

构建直接发酵淀粉产生酒精的酵母融合菌株的研究

庞小燕^{1*} 王吉瑛² 赵凤生¹

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

(兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘 要 以酒精酵母和热带假丝酵母为亲本, 通过单亲灭活原生质体融合技术, 获得了既具有糖化酶活性又能高产酒精的稳定的酵母融合株, 并测定和比较了融合子的细胞大小、DNA 含量以及比增长率 μ 、淀粉利用能力、乙醇耐受性、 α -淀粉酶和糖化酶活力等生产性能。属间原生质体融合率为 9.2×10^{-6} 。F-1 和 F-5 两株融合子性状较好, 酒精发酵产量可达 8.8% 和 11.5%, 具有良好的应用前景。

关键词 酒精酵母 热带假丝酵母 原生质体融合 酒精发酵

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0165-05

如何才能实现淀粉质原料直接发酵生产酒精一直是酒精发酵工业一个亟待解决的问题^[1-5], 本实验即是以酒精酵母和能较好利用淀粉的热带假丝酵母为亲本, 进行原生质体融合, 以构建具有淀粉糖化活性的新型酒精酵母。融合子的筛选采用单亲原生质体灭活法, 即用不可逆生化抑制剂碘乙酸 (ID) 处理热带假丝酵母的原生质体, 灭活其正常代谢所需酶系, 使之丧失在淀粉培养基上生长的能力, 再将这种灭活了的原生质体和正常的酒精酵母原生质体在 35% 聚乙二醇 (MW: 6000) 和 Ca^{2+} 的诱导下融合, 形成融合子。在融合子中, 失活的热带假丝酵母的酶系统被酒精酵母体内的酶系激活, 代谢得以补偿, 故可在以淀粉为唯一碳源的基础培养基上生长, 以此为特征鉴别融合子。

单亲灭活原生质体融合法不需要选择性标记, 因此可避免重组体失去亲本的优良性状, 还可显著缩短融合工序和时间, 大大提高了筛选效率, 是一种高效、快捷的融合方法^[6,7], 现已广泛为人们所重视和采用。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :酒精酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 399 本实验室保存。热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 968 本实验室保存。

1.1.2 培养基 :液体完全培养基 (YPD): 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%, 酵母膏 1%, pH6.5。固体完全培养基: 同 YPD, 加 2% 琼脂。高渗完全培养基 (YPDS): YPD + 0.8 mol/L 甘露醇。选择性培养基 (MM): 可溶性淀粉 2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.05%。高渗选择性培养基 (MMS): MM + 0.8 mol/L 甘露醇。固体麸曲培养基: 麸皮: 玉米面: 水 = 3: 1: 3。淀粉发酵培养基 (YEPSF): 可溶性淀粉 5%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.025%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0125%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.025%, KH_2PO_4 0.2%。以上培养基均为 1.05 kg/cm² 30min 灭菌。

1.1.3 试剂 : pH5.8、0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (PB), 渗透压稳定剂 0.8 mol/L 甘露醇溶液。高渗磷酸缓冲液 (PBS): PB + 渗透压稳定剂。预处理剂: 由 0.1 mol/L EDTA 配制的 0.4% 巯基乙醇溶液。脱壁酶 蜗牛酶 (Helicase) 和纤维素酶 (Cellulase) 均购自北京百泰生化技术公司。使用时按所需浓度用渗透压稳定剂配制, 0.22 μ 微孔滤膜过滤除菌。促融剂: 35% PEG6000 (20 mmol/L CaCl₂ 0.8 mol/L KCl)。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的制备与再生 : 收集处于对数生长期 (12 ~ 16h) 的 *S. cerevisiae* 399 和 *C. tropicalis* 968 细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入预处理剂 EDTA-巯基乙醇于 30°C 处理 30min, 洗涤后加入蜗

牛酶和纤维素酶的混合酶液, 33℃ 振荡脱壁。酶解完成后用 PBS 反复洗涤。取少量菌悬液稀释到适当浓度后涂 YPD 和 YPDS 平板, 计算原生质体形成率和再生率。

1.2.2 单亲原生质体的灭活 将新制备的热带假丝酵母原生质体用 0.1% 碘乙酸 (ID) 在 30℃ 下处理 40min, PBS 洗涤。

1.2.3 双亲原生质体的融合及融合子的检出 新鲜的热带假丝酵母灭活原生质体和酒精酵母原生质体按 1:1 的比例混合, 悬于促融剂中, 混匀, 30℃ 水浴中静置处理 40min。融合菌液用 PBS 反复洗涤。取少量适当稀释后涂布于 MMS 和 YPDS, 30℃ 培养 7d。记录 MMS 和 YPDS 两种培养基上的菌落数。

挑取 MMS 上的小菌落转接在 MM 上培养, 连续传代 10 次, 将稳定的融合子转至 YPD 斜面上再传代 10 次, 能稳定遗传的即视为真正的融合子保存。

1.2.4 融合子的鉴定 融合子细胞大小的测定: 细胞体积按 $V = \pi ab^2/6$ 计算 (式中: a 为细胞长轴长度, b 为细胞短轴长度)。融合子 DNA 含量的测定: 参考文献 [8, 9]。

1.2.5 融合子的性能测定 菌体比增长率 μ 值的测定: 比增长率 (Specific growth rate) 是能够确切地描述微生物生长特性的一个参数, 是生物工程学和生理学上的重要概念之一。它的高低由 μ 值来表示, μ 定义为单位重量菌体的瞬时增量。将融合子与双亲株细胞分别活化后, 于完全培养基中培养, 在培养时间为 0h、3.5h、6h 分别取样计数, 计算 μ 值 [10]。

菌体水解淀粉能力的测定 将活化后的融合子和双亲菌株接入以淀粉为唯一碳源的 MM 平板, 30℃ 培养待菌落长成后, 滴加碘液铺满平板, 在 4℃ 冰箱冷存过夜。根据菌落周围透明的水解圈的大小计算水解圈指数, 初步鉴定利用淀粉能力的大小。水解圈指数 = 水解圈直径/菌落直径。

菌株乙醇耐受性的测定 活化的融合子和亲本分别接种在 100mL 含不同酒精度的 YPD 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 48h 后观察其生长情况。

融合株 α -淀粉酶和糖化酶活性的测定 热带假丝酵母和融合子分别接种于固体麸曲培养基, 30℃ 培养 4d, 取固体曲 10g 加 50mL 水和 10mL HAc-NaAc 缓冲液, 搅匀, 于 30℃ 水浴中保温振摇浸出 1h, 用滤纸过滤, 滤液即为粗酶液。 α -淀粉酶活力测定按照 Y_{00} 改良法 [11], 糖化酶活力测定按照文献 [12]。

1.2.6 融合子在酒精发酵中的应用 将性状优良的融合子活化后接种于含 200mL 淀粉发酵培养基

YEPSF 的三角瓶中, 30℃ 水浴厌氧变温发酵, 即前 18h 发酵温度为 27~30℃, 18h 后发酵温度改为 30~33℃。3d 后取 100mL 发酵液蒸馏, 测其酒精含量和淀粉利用率。

2 结果与讨论

2.1 影响原生质体形成与再生的因素

2.1.1 菌龄对原生质体形成的影响 原生质体一般选用对数生长期的菌体, 此时的细胞代谢旺盛, 细胞壁对酶的作用最为敏感。 *S. cerevisiae* 和 *C. tropicalis* 的对数生长期均在 12~16h 之间, 故采用培养 14h 的菌体细胞制备原生质体。

2.1.2 脱壁酶系统的选择 纤维素酶和蜗牛酶是微生物细胞脱壁常用的效果较好的酶。我们比较了纤维素酶、蜗牛酶 2 种单酶及不同浓度的混合酶对酵母细胞进行酶解后释放出原生质体的数量 (图 1), 实验表明, 单酶处理的效果不如混合酶处理的效果好。对于 *S. cerevisiae*, 最佳酶系统为 1% 纤维素酶 + 1% 蜗牛酶, 同法测得 *C. tropicalis* 的最佳酶系统为 1.5% 纤维素酶 + 0.5% 蜗牛酶, 酶系统的不同与两类酵母细胞壁的化学组成不同有关。在此条件下酶解 2~2.5h, *S. cerevisiae* 399 和 *C. tropicalis* 968 的原生质体形成率分别为 78% 和 83%, 再生率分别为 25% 和 18%。由于两亲本原生质体的再生率均较高, 故可进行以后的融合实验。

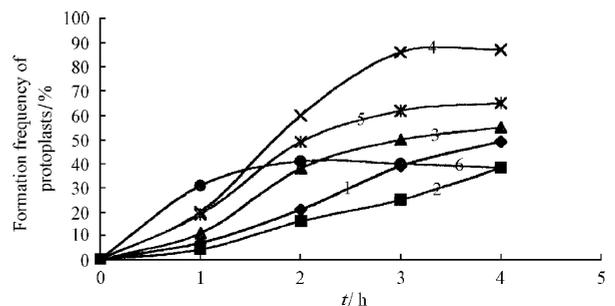


图 1 酒精酵母 399 在不同酶液中原生质体释放量的比较
Fig. 1 Protoplasts released from *S. cerevisiae* 399 at different enzyme concentration

◆, 1% cellulase; ■, 1% helicase;
▲, 0.5% cellulase + 0.5% helicase; ×, 1% cellulase + 1% helicase;
※, 1.5% cellulase + 0.5% helicase; ●, 2% cellulase + 2% helicase

2.2 单亲原生质体的灭活

热带假丝酵母原生质体灭活所用抑制剂 ID 的浓度定为 0.1%, 因为较高浓度的 ID 对细胞损害强烈, 细胞中大部分的酶系和生理活性会受到抑制, 导致融合实验的失败。

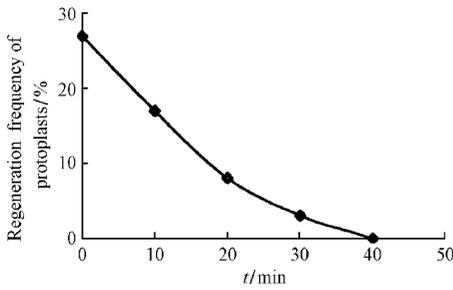


图2 0.1% ID对热带假丝酵母原生质体再生率的影响

Fig.2 The effect of 0.1% ID on the regeneration frequency of the protoplasts released from *C. tropicalis*968

由图2可看出,用0.1% ID处理原生质体,40min时灭活率基本可达100%,若处理时间少于40min,则部分原生质体未被杀死,仍能在YPDS上再生,不利于融合子的筛选,所以我们采用0.1% ID在30℃处理40min来灭活热带假丝酵母的原生质体。

2.3 原生质体的融合及融合子的检出

S. cerevisiae 原生质体与灭活的 *C. tropicalis* 原生质体的融合液在MMS培养基上培养7d后,即可长出白色小菌落,即融合子,而作为对照的灭活 *C. tropicalis* 原生质体在MMS平板上不生长。属间融合率为 9.2×10^{-6} 。这种融合产物存在两种情况:一种为两亲本的细胞质发生了融合而核未融合,即异核体,会因细胞核的不亲和而在传代中发生核的分离;另一种为真正的核融合体,其遗传性状稳定,后代不会发生分离。通过连续传代培养我们获得了8株稳定遗传的融合子,记为F-1~8。

2.4 融合子的鉴定

8株融合子和双亲的细胞大小及DNA含量测定结果见表1。

表1 亲本及融合子细胞大小、DNA含量的比较

Table 1 Comparison of size of cells and DNA content of parents strain and fusants

Strains	Cell volume(μm^3)	DNA content($\mu\text{g} \cdot 10^{-8}/\text{cell}$)
<i>S. cerevisiae</i> 399	12.80	3.1
<i>C. tropicalis</i> 968	10.09	5.6
F-1	72.70	10.7
F-2	49.01	6.7
F-3	28.45	8.3
F-4	13.74	4.2
F-5	52.61	7.4
F-6	21.63	5.8
F-7	23.82	6.3
F-8	56.87	5.4

由表中可看出,融合子的细胞明显大于双亲细胞,DNA含量也高于双亲。表中数据还显示,融合

子的DNA含量并不完全等于或近似于两亲本DNA含量之和,这种现象在其它种间、属间原生质体融合的研究中也有报道^[13,14]。

2.5 融合子的性能测定及筛选

2.5.1 融合子与双亲株细胞比增长率的测定:

表2 亲本及融合子 μ 值的比较

Table 2 Comparison of μ value of parents strain and fusants

Strains	Cell density/(cell/mL)			μ value(h^{-1})	
	0h	3.5h	6h	0~3.5h	3.5~6h
<i>S. cerevisiae</i> 399	5.41×10^5	3.93×10^6	1.11×10^7	0.554	0.438
<i>C. tropicalis</i> 968	4.12×10^6	2.60×10^6	1.19×10^7	0.483	0.512
F-1	4.86×10^5	4.33×10^6	1.99×10^7	0.603	0.589
F-2	3.74×10^5	2.98×10^7	1.25×10^7	0.558	0.570
F-3	5.13×10^5	4.52×10^6	1.66×10^7	0.591	0.558
F-4	3.82×10^5	1.53×10^6	4.20×10^6	0.408	0.383
F-5	5.27×10^5	4.33×10^6	1.84×10^7	0.561	0.575
F-6	5.62×10^5	5.17×10^6	2.55×10^7	0.645	0.615
F-7	4.91×10^5	4.01×10^6	9.57×10^6	0.564	0.430
F-8	3.50×10^5	2.78×10^6	1.06×10^7	0.577	0.531

从表2可看出,8株融合子中,F-4在0~3.5h和3.6~6h期间的比增长率均显著低于亲本,在YPD培养基中长势弱,故将其淘汰。F-7在0~3.5h内的 μ 值大于亲本,但在3.5~6h却大大下降,由于实际生产中设计工艺时一般取2~4h内的 μ 值作为设计参数,因此该融合子仍可继续保存。其余融合子 μ 值均大于双亲,表现为增殖能力强,尤其是F-6,增长速度最快。

2.5.2 菌体利用淀粉能力的测定:酒精酵母不能在淀粉培养基上生长,故无透明圈。假丝酵母和融合子F-1、F-2、F-3、F-5、F-6、F-7、F-8的透明圈指数分别为2.67、4.00、2.00、2.86、3.80、3.17、1.60和3.67。根据水解圈指数的大小,淘汰利用淀粉能力较弱的融合子F-2、F-7。

表3 亲株与融合株乙醇耐受性的测定

Table 3 The determine of ethanol tolerance of parents strain and fusants

Ethanol content	Strains				
	<i>S. cerevisiae</i> 399	F-1	F-5	F-6	F-8
12%	+	+	+	+	+
14%	+	+	+	+	+
16%	+	+	+	+	-
18%	-	+	+	-	-
20%	-	-	+	-	-
22%	-	-	-	-	-

+ : Indicate endurable ; - : Indicate unendurable

2.5.3 融合株乙醇耐受性的测定 :每一种酵母能忍耐的最高酒精浓度,是它在应用上的一个重要特征。F-1、F-5、F-6 的耐受性等于或强于亲株,而 F-8 反而低于亲株,将其淘汰。

2.5.4 融合株产 α -淀粉酶、糖化酶能力的比较 :供体株 *C. tropicalis* 和融合株在固体麸曲培养基中培养使其产酶,抽提出含 α -淀粉酶和糖化酶的粗酶液,分别测其酶活。酶活力的表示是以供体株 *C. tropicalis* 作对比,以相对酶活来表示。

表 4 供体株与融合株 α -淀粉酶、糖化酶能力的比较

Table 4 The activities of α -amylase and saccharogen amylase of the donor parent and fusants

Strains	Activities of α -amylase/%	Activities of saccharogen amylase/%
<i>C. tropicalis</i> 968	100	100
F-1	56.41	52.94
F-5	45.13	82.35
F-6	42.56	23.53

淀粉的快速完全水解需要 α -淀粉酶、糖化酶、脱支酶等的协同作用,因此,要构建能直接发酵淀粉的工程菌,就要求该菌株能够同时产生多种淀粉酶。3 株融合子均获得了热带假丝酵母不同程度的产 α -淀粉酶和糖化酶的能力,这是融合双亲基因组发生交换、重组的结果,也可表明,产 α -淀粉酶和糖化酶能力的高低是由多基因协同控制的。相比起来,F-6 的产酶能力较弱。

通过以上各项生产性能的测定,将最初获得的 8 株融合子层层淘汰、筛选,最后检出 F-1、F-5 两株融合子,它们的各项性能均较好,可应用于酒精发酵。

2.5.5 融合子在酒精发酵中的应用 :由于直接利用生淀粉进行酒精发酵速度较慢,故在 YEPSF 中加入微量糖化酶(100u),再进行融合子的酒精发酵,结果见表 5。

表 5 不同酵母菌株利用淀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 starch

Strains	Ethanol yield(V/V)		Starch utilization ratio	
	/%		/%	
<i>S. cerevisiae</i> 399	1.5		3.2	
F-1	8.8		59.1	
F-5	11.5		76.7	
F-6	6.6		38.2	

3 株融合子在发酵液中的乙醇浓度分别可达

8.8%、11.5%和 6.6%,均显著高于亲本酒精酵母 399。因 F-6 酒精产量较低,故淘汰。F-1 和 F-5 酒精产量高,基本符合工业生产的要求,特别是 F-5,酒精产量最高。用 F-1、F-5 这两个菌株进行酒精发酵,可以大大减少糖化酶用量,简化工艺,提高劳动生产率,具有广阔的应用前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Alfonso P, Isable L C, Tahia B. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion, *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51** (5):995-1003
- [2] ZENG Y (曾云中), ZHANG D N (张冬妮), WU X C (吴雪昌) et al. Construction of Novel *Saccharomyces cerevisiae*, *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1992, **8**(4): 363-370
- [3] Cecilia L, James R. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* for direct conversion of starch and dextrans to ethanol, *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**(1):17-25
- [4] Perberdy J F. Protoplast fusion-a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms, *Enzyme Microb Technol*, 1980, **2**(1):23-29
- [5] GUO X (郭秀君), GUO L Z (郭立忠), YU X (于昕) et al. The construction of yeast fusants and studies on characterization, *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1994, **12**: 254-260, 1994
- [6] Woodring E W. The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors, *Exp Cell Res*, 1978, **112**:395-407
- [7] YUAN Z M (袁志明). The Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* by Using Irreversible Biochemical Inhibitor, *Microbiology*(微生物学通报), 1992, **18**(5):271-275
- [8] Farahnak F, Seki t, Ryu D et al. Construction of Lactose-Assimilating and High-ethanol-producing yeasts by protoplast Fusion, *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**(2):362-367
- [9] FU W (傅维洁). Discussion of specific growth rate and exponential growth phase, *Microbiology*(微生物学通报), 1992, **19**(2):114-115
- [10] SHI Y C (史永昶), JIANG Y M (姜勇明). Comparison of Five Methods for the Assaying of α -Amylase Activity, *Microbiology*(微生物学通报), 1996, **22**(6):371-373
- [11] Tianjin Light-industry University. Analyse of indusry fermentation(工业发酵分析), Light-Industry publishing house, 1980
- [12] ZHANG B R (张博润), WANG Y H (王永红), LIU S F (刘书峰) et al. Protoplast fusion of *Saccharomyces. cerevisiae*, *Microbiology*(微生物学通报), 1986, **13**(2):65-67
- [13] Tamaki H. Genetic properties of abortive products resulting from the protoplast fusion in Yeasts, *Mol Gen Genet*, 1982, **187**:177-179

Construction of Yeast Fusants of Directly Transform Starch into Ethanol

PANG Xiao-Yan¹ WANG Ji-Ying² ZHAO Feng-Sheng¹

¹(College of Science & Technology , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 , China)

²(College of Life Sciences , Lanzhou University , Lanzhou 730000 , China)

Abstract To obtain strains that are able to efficiently produce ethanol directly from starchy material , we have used the protoplast fusion technique to construct hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis*. The isolation of fusants used a selective system by a irreversible biochemical inhibitor-Iodoacetic Acid(ID) , and the fusion frequency was 9.2×10^{-6} . The cell size and DNA content of the fusants were determined. Through testing some productive properties such as specific growth rate , saccharification ability , ethanol tolerance and the activities of α -amylase , saccharogen amylase , we selected two fusants—F-1 and F-5. They were more superior and their ethanol production came up to 8.8% and 11.5% .

Key words *Saccharomyces cerevisiae* , *Candida tropicalis* , protoplast , fusion , alcoholic fermentation

Received : July 19 , 2000

* Corresponding author. Tel 86-21-54743389