

酵母属间原生质体融合改进菌株木糖发酵性能

毛华 曲音波* 高培基 李炜

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要 通过单倍体分离和紫外诱变,获得了14株树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)7124和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)1300的营养缺陷型突变株。用聚乙二醇(PEG)和电诱导融合及致死融合等方法,实现了树干毕赤酵母和酿酒酵母的属间原生质体融合。融合子能发酵木糖产生酒精,其厌氧发酵木糖和木糖-葡萄糖混合液的能力明显优于亲株,耐酒精的性能也比亲株树干毕赤酵母7124有所提高。融合子经DNA含量、细胞体积测定和稳定性能实验证明为稳定融合子。

关键词 树干毕赤酵母,酿酒酵母,属间原生质体融合,木糖发酵

半纤维素是植物纤维材料的主要成分,含量约为10%~40%,是可再生资源。其主要分解产物木糖能被很多微生物所同化,但能发酵木糖产生乙醇的却不多。选育高效的木糖发酵菌是开发纤维素类可再生资源的重要技术关键之一。自然界中存在的木糖发酵菌,如树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*),多需要在微好氧条件下,发酵木糖产生乙醇,其供氧条件难以精确控制^[1,2],菌株的耐酒精能力也较差,影响了其在实际生产中的应用。工业上用的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)能厌氧发酵葡萄糖,有较高的耐酒精能力,可慢速同化木糖,但不能发酵木糖产生乙醇。原生质体融合技术可以扩大基因交流和重组的范围,为酵母的重组研究和遗传改良提供了新的途径^[3,4]。本研究希望通过使用原生质体融合技术,将毕赤酵母和酿酒酵母的优良性状融合起来,获得既能有效地厌氧发酵木糖及葡萄糖和木糖的混合液,又有较高的耐酒精能力的酵母新菌株,为植物纤维水解产物的全面利用奠定基础。通过使用营养缺陷互补融合和致死融合等技术,已初步实现了以上目标。

1 材料和方法

1.1 菌株

树干毕赤酵母(*P. stipitis*)NRRL Y-7124,二倍体,由美国NRRL实验室提供。酿酒酵母(*S. cerevisiae*)M-1300,二倍体,由山东酒精总厂提供。酿酒酵母INVScl(MATa, His⁺ Trp⁻ Leu⁻ Ura⁻),单倍体,多重营养缺陷型,由瑞典隆德大学B. Hahn-Hägerdal教授提供。

1.2 培养基

完全培养基:YEPD培养基^[5]。基本培养基:YNB培养基^[6]。乙酸盐生孢培养基:无水醋酸钾0.4%,琼脂2%。发酵培养基:Delft培养基^[2],碳源种类和含量在文中注明。

高等学校博士学科点专项科研基金资助。

* 通讯联系人。

本文于1995年7月15日收到。

1.3 原生质体制备和融合

1.3.1 单倍体细胞分离^[7]: 在生孢培养基上诱导酵母形成子囊,用蜗牛酶破壁后,分离由子囊孢子形成的单倍体细胞小菌落。回涂生孢培养基,无孢子形成的即确认为单倍体。

1.3.2 营养缺陷型选育^[7]: 将毕赤酵母和酿酒酵母的单倍体细胞分别用 UV、NTG 及 DES 等诱变剂诱变,采用生长谱法检出营养缺陷型。

1.3.3 原生质体制备: 用 1% 蜗牛酶处理细胞悬液 90min,方法详见文献[5,7]。

1.3.4 原生质体融合: PEG 诱导融合^[5,7];电诱导融合^[7,8]: 系用 BIOJET 型多用电穿孔系统(德国 B. Braun 公司),电脉冲强度 $11\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$,脉冲时间为 $10\mu\text{s}$,脉冲 3 次,脉冲间隔 1s。

1.4 融合子的分析

1.4.1 细胞体积测定: 显微测定法测出细胞的长轴和短轴(分别用 a, b 表示),根据公式:

$$V = \frac{4}{3}\pi \cdot \frac{a}{2} \cdot \left(\frac{b}{2}\right)^2$$

算出细胞体积 V 。

1.4.2 DNA 含量测定: 用文献[9]的方法提取酵母细胞的 DNA 后,按文献[10]的方法测定 DNA 含量。

1.4.3 异核体的排除: 参见文献[11]。

1.4.4 融合子的稳定性测定: 将融合子在完全培养基上连续传代,每隔 5 代接入 Delft 培养基中,测定其对木糖及混合糖液的发酵性能,并与未经反复传代的融合子进行比较。

1.5 菌株生长和发酵性能

1.5.1 菌株耐酒精能力测定: 在接种前向培养基中分别加入 2%、4%、5%、6% 酒精,100~120r/min,28℃ 培养,测定酒精对菌株生长的影响。

1.5.2 半好氧发酵: 250ml 三角瓶加 30ml Delft 培养基,70r/min,28℃ 培养 40~50h。

1.5.3 静止发酵: 18mm×180mm 试管装 20ml 培养基,28℃ 静止发酵 5~9d。

1.6 分析测定方法

乙醇浓度测定: 气相色谱法。木糖浓度测定: 地衣酚法^[12]。葡萄糖浓度测定: DNS 法测定还原糖^[13],与地衣酚法结合计算出葡萄糖量。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌原生质体融合

将酿酒酵母 1300 和树干毕赤酵母 7124 分别接种于生孢培养基上,诱导生成子囊,进而分离单倍体子囊孢子形成的小菌落。用 UV、NTG、DES 等诱变剂诱变处理单倍体细胞,筛选出了 3 株酿酒酵母营养缺陷型和 11 株毕赤酵母营养缺陷型。

选用酿酒酵母 1300-4(His⁻)、树干毕赤酵母 7124-A3(Met⁻)、7124-51(Pu⁻),制备原生质体。采用 PEG 诱导和电诱导两种方法,进行营养缺陷型互补融合。在基本培养基上,选出了数千株不再表现营养缺陷的融合子。电诱导的原生质体融合率约为 10^{-3} ,PEG 诱导的融合率在 10^{-4} ~ 10^{-5} 左右。电诱导的融合率明显高于 PEG 诱导的融合率。

实验中还尝试进行了单亲株致死融合。将树干毕赤酵母 7124 二倍体细胞,制备成原生质体悬液,15W 紫外灯 20cm 照射 30min 致死,用 PEG 法,同酿酒酵母 INVScl 营养缺陷型

菌体的原生质体融合,选到了一些三倍体的融合子。将融合子接入木糖发酵培养基发酵,筛选出发酵性能改进的融合子。表 1 给出了选出的部分融合子的来源。

表 1 部分原生质体融合子的来源

Table 1 The source of some protoplast fusants

Parent strain 1			Parent strain 2			Fusion method	Fusant	
Strain	Auxotrophy	Ploidy	Strain	Auxotrophy	Ploidy		Strain	Ploidy
7124-A3	Met ⁻	n	1300-4	His ⁻	n	PEG	A3-7	2n
7124-A3	Met ⁻	n	1300-4	His ⁻	n	EP [*]	A3-16	2n
7124-51	Pu ⁻	n	1300-4	His ⁻	n	PEG	51-15	2n
7124-51	Pu ⁻	n	INVSC	His ⁻ Trp ⁻	n	PEG	51-1	2n
				Leu ⁻ Ura ⁻				
7124	UV [*]	2n	INVSC	His ⁻ Trp ⁻	n	PEG	30	3n
				Leu ⁻ Ura ⁻				

UV^{*}: UV inactivation; EP^{*}: electroporation.

2.2 融合子的鉴定

营养缺陷型(或致死)亲株细胞在基本培养基上不能生长。通过原生质体融合而恢复为原养型后,在基本培养基上长出的菌落均应为融合子。为进一步确认,对融合子的细胞体积和 DNA 含量进行了测定。由表 2 可以看出,融合子的体积和 DNA 含量约为两亲株之和。其体积比为二倍体;单倍体=2:1;DNA 含量比也是二倍体;单倍体=2:1。二倍体单亲致死融合得到的三倍体融合子 30 号菌的体积和 DNA 含量,则均为单倍体的 3 倍。因此,从体积和倍体性上证明上述融合子确为双亲融合的结果。

表 2 亲株和融合子的体积、DNA 含量及倍体性的比较

Table 2 Comparison of the cell volume, DNA content and ploidy between the parent strains and fusants

	Strain	Cell length	Cell width	Cell volume	DNA content	Ploidy
		/μm	/μm	/μm ³	/10 ⁹ μg·cell ⁻¹	
	7124	12.0	7.25	329.88	—	2n
Parent strain	7124-A3	7.5	6.25	153.22	8.65	n
	7124-51	7.0	6.5	154.68	9.74	n
	INVSC	8.25	6.5	182.30	9.46	n
	1300-4	7.5	6.5	165.73	10.7	n
	51-15	10.25	7.5	301.54	18.85	2n
	51-1	11.5	7.5	338.32	17.24	2n
Fusant	A3-7	9.5	8.0	317.98	19.42	2n
	30	12.0	9.0	508.36	26.02	3n
	A3-16	10.0	8.0	334.72	17.68	2n

将融合子在完全培养基上经 25 次传代后,进行单细胞分离,分别点种在 YNB 基本培养基和 YEPD 完全培养基上,均能够生长。显示所有细胞都保留了融合子的营养特征,未出现基因分离现象,从而排除了异核体的可能性。检测传代后的融合子的发酵性能,发现与保存在 YNB 培养基上传代一次的结果相似,也表明融合子是稳定的。

2.3 融合子与树干毕赤酵母 7124 生长和发酵性能的比较

2.3.1 半好氧条件下的木糖发酵:图 1 为部分融合子与亲株 7124 的比较。部分融合子的产乙醇的周期缩短。其中几株融合子的最大产乙醇量略优于或相似于亲株。可见,融合子

保存了亲株半好氧发酵木糖产量较高的优良性状。

2.3.2 厌氧条件下的木糖发酵:如图 2 所示,亲株 7124 在静止厌氧条件下,发酵 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木糖产乙醇的量很低,9 天时的最大产乙醇量仅为 $2.8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而同样条件下的融合子 $\text{A}_3\text{-7}$ 、51-15、30 号菌的产乙醇量则分别达到 $5.8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,比亲株提高约一倍。

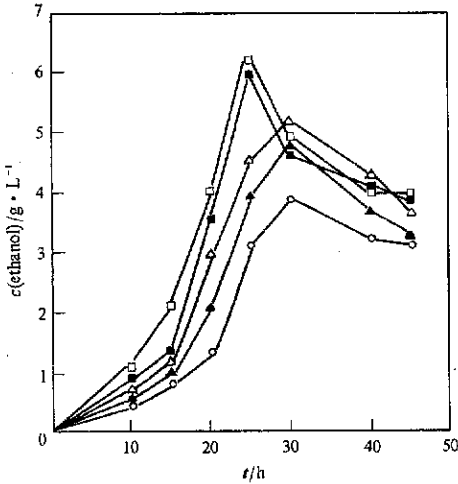


图 1 融合子与干毕赤酵母发酵木糖产生乙醇的比较

Fig. 1 Comparison between ethanol production of fusants and parent strain *P. stipitis* In $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylose medium fusants at semi-aerobic conditions, Conc. of xylose: 10g/L .

□51-15; ■51-1; △7124; ▲30; ○ $\text{A}_3\text{-7}$ 。

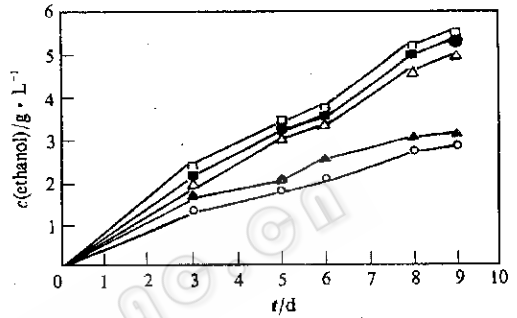


图 2 融合子与亲株 7124 静止发酵木糖的比较

Fig. 2 Comparison between ethanol production of fusant and parental strains 7124

In $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylose medium at anaerobic condition.

Strains: □ $\text{A}_3\text{-7}$; ■51-15; △30; ▲ $\text{A}_3\text{-16}$; ○7124.

2.3.3 半好氧条件下的葡萄糖-木糖混合发酵:天然纤维水解物中同时含有葡萄糖和木糖等多种糖类,研究混合糖液的发酵具有重要的实践意义。表 3 列出了总糖为 20g/L ,葡萄糖与木糖之比(简称为混糖比)分别为 1:1、2:1 和 3:1 时的半好氧发酵的试验结果。由表中可见,融合子具有利用混合糖液生长快,发酵产量高的特点,其优势比在单纯木糖培养基中更加明显。这可能是由于融合子融合了两亲株的各自优点的缘故。

2.3.4 厌氧条件下的混合糖发酵:在总糖为 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,混糖比为 1:1、2:1 和 3:1 的条件下进行的厌氧发酵实验表明,融合子的发酵性能均优于亲株 7124(数据略)。当总糖为 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,融合子与亲株的差别更加明显(见表 4)。其中 $\text{A}_3\text{-7}$ 的发酵性能最好。混糖比为 1:1 时,其乙醇产量可达到 $11.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,比亲株 7124($5.9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)高 90% 左右;混糖比为 1:2 及 2:1 时,乙醇产量也可达 $10.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。51-15 和 30 号菌对混合糖液的厌氧发酵性能也明显优于亲株 7124。

表 3 融合子与亲株(7124)半好氧发酵最大产乙醇量的比较

Table 3 Comparison of the maximum ethanol concentrations produced by the

parent strain (7124) and the fusants

Strains	G:X = 1:1		G:X = 2:1		G:X = 3:1	
	t/h	Ethanol /g·L ⁻¹	t/h	Ethanol /g·L ⁻¹	t/h	Ethanol /g·L ⁻¹
7124	30	6.60	25	6.85	25	6.98
51-15	25	7.36	25	7.80	25	8.12
30	25	7.42	25	7.80	25	8.05
A3-7	30	6.72	25	7.06	25	7.14
51-1	25	7.62	25	8.06	25	8.16

* G:glucose; X:xylose, In 20g·L⁻¹sugar mixtures at semi anaerobic condition.

表 4 部分融合子与亲株 7124 厌氧发酵情况的比较

Table 4 Comparison of anaerobic fermentation of fusants and parent (7124)

G:X	Strain	Ethanol/g·L ⁻¹	Yield
1:1	7124	5.9	0.20
	A3-7	11.2	0.37
	30	8.5	0.28
	51-15	8.2	0.27
1:2	7124	5.0	0.17
	A3-7	10.2	0.34
	30	9.0	0.30
	51-15	7.8	0.26
2:1	7124	7.5	0.25
	A3-7	10.7	0.36
	30	8.7	0.29
	51-15	8.7	0.29

Conc. of sugar mixtures is 30g·L⁻¹

2.3.5 融合子耐酒精能力的测定: 在含 2% 及 4% 乙醇的培养液中, 融合子的生长远优于亲株 7124 (图 3)。在 4% 乙醇存在情况下, A3-7 生长 30h 时, 菌体量接近最大值 (OD₆₂₀ 值约 0.66), 与在 2% 乙醇条件下的最大生物量 (OD₆₂₀ 值约 0.75) 相近。说明 4% 乙醇未对融合子的生长造成明显抑制。而亲株 7124 此时的 OD₆₂₀ 值仅为 0.25, 远低于其在 2% 乙醇培养液中的 OD₆₂₀ 值 (约 0.57)。由图中可见, 在 6% 乙醇培养液中, 融合子的生长状况同亲株 7124 在 5% 乙醇培养液中的生长相似, 显示融合子生长所能耐受的最大酒精浓度, 比其亲株 7124 提高了 1 个百分点以上。其它融合子的生长情况与 A3-7 相似。

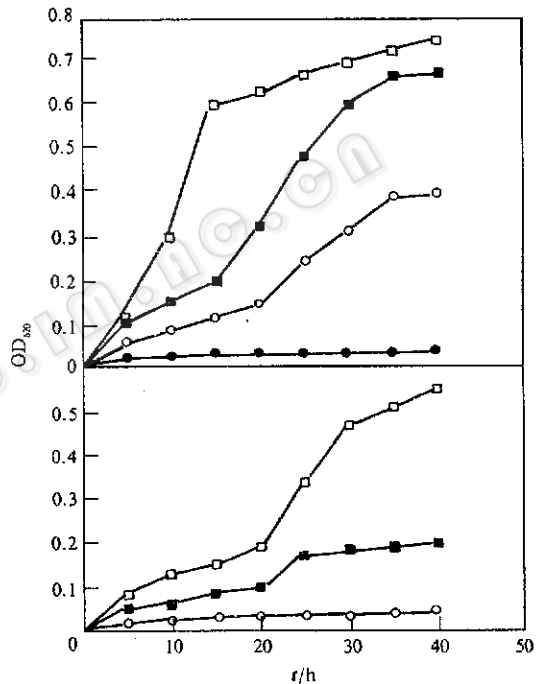


图 3 融合子 A3-7 与亲株 7124 在含不同浓度乙醇的培养基中的生长情况

Fig.3 Growth of fusant A3-7 and *P. stipitis* 7124 in the media containing various amounts of ethanol.

Ethanol conc. / % : □2; ■4; ○5; ●6

3 小 结

本研究结果显示,通过原生质体融合技术,有可能在不同酵母属间实现远缘杂效,获得将双亲株各自优良性状融合在一起的融合子。本实验筛选到的部分融合子,在半好氧条件下发酵木糖的能力略优于或相似于亲株 7124;而厌氧发酵木糖和木糖-葡萄糖混合液的能力有很大提高;融合子稳定性较好,生长能耐受的最大酒精浓度也比亲株提高了一个百分点,为天然纤维材料水解液的酒精发酵研究提供了新的菌株,并为进一步开展酵母遗传育种工作提供了参考。

参 考 文 献

- [1] Hinman N D, Wright I D, Hoagland W *et al.* Appl Biochem Biotechnol, 1989, 20/21:391~401.
- [2] Grootjen D R J, van der Lans RGJ, Luyben KChAM. Enzyme Microb Technol, 1990, 12:20~23.
- [3] Weichen O K, Shimizu S. Appl Environ Microbiol, 1987, 53:542~548.
- [4] Heluane H, Spencer J F T, Spencer D *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 40:98~100.
- [5] 张博润,蔡金科,微生物学报.1990,30(3):182~188.
- [6] 白毓谦,方善康,高东等.微生物实验技术,济南:山东大学出版社,1987,pp. 478~479.
- [7] 杜连祥等.工业微生物学实验技术,天津:天津科学技术出版社,1992,217~219, 163~168, pp. 225~240.
- [8] 王岳五,宇学峰,汪和睦等.真菌学报,1990,9(1):56~63.
- [9] 贾盘兴,蔡金科等.微生物遗传实验技术,北京:科学出版社,1992, pp. 244~246.
- [10] J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南(第二版).北京:科学出版社,1992, p. 956.
- [11] 张博润,王永红,刘书峰等.微生物学通报,1986,13(2):65~73.
- [12] 中山大学生物系生化微生物学教研室编,生物化学导论,北京:人民教育出版社,1978, p. 31
- [13] 北京大学生物系生物化学教研室编,生物化学实验指导,北京:高等教育出版社,1979, pp. 22~24.

Improvement of Xylose Fermentation by Intergeneric Protoplast Fusion of *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*

Mao Hua Qu Yinbo Gao Peiji Li Wei

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Fourteen auxotrophic mutants of *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 and *Saccharomyces cerevisiae* M-1300 were obtained by the mutation of their haploid cells. Intergeneric protoplast fusion of the auxotrophic mutants of UV-inactivated parental strain, induced by PEG or electroporation, were reported. The fusants can ferment xylose to ethanol efficiently. The abilities of some fusants to ferment xylose or xylose-glucose mixture anaerobically and the tolerance to ethanol for their growth are better than the parental strain *P. stipitis* 7124. The division test of nuclear gene type and the stability of repeat passage showed that these fusants were stable and not heterokaryons.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, intergeneric protoplast fusion, xylose fermentation