

## 耐热酵母与酿酒酵母原生质体融合的研究

方霭祺 李绍兰 陈有为 李萍

(云南省微生物研究所, 昆明)

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 396 是利用甘蔗糖蜜生产酒精的生产菌株, 假丝酵母 (*Candida sp.*) C<sub>6</sub> 是我们从云南温泉底泥中筛选到的一株能在 45℃ 生长良好的耐热酵母, 我们应用原生质体融合技术进行了两菌株属间融合的研究。通过亚硝基胍 (NTG) 诱变得到的营养缺陷型菌株 396 (arg<sup>-</sup>) 和 C<sub>6</sub> (lys<sup>-</sup>), 其融合频率为  $0.91 \times 10^{-5}$ 。从检出的融合子中挑选 6 株进行考核, 其细胞体积平均为亲株的 1.3 倍, DNA 含量平均为亲株的 1.6 倍, 培养特征、形态、大小和生化特征表现不一, 特别是糖类的同化试验。除 F<sub>2</sub>、F<sub>14</sub> 外, 其他 4 株可以排除异核体形成的可能性。比较了在 28℃, 40℃ 和 45℃ 培养条件下出发亲株 396、C<sub>6</sub>、直接亲株 396 (arg<sup>-</sup>) C<sub>6</sub> (lys<sup>-</sup>) 和融合子 F<sub>1</sub>、F<sub>7</sub>、F<sub>12</sub>、F<sub>13</sub> 的生长曲线、基质利用率和乙醇产率等, 得到一株在 40℃ 培养条件下糖的利用率为 94.3%、乙醇产量为 59.7g/L 的属间融合株 F<sub>13</sub>。

**关键词** 耐热酵母; 营养缺陷型; 原生质体融合; 亲株; 融合子

自 1977 年 Ferenczy 等将原生质体融合技术用于酵母以来, 关于酵母菌的种内融合和种间融合有不少报道。1978 年 Provost 等又报道获得了热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 和扣囊复膜孢酵母 (*Saccharomycopsis fibuligera*) 的属间融合子。1984 年品川早苗将酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) N<sub>1</sub>, 一株高产乙醇但不耐热的菌株与耐高温的菌株 TJ<sub>1</sub> 融合得到 AM 12, 可以在 40℃ 高产酒精。

本文对生产酒精的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 396 和能在 45℃ 生长良好的耐热酵母 (*Candida sp.*) C<sub>6</sub> 的属间原生质体融合进行了研究。

### 材料与方 法

#### (一) 菌株

原始出发菌菌株: 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 396 是云南省建水糖厂提供的甘蔗糖蜜酒精生产菌株; 假丝酵母

(*Candida sp.*) C<sub>6</sub> 是我们从云南温泉的底泥中分离到的一株能在 45℃ 生长良好, 并能发酵糖产生乙醇的耐热酵母。融合用直接亲株则是以上两菌株经 NTG 诱变后得到的营养缺陷型菌株 396 (arg<sup>-</sup>) 和 C<sub>6</sub> (lys<sup>-</sup>)。

#### (二) 培养基

完全培养基 (YPD) (%) : 酵母粉 (上海酵母厂) 0.5, 蛋白胨 1, 葡萄糖 2, 固体加琼脂 2; 高渗完全培养基 (YPD) 即 YPD 加 17% 蔗糖; 基本培养基 (YNB) 采用 Wicherham 培养基<sup>[1]</sup>; 融合子检出培养基 (YNBS) 即 YNB 加蔗糖 17%。

酒精发酵用培养基: 甘蔗糖蜜 (云南省建水糖厂提供) 17Bx°, 硫酸铵 0.2%, 磷酸 0.1%, pH 4.5。

#### (三) 试剂

0.2mol/L 磷酸缓冲液 (PB), pH 5.8; 亚硝基胍 (NTG)-PB 诱变剂中 NTG 浓度

本文于 1989 年 7 月 24 日收到。

系云南省应用基础基金资助课题。

1 mg/ml, 使用剂量250 $\mu$ g/ml; 制霉菌素(NY)诱变浓缩剂使用剂量 150 $\mu$ g/ml, 用二甲基甲酸胺溶解NY; 用于耐热酵母  $C_0$  ( $1, s^-$ ) 的预处理剂是 Tris 100mmol/L, DTT(二巯基苏糖醇)5mmol/L, EDTA 5 mmol/L; 用于酿酒酵母396( $arg^-$ )的预处理剂是Tris 100mmol, 巯基乙醇 0.5%; 脱壁酶液是中科院生物物理所提供的蜗牛酶0.5%(1%)加0.7mmol/L 甘露醇溶于磷酸缓冲液(PB)中, 使用前配制并用 G6 细菌漏斗过滤除菌; 助融剂为35%聚乙二醇(PEG MW.6000)-10mmol/L 氯化钙溶液。

#### (四) 方法

采用文献[4]和[5]的方法通过 NTG 诱变出发菌株后, 又采用文献[6]的方法用NY浓缩出营养缺陷型菌株, 最后用 Fincham 等<sup>[7]</sup>的方法进行菌株营养缺陷型的鉴定; 原生质体的制备、再生和融合的方法参考文献[8]和[9]; DNA 的测定参考文献[10]的方法, 用2g重结晶二苯胺加入100ml冰乙酸和10ml 高氯酸, 使用前加入1.6%的乙醛溶液 1 ml, 30 $^{\circ}$ C保温14h, 采用酶解法破壁后提取DNA, 但  $C_0$  有少数细胞壁未破, 异核体的检测参考文献[11]的方法, 乙醇含量的测定采用气相色谱内标标准曲线法, 内标物用甲乙酮; 糖量的测定用3,5-二硝基水杨酸定糖法。

#### (五) 参数的计算

1. 突变率( $a$ ):  $a = (M - M_0) / (N_0 - N)$ , 式中  $M_0$ : 起始突变数, 一般为0,  $M$ : 最后的突变数,  $N_0$ : 起始活细胞数,  $N$ : 最后活细胞数。

2. 原生质体形成率和再生率: 原生质体形成率(%) =  $(A - B) / A \times 100\%$ ; 原生质体再生率(%) =  $(C - B) / (A - B) \times 100\%$ ;  $A$ : 蜗牛酶处理前菌落数(YPD平皿);  $B$ : 蜗牛酶处理后未脱壁细胞形成的

菌落数(YPD平皿);  $C$ : 蜗牛酶处理后未脱壁细胞形成的菌落数加原生质体再生细胞菌落数(YPD平皿)。

3. 原生质体融合频率( $F_f$ ):

$$F_f = \frac{\text{YNB平皿营养互补细胞形成菌落数}}{\text{YPDS平皿再生细胞的菌落数}}$$

4. 细胞体积( $V$ ):

$$V(\mu\text{m}^3) = 4/3 \cdot \pi \cdot a/2 \cdot (b/2)^2, \text{ 式中}$$

$a$ : 长轴( $\mu\text{m}$ );  $b$ : 短轴( $\mu\text{m}$ )。

5. 基质利用率( $E$ ):

$$E(\%) = \frac{\text{消耗的基质}}{\text{原来的基质}} \times 100\%$$

6. 乙醇产率( $Y$ ):

$$Y(\%) = \frac{\text{乙醇产量}}{\text{基质消耗量}} \times 100\%$$

## 结果与讨论

### (一) 营养缺陷型标记菌株的获得

用250 $\mu$ g/ml NTG 诱变1h, 150 $\mu$ g/ml NY 浓缩后检出精氨酸缺陷型菌株 396 ( $arg^-$ )、赖氨酸缺陷型菌株  $C_0$  ( $1, s^-$ ) 和亮氨酸缺陷型菌株  $C_0$  ( $leu^-$ ) (表1)。

396( $arg^-$ )和  $C_0$  ( $1, s^-$ ) 没有检出回复突变株, 而  $C_0$  ( $leu^-$ ) 的回复突变率为  $10^{-4}$ 。从细胞形态上观察396( $arg^-$ )和  $C_0$  ( $1, s^-$ ) 都与原出发菌株相似, 而  $C_0$  ( $leu^-$ ) 不论在 YPD 固体培养基上或液体培养基中均呈簇生的假菌丝型, 不宜用于融合。

### (二) 原生质体的制备和融合

营养缺陷型菌株静止培养 14h, 离心收集菌体, 30 $^{\circ}$ C预处理20min后进行脱壁。由于0.5%和1.0%的蜗牛酶对396( $arg^-$ )的脱壁率分别为78.04%和77.77%(血球计数板计数), 差异不太大, 所以我们采用0.5%蜗牛酶。396( $arg^-$ )的细胞浓度为  $4.05 \times 10^6$  cells/ml, 原生质体形成率为

表 1 用亚硝基胍诱变剂诱变和筛选营养缺陷型突变菌株  
Table 1 Mutation and selection of auxotrophic mutants by NTG

菌株 Strains	细胞数 Number of cells (cells/ml)	NTG		营养缺陷型 Auxotroph
		致死率 Death rate (%)	突变率 Mutation rate (a)	
396	$0.8 \times 10^7$	99.995	$7 \times 10^{-6}$	arg <sup>-</sup>
C <sub>6</sub>	$5.92 \times 10^7$	99.997	$3 \times 10^{-6}$	lys <sup>-</sup> , leu <sup>-</sup>

92.86%，再生率为4.83%。而C<sub>6</sub>(lys<sup>-</sup>)的细胞浓度为  $2.0 \times 10^6$  cells/ml，原生质体形成率为 84.57%，再生率为7.75%。C<sub>6</sub>(lys<sup>-</sup>)的细胞破壁较 396(arg<sup>-</sup>) 困难一些。

营养需求看除了F<sub>7</sub>在 YNB 上有时生长，有时不生长，而在补充了精氨酸的YNB平皿上完全不生长外，其他均为原养型菌株，融合子与原始亲株和直接亲株的生物学特性比较见表2。DNA 含量的比较见表3。

(三) 融合子的生物学特性

随机挑出 6 株融合子进行考核。从其

从表 2 和表 3 可以看出融合子的培养

表 2 不同菌株形态特征和生理生化特征

Table 2 Morphological character, physiological and biochemical character of different strains

特征 Character	原始亲株 Original parents		直接亲株 Immediate parents		融合子 Fusants					
	396	C <sub>6</sub>	396(Arg <sup>-</sup> )	C <sub>6</sub> (lys <sup>-</sup> )	1	2	7	12	13	14
形态 Morphology	Y	P	Y	P	P	YP	P	Y	Y	Y
膜 pellicle	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
产孢 Sporification	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
细胞体积(μm <sup>3</sup> ) Volume of cell	90	68	95	95	128	145	90	153	97	130
同化试验 Assimilation tests										
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Maltose	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Sucrose	+	-	+	w	-	-	+	+	+	-
Raffinose	+	-	w	-	-	-	-	+	+	-
Xylose	-	+	-	+	+	w	+	+	+	w
Ethanol	+	+	-	-	+	+	+	-	-	w
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Y: 酵母型 Yeast-like; P: 假丝酵母型 Pseudomycelial form

特征形态，大小、每个细胞的 DNA 含量和生理生化特征表现不一，特别是糖类同化更是多样，其细胞体积平均为亲株的1.3倍，DNA含量平均为亲株的1.6倍。

对融合子异核体的检查结果(表4)除F<sub>2</sub>和F<sub>14</sub>外，其他4株F<sub>1</sub>、F<sub>7</sub>、F<sub>12</sub>和F<sub>13</sub>可以排除异核形成的可能性。

(四) 融合子的耐热性和乙醇产量

1. 在不同温度条件下亲株和融合子的生长曲线：出发亲株、直接亲株和融合子在 YPD 液体培养中静止培养在 28℃、42℃和45℃, 72h 的生长曲线(图1)表明营养缺陷型菌株的耐热性比出发菌株显著下降，而回到原养型的融合子耐热性虽然

表 3 亲株和融合子的DNA含量  
Table 3 DNA content of the parents and the fusants

菌株 Strains	细胞数量 Number of cells (cells/ml)	DNA ( $\mu\text{G}$ )		融合子与亲株DNA含量之比值 Ratio of DNA content (fusant/parent)	
		总量 Total	每个细胞量 Per cell		
				396(arg <sup>-</sup> )	C <sub>6</sub> (lys <sup>-</sup> )
396(arg <sup>-</sup> )	$0.77 \times 10^9$	11.17	$1.45 \times 10^{-8}$		
C <sub>6</sub> (lys <sup>-</sup> )	$5.48 \times 10^9$	59.18	$1.08 \times 10^{-8}$		
F <sub>1</sub>	$2.48 \times 10^9$	51.09	$2.08 \times 10^{-8}$	1.42	1.91
F <sub>7</sub>	$1.98 \times 10^9$	36.43	$1.84 \times 10^{-8}$	1.26	1.70
F <sub>12</sub>	$3.13 \times 10^9$	78.25	$2.50 \times 10^{-8}$	1.72	2.31
E <sub>13</sub>	$4.30 \times 10^9$	67.94	$1.58 \times 10^{-8}$	1.09	1.46

表 4 融合子异核体的检查  
Table 4 Test of heterokaryon of fusants

培养基 Media	融合子菌落数 Colony total of fusants (colony/plate)					
	1	2	7	12	13	14
YPD	100	100	100	100	80	80
YNB	100	85+9*	100	100	80	72+4*
YNB+arg	100	94	100	100	80	76
YNB+lys	100	89+5*	100	100	80	72+5*
YNB+arg+lys	100	100	100	100	78+2*	78

\* 表示生长缓慢 Slow growth

表 5 亲株和融合子发酵参数的比较  
Table 5 Comparison between the parents and the fusants on the fermentation parameter

菌株 Strain	温度 Temperature(°C)	X (g/L)	P (g/L)	E (%)	Y (%)
C <sub>6</sub>	28	11.5	29.6	75.0	29.3
	40	13.4	30.5	80.2	28.2
	45	7.7	24.8	70.3	26.1
396	28	9.5	59.1	95.2	46.0
	40	7.8	38.4	86.4	32.9
	45	1.0	4.0	15.0	19.8
C <sub>6</sub> (lys <sup>-</sup> )	28	10.0	20.7	60.4	23.7
	40	8.1	29.8	70.5	31.3
	45	7.5	7.5	24.6	22.6
396(arg <sup>-</sup> )	28	6.9	21.2	65.0	24.2
	40	4.5	26.8	70.4	28.2
	45	0.4	0.0	6.4	0.0
F <sub>1</sub>	28	10.8	22.4	45.5	36.5
	40	8.9	21.4	40.0	44.6
	45	3.2	2.7	12.1	16.6
F <sub>7</sub>	28	8.5	24.4	55.2	32.8
	40	8.0	23.5	52.8	33.0
	45	7.3	13.9	20.4	50.6*
F <sub>12</sub>	28	9.0	17.3	36.0	35.6
	40	8.7	32.3	65.1	36.8
	45	2.5	5.9	25.0	17.8
F <sub>13</sub>	28	9.5	40.2	86.4	34.7
	40	8.5	59.7	94.3	46.9
	45	6.5	14.6	38.7	28.0

X(g/L); 生物量 Biomass; P(g/L); 乙醇产量 Ethanol \* 测定误差 Error of estimation

各株不一,但也都比原出发亲株略差。

2. 不同温度条件下基质消耗和乙醇产量的比较: 各类型菌株在28℃、40℃和45℃培养条件下,利用甘蔗糖蜜发酵乙醇的各种参数(表5)表明,营养缺陷型菌株396(arg<sup>-</sup>)在不同温度下,乙醇的产率和

基质的利用都比原出发亲株396低,经过与耐热菌株C<sub>6</sub>(l s<sup>-</sup>)融合后得到的融合子,只有F<sub>13</sub>一株乙醇产率和基质利用率比较理想。在40℃和45℃下培养,乙醇产量均高于原生产菌株396。

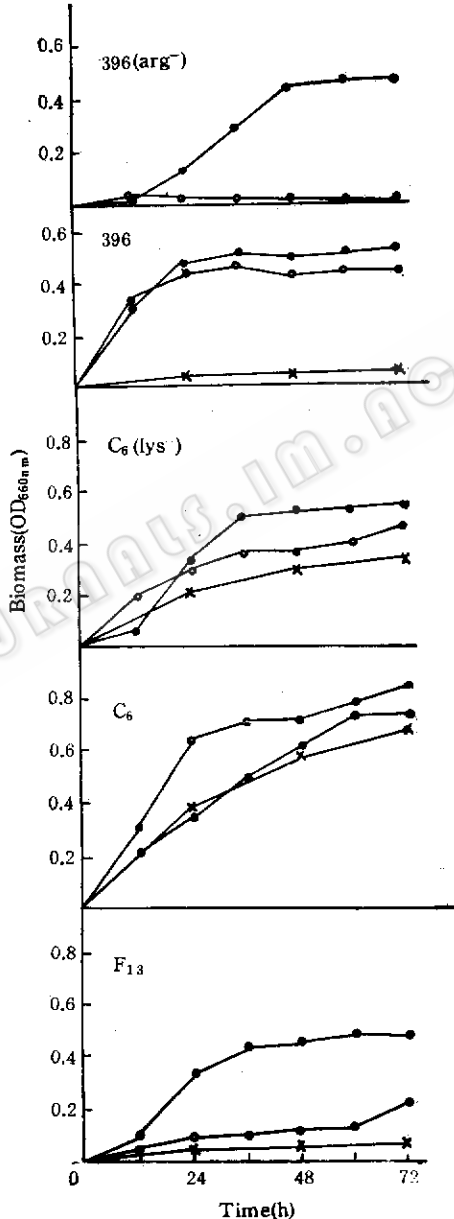


图1 亲株和融合子F<sub>13</sub>在不同温度下培养的生长曲线

Fig.1 Growth curves of the parents and the fusant F<sub>13</sub> under different temperature

● 28℃ ○ 42℃ × 45℃

## 参 考 文 献

- [1] Ferenczy, L. et al., *Nature*, 268:524—525, 1977.  
 [2] Provost, A. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 3(6):309—312, 1978.  
 [3] Lodder, J. et al., In "The yeasts—A Taxonomic Study" edited by North-Holland publishing Co. Amsterdam, p. 82, 1970.  
 [4] Adeleberg, E. A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18:788—795, 1965.  
 [5] 陈中孚等, 遗传, 4(1):36—37, 1982.  
 [6] Snow, R., *Nature*, 211: 206—207, 1966.  
 [7] Fincham, J. R. S. et al., In "Fungal Genetics" Oxford Blackwell Scientific Pub. p. 51, 1971.  
 [8] Tournier, P. et al., *Arch. Microbiol.*, 115(2):143—149, 1977.  
 [9] Sipiczki, M. et al., *Molec. Gen. Genet.*, 151:77—81, 1977.  
 [10] Giles, K. W. et al., *Nature(London)*, 206:93, 1965.  
 [11] 张博润等, 微生物学通报, 13(2):65—67, 1986.  
 [12] Muller, G. L., *Anal. Chem.*, 31:426, 1959.

## STUDY ON PROTOPLAST FUSION BETWEEN A THER- MOTOLERANT YEAST AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Fang Aiqi Li Shaolan Chen You ci Li Ping  
(Yunnan Institute of Microbiology, Kunming)

Protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* 396 and thermotolerant yeast *Candida* sp. C<sub>6</sub> has been studied. 396 is a molasses distillers' yeast, C<sub>6</sub> was isolated from the hot spring in Yunnan and it grows optimistically at 45°C

We obtained the auxotrophic mutants of 396(arg<sup>-</sup>) and C<sub>6</sub>(lys<sup>-</sup>) by mutation with nitrosoguanidine (NTG). The frequency of fusion is 0.91 per 10<sup>5</sup> protoplast. Six fusants were studied. The average volume of cells 1.3 times the size of their parents. The ratio of average DNA content of fusants to their parents is 1.6. Other characteristics i.e. colonial, cell morphology and physiology, special carbon sources assimilation of fusants appeared different. The possibility of heterokaryon formation was excluded except for F<sub>2</sub> and F<sub>14</sub>.

The growth curves, efficiency of sugar utilization and ethanol yield for original parents 396 and C<sub>6</sub>, and Immediate parents 396(arg<sup>-</sup>) and C<sub>6</sub>(lys<sup>-</sup>), fusants F<sub>1</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>12</sub> and F<sub>13</sub> have been compared at 28°C, 40°C, and 45°C. The fusant F<sub>13</sub> with efficiency of utilization 94.3% and the final ethanol concentration 59.7g/L at 40°C has been selected.

## Key words

Thermotolerant yeast; auxotroph; protoplast fusion; parents; fusant