

原生质体融合构建耐高温酵母菌株*

孙君社 李 雪 李军席

(中国农业大学食品学院 北京 100083)

摘 要 通过原生质体融合选育耐高温的酵母,以解决在纤维素类物质同步发酵过程中酵母发酵温度同纤维素酶酶解温度不一致的问题。利用电场诱导原生质体融合技术对产酒率高的菌株 Sb1 和产酒率低但耐高温的菌株 No.30 进行融合。经过融合条件的选择,分别对 2 亲株进行遗传标记,3.5% 蜗牛酶处理原生质体,在脉冲强度为 11 kV、宽度 10 μ S、次数为 2 次时进行融合,得到数株融合子。鉴定得知,融合子 2 是所需要的融合子,其在固态发酵 45℃ 时产酒精能力达到体积分数 7.28%。

关键词 酵母菌 原生质体 电融合 高温酒精发酵

在纤维素类物质同步糖化发酵(SSF)过程中,制约反应效率的 1 个重要因素就是纤维素酶的最适温度同酵母发酵的最适温度的不一致。纤维素酶的最适温度为 45 ~ 50℃ 左右,而酵母发酵的控制温度一般在 30℃ 左右,选用耐高温酵母菌株是解决纤维素同步发酵中这 2 个温度不协调的有效方法^[1]。

长期以来,高温菌株的选育主要集中在自然界筛选^[2,3]和高温驯化^[4]。利用分子生物技术手段改良酵母等亦有报道^[5]。原生质体融合是以 2 亲株的细胞膜的融合为起点,经细胞质的完全融合,直至基因组的交换重组,产生众多的重组子,从中筛选出耐高温型的重组子^[6]。Setei 等^[7]和方霭祺等^[8]通过原生质体融合分别获得了 42℃ 条件下发酵产酒精体积分数为 6.0% 和 40℃ 发酵产酒精体积分数为 5.9% 的耐高温酵母。文铁桥等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℃ 下发酵产酒精体积分数为 7.4% 的融合子^[9]。

本文正是通过原生质体融合技术,力求利用现有的出发菌株获得耐高温的酵母,以解决纤维素同步糖化发酵过程中的纤维素酶

同酵母最适温度不同的问题。

1 材料与方法

1.1 菌 株

(1) 葡萄酿酒酵母 No.30:由中国微生物菌种中心提供,该酵母耐高温能力强,可在 45℃ 条件下很好的生长,但在此温度发酵时,产酒精能力较差。

(2) Sb1 酵母:由山东大学微生物系购得,在 30℃ 条件下生长很好,产酒精能力较强。

1.2 培养基

(1) 麦芽汁固体培养基:灭菌后加入溴化乙锭,质量浓度为 1 mg/L。

(2) 甘油培养基:见参考文献[10]。

(3) 含 1% 葡萄糖和 1% 琼脂的培养基。

(4) 三苯基四氮唑酸盐(TTC)溶液(5% 的母液)。

(5) YEPD 液体培养基:蛋白胨 2%,葡萄糖 2%,酵母膏 1%,pH5.8。

(6) 完全培养基(YEPD 固体培养基):YEPD 液体培养基中加入 2% 琼脂。

(7) 高渗完全培养基(YEPDS):在 YEPD 液体培养基中加入 2% 琼脂,KCl 终浓度为

第一作者:博士后,副教授。

* 国家自然科学基金资助项目(No.29976045)

收稿时间 2002-01-20

0.6 mol/L。

(8)甘油鉴别培养基:甘油 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, 酵母膏 0.01 g, NaCl 0.01 g, CaCl_2 0.01 g, 蒸馏水 100 mL, KH_2PO_4 0.1 g, pH 5.0。

(9)乙醇发酵培养基:见参考文献 [11]。

1.3 试剂

(1)蜗牛酶液:用 CPB 配制 $0.45 \mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤。

(2)溴化乙锭溶液(EB 母溶液):质量浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ (无菌水配制)。

(3)1% 淀粉指示剂。

(4)柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(CPB):见参考文献 [12]。

(5)脱壁预处理剂(DWPG):见参考文献 [11]。

(6)脉冲缓冲液:见参考文献 [13]。

(7)高渗 PB:见参考文献 [11]。

1.4 乙醇体积分数测定

重铬酸钾比色法^[14]。

1.5 方法

1.5.1 遗传标记的获得

(1)No.30 的呼吸缺陷型突变体的筛选^[5]:吡啶黄、溴化乙锭等可诱发酵母呼吸缺陷型突变。野生型酵母菌落能还原三苯基四氮唑盐酸盐(TTC)而变成红色。呼吸缺陷型菌株则无此能力,菌落仍为白色,利用这一特性可以检出呼吸缺陷型酵母。

(2)菌株 Sb1 遗传缺陷型标记的选择:取 Sb1 酵母的原生质体液(浓度为 5×10^7 个/mL),倒入无菌的培养皿中,于 20 W 紫外灯下保持 30 cm 的垂直距离照射不同的时间,每隔 5 min 摇动 1 次。照射完毕,取样镜检原生质体是否破裂或裂解。同时在照射前后取原生质体悬液涂布高渗 YEPD 平板,在 30℃ 下培养 3 d 观察存活情况。

1.5.2 原生质体的制备与再生

活化上述菌株,于 YEPD 液体培养基活化一定时间,各取 5 mL, 3000 r/min 离心 5 min, 无菌水洗 2 次;CPB 洗 1 次。各加入

DWPG 1 mL, 30℃ 下预处理 20 min。4000 r/min 离心 4 min, 弃去上清液,加入蜗牛酶液,在 30℃, 100 r/min 摇床振荡 0.5 ~ 1 h。在相差显微镜下镜检,当 90% 以上细胞变为原生质体后, 3000 r/min 离心 8 min, CPB 洗 2 次。最后加入 4 mL 高渗 PB 制得原生质体悬液,并分别适当稀释并涂布高渗 YEPD, 所得悬液浓度控制在 5×10^7 个/mL 左右待用。

1.5.3 原生质体融合

将 2 种原生质体悬液以体积比 1:1 混合(5×10^7 个/mL)在 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液,用 0.4 mol/L CaCl_2 溶液洗涤 1 次。向沉淀中加入电极缓冲液,轻轻摇匀得悬液。用移液器吸取 50 μL 悬液注入融合体小室内。将融合小室放于倒置显微镜下观察,接通低压交变电场。电脉冲结束后,让融合小室静置存放 15 min 以上,取融合的原生质体悬液用 1.2 mol/L 山梨醇溶液稀释后,涂布高渗 YEPD 培养基和甘油,鉴别培养基平板,于 45℃ 下培养 6 d,对再生菌落计数,计算融合频率,挑取融合子。

1.5.4 融合子筛选

(1)发酵液的醇化及酒精的定量测定:见参考文献 [14, 15]。

(2)遗传稳定性的检验^[10]:融合子继代培养 15 次,稀释并涂布 YEPD 平板,挑选生长的单菌落,分别用牙签点种于甘油培养基和 YEPD 平板,观察培养后的生长情况。如在 2 种平板上均生长良好,则为融合子,否则为异核体。

(3)细胞大小的测检及其体积的计算:见参考文献 [10, 12]。

2 结果及讨论

2.1 小菌落(呼吸缺陷型)突变体筛选

酵母细胞线粒体 DNA(mt DNA)突变会造成呼吸缺陷,产生小菌落,采用的化学诱变剂为溴化乙锭(简称 EB)。

由图 1 可知,EB 终质量浓度在 $10 \mu\text{g/mL}$ 时小菌落比数发生了突变。在对挑取的小菌

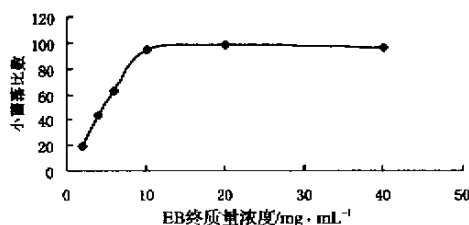


图1 不同EB浓度处理效果

落突变株进行鉴定时,用 TTC 显色法,并利用甘油培养基对小菌落突变株和野生型加以筛选,同时经发酵能力的测定,得到了 5 株稳定的 No.30 呼吸缺陷突变株,分别为 NH_1 , NH_2 , NH_3 , NH_4 , NH_5 。

2.2 灭活 Sb1 原生质体紫外线致死剂量的确定^[10,16]

采用不同的紫外照射时间,对 Sb1 的原生质体进行处理,保持 Sb1 的原生质体悬液浓度为 5×10^7 个/mL 左右。

表1 紫外线致死剂量的确定

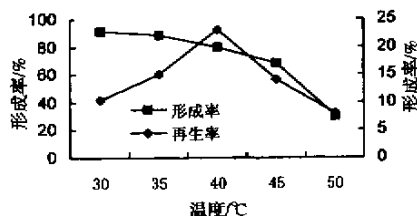
时间/min	30	35	40	45
存活菌落数	2	0	0	0
存活率/%	5×10^{-6}	0	0	0

注:存活率为照射前后在高渗 YEBP 平板上生长的菌落数之比。

在高渗 YEPD 平板上形成的菌落,大多为再生的原生质体,而少数为未脱壁的细胞。灭活的目的是破坏原生质体的再生能力,并将破坏其结构,由表 1 结果可知,紫外照射合理的时间为 40 min,镜检观察这时的原生质体是完整的。

2.3 温度对菌株 NH_4 原生质体制备的影响

由图 2 结果可以看出, NH_4 在 40°C 时形成率较 35°C 略有下降,但再生率却大幅度提

图2 温度对菌株 NH_4 原生质体制备再生的影响

高。温度过高或过低均对再生率不利,这主要是由于 NH_4 的耐高温特性在酶解时具有其活跃的生理状况,对酶的敏感性增强,从而抵消了部分由于酶活性的损失而造成的对形成率的影响,由此制得的原生质体对环境的适应能力就很大,从而保持了较高的再生率。因而 NH_4 在 40°C 时酶解是理想的。

2.4 蜗牛酶浓度对于原生质体制备和再生的影响

经不同的蜗牛酶浓度对原生质体制备和再生的比较得知,质量分数为 3.5% 时各菌株的原生质体形成率和再生率比较理想。而当酶的浓度升高时,会因为酶对细胞膜的作用而造成损伤,从而使再生率下降。

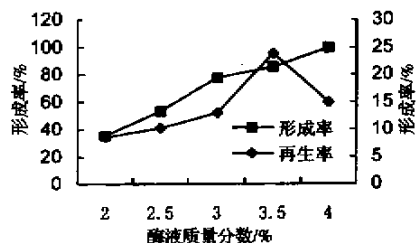
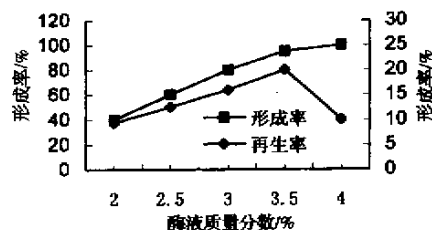
图3 酶浓度对 NH_4 原生质体制备和再生的影响

图4 酶浓度对 Sb1 原生质体制备和再生的影响

2.5 电场诱导融合参数的选择

电融合时原生质体在高压脉冲下会排成不同长度的串珠结构。该结构在高压脉冲下使原生质体膜产生可逆电激孔,相邻细胞相互沟通而融合。自 1950 年电融合技术问世以来,由于其安全、快捷的特点,得到了广泛的推广应用。然而由于不同的生物细胞结构的差异,导致融合条件存在较大的差异。为

了得到较高的融合频率,必须针对不同生物细胞,精心选择电脉冲强度、脉冲宽度、脉冲间隔和次数等参数。为了更好的确定脉冲参数,选择脉冲强度、宽度、次数进行3因素3水平正交实验。

表2 正交实验

实验号	脉冲强度	脉冲宽度	空列	脉冲次数	融合率
1	K(9)	K(10)	1	K(2)	1.8×10^{-5}
2	1	L(15)	2	L(3)	8.6×10^{-6}
3	1	L(20)	3	L(4)	3.6×10^{-6}
4	L(10)	1	2	3	1.6×10^{-4}
5	2	2	3	1	4.3×10^{-5}
6	2	3	1	2	7.8×10^{-5}
7	L(11)	1	3	2	2.5×10^{-4}
8	3	2	1	3	8.7×10^{-5}
9	3	3	2	1	3.1×10^{-4}
较好水平	A ₃	B ₁		C ₁	
主次因素			A > B > C		

注:融合率 = 甘油培养基菌落数/原生质体总数。

各因素影响大小的顺序为脉冲强度 > 脉冲宽度 > 脉冲次数,最佳融合条件为 A₃ B₁ C₁,即脉冲强度、宽度、次数为 11、10、2 时为佳,此时的融合率为 4.10×10^{-4} 。

2.6 融合子的鉴定

2.6.1 各菌株在最适温度下的产酒精能力

表3 各菌株的产酒精能力

菌株	温度/℃	产酒精的体积分数/%
Sb1	30	6.42
NH ₄	45	2.58
融合株 1	45	6.35
融合株 2	45	7.28
融合株 3	45	2.94
融合株 4	45	3.93
融合株 5	45	5.38

在得到的几株融合子中,融合株 1、2、5 在 45℃ 下的发酵能力与酵母 Sb1 在 30℃ 时的发酵能力比较接近,因此进一步将主要研究融合株 1、2、5 是否是真正的融合子。

2.6.2 遗传稳定性

经过遗传 15 代以后,融合株 1、2、5 仍能稳定生长,则说明融合株遗传稳定。

2.6.3 细胞大小的确定

当 2 亲株细胞融合以后,其细胞体积会

有所增大,因而经过此法可以鉴别融合株。由表 4 中可知,融合株 2 的长短轴及菌株的体积都有不同程度的增大,结合以上的测定结果,可得出此融合株 2 是真正的融合子。

表4 亲株和融合株 2 的体积大小测定

菌株	长轴 a/μm	短轴 b/μm	体积/μm ³
NH ₄	10.75	6.50	237.89
Sb1	11.25	5.00	147.30
融合株 2	16.00	6.80	387.50

3 小 结

(1) 在原生质体融合中,对单一亲株的灭活可以实现遗传物质的单向传递,被灭活亲株的原生质体失去再生的能力,再与另一方发生融合后,在再生完全培养基平板上长出的只有可能为后者,这便达到了直接淘汰前者的目的,提高了筛选频率。此实验成功地采用了单亲灭活获得了多株融合子,融合频率较高,而 No.30 的耐高温性能在融合子中得到了表达。

(2) 利用电场诱导原生质体融合技术对菌株 Sb1 和 No.30 进行融合。在原生质体制备时选择 30℃、3.5% 蜗牛酶处理。融合时为了能得到较高的融合率,对电场强度进行了选择,在脉冲强度、宽度、次数分别为 11 kV、10 μs、2 次时,通过融合后得到了融合子,且对它的一些性质进行了鉴定,得知融合子具有 2 亲株的某些特性,经过小型发酵实验融合株的发酵能力也较高,最后确定此融合株 2 是所需要得融合子,在 45℃ 时产酒精能力达到 7.28%,完全可适应纤维素的同步糖化发酵。

参 考 文 献

- Ballesteros I et al. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994, 45/46: 283 ~ 293
- Ballesteros I et al. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991, 28(9): 307 ~ 315
- Banat I M, Marchant R. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1995, 11: 304 ~ 306

- 4 Suuttri M et al. Journal of General Microbiology ,1990 , 136 :1469 ~ 1474
- 5 Sakanaka K et al. Journal of Fermentation and Bioengineering ,1996 ,81 :104 ~ 108
- 6 陶文沂主编.工业微生物生理与遗传育种学.北京:中国轻工业出版社,1997. 335 ~ 343
- 7 Seki T S, Mykga S. Biotechnology ,1983 ,5 :351 ~ 356
- 8 方霭祺,李绍兰,陈有为等.生物工程学报,1990 , 2 (3) :224 ~ 229
- 9 文钱桥等.微生物学报,1999 ,2 :141 ~ 147
- 10 夏淑兰.现代微生物实验技术.北京:轻工业出版社,1988.36 ~ 48
- 11 文钱桥等.中国酿造,1990 (7) :25 ~ 30
- 12 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册.北京:中国轻工业出版社,1997. 220 ~ 223
- 13 张国政等.中国酿造,1995 (3) :12 ~ 16
- 14 胡嗣明,张天杭.酒精生产分析检验.北京:轻工业出版社,1987. 148 ~ 150,125 ~ 131
- 15 扬惠英等.中国酿造,1993 (3) :15 ~ 18
- 16 周东坡.微生物学报,1999 (10) :454 ~ 460

Constrution of Thermotolerant Alcohol Producing Yeast by Protoplast Fusion

Sun Junshe Li Xue Li Junxi

(Food College , China Agricultural University ,Beijing ,100083)

ABSTRACT Protoplast fusion technique between *S. cerevisiae* No.30 and *S. bayanus* Sb1 has been studied. No.30 can grow at 45℃ but has a lower alcohol yield. However Sb1 is a high alcohol yield yeast but can't grow at 45℃. The best intensity ,width , interval frequency of the electrofusion impulse are 11 kV ,10μS ,59s respectively. The result shows that the fusant greatly expressed the properties of parent strains in thermotolerance and alcohol yield. The fusant 2 has a high alcohol yield(7.28%) using glucose as substrate at 45℃.

Key words yeast ,protoplast ,electrofusion ,high temperature alcoholic fermentation

日本饮料工业健康甜味剂使用情况

过去 10 年日本国民中肥胖症、高血压和糖尿病发病率不断上升,鉴于此,日本饮料工业大力开发与应用健康饮料专用甜味剂,以取代容易使人发胖的蔗糖。

据日本刊物报道,日本饮料工业专用甜味剂主要分为 3 大类:即化学合成甜味剂,如天冬甜肽(阿斯巴甜)、天然甜味剂,如甘草甜素(甘草酸)、甜叶菊苷等;各种异型甜味剂,如大豆寡糖、乳果寡糖、麦芽糖醇、异麦芽糖醇、赤藓糖醇等。据介绍,日本各大饮料公司(如三得利、麒麟、朝日啤酒等)已在其饮料产品中普遍使用甜叶菊苷和阿斯巴甜,以取代食后有苦味残留感的糖精钠,从而造成日本糖精钠市场的逐年萎缩。无论甜叶菊苷或阿斯巴甜均不含任何热量(或仅含很少热量)。目前,日本仅饮料业使用的甜菊苷即高达年 200t。为改善甜菊苷的异味,日本科学家发现,只要将甜菊苷与 L-苹果酸以 1:1 调合后使用,即可使甜菊苷的异味大为改善。

值得注意的新动向是,近几年来,木糖醇在日本饮料工业中使用增长较快。据介绍,木糖醇不仅不含热量,甜味纯正,而且对人体还有某些保健作用。据说常饮含木糖醇的饮料可防止老年痴呆症,故木糖醇值得在饮料及其他食品中推广应用。日本木糖醇年产量约 4 000 t,估计饮料用木糖醇约占其中 1/3。