

# 克鲁维酵母种间原生质体融合的研究

孙玉华\* 郭杰炎

(复旦大学微生物学与微生物工程系 上海 200433)

**摘要** 乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis* Y12-1) 和脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis* 8554) 是乳糖酶生产菌株。应用原生质体融合技术进行了两菌株种间融合的研究。通过试验, 原生质体形成及再生的最佳条件为: 对数期的细胞, 2%的蜗牛酶, 30℃酶解30分钟, 原生质体形成率90%以上, 再生率20%左右。原生质体融合由聚乙二醇(PEG)诱导。*K. lactis* Y12-1不能发酵菊糖;*K. fragilis* 8554不能同化D-松三糖和麦芽糖。利用二菌株自身的营养缺陷性质获得融合子。融合子既能发酵菊糖又能同化D-松三糖和麦芽糖; 融合子的DNA含量约为二亲株之和; 融合子的菌落形态与亲株相比有一定差别, 在以乳糖为碳源的培养基中, 融合子的乳糖酶产量提高14—16%; 连续15次传代, 融合子稳定。

**关键词** 克鲁维酵母, 原生质体融合, 乳糖酶

原生质体融合技术近几十年来已被人们广泛利用<sup>[1,2]</sup>。从1977年 Ferenczy *et al.*<sup>[3]</sup>最先报道酵母菌原生质体的诱导融合以来, 关于酵母菌原生质体诱导融合的报道已很多<sup>[4,5]</sup>。

乳糖酶, 即 $\beta$ -D-半乳糖苷酶, 对乳糖水解起催化作用。经乳糖酶水解的牛乳可供乳糖不耐症者饮用<sup>[6]</sup>。食品用的乳糖酶主要来源于克鲁维酵母<sup>[7]</sup>。本实验室已分离到乳糖酶生产菌株<sup>[8]</sup>。为进一步提高乳糖酶产量, 用其中两株乳酸克鲁维酵母 Y12-1 和脆壁克鲁维酵母 8554 进行融合, 获得了融合子。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

来源见文献 [8]。下文分别简称 Y12-1、8554。

### 1.2 培养基

马铃薯培养基, YM 固体培养基, YM 液体培养基, McClary 培养基, 糖发酵基础培养基, 同化碳源基础培养基均同于文献 [9]; YNB 液体培养基: 0.67% YNB (Difco, 没有氨基酸), 2%糖; YNB 选择性再生培养基: YNB 液体培养基加 0.8% 山梨醇和 3% 琼脂; 摇瓶培养基: a. 乳糖 2%, 酵母膏、蛋白胨各 0.2%, 自然 pH; b. 乳糖 2%, 其它 6%, pH5—5.5, 蒸馏水配制。250ml 三角瓶装 50ml。

### 1.3 试剂

\* 现在上海水产大学养殖系, 邮编 200090。  
本文于 1993 年 7 月 19 日收到。

0.2mol/L 磷酸缓冲液 (PB, 内含 0.8mol/L 山梨醇, pH5.8); Zymolase-20T (*Arthrobacter luteus*)-PB (Seikagaku, Koggo Co 2.9 Nihonbashi-honcho Cneloku Tokyo 103 Japan) (复旦大学遗传所李育阳教授赠); 0.1%EDTA-巯基乙醇-PB; 2%蜗牛酶-PB, 内含 0.8mol/L 山梨醇; 聚乙二醇液: 35%聚乙二醇 (MW4 000), 10mmol/L 氯化钙, 0.8mol/L 山梨醇; TE pH7.8 (Tris/EDTA); 0.5mol/L 过氯酸; A、B 液<sup>[10]</sup>; 上述培养基和各种溶液 (酶、TE、A、B 液除外) 均 0.08MPa 灭菌 20 分钟。

## 1.4 方法

1.4.1 单倍体制备: 将生孢培养基上生孢菌体用 Zymolase-PB 酶解, 然后用低渗无菌水稀释以胀破形成的原生质体, 涂平板, 使子囊孢子形成菌落, 测定菌落的 DNA 含量, 挑选 DNA 含量相当于原菌株 1/2 的菌落为单倍体。

1.4.2 原生质体制备与再生: 收集处于对数期的菌体, 经 0.1%EDTA-巯基乙醇-PB 液 30℃ 预处理 30 分钟后用 2%蜗牛酶 30℃ 处理 30 分钟, 收集原生质体, 分别用高渗液和低渗液无菌水稀释, 涂布于 YNB 再生培养基和 YM 固体培养基上, 28℃ 培养 3—5 天, 待长成菌落后计数并与对照组比较计算原生质体形成率及再生率。

形成率 =  $(A - C) / A \times 100\%$ , 再生率 =  $(B - C) / (A - C) \times 100\%$ 。A: 破壁前的菌落数; B: 破壁后高渗液稀释涂布高渗再生培养基的菌落数; C: 破壁后无菌水稀释涂布低渗培养基的菌落数。

1.4.3 原生质体的融合: 两种原生质体等量混合, 在聚乙二醇的作用下 30℃ 保温 30 分钟, 洗涤后稀释, 取定量混于以 D-松三糖为碳源的高渗选择性再生培养基中, 浇在已有一薄层 YNB 固体培养基上, 28℃ 培养, 待长出菌落后测定融合子。

1.4.4 融合子的检出: 取上述平板中菊糖发酵及麦芽糖、D-松三糖同化阳性的菌株, 测定 DNA 含量, 确定融合子。

1.4.5 融合子的分析: 融合子的菌落形态观察采用平板点种法<sup>[9]</sup>, 稳定性的测定采用传代并重复糖发酵及同化试验的方法, 乳糖酶产量的测定采用文献〔8〕的方法。

1.4.6 DNA 含量的测定: 同文献〔10〕。

1.4.7 乳糖酶发酵: 28℃ 往复式摇床 110r/min, 培养 42 小时。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单倍体的制备

单倍体原生质体的融合易于得到稳定的融合子。定量测定两菌株各 20 个菌落的 DNA 含量, Y12-1 的大部分菌落的 DNA 含量为每个细胞  $6.60 \times 10^{-8} \mu\text{g}$  左右, Y12-1-8 和 Y12-1-10 分别为  $3.59$  和  $3.19 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ , 约为正常细胞的 1/2, 故 Y12-1-8、Y12-1-10 菌株为 Y12-1 的单倍体, 同样测得 8554 的单倍体为 8554-2 株。用回接生孢培养基的方法进行了验证。

原生质体形成率为 90% 左右, 用低渗无菌水稀释时酶解破壁的这部分细胞胀破, 内含的子囊孢子被释放出来, 虽然只有部分细胞可形成 2—4 个子囊孢子, 但平板形成的菌落中单倍体细胞肯定占有一定比例。各菌落 DNA 含量测定表明分别有 1/10, 1/20 细胞的 DNA 含量为原始菌株的 1/2, 因此认为这几株细胞是单倍体。

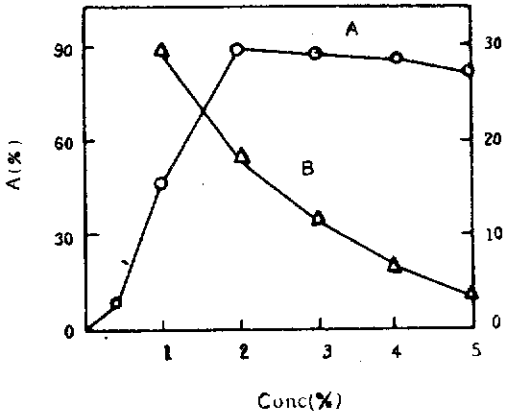


图 1 酶浓度对克鲁维酵母原生质体形成率及再生率的影响

Fig. 1 Effects of the enzyme concentration on the formative and regenerative rate of *Kluyveromyces* protoplasts

Time: 30min, Temperature: 30°C

A: Formative rate of protoplasts (%)

B: Regenerative rate of protoplasts (%)

### 2.2 原生质体的制备与再生

原生质体的制备与再生受酶浓度、酶解时间、酶解温度等因素的影响。图 1 表明不同浓度的酶对原生质体释放速度的影响。当酶浓度较低时，随着酶浓度的增加，原生质体形成率上升，当酶浓度高于 2% 时，原生质体形成率不再上升。图 2 表明酶浓度一定时，随着保温时间的延长，原生质体形成率增加，但 30 分钟后原生质体形成率已达 90%，时间延长，形成率不再明显增加，随着酶浓度和酶解时间的增长，原生质体再生率下降。图 3 表明 30°C 时原生质体形成率最高达 90%。缓冲液的 pH 值及再生培养基的成分都对原生质体形成及再生有一定影响。

综上所述，原生质体制备及再生的最佳条件为：2% 的蜗牛酶在 30°C 酶解 30 分钟，缓冲液的 pH5.8 时，原生质体形成率高达 90% 以上，再生率在 20% 左右。

### 2.3 融合子的鉴定与分析

2.3.1 融合子的选择：本实验采用两亲株本身的内在特性选择融合子，Y12-1 菌株能同

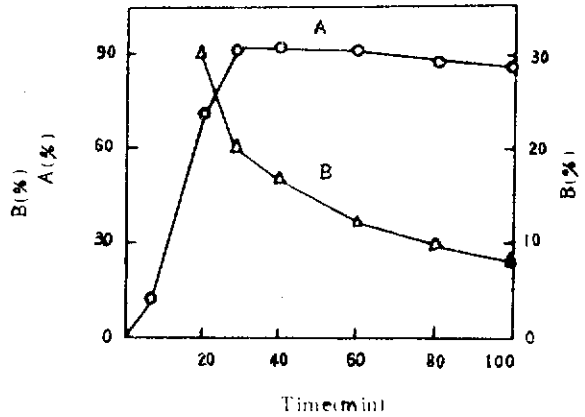


图 2 酶解时间对克鲁维酵母原生质体形成率及再生率的影响

Fig. 2 Effects of time on the formative and regenerative rate of *Kluyveromyces* protoplasts

Temperature: 30°C, Enzyme concentration: 2%

A: Formative rate of protoplasts (%)

B: Regenerative rate of protoplasts (%)

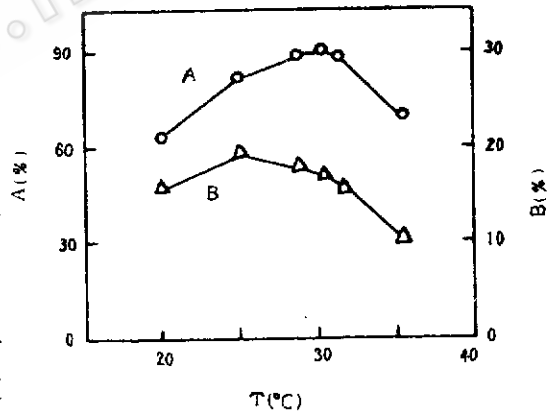


图 3 酶解温度对克鲁维酵母原生质体形成率及再生率的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the formative and regenerative rate of *Kluyveromyces* protoplasts

Time: 30min, Enzyme concentration: 2%

A: Formative rate of protoplasts (%)

B: Regenerative rate of protoplasts (%)

化麦芽糖和 D-松三糖,却不能发酵菊糖,8554 菌株能发酵菊糖却不能同化麦芽糖和 D-松三糖,因此在以 D-松三糖为碳源的选择性再生培养基上长出的菌落应包括 Y12-1 和融合子,挑取大量的菌落作菊糖发酵试验,测出 5 个能发酵菊糖的菌落,按其编号简称为 F87、F101、F 298、F 273、F 365。划线分离单菌落并传代 5 次,再作发酵和同化试验,结果见表 1,只有 F 87、F 101 仍然保持稳定。多次传代结果相同。

2.3.2 融合子 DNA 含量测定:表 2 列出的 F 273、F 298、F 356 的 DNA 含量都大于一亲株单倍体的 DNA 含量但小于二亲株单倍体 DNA 之和,这可能是一亲株的 DNA 片断进入另一亲株的原生质体形成的融合体<sup>(5)</sup>。F 87、F 101 二者的 DNA 含量与二亲本的 DNA 量之和相近,可能是二亲株原生质体融合在一起的结果。且连续传代稳定,因此认为 F 87、F 101 为稳定的融合子。

表 1 5 株菌对麦芽糖、D-松三糖及菊糖的利用

Table 1 The utility of five fusants of maltose, D-melezitose and inulin

Utility	Strain						
	Y12-1	8554	F356	F87	F101	F273	F298
Assimilation of maltose	+	-	+	+	+	±	±
Assimilation of melezitose	+	-	±	+	+	±	+
Fermentation of inulin	-	+	+	+	+	+	+

+ , Positive    - , Negative    ± , Not obvious

表 2 各融合子的 DNA 含量

Table 2 Average NDA content per cell of fusants

Strain	Number of cells ( $\times 10^9$ )	DNA content ( $\mu\text{g}$ )	
		Total ( $\mu\text{g}$ )	DNA content per cell ( $\times 10^{-8} \mu\text{g}$ )
Y12-1-10	1.86	60.6	3.26
8554-2	1.94	114.0	5.88
F87	1.79	164.0	9.16
F101	1.62	149.0	9.20
F273	1.17	81.8	6.99
F298	1.21	58.0	4.79
F356	0.71	48.6	6.86
Y12-1 diploid	1.31	87.4	6.68
8554 diploid	0.67	71.0	11.64

2.3.3 融合子的菌落形态:据图 4 描述融合子与亲本的菌落形态差别见表 3。从图 4 看出,融合子与亲本菌落形态有一定差异。

2.3.4 融合子的乳糖酶产量:实验结果见表 4。表 4 所示,培养基 a 中各菌株的乳糖酶产量都较低,且融合子的乳糖酶产量与亲本相比基本没有差异。但在培养基 b 中,不仅

各菌株的乳糖酶产量都有所提高, 尤为突出的是融合子的乳糖酶产量比亲本提高 14—16%。

表 3 融合子的菌落形态与亲株的比较\*

Table 3 Comparison between colony morphology of fusant and parental strains

Strain	Characteristics of culture
Y12-1	Creamish-white, margin is entire, somewhat shiny, raised in the centre, diameter 2.2cm
8554	Creamish-white shiny, margin is erose, pseudomycelium, diameter 2.6cm
F87	Creamish-white, shiny, thickness in the centre, circumference is radio-striated, diameter 2.5cm
F101	Creamish-white, glistening, dull and radio-striated in the circumference, diameter 2.6cm

\* Medium: YM

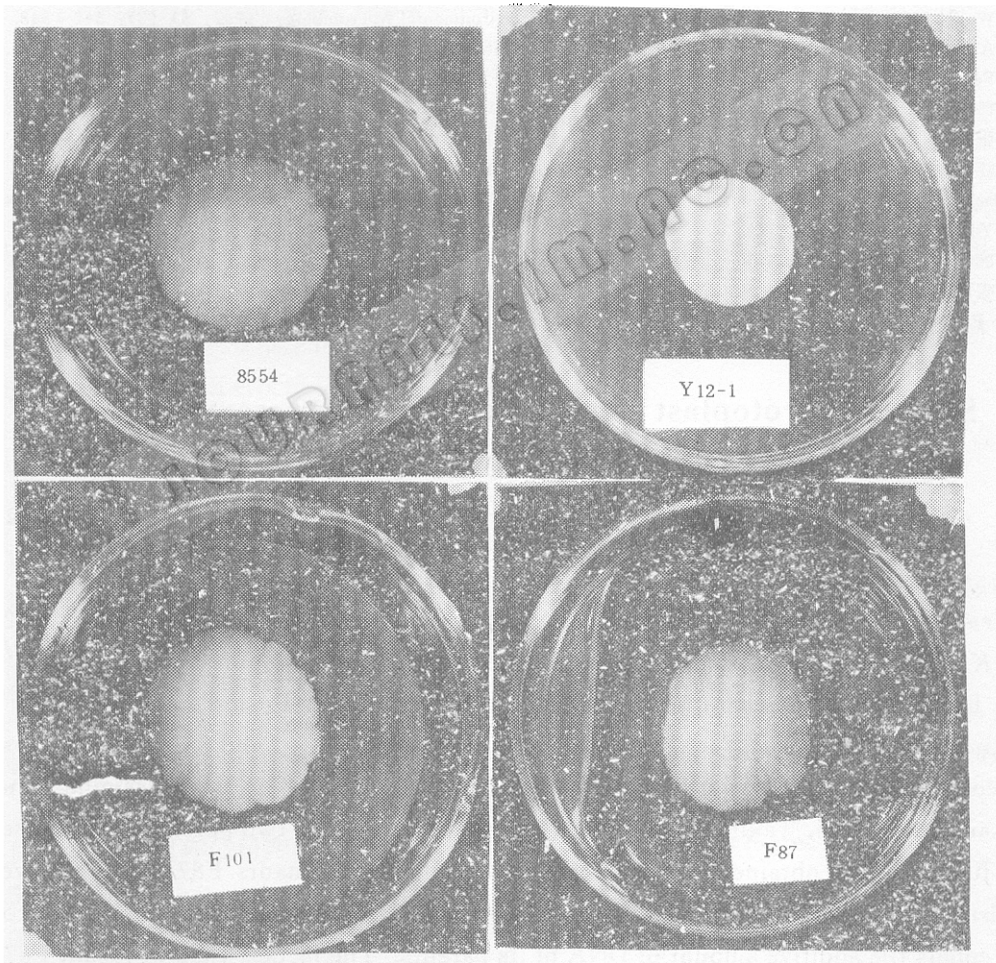


图 4 融合子的亲本菌株的菌落形态的比较

Fig. 4 Comparison between colony morphology of fusant and parental strains (huge colony)

表 4 融合子与亲本的乳糖酶产量比较

Table 4 Comparison between the lactase yields of fusant and parental strains

Strain	The lactase yield in different medium		Comparison between lactase yield in medium a b	
	Medium a	Medium b	Comparison to Y12-1	Comparison to 8554
Y12-1	0.580	0.995	1.000	\
8554	0.584	0.989	\	1.000
F87	0.589	1.130	1.136	1.143
F101	0.589	1.155	1.161	1.168

The lactase yield was indicated by OD<sub>420</sub>.

## 参 考 文 献

- [1] Wei chen, Ohmiya K and Shimizu S. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53 (3): 542-548.
- [2] Alfonso IP, Calderon L, Benitez T. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51 (5): 995-1003.
- [3] Ferenczy L, Maraz A. Nature, 1977, 268 (2): 524-525.
- [4] Pieter V S, Johannes B, Van D P. Journal of Bacteriology, 1977, 130 (2): 946-947.
- [5] 张博润, 黎金科. 微生物学报, 1990, 30 (3): 182-188.
- [6] 江佛湖, 颜纪贤, 李明岳等. 中华消化杂志, 1991, 11 (4): 222-223.
- [7] Burgess K, Shaw M. In: Godfrey T, Roichelt J eds. Industrial Applications Dairy, Industrial Enzymology, New York, Nature Press, 1983, 260-283.
- [8] 郭杰炎, 周士惠. 复旦学报 (自然科学版), 1990, 29 (4): 423-430.
- [9] 张纪忠等. 见: 周德庆主编, 微生物学实验手册, 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 197-228.
- [10] Farahnak F *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51 (2): 362-367.

## Study on Protoplast Fusion Between *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces fragilis*

Sun Yuhua Guo Jieyan

(Microbiology and Microbial Technology Department, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** Result of interspecific protoplasts fusion between *Kluyveromyces lactis* Y12-1 and *K. fragilis* 8554 induced by PEG were reported. The optimum conditions for efficient formation and regeneration of protoplast were observed. Fusion was carried out by treating suspension of protoplast derived from the cells of Y12-1 and 8554 with the fusogen containing 35% PEG. Y12-1 can't ferment inulin, while 8554 can't assimilate maltose and melezitose. Taking advantage of the auxotroph of the two parental strains, several fusants were obtained. Two genetically stable recombinants F87 and F101 were confirmed by the increased amount of chromosomal DNA per cell. A fusant's DNA content equals the additive amount of DNA of its parents. The lactase yield of fusant F87 is 113.6% and 114.3% while the fusant F101 is 116.1% and 116.8% of that of diploid Y12-1 and 8554 respectively.

**Key words** *Kluyveromyces*, protoplast fusion, lactase