

文章编号:1009-038X(2004)06-0100-03

纤维素酶 Celluclast 1.5 L 在酵母菌原生质体制备及再生中的应用

冯小树¹, 何萍¹, 沈国强², 姜文候², 钱俊佳¹

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏无锡 214036)

摘要: 比较了在不同的酶浓度、处理时间、渗透剂和 pH 值下纤维素酶 Celluclast 1.5 L 和蜗牛酶在酵母菌原生质体的形成和再生中的应用。在最佳条件下, 单独使用纤维素酶的原生质体的形成率可达 60% 左右, 原生质体的再生率可达 10% 以上, 与蜗牛酶类似。

关键词: 纤维素酶 Celluclast 1.5 L; 酵母菌; 原生质体; 再生

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

The Use of Enzyme Celluclast 1.5 L in Production and Regeneration of Yeast Protoplast

FENG Xiao-shu¹, HE Ping¹, SHEN Guo-qiang², JIANG Wen-hou², QIAN Jun-jia¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Jiangsu Engineering Research Center for Bioactive Products Processing Technology, Wuxi 214036, China)

Abstract: This paper indicated the use of enzyme Celluclast 1.5 L (a liquid cellulase preparation) in production and regeneration of protoplast of yeast. Under the optimum conditions, the production yield of yeast protoplast is about 60% and the regeneration yield of yeast protoplast is above 10%.

Key words: Celluclast 1.5 L; yeast; protoplast; regeneration

在酵母菌原生质体的形成与再生中使用的工具酶通常是从玛瑙螺胃液中提取的蜗牛酶。这种酶虽然对酵母菌的细胞壁具有良好的水解作用, 但因为它实际上是含有纤维素酶、甘露聚糖酶、葡糖酸酶、几丁质酶、脂酶等 30 多种酶的混合物, 因此难以通过原生质体形成与再生时的动力学研究来了解酵母菌细胞壁的构建方式和过程。纤维素酶 Celluclast 1.5 L 是一种专门作用于 β -葡聚糖的商品化

纤维素分解酶, 而维持酵母菌细胞壁强度的主要物质是位于细胞壁内层的葡聚糖。因此用 Celluclast 1.5 L 酶取代蜗牛酶来实施酵母菌原生质体的制备与再生, 不仅为酵母菌原生质体的制备提供了一种新的方法, 而且可以通过酵母菌原生质体形成与再生的动力学研究来了解酵母菌细胞壁的构建方式和构建过程。作者研究了 Celluclast 1.5 L 酶在酵母菌原生质体形成和再生中的几个主要条件。

收稿日期: 2003-09-22; 修回日期: 2003-12-16.

作者简介: 冯小树(1945-), 男, 江苏无锡人, 副教授.

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母(*S. cerevisia*)1023 由江南大学生物工程学院微生物教研室提供。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 蛋白胨 2 g/dL,牛肉膏 1.0 g/dL,葡萄糖 2 g/dL。如果固体培养,则另加入 2 g/dL 琼脂。自然 pH,0.08 MPa 灭菌 20 min。

1.2.2 高渗再生培养基 在上述固体培养基中加入 0.6 mol/L 蔗糖或按需要加入 0.6 mol/L 其它物质。

1.3 主要试剂

1.3.1 工具酶 蜗牛酶(Snailase):购自上海化学试剂公司;纤维素酶(Celluclast 1.5 L):由广州诺维信公司提供。蜗牛酶(固体)在使用前用磷酸缓冲液配成 1%酶液。Celluclast 1.5 L(液体)在使用前以磷酸缓冲液配成 40%的酶液,均以 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌。

1.3.2 高渗稳定剂 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液中分别加入 0.6 mol/L 的蔗糖、甘露醇、山梨醇、NaCl 而成。

1.3.3 原生质体的制备 将酵母菌从斜面上接入装有 30 mL 完全培养基的 150 mL 三角烧瓶中,在摇床上以 120 r/min、30 $^{\circ}$ C 振荡培养 20 h;吸取此培养菌液 1.5 mL 接入另一个装有 30 mL 完全培养基的 150 mL 三角烧瓶中,继续振荡培养 6 h。吸取 10 mL 菌液于离心管中,1 500 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀以生理盐水洗涤 2 次,最后一次洗涤后定容到 10 mL。吸取 1 mL 菌液以生理盐水做稀释度,以 10^{-7} 、 10^{-8} 倍的菌液在完全固体培养基上涂布培养,计数,得到的数据为每毫升原始菌液中的菌数 A。另吸取 2 mL 菌液置于一个 100 mL 的三角烧瓶中,加入 2 mL 高渗稳定液和 1 mL 酶液后,置于摇床上以 30 $^{\circ}$ C、120 r/min 振荡培养 1 h。从三角烧瓶中吸取 1 mL 混合液于离心管中,1 500 r/min 离心 10 min,用高渗稳定液洗涤 2 次后定容到 2 mL。吸取 0.5 mL 菌液用无菌水稀释,以 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍在高渗再生培养基上涂布培养,计数,余液待用。得到的数据经计算后为每毫升原始菌液中残留的菌数 B。从 A-B 可以得到每毫升菌液中产生的原生质体数。从 (A-B)/A 可得到原生质体的产生率。

1.3.4 原生质体的再生 从待用的离心管中吸 0.5 mL 菌液,以高渗培养液做稀释,以 10^{-6} 、 10^{-7} 、

10^{-8} 倍在高渗再生培养基上涂布培养,计数。得到的数据经计算后,为经再生处理后每毫升原始菌液中的菌数 C。从 C-B 可得到每毫升酶处理后经再生的菌液中的再生原生质体数。所以,从 (C-B)/(A-B) 可得到原生质体的再生率。

2 结 果

2.1 酶液对原生质体形成与再生的影响

采用 3 种不同的酶液组成来研究不同的酶液组成对原生质体形成和再生的影响。第一种是用 1% 的蜗牛酶 1 mL,第二种用 40% 的 Celluclast 1.5 L 1 mL,第三种是上述两种酶的混合液(每种酶各占 0.5 mL)。原始菌液为 3.2×10^8 CFU,酶处理时间为 1 h,缓冲液 pH 值为 5.8,再生培养基中加入 0.6 mol/L 的蔗糖,结果见表 1。

表 1 酶液组成对原生质体形成和再生的影响

Tab. 1 Influence of different enzyme preparations on the production and regeneration of yeast protoplast

酶液种类	原生质体产生率/%	原生质体再生率/%
蜗牛酶	60	11
Celluclast 1.5 L	57	13
混合酶	57	12

从表 1 可见,Celluclast 1.5 L 酶对原生质体的形成与再生的作用与蜗牛酶基本相似,而且再生率还略高于蜗牛酶。因此用 Celluclast 1.5 L 来替代蜗牛酶进行酵母菌原生质体制备和再生的方法是可行的。由于 Celluclast 1.5 L 酶对 β -葡聚糖的专一水解作用,可以进一步通过酵母菌原生质体形成和再生的动力学研究来了解酵母菌细胞壁的构建。

2.2 酶处理时间的影响

研究了酶处理时间对酵母菌原生质体形成和再生的影响,发现酶处理时间的增加,虽然可以增加原生质体的产生率,但原生质体的再生率反而下降了。这可能是随着作用时间的增加,酶对酵母细胞造成的损伤也随之增加的缘故,结果见表 2。

表 2 酶处理时间的影响

Tab. 2 Effect of enzyme treatment time

酶液种类	原生质体产生率/%		原生质体再生率/%	
	1 h	2 h	1 h	2 h
蜗牛酶	60	69	11	4.5
Celluclast 1.5 L	57	63	13	5.9
混合酶	57	63	12	3.5

2.3 渗透稳定剂的影响

分别用 0.6 mol/L 的蔗糖、甘露醇、山梨醇和 NaCl 来配制高渗缓冲液和高渗再生培养基,以研究不同的渗透稳定剂对原生质体形成和再生的影响.原始菌液为 7.0×10^8 CFU,缓冲液 pH 值为 5.8,工具酶为 Celluclast 1.5 L,结果见表 3.

表 3 渗透稳定剂的影响

Tab.3 Effect of osmotic stabilizers

稳定剂 种类	原生质体 产生率/%	原生质体 再生率/%
蔗糖	57.1	12.5
甘露醇	55.7	7.7
山梨醇	42.8	6.7
NaCl	38.5	3.4

从表 3 可见,本实验结果与其他研究者报道的结果“在真菌原生质体形成和再生中有机稳定剂的效果好于无机稳定剂,有机稳定剂中蔗糖的效果最好,甘露醇的效果次之”是一致的.

2.4 pH 值的影响

为研究不同的 pH 值对酵母菌原生质体形成和再生的影响,作者用 0.6 mol/L 的蔗糖配制高渗缓冲液和高渗再生培养基,研究缓冲液 pH 值分别为 5.8,6.8,7.2 时酵母菌原生质体的产生率和再生率,原始菌液为 5.6×10^8 CFU.工具酶用 Celluclast 1.5 L,酶处理时间为 1 h,结果见表 4.

表 4 pH 值的影响

Tab.4 Effect of pH

pH 值	原生质体 产生率/%	原生质体 再生率/%
5.8	57	12.5
6.8	55	10
7.8	25	4

以 Celluclast 1.5 L 为工具酶时,在酸性条件下,原生质体的产生率和形成率均比较高,其中 pH 5.8 和 pH 6.8 原生质体产生率几乎无差异,但是原生质体的再生率还是有一定差异的,pH 值为 5.8 时的再生率明显高于 pH 值为 6.8 时的再生率.在 pH 值超过 7.0 后,无论是原生质体的产生率还是原生质体的再生率均大幅度降低,这种情况与酵母菌喜好在偏酸性的环境中生长是一致的.

3 结 论

纤维素酶 Celluclast 1.5 L 可以作为酵母菌原生质体的形成和再生中使用的工具酶,最佳条件是:以 pH 5.8 的磷酸缓冲液配制的 0.6 mol/L 蔗糖液为高渗稳定剂,质量分数 8% 的酶液处理 1 h,菌龄 6 h,酶处理后在加 0.6 mol/L 蔗糖的完全培养基上再生 24 h.在这样的条件下,原生质体产生率与再生率与用蜗牛酶做工具酶类似.

参考文献:

- [1] Lin L F, Levin R E. Relative effectiveness of yeast cell wall digesting enzymes on *Yarrowia lipolytica* [J]. *Microbios*, 1990, 63 (255): 109—115.
- [2] Byong Kak Kim. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *lentinus lepideus* [J]. *Life Sciences*, 2000, 66(14): 1359—1367.
- [3] 单志萍,姜文候,孟好. 丝状真菌三孢布拉霉原生质体制备及再生条件的研究[J]. *江苏食品与发酵*, 1999, (3): 11—14.
- [4] 王庚,杜连祥. 新月弯孢霉原生质体制备及再生条件的研究[J]. *微生物通报*, 1999, 26(1): 21—23.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 99 页)

参考文献:

- [1] 王立泽,叶家栋,游庄信,等. 食用菌栽培[M]. 合肥:安徽科技出版社,1998.
- [2] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 153—155.
- [3] 唐薇,鲁新成. 美味牛肝菌多糖的生物活性及抗 S-180 肿瘤的效应[J]. *西南师大学报(自然科学版)*, 1999, (4): 478.
- [4] 赵国华,陈宗道,李志孝,等. 活性多糖研究新进展[J]. *食品与发酵*, 2001, 27(7): 45—48.
- [5] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998. 212—213.
- [6] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论[M]. 北京:人民教育出版社,1978. 9—10.
- [7] 贾身茂,张金霞. 食用菌标准汇编(一)[M]. 北京:中国标准出版社,1997. 107—109.
- [8] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所. 食物营养测定法[M]. 北京:人民卫生出版社,1991.
- [9] 何培新. 名特新食用菌 30 种[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [10] 扬革. 担子菌纲 8 种真菌的营养成分[J]. *无锡轻工大学学报*, 2000, 19(2): 174.
- [11] 应建浙,卯晓岚,马启明. 中国药用真菌图鉴[M]. 北京:科学出版社,1987.

(责任编辑:杨 勇)