

## 酵母融合菌株的构建及其特性研究

郭秀君 郭立忠 于 昕

(山东大学微生物学系 济南 250100)

**摘 要** 以酿酒酵母和糖化酵母为亲本,通过正交实验优化了亲本原生质体的制备,再生以及融合的最佳条件,由此获得了既具有糖化能力又可产高浓度酒精的稳定的酵母融合菌株。融合株的体积较亲株大,DNA含量与两亲株DNA含量之和相当,淀粉水解能力,葡萄糖发酵效率,生长速率及产酒精能力等均优于亲株。

**关键词** 酿酒酵母,糖化酵母,原生质体融合,正交实验法

原生质体融合技术是将遗传性状不同的两个脱壁细胞融合成为一个细胞的技术。自从1974年Kao和Michayluk发现PEG的促融性质以来,原生质体融合技术已得到广泛的应用。酒精发酵是重要的发酵工业。目前生产上利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)均不产生糖化酶,所以酒精发酵所利用的淀粉原料需要先经过糖化酶糖化,而糖化酵母(*S. diastaticus*)具有发酵可溶性淀粉和糊精的能力。因此,用原生质体融合等方法构建具有淀粉糖化活性的酵母菌株<sup>[1,2]</sup>,以实现淀粉直接发酵成酒精的一步法生产<sup>[3~5]</sup>,具有重要的理论意义和潜在的实用价值。原生质体融合育种的整个过程受到诸多因素的影响,多数文献资料皆研究单因子的影响<sup>[6]</sup>,而综合分析各因素的研究报道较少。我们利用酿酒酵母和糖化酵母为亲本,用正交实验获得了原生质体形成、再生及融合的最佳条件,并在此基础上得到了既有糖化力又产酒精的酵母融合菌株。同时,对酵母融合株的部分特性进行了鉴定。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种

糖化酵母5106-9A(*S. diastaticus* a arg<sup>-</sup> leu<sup>-</sup> STA1),酿酒酵母10号(*S. cerevisiae* 10 his<sup>-</sup> 2n)。

#### 1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(YEPD)(%):见文献[7]。

1.2.2 完全高渗培养基(YEPDS)(%):见文献[5]。

1.2.3 基本培养基(MM)(%):见文献[14]。

1.2.4 高渗基本培养基(MMS)(%):见文献[5]。

1.2.5 同化淀粉培养基(YPSB)(%):见文献[20]。

1.2.6 葡萄糖发酵培养基(YEPGF)(%):见文献[5]。

本文于1995年11月29日收到。

1.2.7 淀粉发酵培养基(YEPSF):见文献[5]。

1.2.8 高渗培养基:分别用20%,25%,30%的葡萄糖代替 YEPGF 中的 12%的葡萄糖。上述所有培养基的 pH 皆调节到 6.0~6.5,0.5MPa 压力下灭菌 20min。

### 1.3 试剂

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

1.3.2 蜗牛酶:购于中科院生物物理所中生公司,使用时用 CPB 配制。

1.3.3 融合诱导剂:聚乙二醇(PEG, MW 6000) + 0.01mol/L CaCl<sub>2</sub>,使用时用 CPB 配制。

1.3.4 其他溶液:0.1% β-巯基乙醇(ME)溶液,0.4mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,0.1% EDTA-Na<sub>2</sub> 溶液。

1.3.5 组氨酸(His)35mg/L,精氨酸(Arg)35mg/L,亮氨酸(Leu)35mg/L。1.3.1 和 1.3.4 皆在 0.05MPa 压力下灭菌 20min,1.3.2,1.3.3 和 1.3.5 皆用 0.45μm 滤膜抽滤灭菌(G6 滤斗)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 融合株的构建:(a)原生质体的制备:对数生长早期的细胞用 CPB(pH6.0)离心洗涤 3 次,然后稀释,使最终细胞浓度达 10<sup>8</sup> 个/ml 用 0.1% β-巯基乙醇预处理 10min,洗涤后用蜗牛酶液脱壁<sup>[5]</sup>。原生质体的形成率(%) = (A - B)/A × 100%,两亲株细胞分别酶解脱壁后再混合融合。(b)原生质体的诱导融合与再生:用 0.4mol/L CaCl<sub>2</sub> 离心洗涤双亲原生质体两次,将双亲原生质体按 1:1 混合均匀,加入等体积的 PEG,于 30℃ 恒温培养,选出原养型单菌落(营养互补的融合子)转接在 MM 斜面上,以备鉴定,分析用。

$$\text{融合率} = \frac{\text{基本培养基上生长菌落数}}{\text{完全培养基上生长菌落数}} \times 100\%$$

$$\text{再生率}(\%) = (C - B)/(A - B) \times 100\%$$

A:蜗牛酶处理前的菌落计数(无菌水稀释, YEPD 上涂布)

B:蜗牛酶处理后没脱壁的菌落计数(无菌水稀释, YEPD 上涂布)

C:蜗牛酶处理后没脱壁的菌落数和原生质体再生的菌落数(处理后用 0.7mol/L KCl 稀释, YEPD 上涂布)。

1.4.2 正交实验:对糖化酵母和酿酒酵母原生质体的制备、再生及原生质体融合的条件,参考以往单因子实验的有关报道,按照正交实验表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行四因素三水平正交实验<sup>[8,9]</sup>。

1.4.3 融合株的鉴定:融合株稳定性的测定:将融合实验中在 MM 上生长的融合子菌落随机挑取,再在 MM 上培养 30℃ 48h 连续传代 15 次,以淘汰不稳定的融合株,然后转接 YEPD 斜面做鉴定用。将亲株和已经连续传代的融合株,各取一环接种于装有 0.5ml 生理盐水的小试管中。在 28℃ 饥饿 4~6h。用灭菌牙签分别取此菌液点种于 MM、MM + His、MM + Arg、MM + Leu、MM + His + Arg + Leu 平板上,30℃ 培养 2~4d,观察生长情况,以考察融合子遗传稳定程度。

1.4.4 细胞体积的测定:将已活化的亲株和融合株,分别取样镜检,用测微尺测量细胞大小。每株计 10 个细胞取其平均值,按公式

$$V = \frac{3}{4} \pi \cdot \frac{a}{2} \cdot \frac{b^2}{2}$$

计算,式中  $a$  为细胞的长轴,  $b$  为短轴。

1.4.5 细胞 DNA 含量的测定:参考文献[17]。核酸提取采用 Schneider 法, DNA 含量测定用二苯胺法<sup>[18]</sup>。

1.4.6 淀粉水解能力的测定:以 YPSB 平板水解圈指数及按杜氏发酵法产气时间来测定菌株糖化酶活性及发酵淀粉能力。

$$\text{水解圈指数} = \frac{\text{水解圈直径(cm)}}{\text{菌落直径(cm)}}$$

1.4.7 亲株和融合株生长速率测定:参照文献[19],稍加改进。将待测菌株在 30℃ 振荡培养后,每融一定时间,取样于 650nm 测定 OD 值。

1.4.8 亲株和融合株耐酒精度的测定:取培养 24h 的种子液 0.5ml,分别接种在含不同酒精度的 YEPD 液体培养基中,30℃ 振荡培养 48h 之后,离心收集菌体,用无菌水制成细胞悬液。用血球计数板测定细胞数,把悬液的细胞浓度调到  $1 \times 10^2$  个/ml,吸取定量的悬液接种到 YEPD 平皿上,均匀涂布后置于 30℃ 培养 58h,观察生长情况,统计菌落数。以不含酒精的 YEPD 为对照。

1.4.9 亲株和融合株耐渗透压的测定:将亲株和融合株振荡培养 2h 后,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml,分别取其 1ml 加入到 5ml 高渗培养基中振荡培养,定时取样计细胞数,以观察其生长情况。

1.4.10 酒精发酵能力的测定:以 10% 的接种量接入 150ml, YEPGF 液体培养基中(三角瓶带有特制的发酵栓),30℃ 进行发酵,每隔 24h,测定 CO<sub>2</sub> 的失重,最后测酒精产率。玉米粉按料水比 1:2 混合于三角瓶,经过蒸煮,冷却到 55~65℃ 后,用 10% HCl 调 pH4.5~5.0,加糖化酶制剂,糖化 30min 后,将糖化液冷却到 30℃,加入酵母菌液,在三角瓶上装上特制的发酵栓,在发酵栓中加入 1ml 浓硫酸,然后 30℃ 下进行发酵。用 24h 测重法测定损失的 CO<sub>2</sub> 重量,68h 后蒸馏发酵醪,根据蒸馏液的酒精度和温度查表,以此考察不同酵母融合株的产酒精能力。

## 2 结 果

### 2.1 菌龄对原生质体形成的影响

菌龄是影响原生质体形成的重要因素之一。实验结果表明,原生质体形成率较高的时间是在亲本细胞培养 12~18h。这段时间在其生长曲线上正好为对数生长早期,此期细胞对蜗牛酶的作用比较敏感,故原生质体的形成率最高。因此实验菌株的菌龄皆选为 14h。

### 2.2 原生质体制备与再生条件的优化

从正交实验结果表明,原生质体形成与再生优化的条件是糖化酵母和酿酒酵母用 0.1% EDTA-Na 和 0.1% ME 预处理,分别以 2% 和 1% 蜗牛酶在 30℃ 下脱壁处理 40min,此时原生质体形成率分别为 91.4% 和 89.1%,再生率分别是 10.3% 和 10.8%。

### 2.3 原生质体融合条件的优化

以 PEG 浓度,融合的时间,温度及 pH 值进行原生质体融合的 4 因素 3 水平正交实验,结果见表 1,极差分析表明,PEG 浓度对原生质体的融合影响最大,而其他几个因素对原生质体融合作用差异不大。PEG 是原生质体融合诱导剂,其 PEG 浓度与原生质体的

存活率和融合率有一定的关系<sup>[10]</sup>。PEG 浓度过低,由于不能起到足够的渗透压稳定作用,致使原生质体存活率降低。另外,PEG 对原生质体有一定毒性<sup>[11]</sup>。所以,要控制 PEG 浓度不能过高。实验结果表明,PEG 35%,pH6.0,30℃下处理 30min 的条件融合效果最好,融合率达  $1.02 \times 10^{-5}$ 。

表 1 原生质体融合条件的正交实验结果

Table 1 The cross aut test results of the fusion condition of protoplasts

Group	A	B	C	D	Fusion rate( $\times 10^{-6}$ )
1	A1	B1	C3	D2	3.1
2	A2	B1	C1	D1	6.2
3	A3	B1	C3	D3	1.6
4	A1	B2	C2	D1	3.0
5	A2	B2	C3	D3	9.6
6	A3	B2	C1	D2	1.9
7	A1	B3	C1	D3	3.1
8	A2	B3	C3	D2	10.2
9	A3	B3	C3	D1	3.0
K <sub>1</sub>	9.2	10.9	11.2	12.2	
K <sub>2</sub>	26.0	14.5	14.8	15.2	
K <sub>3</sub>	6.5	16.3	15.7	14.3	
K <sub>1</sub>	3.1	3.6	3.7	4.1	
K <sub>2</sub>	8.7	4.8	4.9	5.1	
K <sub>3</sub>	2.2	5.4	5.2	4.8	
R	6.5	1.8	1.5	1.0	

Notes: A: Concentration of PEG / % : A<sub>1</sub>:30, A<sub>2</sub>:35, A<sub>3</sub>:40

B: Treating temperature/℃ : B<sub>1</sub>:20, B<sub>2</sub>:25, B<sub>3</sub>:30

C: Treating time, /min; C<sub>1</sub>:20, C<sub>2</sub>:30, C<sub>3</sub>:40

D: pH value, D<sub>1</sub>:5.0, D<sub>2</sub>:6.0, D<sub>3</sub>:7.0.

表 2 亲株与融合株营养要求

Table 2 The nutritional requirement of the parents and the fusants

Strains	Medium				
	MM	MM + His	MM + Arg	MM + Leu	MM + His + Leu + Arg
Parents					
10#	-	+	-	-	+
5106-9A	-	-	-	-	+
Fusants					
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+

\* + growth, -not growth

## 2.4 融合株稳定性的测定

在 MM 上进行连续传代,经过多代(本实验用 15 代)的自然分离和选择,可以获得稳定的融合株。亲株酿酒酵母为 His 缺陷型,且不能利用淀粉,亲株糖化酵母为 Arg、Leu 缺

陷型,所以它们都不能在 MM 上生长,而按营养互补的原则能在 MM 生长的是两亲株的融合株。从表 2 结果可以看出,融合株是亲株的原养型。

## 2.5 融合子细胞结构特征

**2.5.1 细胞体积的测定:**结果表明(表 3),融合株细胞体积均大于亲株细胞,约为两亲株细胞体积之和。从菌落大小也可以看出,融合株的菌落比两亲株的都大。

**2.5.2 DNA 含量的测定:**融合子的 DNA 含量与其两亲株 DNA 含量之和基本相符(表 3)。

表 3 酵母亲株和融合株倍性测定(平均数)

Table 3 The polyploid detem ine of the prim any stains and fusants

菌 株	预测倍性	细胞大小			一个细胞 DNA 含量 / $\mu\text{g}\cdot 10^{-8}$	按 DNA 含量确定的倍性
		长/ $\mu\text{m}$	宽/ $\mu\text{m}$	体积/ $\mu\text{m}^3$		
5106-9A	n	3.8	3.2	20	2.63	1.0
10 号	2n	5.3	4.8	63.9	5.72	2.17
融合株 4 号	3n	6.3	5.4	96.1	8.34	3.17
融合株 6 号	3n	6.2	5.4	94.6	7.97	3.08

## 2.6 融合子生理生化特性

**2.6.1 淀粉水解能力的测定:**结果表明(表 4),融合株 4 号和 6 号开始产气的时间分别为 2d 和 2.5d,比亲株早,淀粉水解能力也优于亲株。

表 4 淀粉水解能力测定

Table 4 The ability detemine of saccharification

菌株	水解圈指数*	开始产气的时间/h**
5106-9A	1.53	72
融合株 4	1.70	48
融合株 6	1.67	60

\* YPSB agar medium

\*\* YEPSF medium

### 2.6.2 融合株 4 号、6 号生长速率的测定:

由图 1 可以看出融合株 4 号、6 号在生长速率上,均高于亲株,另外,4 号的生长速率比 6 号的稍高一点。

### 2.6.3 融合株耐酒精度的测定:乙醇耐受性

定义是使菌株的发酵活性或生长完全被抑制时的乙醇浓度。实验结果表明,4 号菌株的酒精耐性是在 20%~22% 之间,6 号菌株是在 18%~20% 之间,亲株 10 号是在 15%~18% 之间。由此可见融合株 4 号和 6 号的耐酒精精度皆高于亲株 10 号。

**2.6.4 亲株和融合株耐渗透压的测定:**由图 2 可以看出:4、6 及 10 号菌株在 20%、25% 的葡萄糖培养基上,细胞数随时间的增加而增加,葡萄糖浓度为 30% 时,细胞数增加很少,说明它们皆不能在糖浓度为 30% 以上的条件下较好的生长。融合株 4 号、6 号耐渗透压的能力均优于亲株 10 号。

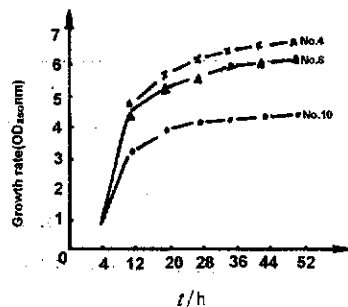


图 1 亲株与融合株生长速率的比较

Fig 1 Comparison of grow thrates of the parents strain and fusants

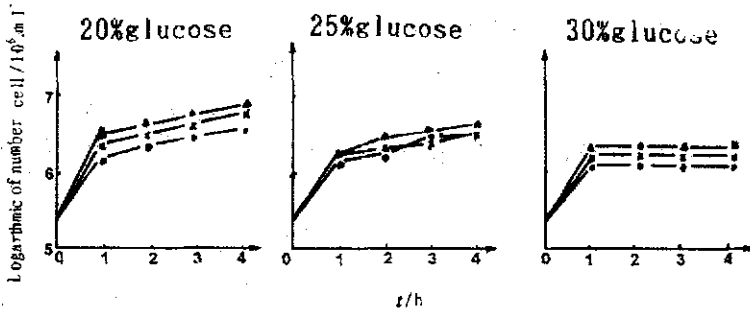


图2 亲株与融合株在不同渗透压下的生长情况

Fig 2 Comparison of growth between the primary strain and fusants under the different osmotic pressure

Legend are the same as in Fig. 1

2.6.5 不同酵母菌株酒精发酵能力的比较:亲株 10 号和生产菌株 724 不具有糖化能力,而 4 号和 6 号是新构建的融合株,具有一定的糖化能力。表 5 是 10 号、724 号、4 号和 6 号四菌株利用玉米粉发酵产酒精能力的测试。糖化酶用量,10 号和 724 号为 400u/g 原料数,4 号和 6 号为 100u/g 原料。由表 5 可以看出,在加入不同糖化酶的情况下,4 号、6 号产酒精能力比亲株高,与 724 号相近。

表 5 不同酵母菌株利用玉米粉产酒精能力的比较

Table 5 The comparison of the abilities of different yeast strains to product ethanol by making use of maize flour

菌株	失去 CO <sub>2</sub> 的重量/g·L <sup>-1</sup>				残糖/%	淀粉利用率/%	发酵液中的乙醇浓度(V/V)/%
	0h	24h	48h	72h			
10 号	0	6.1	14.1	20.1	0.34	83	13.1
4 号	0	7.8	16.1	21.6	0.22	90	14.5
6 号	0	7.4	16.8	22.5	0.18	91	14.9
724 号	0	7.9	16.4	21.2	0.25	89	14.3

\* 糖化酶用量:10 号和 724 号为 400u/g 原料,4 号和 6 号为 100u/g 原料

### 3 讨 论

酿酒酵母和糖化酵母原生质体的形成和再生受外界条件影响较大,诸多的因素之间,原生质体的形成率和再生率之间又相互联系,很难掌握。本文采用多因子正交实验,选择对酵母原生质体形成和再生影响较大的四个因素,每因素取三个水平进行设计,通过 9 次实验可以确定影响原生质体形成和再生的主次因素,从而确定出原生质体形成和再生的最佳条件。结果表明这种实验方法对研究原生质体的形成和再生是可行的。

酶浓度是影响原生质体形成和再生的最重要因素。此外提高酶处理温度或延长酶处理时间以及 ME 的加入都可提高原生质体的形成率,但原生质体的再生率却随之下降,这与 Gunge N<sup>[12]</sup>、Takuos<sup>[13]</sup>、谭蓓英等人<sup>[14]</sup>的研究结果是一致的。

为提高融合频率,首先要求原生质体分离和融合之间的操作时间越短越好;其次,要求原生质体分离的越纯越好,若原生质体悬液中含有残存的细胞壁和各种颗粒物等,它们

都能与 PEG 反应,显著降低融合效应;最后,为缩短融合和凝集过程,提高融合频率,可以适当提高渗透压稳定剂的浓度,两亲株的原生质体一般以 1:1 相混合为宜。

通过原生质体融合技术选育出了具有糖化酶活性的耐高浓度酒精酵母新菌株。从发酵条件,成熟发酵醪中的乙醇浓度,残糖和淀粉利用率来看,这一菌株在酒精发酵中具有很大的应用价值,应用该菌株可以减少糖化酶用量,大大降低成本,提高劳动生产率。

### 参 考 文 献

- [1] Spencer J F T. *Ann Rev Microbiol*, 1983, **37**:121~142.
- [2] 居乃琥. *应用微生物*, 1985(1):41~44.
- [3] Cecila L, James R M, *J Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**(1):17~25.
- [4] Figueroa L L *et al.* *Siotechnol Lett*, 1984, **6**(4):269~274.
- [5] 曾云中,张冬妮,吴雪昌等, *生物工程学报*, 1992, **8**(4):363~370.
- [6] 李维泉,焦瑞身. *微生物学报*, 1991, **31**(3):251~253.
- [7] 蔡金科,张博润,刘惠平. *遗传学报*, 1978, **5**(1):9~16.
- [8] 姜同川. *正交实验设计*, 济南:山东科技出版社, 1985.
- [9] 林德光. *生物统计的数学原理*, 辽宁人民出版社, 1982.
- [10] 陈海昌. *天津微生物*, 1985, **3**:1~6.
- [11] Schnettler R *et al.* *Method in cellBiology*, 1978, **20**:149~158.
- [12] Gunge N *et al.* *Japan J Genet*, 1978, **54**:41~49.
- [13] Takuo S., K yo-im K., KiyoshiS *et al.* *Agric Bio. Chem.*, 1986, **50**(2):297~306.
- [14] 谭蓓英,王 花,孙玉琴. *真菌学报*, 1983, **2**(3):192~196.
- [15] Anh J S, Pack M Y. *Appl Environ Microbio*, 1985, **49**(6): 1550~1552.
- [16] (日)微生物研究法讨论会编,程光胜等译. *微生物等实验法*, 北京科学出版社, 1981, pp. 229.
- [17] Farahnak F, Seki T, Dewey D Y *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**(2):262~367.
- [18] 张龙翔等. *生物化学实验方法和技术*, 北京:人民教育出版社, 1982, pp. 219~220.
- [19] 邱鸿芳,陈士怡. *遗传学报*, 1985, **12**(3):175~182.
- [20] Ichiro Y, Sakuzo F, *Agric. Biol Chem.*, 1983, **47**(11):2639~2692.

## The Construction of yeast Fusants and Studies on Characterization

Guo Xiujun Guo Lizhong Yu Xin

(Department of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** With *Saccharomyces diastaticus* and *S. cerevisiae* as primary strains, through the cross cut tests, the optimum conditions of the preparation, regeneration and fusion of protoplast was found, which have the capacity of both saccharification and ethanol production. The fusants have bigger cells, equal DNA containing to that of two primary strains, and they are superior in the capacities of saccharification, fermenting strength and ethanol productivity to the primary strains.

**key words** *Saccaromyces diastaticus*, *S. cerevisiae*, protoplast fusion, cross cut test