

# 嗜鞣管囊酵母产孢及单倍体分离研究

吴仁智<sup>1,2</sup>, 陈东<sup>1,2</sup>, 张水龙<sup>1,2</sup>, 黄日波<sup>1,2</sup>

(1.广西大学生命科学与技术学院,广西 南宁 530004;2.广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室,国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西生物炼制重点实验室,广西 南宁 530007)

**摘要:** 能诱导酿酒酵母产孢的醋酸盐培养基不能诱导管囊酵母 1770、1771 产孢。1770、1771 分别在 YM1、YM2 中均不产孢,前者在 YMA2 平板上当菌落过疏时能产孢,产孢率为 2%,而菌落过密过小时不能产孢,同等条件下后者均不能产孢,管囊酵母是强烈型同宗结合型菌株,子囊孢子在培养过程中易发生二倍体化,尝试添加 Triton X-100 及胰蛋白酶处理,避免发生二倍体化,但作用不明显,分离不到单倍体。

**关键词:** 微生物; 管囊酵母; 产孢; 单倍体; 燃料乙醇

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.2

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)07-0020-03

## Study on Sporulation and Haploid Separation of *Pachysolen tannophilus*

WU Renzhi<sup>1,2</sup>, CHEN Dong<sup>1,2</sup>, ZHANG Shuilong<sup>1,2</sup> and HUANG Ribo<sup>1,2</sup>

(1.College of Life Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004;2.State Key Lab of Non-food Biomass Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Lab of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China)

**Abstract:** The spore-inducing acetate culture medium for *S.Cerevisiae* could not sporulate for *Pachysolen tannophilus* 1770 or 1771. *Pachysolen tannophilus* 1770 or 1771 could not sporulate both in YM1 and in YM2. *Pachysolen tannophilus* 1770 in YMA2 could sporulate as the colony scattered and its diameter was about 2 mm (sporulation not occurred as the colony overcrowded). However, *Pachysolen tannophilus* 1771 never sporulate under the same conditions. *Pachysolen tannophilus* is a strongly homothallic organism and diploidization easily occurs during the culture process. In the experiments, we tried to add Triton X-100 or trypsin in YMA2 plate to avoid diploidization but no satisfactory effects were achieved and we failed in separating haploid successfully.

**Key words:** microbe; *Pachysolen tannophilus*; sporulation; haploid; fuel alcohol

木质纤维素类物质是世界上最为丰富的可再生资源。采用微生物发酵将其转化为燃料乙醇可以缓解人类社会对石油等化石能源的依赖,意义重大。不过,利用木质纤维素生产燃料乙醇尚存在一系列技术瓶颈,利用其中的半纤维素组分的主要水解产物,木糖发酵生产乙醇为技术难题之一。管囊酵母已经被发现能够代谢木糖产酒精<sup>[1]</sup>,被证明其可能在生物质转化为能源方面具有更高的效率,因而具有潜在的工业价值<sup>[2]</sup>。诱导酵母产孢从而获得单倍体是进行酵母遗传学和育种工作极为关键的一步,它既是性状遗传分析所必需,又可为杂交做好亲本的准备<sup>[3]</sup>。管囊酵母产孢及单倍体分离至今国内仍未见报道。为此,本文对管囊酵母产孢及单倍体的分离进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*),编号分别为 1770、1771,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CI-CC)。

### 1.2 试剂

蛋白胨、酵母粉购自 OXOID;麦芽提取物购自北京奥博星;蜗牛酶、Triton X-100、β-巯基乙醇购自上海生工;EGTA、β-葡萄糖苷酶购自 Sigma。

#### 1.2.1 40 mg/mL 蜗牛酶配制

称取蜗牛酶粉末,加入 1×柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH5.99)配制成终浓度为 40 mg/mL 的溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

基金项目:国家自然科学基金项目(No.20666002);广西自然科学基金项目(No.0728001);广西科技攻关项目(No.0537012-G)资助。

收稿日期:2011-03-14

作者简介:吴仁智(1984-),男,广西北海人,在读硕士生,主要从事木质纤维素燃料乙醇等生物质能源方面的研究,E-mail:rzwu0721@126.com。

优先数字出版时间:2011-05-11 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110511.1054.002.html?uid=>

### 1.2.2 2%(w/v)胰蛋白酶配制

参考文献[4],用已灭菌 D-Hank 溶液溶解配制成终浓度为 2%胰蛋白酶(含 0.2%(w/v)EGTA)的溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

## 1.3 培养基

### 1.3.1 YPD 培养基

酵母粉 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%。

### 1.3.2 预生孢培养基

酵母粉 2%,蛋白胨 1%,葡萄糖 2%。

### 1.3.3 含醋酸盐的生孢培养基 Ac

Ac1:葡萄糖 0.1%,KCl 0.18%,NaAc 0.82%,酵母粉 0.25%。

Ac2:葡萄糖 0.1%,KAc 0.98%,酵母粉 0.1%。

Ac3:葡萄糖 0.1%,KAc 0.98%,酵母粉 0.25%。

Ac4:葡萄糖 0.05%,KAc 1%,酵母粉 0.1%。

Ac5:葡萄糖 0.05%,KAc 1.2%,酵母粉 0.1%。

Ac6:葡萄糖 0.05%,KAc 1.5%,酵母粉 0.1%。

Ac7:KAc 1%。

### 1.3.4 含麦芽提取物的培养基 YM

参见文献[2],115℃,20 min 灭菌。

#### 1.3.4.1 pH 自然条件下生孢培养基

生孢培养基 YM1:酵母粉 0.4%,葡萄糖 0.4%,麦芽提取物 1%,pH 自然。

生孢培养基 YMA1:酵母粉 0.4%,葡萄糖 0.4%,麦芽提取物 1%,琼脂 2%,pH 自然。

#### 1.3.4.2 pH 为 5.0 条件下生孢培养基

生孢培养基 YM2:酵母粉 0.4%,葡萄糖 0.4%,麦芽提取物 1%,pH5.0。

生孢培养基 YMA2:酵母粉 0.4%,葡萄糖 0.4%,麦芽提取物 1%,琼脂 2%,pH5.0。

## 1.4 生长曲线

用接种环从斜面挑取一满环管囊酵母菌株接种于 YPD 培养基于 30℃培养,活化 2 次后,种子液按 1%接种量接入到装有 100 mL YPD 的 250 mL 三角瓶中,取样测 OD<sub>600</sub>,YPD 培养基做空白。

## 1.5 子囊孢子的诱导<sup>[5]</sup>

### 1.5.1 生孢培养基培养

经预生孢培养基培养后转入生孢培养基培养,用接种环从斜面挑取一满环管囊酵母菌株接种于 YPD 培养基于 30℃培养,活化 2 次后,接入预生孢培养基,于 28℃、130 r/min 培养 24 h,然后收集菌体,经无菌水洗涤 2 次后接入生孢培养基上,分别于 25℃、28℃、30℃、130 r/min 培养 3~7 d,每天取样于显微镜下观察子囊孢子的形成情况。

对于利用固体培养基的管囊酵母菌,将其稀释后涂板培养观察。

### 1.5.2 直接进行生孢培养基培养

同 1.5.1,但不经过预生孢培养基培养。

## 1.6 子囊裂解和单倍体的分离及鉴定

取适量已形成子囊的菌体,用 10%β-巯基乙醇预处理 1 h,经无菌水洗涤 2 次后加入终浓度为 40 mg/mL 的蜗牛酶液,30℃、180 r/min 条件下水浴摇床酶解 24 h,使子囊壁破裂,然后经 55℃水浴处理 10 min 杀死营养细胞。取 100 μL 酶解液涂布在分别含有 1%、2%、3%、4%、5%、6% Triton X-100 或 2%胰蛋白酶的 YMA2 平板上,30℃培养;另外,酶解 24 h 后,各取 1 mL 酶解液分别加入 500 U 和 1000 U β-葡萄糖苷酸酶<sup>[6]</sup>,按上述方法进行热处理及涂板,30℃培养。除以上涂板培养外,还采用接种环蘸取酶解液进行划线培养,平板同上。镜检平板上长出的所有菌落,产孢者为双倍体,不产孢者为单倍体。

## 1.7 产孢率计算方法

在显微镜下观察孢子,统计一个视野内酵母总数和子囊孢子数,观察 5 个视野,计算产孢率。

产孢率(%)=子囊数量/总细胞数

## 2 结果与分析

### 2.1 管囊酵母生长曲线

管囊酵母 1770、1771 在 YPD 液体培养基中的生长结果见图 1。从图 1 可知,两者生长相差不大,6 h 开始后均进入对数期,30 h 后进入稳定期。因此,选择培养 24 h 后收集菌体进行产孢培养是比较理想的。

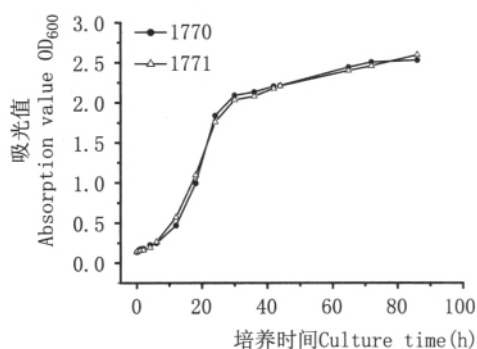


图 1 1770 和 1771 生长曲线(二次试验的平均值和标准差)

### 2.2 醋酸盐诱导产孢子情况

即便是有孢子形成能力的细胞,也需要先在有丰富的氮源和碳源的培养基中进行增殖,即采用预生孢培养基进行预培养,然后再将细胞移到营养贫乏的生孢子培养基上才能形成孢子,孢子生成培养基常用 1%KAc 溶液<sup>[5]</sup>。醋酸盐能诱导酿酒酵母产孢,且醋酸钠与醋酸钾诱

孢子囊效果相当<sup>[7]</sup>。但对于 1770 及 1771, 经过预生孢培养后, 再接入含有醋酸盐的产孢培养基 Ac1、Ac2、Ac3、Ac4、Ac5、Ac6、Ac7 上, 均不能产孢。此外, 不经预生孢培养阶段直接接入以上 7 种培养基亦不能产孢。另外, 以上 7 种培养基添加 2% 琼脂制成固体培养基进行培养, 不管是否进行预培养亦不产孢。在孢子生成过程中, 孢子生成时的培养温度很重要, 菌株生长的适温在 30℃ 左右, 也有在 40℃ 可以生长的菌株, 但孢子生成的适温应在 25~30℃, 超过 35℃ 几乎不可能生成孢子<sup>[8]</sup>。而对于 1770、1771, 利用含醋酸盐的生孢培养基在 25℃、28℃、30℃ 条件下培养都不能诱导产孢。因此, 能诱导酿酒酵母产孢的醋酸盐培养基对管囊酵母 1770、1771 产孢的作用不明显。

### 2.3 麦芽提取物诱导产孢情况

利用含有麦芽提取物的培养基在 30℃ 条件下, 分别进行液体和固体培养。采用液体培养, 在 pH 自然和 pH5.0 条件下均未观察到子囊的出现, 即不能诱导管囊酵母 1770、1771 产孢。固体培养结果见表 1。

表 1 含麦芽提取物固体培养基的产孢情况

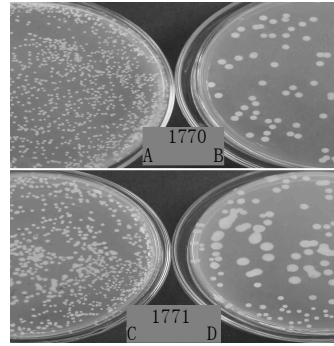
菌株	产孢情况	
	pH 自然(培养基 YMA1)	pH5.0(培养基 YMA2)
1770	-	++
1771	-	-

注: -: 不产孢, ++: 产孢。

在孢子生成过程中, 孢子生成时的 pH 也很重要。管囊酵母 1770、1771 产孢子情况见图 2。1770 在 pH5.0 平板上能产孢子, 但跟菌体密度有一定的关系, 稀释成  $10^{-4}$  涂平板长出的菌落过密, 菌落过小(约 0.5 mm, 图 2,A), 菌落镜检未观察到孢子生成, 而稀释成  $10^{-5}$  涂平板长出的菌落 100~150 个, 直径较大(约 2 mm, 图 2,B), 菌落分布比较松散, 镜检能观察到孢子生成, 孢子的显微镜照片见图 3, 但产孢率不高, 2% 左右。而 1770 在 pH 自然(约为 7)的平板上未观察到孢子的生成。由此可见, 管囊酵母 1770 产孢的适应 pH 约为 5.0, 而酿酒酵母营养生长的最适 pH 在 5 左右, 孢子生产时的最适 pH 在 7、8 左右, 在 pH6 以下, 不仅会使减数分裂及成熟孢子出现的时间延长, 而且孢子生产率也会降低<sup>[5,8]</sup>; 管囊酵母 1771 在 pH5.0 或 pH 自然的平板上均未观察到孢子生成。稀释成  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  涂平板(图 2,C/D), 长出的菌落的表面普遍比 1770 的光亮, 聚集的水分较多, 尤其是  $10^{-5}$  涂板上长出的菌落较为明显。产孢过程中水分也很重要, 这也许是 1771 不能产孢的原因之一。

### 2.4 单倍体分离

1770 在 YMA2 平板上长出的子囊经蜗牛酶或  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶解子囊壁后, 经过 55℃ 处理杀死营养细



注: A:1770(稀释成  $10^{-4}$ ), 不产孢; B:1770(稀释成  $10^{-5}$ ), 产孢; C:1771(稀释成  $10^{-4}$ ), 不产孢; D: 1771(稀释成  $10^{-5}$ ), 不产孢。

图 2 1770、1771 生孢培养基 YMA2 生长照片

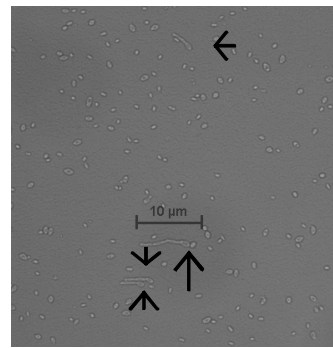


图 3 1770 子囊的显微镜照片( $\times 400$ )

胞, 子囊孢子由于热耐受性强存活下来。由于管囊酵母是强烈的同宗结合型菌株<sup>[2]</sup>, 因此子囊孢子在培养过程中很容易两两结合(a 与 a 或  $\alpha$  与  $\alpha$ )形成结合子, 发生二倍体化<sup>[9]</sup>, 故酶解后子囊孢子不能接到营养细胞生成所需的 YPD 平板上, 而是直接接到生孢培养基 YMA2 平板上生长, 长出的单菌落全部镜检, 结果是均能产孢, 由此可见, 此培养过程发生了二倍体化, 分离不到单倍体。

目前, 有关管囊酵母发生二倍体化的具体过程没有相关的文献报道。究其原因可能是子囊孢子发生二倍体化前, 单孢子之间会在各自细胞表面形成一个信号纽带, 也许是形成蛋白质受体, 从而开启两两结合的通道。为了打破此蛋白质通道, 尝试使用一些方法, 如在 YMA2 中添加表面活性剂 Triton X-100 或胰蛋白酶, 避免发生二倍体化从而分离得到单倍体, 但均能产孢, 即在培养过程发生了二倍体化, 从而分离不到单倍体。

### 3 结论

不管有无预生孢培养过程, 能诱导酿酒酵母产孢的醋酸盐培养基对管囊酵母 1770、1771 产孢的作用不明显; 1770、1771 分别在 YM1、YM2 中均不产孢, 前者在 YMA2 平板上当菌落过疏时能产孢, 但产孢率不高, 2% 左右, 而菌落过密、过小时不能产孢, 同等条件下后者均

(下转第 26 页)

力有明显抑制作用,  $Mg^{2+}$  微弱抑制该酶的活力。

### 2.2.2 透性细胞海藻糖合酶的底物特异性研究

将透性细胞海藻糖合酶分别与5%终浓度的葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、糊精、可溶性淀粉溶液在最适条件下反应6h,用HPLC测定反应混合液中海藻糖的含量,结果见表3。

表3 透性细胞海藻糖合酶的底物特异性 (%)

底物	海藻糖	底物	海藻糖
葡萄糖	0	乳糖	0
果糖	0	糊精	0
麦芽糖	4	可溶性淀粉	0
蔗糖	0		

由表3可知,透性化细胞海藻糖合酶能以麦芽糖为底物,将其转化为海藻糖,而对其他5种糖类均不起作用,说明该酶具有极强的底物特异性。另外,张峻等对亚栖热菌透性化细胞海藻糖合酶的底物特异性进行研究<sup>[5]</sup>指出,该细胞酶对麦芽糖和海藻糖具有部分水解作用,可以催化2种糖转化成葡萄糖。本实验并没有出现类似现象,这可能由于海藻糖合酶的同源性较差,不同菌种的性质不同导致。

### 2.2.3 透性化海藻糖合酶的稳定性

将透性化海藻糖合酶分别置于室温、4℃、-20℃保存。每隔一段时间测定1次酶活。观察酶活变化规律,结果见表4。

表4 透性细胞海藻糖合酶的保存稳定性

保存	酶活力(U/g)				
	0	7 d	14 d	21 d	30 d
室温	140.01	112.46	72.67	52.37	30.64
4℃	140.01	130.72	117.43	105.29	91.18
-20℃	140.01	134.39	121.92	112.26	110.52

将透性化海藻糖合酶保存于-20℃时,30d酶活下降不大,虽然冷冻引起少量酶活的丢失,但酶活力保存率

(上接第22页)

不能产孢;管囊酵母是强烈的同宗结合型菌株,子囊孢子在培养过程中很容易发生二倍体化,尝试添加Triton X-100或胰蛋白酶处理,但作用均不明显,分离不到单倍体。

### 参考文献:

- [1] Schneider H., Wang P. Y., et al. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1981, 3: 89-92.
- [2] James Allen P., Zahab Diana M.. A genetic system for *Pachysolen tannophilus*, a pentosefermenting yeast[J]. *Journal of General Microbiology*, 1982, 128: 2291-2301.

仍可达78.9%,保存7d酶活保存率高达94.1%。当保存于4℃时,30d酶活力保存率仅为65.1%,保存7d,酶活力保存率达93.4%。当置于室温保存时,透性化海藻糖合酶明显不如前两种条件下稳定,保存7d酶活力有显著下降,至30d时酶活已下降很多,酶活保存率仅为21.9%。因此,透性化海藻糖合酶在室温下保存很不稳定,应尽量置于低温下保存,保存时间最好不要超过7d。

### 3 结论

通过对透性细胞海藻糖合酶的酶反应工艺优化并研究了透性细胞海藻糖合酶的性质,得到了酶催化反应的最适pH7.8,最佳转速为180r/min,最适酶反应温度为40℃,最适反应时间为8h。

透性细胞海藻糖合酶的激活离子有 $Na^+$ 、 $K^+$ ,重金属离子对菌体生长和酶活有强抑制性, $Mg^{2+}$ 有利于菌体生长,但对菌体酶活有轻微的抑制。透性细胞海藻糖合酶有极强的底物特异性,只能单一的催化麦芽糖转化为海藻糖。在室温下保存很不稳定,应尽量置于低温下保存,保存时间最好不要超过7d。

### 参考文献:

- [1] 尤新.淀粉糖品生产与应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997:1295-3111.
- [2] 薛璐,马莺.透性化海藻糖合酶特性的研究[J].*食品科学*,2003,24(3):26-29.
- [3] 张峻,陈晓云,齐欣,等.透性化细胞海藻糖合酶的制备及其性质研究[J].*南开大学学报:自然科学版*,2005,38(5):93-96.
- [4] Ying Ma, Lu Xue, DaWen Sun, Characteristics of trehalose synthase from permeabilized *Pseudomonas putida* cells and its application in converting maltose into trehalose[J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 77(2):342-347.
- [5] Yan Zhou, Qipeng Yuan, HuiLing Gao, Production of trehalose by permeabilized *Micrococcus* QS412 cells[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 43: 137-141.
- [3] 李华,刘丽丽,李娟.酿酒酵母产孢培养基的筛选及单倍体的分离[J].*酿酒科技*,2008(6):22-24.
- [4] 金由辛,等译.精编分子生物学实验指南[M].5版.北京:科学出版社,2008:1104.
- [5] 王岳五,译.酵母解剖[M].天津:南开大学出版社,1990:169-180.
- [6] 霍克克,等译.酵母遗传学方法实验指南[M].2版.北京:科学出版社,2009:121.
- [7] 王丽丽,仪宏,侯建革,等.环境诱导酵母产生子囊孢子的营养条件研究[J].*酿酒*,2003,30(6):30-32.
- [8] Schiller M.D., et al. *Molec[J]. Gen. Genet.* 1977, 156: 71-78.
- [9] 丁友昉,陈宁.普通微生物遗传学[M].天津:南开大学出版社,1990:193-211.