

电融合技术选育能利用木糖和纤维二糖生产乙醇的菌株

王岳五 宋林生 周与良

(南开大学生物系, 天津)

以携带营养缺陷型标记的季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliermondii* S 208 Arg⁻) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* 314) 为亲本, 采用 GH-401 型电诱导基因转移/细胞融合仪, 用 3 个强度为 18 kV/cm, 时程为 10 μ s, 间隔为 1 s 的高压电脉冲处理原生质体, 营养互补的融合频率为 3.6×10^{-3} 。在选择和非选择培养基上连续传代 20 余次后, 对得到的稳定的融合子进行分析比较, 结果表明, 它们是两亲株融合后形成的融合体。其中有两株融合子能利用木糖和纤维二糖生产乙醇, F-106 利用 D-木糖 (2%) 和纤维二糖 (2%) 生产乙醇的产量分别为 3.1 g/l 和 1.05 g/l; F-308 分别为 0.2 g/l 和 2.8 g/l。

关键词 D-木糖; 纤维二糖; 乙醇; 酿酒酵母; 季也蒙假丝酵母

电场诱导原生质体融合技术是一项新兴的细胞融合技术。由于该项技术具有空间定向、时间同步、融合频率高, 操作简便快速等优点, 近几年发展迅速, 广泛应用于动物、植物、微生物的细胞融合以及脂质体、质粒等与细胞的融合^[1-6], 取得了大量的研究成果。

本实验采用汪和陆等研制的 GH-401 型电诱导基因转移/细胞融合仪, 用 10% 的 PEG 替代电介质电泳凝聚细胞, 然后在融合小室中, 用高压电脉冲处理原生质体, 进行属间融合, 筛选出能利用木糖和纤维二糖生产乙醇的菌株, 从而为构建可发酵木糖和纤维二糖的新菌株提供了新的实验方法, 对于我国纤维素再生自然资源的开发和利用具有一定的理论意义和应用价值。

材料和方法

(一) 菌种

1. 酿酒酵母 314 (*Saccharomyces cerevisiae* 314); 本实验室保藏菌种, 不

能同化和发酵 D-木糖和纤维二糖。

2. 季也蒙假丝酵母 S₂₀₈ (*Candida guilliermondii* S208 Arg⁻): 是作者从福建采回的土样中分离鉴定得到的。经原生质体紫外线诱变后得到的精氨酸缺陷型。在以葡萄糖为碳源的发酵培养基中不生产乙醇。

(二) 培养基

1. 完全培养基 (YEPD)^[7]。

2. 基本培养基 (YNBX 或 YNBC): 0.67% Difco-Bacto 氮基本培养基^[8] (不含氨基酸), 2% D-木糖或 2% 纤维二糖。

3. 再生基本培养基 (YNBX-R 或 YNBC-R): 在 YNBX 或 YNBC 中加入 1 mol/L 山梨醇。

4. 发酵培养基 (YNBX-F 或 YNBC-F)^[9]: 纤维二糖和 D-木糖的浓度为 2%。

(三) 试剂

1. 原生质体稳定液: 在 0.2 mol/L pH5.8 的磷酸缓冲液中加入 1 mol/L 山梨

本文于 1990 年 12 月 28 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

醇。

2. 加脉冲缓冲液:10%PEG(6000), 1 mol/L山梨醇, 10 mmol/L CaCl_2 , 无离子水配制。

3. 蜗牛酶液:原生质体稳定液中加入1%的蜗牛酶。

(四) 原生质体的制备

离心收集对数生长期的菌体, pH 5.8 PBS洗三次, 0.05 mol/L EDTA, 1%β-巯基乙醇, 28℃预处理 30min, 稳定液洗三次, 加入1%蜗牛酶液, 37℃酶解破壁。酿酒酵母破壁 30min, 季也蒙假丝酵母破壁 10min, 稳定液洗两次, 配成适当浓度的原生质体悬液。

(五) 电诱导原生质体融合

参照王岳五^[10]等的方法, 将两亲本的原生质体悬液按1:1的比例等量混合, 离心, 将沉淀物悬浮于加脉冲缓冲液中。用注射器取0.4ml原生质体悬液从进样孔注入融合小室, 将融合小室的两极与融合仪的高压脉冲输出相接, 调定电脉冲强度为18kV/cm, 脉冲时程为10μs, 脉冲个数为3, 脉冲间隔为1s。启动融合仪, 进行电诱导融合。处理后静置5—10min, 然后用注射器将原生质体悬液吸出, 用原生质体稳定液进行适当稀释后分别与再生基本培养基和再生完全培养基混合倒平板, 28℃培养。

(六) 融合子的检出及其鉴定

1. 融合子的检出:在高渗选择培养基上再生培养一周后, 将长出的融合子在YNBX和YNBC上连续传代10余次后, 对长势好的融合子, 在YEPA平板上随机挑选单菌落, 在YNBX或YNBC平板上复检, 如此反复10余次后, 对稳定的融合子进行分析鉴定。

2. 融合子细胞形态观察及大小测定:将两亲本及融合子在YEPA平板上培

养3天, 涂片, 显微镜下观察细胞形态, 同时用显微测微尺随机测量50个细胞的长轴(a)和短轴(b), 按公式:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \left(\frac{a}{2} \right) \left(\frac{b}{2} \right)^2$$

计算出细胞的体积和轴比(b/a)。

3. 细胞DNA含量的测定:按照本文原生质体的制备方法制备出原生质体, 参照龚启惠^[11]等的方法, 提取细胞全DNA, 用DU-7紫外分光光度计测定出DNA的浓度, 然后对照原生质体悬液的浓度, 计算出每个细胞中DNA含量。

4. 同工酶分析:参照张道海^[12], 邢来君^[13], 徐大雅^[14]等的方法, 在电泳完毕后, 进行酯酶和过氧化物酶染色。

5. 融合子发酵性能的测定:将亲本及融合子活化后接入YNBX-F和YNBC-F中, 28℃振荡培养72h。4℃18,000 rpm离心10min, 取上清液用102G型气相层析仪测定乙醇的含量。

结果和讨论

(一) 脉冲电压强度对融合频率的影响

电场诱导原生质体融合, 影响融合频率的因素很多。本文采用GH-401型电诱导基因转移/细胞融合仪及其改进的电极系统, 用10%的PEG替代双向电泳凝聚细胞, 从而使融合过程不受交变电场频率和强度的影响。融合小室中改进的电极系统每次可处理0.4ml样品, 使得大量的细胞可以参与融合。同时, 该方法还具有操作简便快速, 不易污染等优点。

脉冲电压强度是影响融合频率的重要因素之一。本实验参照王岳五^[10]等的方法, 固定脉冲个数, 脉冲时程和脉冲间隔, 改变脉冲电压强度, 进行电诱导原生

表1 脉冲电压强度对融合频率的影响

Table 1 Effect of electric pulse strength on protoplast fusion frequency**

脉冲电压强度 Strength of pulse(kV/cm)	0	9	12	15	18	21	24
融合子数/ml No. of fusion products/ml	0	2.87×10^3	4.32×10^4	3.64×10^5	3.19×10^6	3.73×10^4	8.96×10^2
融合频率** Fusion frequency	0	3.2×10^{-6}	4.9×10^{-5}	4.1×10^{-4}	3.6×10^{-3}	4.2×10^{-5}	1.0×10^{-6}

* 两亲本原生质体总数为: 8.86×10^8

Total number of parent protoplasts(ml) is 8.86×10^8

** 融合频率 = 融合子数(ml^{-1})/原生质体总数(ml^{-1})

Fusion frequency = $\frac{\text{No. of fusion products}(\text{ml}^{-1})}{\text{Total No. of parent protoplasts}(\text{ml}^{-1})}$

质体融合, 结果如表 1 所示。

对电诱导原生质体融合机理的研究表明, 一定强度的电脉冲可以使细胞膜产生可逆的电穿孔。当高压电脉冲作用在两个并列膜时, 电击会引起膜结构的局部扰乱, 从而在两个并列膜中出现孔洞, 孔洞中的类脂分子随机定向而在膜重新封闭时, 两个细胞连通起来。由于在细胞连通处膜表面的曲率很高, 处于高张力状态, 所以在不需能量的条件下融合体可逐渐变圆, 最后合二为一成为球形。一般情况下, 诱发细胞融合的电强度应为形成孔洞的临界电压强度的1.5—2.0倍^[16]。若脉冲电压太低, 则不能使紧密接触的细胞膜形成孔洞或形成的孔洞较少, 从而影响融合频率。如果脉冲电压强度超过临界击穿电压太多, 则会造成细胞膜的不可逆破裂, 同时, 过高的电压也会在细胞内引起高电压密度, 对细胞器和细胞质有害, 同样也影响到融合频率。从表 1 可以看出, 脉冲电压小于 18kV/cm时, 融合频率随脉冲电压的增加而呈线性增加。脉冲电压高于 18kV/cm时, 融合频率又随脉冲电压的升高而直线下降, 在 18kV/cm 时达到最高。

(二) 融合子的检出及稳定性测定

电诱导处理后的原生质体悬液与高渗

选择性基本培养基混合后倒平板。由于酿酒酵母不能利用其中的 D- 木糖或纤维二糖, 所以其原生质体不可能再生细胞壁而长成菌落。而季也蒙假丝酵母 $S_{2.0}$ 为精氨酸缺陷型, 在高渗选择培养基上也不能生长, 只有两亲本的原生质体发生融合后, 才可能使营养得到互补, 从而在高渗选择培养基上长成菌落。

将在高渗选择性培养基上长出的菌落在 YNBX 和 YNBC 平板上连续传代, 同时不断淘汰长势弱的和发生分离的融合子。将得到的 154 株融合子涂 YEPD 平板, 从 YEPD 平板上随机挑选单菌落, 在 YNBX 和 YNBC 上进行复检, 如此反复十余次, 共得到 127 株稳定的融合子, 其中有 34 株能同时在 YNBX 和 YNBC 上生长, 从中随机挑选 6 株, 分别对其进行细胞形态大小, 遗传, 生理生化等几个方面的分析和鉴定。

(三) 亲本及融合子细胞大小的测定及形态观察

从表 2 可以明显看出, 融合子与亲本在细胞体积和形态上均有明显差异。亲本 $S_{2.0}$ 细胞体积较小, 但接近球形。314 细胞体积较大, 但比较细长。6 株融合子的细胞体积都比 $S_{2.0}$ 大, 但在细胞形态上更趋于 $S_{2.0}$, 其轴比都大于 314。

表2 亲本及融合子细胞的平均大小及DNA含量

Table 2 Mean size and DNA content of cell of parents and fustants

菌株 Strains	平均长轴 Mean major axis(μm)	平均短轴 Mean minor axis(μm)	平均体积 Mean volume (μm ³)	平均轴比 Axis ratio	DNA含量 DNA content (10 ⁻⁶ μg)
S208	4.92	3.81	37.33	0.77	1.13
314	11.29	4.48	118.58	0.48	11.80
F-60	6.25	5.17	87.43	0.83	3.39
F-106	6.61	4.41	67.28	0.67	8.65
F-108	5.49	3.75	40.40	0.68	7.82
F-308	7.64	6.08	147.80	0.80	12.20
F-110	6.67	5.00	87.27	0.75	4.40
F-411	6.29	5.16	87.66	0.82	3.64

(四) 亲本及融合子细胞 DNA 含量

的测定

从表 2 的结果可以看出，各融合子细胞中DNA的含量都比S₂₀₈高，只有F-308的DNA含量接近两亲本DNA含量之和，其余融合子的DNA含量都比314的DNA含量低。这种融合子DNA含量少于两亲本DNA之和的现象在其它研究者的实验中也有报道^[16-18]。这种情况很可能是由于在细胞融合后，DNA发生重组，融合子细胞内的核质比重新进行自我调整，丢失一部分DNA所造成的。

(五) 同功酶分析

结果如图 1，图 2 所示。从图上可以看出，各融合子的同功酶图谱与其亲本中任何一个相比都不完全相同，但却和两亲本具有一定相同的同功酶谱带，这说明融合子和两亲本都不相同，但和两亲本存在

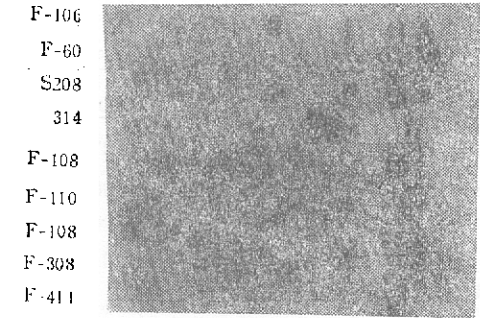


图 1 亲本及融合子酯酶图谱

Fig.1 The esterase profiles of the parents and fustants



图 2 亲本及融合子过氧化物酶图谱

Fig.2 The superoxidase profiles of the parents and fustants

表3 融合子木糖和纤维二糖的发酵能力

Table 3 D-xylose and cellobiose fermentation ability of the fustants

菌株 Strains	乙醇产量 Ethanol production(g/l)	
	YNBX-F	YNBC-F
S208	—	—
F-106	3.1	1.05
F-60	—	0.8
F-108	4.2	—
F-308	2.8	0.2
F-110	—	—
F-411	—	2.6

亲缘关系，它们无疑是两亲本融合后形成的融合子。

(六) 发酵性能测定

从表 3 可以看出，在所得的融合子中，F-106，F-308 既可利用木糖又可利用纤维二糖生产乙醇，因此具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Halfman, H. J. et al., *Arch. Microbiol.*, 134: 1—4, 1983.
[2] Bushl, R. et al., *FEBS Lett.*, 150 (1): 38—42, 1982.
[3] Hashimoto, H. et al., *Appl. Microbiol.*, 21: 336—339, 1985.
[4] Robert, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 6815—6819, 1986.
[5] Forster, E. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 34: 69—72, 1986.
[6] Salham, N. et al., *Protoplasma*, 126: 30—35, 1985.
[7] 倪宝富, 陈士怡: 遗传学报, 12 (2): 93—101, 1985.
[8] Lodder, J.: *The Yeast—A Taxonomic Study*, Published by North-Holland publishing company, pp. 80—83, 1970.
[9] Margaritis, A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 (5): 1039—1041, 1982.
[10] 王岳五等: 真菌学报, 9 (1): 56—63, 1990.
[11] 龚启惠等: 实验生物学报, 21 (1): 75—79, 1982.
[12] 张道海等: 微生物学杂志, 9 (3): 15—21, 1989.
[13] 周与良, 邢来君: 南开大学学报, 1: 104—109, 1988.
[14] 徐大雅等: 真菌学报, 1 (1): 40—47, 1982.
[15] 汪和陆: 生物化学与生物物理进展, 3: 52—58, 1985.
[16] 张博润等: 微生物学通报, 13 (2): 65—67, 1986.
[17] 张博润等: 生物工程学报, 2 (4): 29—34, 1986.
[18] Tamki, H.: M. G. G., 187: 177—179, 1982.

Selection of D-xylose and Cellobiose-fermenting and Ethanol-producing Strains by Electric Field-induced Protoplast Fusion

Wang Yuewu Song Linsheng Zhou Yuliang

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

The protoplast fusion between *Candida guilliermondii* S208 (Arg⁻) and *Saccharomyces cerevisiae* 314 was induced with the model GH-401 Electric Induced Gene Transfer/Cell Fusion System by three pulses (18kV/cm, 10 μ s duration) applied at an interval of 1s. The frequency of appearance of prototrophic hybrids was 3.6×10^{-3} .

Stable fusion products were obtained after continual subculture on selected and unselected medium more than 20 times. The results of comparative studies showed that the fusion products were real hybrids of both parents. Two fustants, F-106 and F-308, could ferment both D-xylose (2%) and cellobiose (2%) to ethanol. The ethanol production of F-106 were 3.1 g/l and 1.05 g/l respectively, F-308 were 0.2 g/l and 2.8 g/l respectively.

Key words

Electric field-induced fusion, D-xylose, cellobiose, ethanol, *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*