-TY-1-A)at 33℃ is 1(ml/V)

7. 融合株33℃与40℃葡萄糖发酵效率的测定: 从表5的结果(三次实验的平均值)我们可以看到二倍体融合株CA-18在33℃与40℃条件下的葡萄糖发酵能力优于亲株7C, 而低于HU-TY-1-A, 约为两亲株之均值。而三倍体融合株CCA-30

在33℃条件下葡萄糖发酵能力优于两亲株, 40℃条件下发酵能力优于亲株7C低于HU-TY-1-A, 也约为两亲株之均值。通过对融合株的鉴定分析, 发现融合株重组频率高, 类型多, 表型也各不相同。

参 考 文 献

- [1] Lalue, C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(1):17-25, 1984.
- [2] Erratt, J. A., *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 5(2):95-104, 1987.
- [3] Yamashita, I. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 48(1):137-141, 1984.
- [4] Yoshikaza Tanaka et al., *Agric. Biol. Chem.*, 50(4):965-969, 1986.
- [5] Yamashita, I. et al., *J. Bacteriology*, 161(2):574-582, 1985.
- [6] Yamashita, I. et al., *J. Bacteriology*, 164(2):769-773, 1985.
- [7] 王岳五、陈宁, 《微生物遗传学与实验技术》, pp.191-192, 1989.
- [8] 曾云中等; 杭州大学学报, 18(4):461-463, 1991.
- [9] 陈士怡、徐洪基; 《酵母遗传学》, pp.64-65, 1989.

表 5 部分亲株与融合株33℃与40℃葡萄糖发酵效率测定

Table 5 Comparative test of glucose fermentation of some parents and fusants at 33℃ and 40℃ respectively

strains	CO production(g)		Ethanol production(w/v)	
	33℃	40℃	33℃	40℃
HU-TY-1-A	4.18	3.40	4.02	3.10
5101-7C	3.55	2.30	3.23	1.98
CA-18	3.60	3.00	3.62	2.37
CCA-30	4.43	3.20	4.11	2.67

[10] 楼纯菊等; 真菌学报, 4(2):118-124, 1984.

[11] 北大遗传教研室; 《遗传学实验方法与技术》, pp.68-70, 1983.

[12] 王英凯等; 食品与发酵工业, 3:13-17, 1980.

[13] 夏淑兰; 《现代应用微生物学实验技术》, pp.69-72, 1988.

- [14] 蔡金科等, 遗传学报, 5(1):9—19, 1978.
 [15] 张博润等, 生物工程学报, 2(4):29—34, 1986.
 [16] Hsiao, C.I. & Carbon, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829—3833, 1979.
 [17] Takuo, S. et al., Agric. Biol. Chem., 50(2):297—306, 1986.
 [18] Ogur, M., Arch. Biochem. Biophys., 40:178—184, 1982.
 [19] Stewart, P.R., Method Cell Biology, edited by Prescott, D.M., Academic press, New York, 12:122—123, 1975.
 [20] 邱鸿芳等, 遗传学报, 12(3):175—182, 1985.
 [21] 蔡金科等, 微生物学报, 25(2):124—128, 1985.
 [22] 胡嗣明, 张天抗, 《酒精生产分析检验》, pp.131—145, 1983.
 [23] 柳岛直彦(日)编, 王岳五译:《酵母解剖》, 170—172, 1990.
 [24] Johnston, J.R., J. Inst. Brew., 71:130—135, 1965.
 [25] Falcone, G. et al., Science, 124:272, 1956.

Construction of Novel *Saccharomyces cerevisiae*

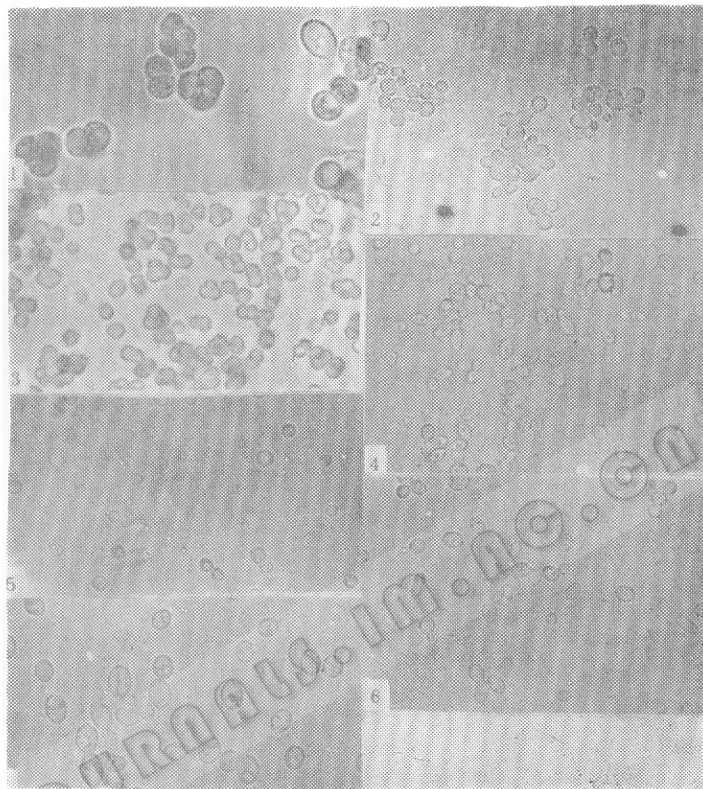
Zeng Yunzhong Zhang Dongni Wu Xuechang Zhu Xiaoping
Chen Shiyi

(Department of Biology, Hangzhou University, Hangzhou)

Novel *S. cerevisiae* BA-2, BA-3, CA-18, DA-2, CCA-30 were obtained by means of protoplast fusion which processed as follows: The thermotolerant yeast (*S. cerevisiae* HU-TY-1-A) fused separately with *S. diastaticus*, such as the identical mating type auxotrophic haploids 5101-7C(arg-STA1), 5206-1B(arg-STA2), and 5301-14D(leu-met-his-STA3), CC-1(arg-STA1/STA1) involving with 35% polyethylene glycol (PEG MW 4000) and 1mmol/L CaCl₂. The fusion frequency resulted from complementation of the parental nutrient markers is about $3.3-8.7 \times 10^{-6}$. The comparative studies between the novel strains and the parental strains showed that their cell size, cell morphology, DNA content per cell, growth rate, biomass, fermentation ability and sporulating ability are quite different. The cell volume and DNA content of the novel strains are about the sum of that of two parents. The growth rate of novel strains at 30°C and 40°C is higher than that of parents. Their biomass at 30°C is 2 times higher than that of parents. The biomass at 40°C is 1.3 times higher than that of parent HU-TY-1-A. The novel strains are also capable of fermenting soluble starch and glucose at 33°C and 40°C.

KEY WORDS

S. diastaticus; thermotolerant yeast; protoplast fusion



- 1 HU-TY-1在SPM上的产孢
- 2 HU-TY-1-A×Y30哑铃型细胞
- 3 HU-TY-1-A×Y30杂合子的产孢
- 4 亲株7C细胞形态
- 5 亲株HU-TY-1-A细胞形态
- 6 CA-18细胞形态
- 7 CCA-30细胞形态