

## 用原生质体融合构建高产酒精酵母株

何秀良 鞠京丽 蔡崇光 李继安\* 王增博\*\*

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

**摘要** 用单孢子分离、单倍体诱变、原生质体融合等手段,获得了酵母菌株——科生 9064。用该菌的固定化细胞进行发酵玉米糖化醪生产酒精的扩大试验。经 8 个月的吨级生物反应器运转试验结果证明,该酵母凝胶粒子活性稳定,在玉米糖化醪液初糖浓度为 18%~20%,pH 值 4.0~5.0,温度为 38~40℃的条件下,发酵时间约为 20h,终酒精含量达 9%~11%(V/V),残糖含量为 1.0%以下,理论转化率达 90%以上。并对新菌株的培养形态及生理生化特征等进行了研究,证明它是一株新型的酿酒酵母菌。

**关键词** 酿酒酵母,原生质体融合,固定化,玉米糖化醪,酒精,耐高温

本文报道了选育适宜用玉米糖化醪发酵酒精的耐高温、耐酒精、发酵力强的新型酿酒酵母——科生 9064 菌株的方法,并用该菌的固定化细胞进行了发酵玉米糖化醪生产酒精的扩大试验。结果证明,固定化酵母细胞粒子活性可达 8 个月以上,酒精产量稳定。该项研究的结果,迄今国内外报道甚少。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株

原始出发菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)1300<sup>#</sup>为常用生产酒精菌,由沈阳市酒厂提供;酵母 45<sup>#</sup>系从酱油醪中分离到的一株在 45℃下生长良好,并能发酵玉米醪生产酒精的耐热酵母。融合用的直接亲株则是从上述两株菌,经单孢子诱变后分别得到的营养缺陷型菌株 16<sup>#</sup>(a his<sup>-</sup>)和 A<sub>6</sub><sup>#</sup>(a a | a<sup>-</sup>)。

#### 1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(YEPD):参考文献[1]。

1.2.2 基本培养基(MM1):参考文献[2]。

1.2.3 高渗完全培养基(YEPDS):YEPD+17%的蔗糖。

1.2.4 生孢培养基:醋酸钠 0.5%,琼脂 2.0%。

1.2.5 融合子的检出培养基(MM1S):见文献[2]。

1.2.6 发酵酒精原料:系沈阳市老龙口酒厂提供的玉米糖化醪。

#### 1.3 试剂

\*系“沈阳药科大学”1989 届毕业生。

\*\*系“沈阳药科大学”1991 届毕业生。

本文于 1995 年 5 月 23 日收到。

1.3.1 柠檬酸-磷酸缓冲液(CPB), pH5.8, 内含 0.8mol/L 的山梨醇。

1.3.2 1% 蜗牛酶, 使用前用(CPB)配制。

1.3.3 35% PEG(MW = 6000)-0.01mol/L  $\text{CaCl}_2$ -CPB 溶液。

#### 1.4 试验方法

1.4.1 诱变方法: 采用文献[1]方法制备酵母菌单孢子悬浮液之后, 按常规方法在紫外线下照射不同时间, 涂于含有 3% 氯化锂的完全培养基平板上, 培养 2d 后, 再挑取不同特征的生长菌落进行以玉米糖化醪发酵酒精的比较试验。最后用 Fincham 等<sup>[2]</sup>的方法进行菌株营养缺陷型的鉴定。

1.4.2 原生质体的制备, 再生和融合方法: 参考文献[3, 6]。

1.4.3 融合子的筛选: 在高渗基础培养基 MMIS 平板上挑取不同形态的大菌落进行酒精发酵比较试验, 选出既耐高温又高产酒精, 具有双亲株特性的融合子。

1.4.4 融合子的鉴定方法: 参考文献[5, 6]。

1.4.5 DNA 含量测定: 见文献[7]。

1.4.6 固定化细胞的制备: 见文献[8]。

1.4.7 酒精含量的测定: 取 100ml 成熟发酵液于蒸馏瓶中, 加 100ml 自来水, 蒸馏出 100ml 溶液后, 利用酒精比重计测定比溶液中的酒精浓度。

1.4.8 含糖量的测定: 采用改进的费林试剂热滴定定糖法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 营养缺陷型标记菌株的获得

原始酵母亲株 1300<sup>+</sup> 与 45<sup>+</sup> 菌经单孢子复合诱变后, 用生长谱法分别检出了组氨酸缺陷菌株 16<sup>+</sup> (a his<sup>-</sup>) 和丙氨酸缺陷型菌株 A6<sup>+</sup> (a ala<sup>-</sup>)。经细胞形态观察, 上述两菌均与原始出发菌 1300<sup>+</sup> 菌株相似。同时进行了不同温度下发酵玉米糖化醪生产酒精的比较试验, 结果见图 1。

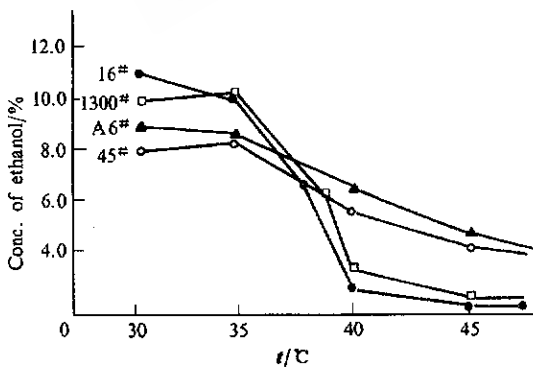


图 1 温度对生产酒精的影响

Fig.1 Effect of temperature on productivity of alcohol

结果见图 1。图 1 所示, 在糖浓度为 19.80%, pH4~5, 温度为 30°C 时, 游离细胞发酵 45h, 16<sup>+</sup> (a his<sup>-</sup>) 菌的酒精产量为 10.6%, 但在 40°C 高温条件下, 发酵力很低, 证明该菌是一株高产酒精的菌种, 但不耐高温。在上述发酵酒精条件下, A6<sup>+</sup> (a ala<sup>-</sup>) 菌在 40~50°C 条件下, 酒精含量达 6.6%, 该菌虽酒精产量不高, 但证明具有耐高温特性。经交配型分析测定, 16<sup>+</sup> (his<sup>-</sup>) 和 A6<sup>+</sup> (ala<sup>-</sup>) 均为 a 交配型。作者采用 16<sup>+</sup> 与 A6<sup>+</sup> 两株特异性菌作为原生质体融合的直接亲株。

### 2.2 高产酒精的融合子筛选

将适于发酵玉米醪高产酒精的 16<sup>+</sup> (a his<sup>-</sup>) 菌株与耐高温的 A6<sup>+</sup> (a ala<sup>-</sup>) 菌株分别经蜗牛酶作用脱壁之后, 制备原生质体, 在 PEG 和  $\text{CaCl}_2$  作用下, 原生质体迅速凝聚成团, 进

行融合。见图 2。

在 MMIS 培养基平板上,随机挑取数 10 株生长出的大菌落,经过多次传代,进行游离细胞发酵比较试验后,得到了数株既酒精产量较高又耐高温的代表性融合子,结果见表 1。从表 1 可见, F64 融合子的酒精含量达 10.5%, 亲株 16<sup>#</sup> 不耐高温, 酒精产量仅为 6.5%, A6<sup>#</sup> 菌株的酒精含量为 8.9%。说明在高温发酵条件下, 两株的酒精产量均低于融合株。

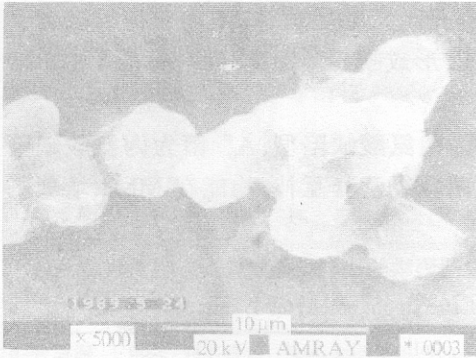


图 2 原生质体融合过程

Fig.2 Photomicrographs of protoplast fusion (500 ×)

同时进行了 F64 融合株与亲株菌的固定化细胞发酵试验。在与游离细胞发酵条件相同的情况下, 经多次固定化细胞比较试验, 发酵 20h, F64 融合子的平均酒精含量为 11.0%, 亲株 A6<sup>#</sup> 为 8.4%, 16<sup>#</sup> 株为 3.0%。试验证明, F64 菌在高温发酵条件下的适应性较好, 发酵力强, 是一株理想的融合子。

2.3 F64 融合子的稳定性试验

为获得既耐高温又高产酒精的具有双亲株特性稳定的融合子, 再次将 F64 菌进行单菌落分纯、传代、驯化。用游离细胞进行了多次比较试验, 其中代表性结果见表 2, 表 2 所示, F64-6 菌的平均酒精产量为 11.2%, 证明该菌具有双亲株的特性。是一株发酵速度快, 耐高温、耐糖、发酵力强、遗传性稳定的优良融合菌株。称 F64-6 菌为“科生 9064(原始亲株 16<sup>#</sup> 与 A6<sup>#</sup> 细胞脱壁成原生质体分别经 90“UV”照射后再融合, 其 F64<sup>#</sup> 融合子称科生, 中科院沈阳应用生态所简称“科生”9064), 新型生产酒精酵母菌株。

表 1 融合子与亲株酒精产量的比较

Table 1 Comparison of ethanol productivity of the parental strains and fusants

Strains	21h		28h		36h		41h		
	R·S/%	Eth/%	R·S/%	Eth/%	R·S/%	Eth/%	R·S/%	Eth/%	
F64	3.1	7.0	1.0	8.4	0.7	10.2	0.3	10.5	
F66	4.0	7.0	2.0	7.6	1.0	9.8	0.7	10.3	
F43	3.5	6.7	2.5	7.5	1.1	9.9	0.5	10.0	
F36	5.0	6.1	3.0	7.0	1.2	9.5	0.5	9.4	
F21	3.2	6.9	1.1	8.5	0.9	9.6	0.4	9.8	
F6	5.3	5.7	2.4	7.3	1.3	8.9	0.7	9.7	
Parent	16 <sup>#</sup>	17.0	2.0	16.5	2.1	15.9	2.7	14.0	6.5
	A6 <sup>#</sup>	6.9	5.4	5.0	6.0	3.2	8.0	1.6	8.9

R·S.: Residual sugar, Eth.: Ethanol, Condition: Sugar 20%, pH4~5, 40℃

#### 2.4 科生 9064 菌固定化细胞发酵玉米醪生产酒精的扩大试验

为进一步考查科生 9064 菌的遗传稳定性, 在沈阳市老龙口酒厂, 用该菌的固定化细胞进行了吨级扩大试验, 于 38~40℃, pH4~5, 发酵约 22h, 取连续发酵 7 批次的代表性

试验结果:初糖浓度平均为 17.46%、残糖含量平均是 0.48%,酒精产量为 10.55%,理论转化率平均为 92.65%。经过 8 个月的吨级生物反应器发酵酒精试验表明,科生 9064 菌的固定化细胞在适宜的发醇条件下,发醇周期由 72h 缩短到 22h,该菌始终保持了耐高温、繁殖速度快、发醇力强的特点,是一株理想的生产菌株。同时,开展了该菌的菌学鉴定工作。

## 2.5 F64 融合株的鉴定与分析

**2.5.1 融合株交配型测定:**本实验所用的两亲株都是 a 交配型菌株,因而获得的融合子应是 aa 交配,通过融合株与标准 d 型(Y188)株交配,形成哑铃型细胞,而与标准 a 型单倍体(G21)菌交配却无此现象。见表 3。

**2.5.2 营养需求测定:**经生长谱法鉴定后,16<sup>#</sup> 菌为组氨酸缺陷型,A<sub>6</sub><sup>#</sup> 菌为丙氨酸缺陷型,它们在基本培养基上均不生长,而 F64 等融合菌株经营养互补,均能在 MM1 培养基上生长,结果见表 4,证明融合株是亲株的原养型。

表 2 F64 融合子的单菌落菌株发酵酒精的比较试验

Table 2 Comparative test of fermentation of the single colony of fusant.64

Strains	16h		26h		38h	
	R·S/ %	Eth/ %	R·S/ %	Eth/ %	R·S/ %	Eth/ %
F64	2.0	6.0	1.0	7.7	0.2	10.8
F64-1	1.5	6.2	0.8	7.8	0.47	8.5
F64-6	1.0	7.4	0.5	9.8	0.19	11.2
F64-16	3.0	5.4	1.6	6.8	0.9	7.5
Controt F64-17	2.0	5.8	1.1	7.5	0.7	8.9
F64-21	1.0	7.0	0.6	9.0	0.4	9.8
F64-24	1.2	6.8	0.7	8.9	0.4	10.2
16 <sup>#</sup>	5.0	2.0	4.0	2.5	3.0	3.2
A <sub>6</sub> <sup>#</sup>	4.0	3.5	2.0	5.9	1.2	8.6

R·S: Residual sugar, Eth: Ethanol Condition: Sugar 18~20%, pH4~5, 40℃.

表 3 亲株及融合株的交配型试验

Table 3 Mating type test of parents and fusants

Strains		Standard strain	
		Y188(d)	G21(a)
Parent	16 <sup>#</sup>	+	-
	A <sub>6</sub> <sup>#</sup>	+	-
Fusant	F <sub>64</sub>	+	-
	F <sub>16</sub>	+	-
	F <sub>43</sub>	+	-
	F <sub>21</sub>	+	-

表 4 亲株和融合株营养需求测定

Table 4 The nutrition requirment of parents and fusants

Strains	Media			
	MM	MM + his	MM + ala	MM + his + ala
F <sub>64</sub>	+	+	+	+
F <sub>66</sub>	+	+	+	+
F <sub>44</sub>	+	+	+	+
F <sub>6</sub> <sup>#</sup>	+	+	+	+
16 <sup>#</sup>	+	+	+	+

**2.5.3 亲株与融合子的 DNA 含量及细胞体积测定:**定结果表 5,融合菌的细胞体积及 NDA 含量平均值分别为两亲株细胞体积及 DNA 含量之和。

表5 亲株与融合株细胞体积 DNA 含量比较  
table 5 Coparison of cell size and DNA content of  
parents and fusants

Strains	Cell size/ $\mu\text{m}$	Cell volume/ $\mu\text{m}^3$	DNA( $\mu\text{g}$ )/cell $\times 10^{-8}$
A6 <sup>#</sup>	5.0 $\times$ 3.2	26.76	1.98
16 <sup>#</sup>	5.1 $\times$ 3.3	29.07	2.24
F <sub>64</sub>	5.15 $\times$ 4.84	63.35	3.24

1300<sup>#</sup> 菌相同。具有不利用乳糖、不利用硝酸盐、不发酵乳糖、发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖及半乳糖等特征。因而证明 F64 融合子是一株耐高温、发酵力强、具有双亲株优良特性、遗传稳定的新型酿酒酵母菌株。

2.5.4 F64 融合子的物生物学特性研究: F64 融合子的细胞形态多数为圆形, 原始亲株 1300<sup>#</sup> 菌多数为椭圆形。除形态特征外, 其它项目, 如液体培养, 菌落培养及生化等主要特征, 基本与

### 参 考 文 献

- [1]何秀良, 段俊英, 柴明等. 微生物学杂志, 1989, 19(3), 50~52.
- [2]Fincham J, Robert S et al. In fungal Genetics, Oxford Blackwell scientific Pub. 1971, 5.
- [3]何秀良, 段俊英, 柴明等. 微生物学杂志, 1988, 8(2): 1~6.
- [4]斎藤和夫, 下饭仁, 佐藤俊一, 特许公报, 1991, 平 3-52955, 237~241.
- [5]坂家广. 酵母的分类同定法, 1980, 三版, 197~212.
- [6]张博润, 王永红, 刘书锋等. 微生物学通报, 1986, 13(2): 65~67.
- [7]Giles K W, Myers A. Nature, 1965, 206: 93.
- [8]段俊英, 柴明, 何秀良等. 生物工程学报, 1987, 3(3): 233~234.
- [9]胡嗣同, 张天抗. 酒精生产分析检验, 北京: 轻工业出版社, 1983, pp. 131~145.
- [10]板井拓夫. 发酵与工业, 1986, 44(3), 238~248.
- [11]清水健一, 横森洋一, 田边佳代等. 特开平 6-62836, 1994, 1~5.
- [12]高桥康次郎, 吉沢淑. 酿协, 1988, 83(7): 10.
- [13]浅野慎一. 发酵工学, 1987, 63(3): 169~177.

## Construction of Novel Yeast Strains for High Ethanol Production by Protoplast Fusion

He Xiuliang Ju Jingli Cai Chongguang Li Jian Wang Zengbo  
(Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015)

**Abstract** The excellent strain SB-9064 was obtained by means of isolation of single spore, mutation of monoploidy, fusion of cell. It is sugar-tolerant, temperature-tolerant strain and possesses high ethanol-producing activity and fast growing fusant in the ethanol fermentation. Ethanol fermentation was carried out using immobilized SB-9064 fusant cell from corn-mash. All experiments were carried out at 38-40°C. The pH of the corn-mash was kept at 4.0~5.0. The fermentation duration was continued for 20~22hours and the yield of ethanol above the ranged in 9.0%~11%. The theoretical conversion rate is more than 90%. The initial sugar concentration and residual sugar were 16%~20% and less than 1.0%, respectively. Studies on the morphological and biochemical characters of the SB-9064 fusant and its identification. It was identified as a Novel Yeast for High Ethanol Production.

**Key word** *Saccharomyces cerevisiae*, protoplast fusion, immobilization, corn mash, temperature-tolerant, ethanol