

酿酒酵母单倍体 1450 原生质体制备的研究

李 华 李 娟

(西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心,陕西 杨凌 712100)

摘 要: 通过研究菌龄、菌体预处理、渗透压稳定剂及含有不同渗稳剂的再生平板等不同因素对酿酒酵母 1450 原生质体制备的影响,确定了其原生质体制备的条件:菌龄为 6 h,预处理剂为 PB+0.1 % EDTANa₂+3 % β-巯基乙醇,采用 1 mol/L 山梨醇为渗透压稳定剂,再生培养基添加 0.5 mol/L 蔗糖为稳定剂,在此条件下,其原生质体形成率达 99.85 % ,再生率达 14.31 % 。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 原生质体制备; 原生质体再生

中图分类号:Q93-3 ;TS261.1 ;Q813

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2009)05-0029-04

Study on the Preparation of Protoplast on Haploid of *Saccharomyces cerevisiae* 1450

LI Hua and LI Juan

(College of Enology, Northwest University of Agriculture and Forestry & Shanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: The effects of different factors including culture time, preculture and osmotic stabilizers on the preparation and the regeneration of haploid of *saccharomyces cerevisiae* 1450 were studied. The optimum technical parameters were summed up as follows: 6 h culture of 1450 cells in logarithmic growth phase, PB+0.1 % EDTANa₂+3 % β-mercaploethanol used in the prestreatment, 0.5 mol/L sucrose used as osmotic stabilizer during the protoplastformation and 1mol/L D-sorbitol sorbitol used in the regeneration. Under the above conditions, the formation rate of the protoplast was 99.85 % and regeneration rate reached up to 14.31 %.

Key words: microbe; *saccharomyces cerevisiae*; protoplast preparation; regeneration

原生质体融合技术于 20 世纪 50 年代开始被研究并逐步应用于微生物育种领域,因其不受亲缘关系、能够克服遗传障碍、实现远源杂交等特殊优势,迅速成为工业微生物遗传育种的重要方法之一^[1~5],尤其在酵母育种工作中,自 1977 年匈牙利人 Sipiczki 与 Ferenczy 首次实现酵母菌的原生质体融合以来,国内外微生物育种工作者广泛利用原生质体融合技术开展种(内)间或属(内)间酵母原生质体融合的研究,而且细胞重组子应用于实际生产中也获得了良好的效果^[6~11]。

原生质体的形成与再生是融合的基础与前提,不同菌株的原生质体制备条件差异较大,不同因素对相同菌株原生质体形成与再生的影响也各不相同,通过改良和优化菌株原生质体制备条件,能够获得较高的原生质体形成率和再生率,是保证融合育种效率的首要条件。目前,有关酿酒酵母原生质体制备的研究很多,但对于有关渗透压稳定剂对其原生质体制备影响的报道尚不多见。本研究为得到一株既能酒精发酵又能苹果酸-乳酸发酵

的新型降酸酵母菌株,在酿酒酵母与酒酒球菌原生质体融合之前,通过研究菌龄、菌体预处理、渗透压稳定剂及含有不同渗稳剂的再生平板等不同因素对优良酿酒酵母原生质体制备的影响,确定其原生质体形成及再生条件,以保障进一步提高融合效率,实现跨界融合筛选高效降酸菌株的研究提供理论与应用基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)1450,轻工业部食品发酵菌种保藏中心提供,其单倍体菌种由西北农林科技大学葡萄酒学院筛选并保藏。

1.2 培养基及配制

完全培养基(YEPD):葡萄糖 2 %,蛋白胨 2 %,酵母粉 1 %,蒸馏水,自然 pH 值,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,配制固体培养基时添加 2 %琼脂。

高渗再生培养基(YEPDS):在完全培养基中分别加

基金项目 陕西省 13115(2007ZDKG-09)资助项目。

收稿日期:2009-03-02

作者简介:李华(1959-),男,重庆梁平人,教授、博士生导师,研究方向:葡萄与葡萄酒研究,E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn。

入 0.8 mol/L KCl、0.5 mol/L 蔗糖和 1 mol/L 山梨醇,自然 pH 值,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.3 主要试剂及配制

磷酸盐缓冲液 (PB): 取 0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液 87.7 mL 与 0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液 13.3 mL 混匀,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,得到 pH 值 6.0 的 PB 缓冲液。

1.3.1 高渗稳定液

①SMM: 蔗糖 0.5 mol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mol/L, 马来酸 0.02 mol/L, 蒸馏水配制, pH 值 6.5, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min;

②PBS: PB 中添加 1 mol/L 山梨醇, pH 6.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min;

③PBK: 用在 PB 中分别添加 0.8 mol/L KCl, 调 pH 6.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.3.2 预处理剂 β -巯基乙醇

于 PB 中添加 0.1% EDTA Na_2 , 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 使用前按需要量加入 3% β -巯基乙醇。

1.3.3 1.5% 蜗牛酶

称取 0.15 g 蜗牛酶悬于 10 mL 高渗稳定液中, 用 0.45 μm 膜过滤除菌, 分装成小份, 于 20 °C 下保存或临用前配制。

1.4 试验方法

1.4.1 菌种活化

取酿酒酵母单倍体 1450 斜面菌种一环, 接种至 10 mL YEPD 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 隔夜培养。以 1% (v/v) 接种量转接至 50 mL YEPD 液体培养基中, 于 28 °C、150 r/min 振荡培养 15 h。取活化菌液 0.5 mL 转接至 50 mL YEPD 液体培养基中, 于 28 °C、150 r/min 条件下培养至菌体对数期。

1.4.2 原生质体的制备^[5,12~15]

取对数期酿酒酵母单倍体 1450 菌悬液 10 mL, 调节细胞数为 $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$, 3500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 PB 缓冲液洗涤 2 次后, 加入预处理剂 0.3% β -巯基乙醇-EDTA-PB 于 37 °C 水浴处理 10~15 min, 离心洗涤后, 加入 1.5% 蜗牛酶液于 32 °C 恒温水浴酶解, 中间间歇性振荡。自酶解 30 min 开始, 定时取样镜检, 当大部分细胞在 40 倍镜下变小, 停止酶解, 5000 r/min 下离心 10 min 洗去酶液, 再用高渗稳定液洗涤 2 次后, 重悬于高渗稳定液中, 以防止原生质体破裂, 4 °C 冰箱保存。

1.4.3 原生质体形成率和再生率的计算

将已制备好的原生质体悬液, 分别以高渗稳定液和无菌水稀释, 涂布于再生培养基上于 28 °C 恒温培养 2~3 d, 待长成菌落后分别计数, 并计算其原生质体的形成率及再生率。

原生质体形成率及再生率计算方法:

$$\text{原生质体形成率} = (A-B)/A \times 100\%$$

$$\text{原生质体再生率} = (C-B)/(A-B) \times 100\%$$

式中: A——酶解前每 1 mL 菌液在低渗平板上长出的菌落数;

B——酶解后每 1 mL 菌液在低渗平板上长出的菌落数;

C——酶解后每 1 mL 菌液在高渗平板上长出的菌落数。

1.4.4 统计学方法

所有试验数据是 3 次重复实验的平均值, 采用 DPS 数据处理系统 Duncan 新复极差法分析。

2 结果与分析

2.1 菌株生长曲线的绘制

取活化 2 次的酵母单倍体 1450 菌悬液 1% 接种于新鲜 YEPD 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 条件下恒温振荡培养, 每隔 2 h 定时取样, 分别在波长为 600 nm 处测定酵母菌悬液的吸光值, 以培养时间为横坐标, 菌液吸光值为纵坐标, 绘制菌体生长曲线(图 1)。

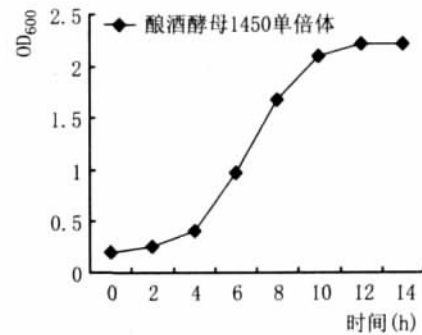


图 1 酿酒酵母单倍体 1450 生长曲线

由图 1 可见, 酵母单倍体 1450 在 YEPD 液体培养基中生长, 培养时间 0~4 h 为菌种的停滞生长期, 于 4 h 开始进入菌体快速生长期并且持续 8 h 的细胞快速生长, 而培养 12 h 之后菌体生长逐渐缓慢而平稳则进入菌体稳定期。

2.2 菌龄对原生质体形成及再生的影响

采用不同生理时期的菌体因其处于不同生理状态下对酶的敏感性差异较大从而影响其原生质体的形成和再生^[16]。根据图 1 酿酒酵母 1450 生长曲线, 分别取停滞期、对数中前期、后期及稳定期菌体进行酶解制备原生质体, 分别计算原生质体形成率和再生率, 结果见图 2。

由图 2 可知, 菌体细胞在不同生长时期, 其原生质体形成率与再生率均不同。菌体细胞随菌龄的增加, 其原生质体形成率与再生率均先增大后减小, 其中处于对数生长中前期的酵母原生质体形成与再生为最优, 其形成率与再生率分别达到 99.72% 和 14.31%, 且明显高于其他时期细胞, 这可能是处于对数生长中前期的菌体生理状态相对一致, 菌体活性高, 对酶的敏感性强, 易于原生质

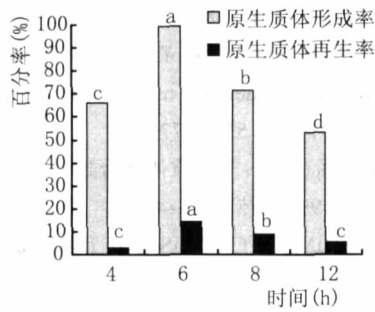


图2 菌龄对原生质体形成与再生的影响

体的形成和再生;而对数后期及稳定期的菌体细胞获得的原生质体形成率与再生率均显著降低,这可能是由于细胞壁相对较厚,对酶解液不敏感,影响原生质体的形成和再生。因此,实验采用对数中前期的细胞,即培养 6 h 的菌种进行原生质体制备,以保证获得活性较高的原生质体。

2.3 预处理剂对原生质体制备的影响

酿酒酵母单倍体 1450 菌体进行酶解前,先用 0.3 % β -巯基乙醇-EDTA Na_2 -PB 进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温预处理 10~15 min,再用 1.5 % 蜗牛酶 32 $^{\circ}\text{C}$ 酶解 40 min,以不采取预处理的菌液做对照直接进行酶解,研究预处理剂在原生质体制备中的作用,结果见表 1。

表1 预处理剂对 1450 原生质体形成和再生的影响

不同处理	原生质体形成率 (%)	原生质体再生率 (%)
预处理剂	99.65 ^a	13.96 ^a
对照	12.87 ^b	0.1 ^b

注:不同字母表示 $p < 0.05$ (下同)。

从表 1 结果可知,酵母细胞经过预处理后,原生质体的形成率和再生率均明显增高,分别达到 99.65 % 和 13.96 %。与未经处理的对照相比,处理后的细胞原生质体形成率和再生率都有极大的提高,尤其对于酵母原生质体的再生,预处理剂的影响非常显著,经过预处理后的菌体获得了较高的再生率,说明在酶解前采用一定浓度 β -巯基乙醇能显著提高酵母原生质体的形成与再生,这是因为预处理剂巯基乙醇使得组成细胞壁结构中的二硫键断裂,促使细胞壁对酶作用较为敏感,同时结合 EDTA- Na_2 螯合剂避免金属离子对酶解的干扰,从而有利于酶解除除细胞壁^[17]。另外,预处理剂对细胞也具有一定损伤作用,因此要选择适宜的预处理时间以保证酶解后的原生质体保持较高活性。

2.4 渗透压稳定剂在原生质体制备中的影响

微生物原生质体制备过程中必须使脱壁后的原生质体处于高渗环境中以维持其稳定性而不致破裂失活,一般认为酵母菌、细菌、放线菌多用甘露糖、蔗糖、山梨醇、木糖等糖溶液系统为稳定剂;丝状真菌多用 MgSO_4 、

KCl、NaCl 等盐溶液为稳定剂^[18]。

本试验选用糖溶液和盐溶液为酶解渗透剂,酶系统分别由含有 1 mol/L 山梨醇、0.5 mol/L 蔗糖及 0.8 mol/L KCl 的磷酸缓冲液配制而得,再生高渗培养基均采用含有相应渗透剂的 YEPD 固体培养基,研究不同稳定剂对酵母单倍体 1450 原生质体形成与再生的影响,结果见图 3。

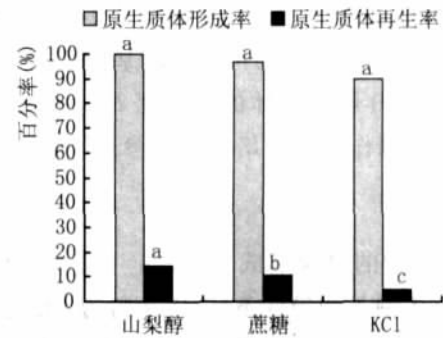


图3 渗透压稳定剂对 1450 原生质体形成和再生的影响

由图 3 可知,3 种不同的渗透剂对于酵母单倍体 1450 原生质体的制备影响均有差异。含有山梨醇、蔗糖和 KCl 不同渗透剂的酶解液对于酵母原生质体的形成率的影响没有显著差异,均达到 90 % 以上,其中以山梨醇为酶解液的渗透剂获得的原生质体形成率最高,达 99.85 %,其次为蔗糖。对于原生质体的再生,这 3 种不同渗透剂对再生的影响有着较为显著的差异,当分别以山梨醇和蔗糖为渗透剂时,菌体再生率均可达到 10 % 以上,且明显优于渗透剂 KCl。实验表明酵母单倍体 1450 原生质体制备中,以山梨醇作为渗透剂所获得的酵母原生质体形成与再生效果最佳,因此选择山梨醇作为酶解渗透压稳定剂。

2.5 培养基中不同渗透压稳定剂对原生质体再生的影响

一般原生质体再生培养基中必须添加无机离子物质或有机物质作为渗透压稳定剂,可提高原生质体的再生率。本实验以山梨醇为酶解渗透剂,而再生培养基分别采用浓度为 0.8 mol/L KCl、0.5 mol/L 蔗糖和 1 mol/L 山梨醇作为渗透压稳定剂,研究比较含有渗透压稳定剂的不同再生培养基对酵母单倍体 1450 原生质体再生效果的影响,结果见表 2。

表2 不同高渗培养基对酿酒酵母 1450 原生质体再生的影响

高渗再生平板	原生质体再生率 (%)
YPD-蔗糖 (0.5 mol/L)	13.75 ^a
YPD-山梨醇 (1 mol/L)	14.31 ^a
YPD-KCl (0.8 mol/L)	12.92 ^a

从表 2 中可以看出,对于山梨醇配制的酶解液所获

得的酵母单倍体 1450 原生质体在含有渗透剂为蔗糖、山梨醇和 KCl 的不同再生培养基上均可以很好的再生,不同渗透剂对其原生质体再生率没有显著差异且均达到 12% 以上,说明再生培养基中不同渗透剂对酵母原生质体的再生影响差异不显著,均可选用盐溶液或糖溶液作为再生培养基的稳定剂。另外在试验中发现 1450 在蔗糖培养基和山梨醇培养基上再生的菌生长速度快且菌落较大而湿润,但在 KCl 培养基上的菌生长速度慢而且菌落较小。考虑到以山梨醇作为再生培养基稳定剂成本较高,因此在酵母 1450 原生质体的再生培养基中选择浓度为 0.5 mol/L 的蔗糖作为再生培养基的渗透压稳定剂。

3 结论

通过一系列的单因素试验,确定了酿酒酵母单倍体 1450 原生质体制备的最佳条件,以菌龄为 6 h 的菌悬液,预处理剂为 PB+0.1% EDTA_{Na}+3% β-巯基乙醇 37℃ 处理,采用 1.5% 蜗牛酶 32℃ 酶解 40 min;制备原生质体时酶解渗透压稳定剂采用 1 mol/L 山梨醇,再生培养基采用 0.5 mol/L 蔗糖做渗透剂的条件下,酵母的 1450 单倍体原生质体形成率达 99.85%,再生率达 14.31%。该实验为下一步与酒球菌原生质体融合筛选葡萄酒降酸酵母菌株奠定了基础。

参考文献:

- [1] NOBUSHIGE NAKAZAWA, KIMIO IWANO. Efficient selection of hybrids by protoplast fusion using drug resistance markers and reporter genes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 98(5): 353-358.
- [2] FERENCZY L, KEVEI F, ZSOLT J. Fusion of fungal protoplasts [J]. Nature, 1974, 248: 793-794.
- [3] Naoto Urano, Rieko Higashikawa, Hiroyuki Hirai. Effect of mitochondria on electrofusion of yeast protoplasts [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23: 107-112.
- [4] RICHARD H, BALT Z. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Technology, 2001, 22(5): 460-471.
- [5] 李华,何家宝.原生质体融合构建葡萄酒降酸酵母的研究[J].微生物学杂志,2006,26(2):5-8.
- [6] Spiczki M., L. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type [J]. Molecular and General Genetics 1977, 151(1): 77-81.
- [7] 周东坡,张宝国.通过灭活原生质体融合选育啤酒酵母新菌株 [J].微生物学报,1993,39(5):454-460.
- [8] MUKAI N, NISHIMORI C, FUJISHIGE I W, et al. Beer brewing using a fusant between a sake yeast and a brewer's yeast [J]. Journal of Bio-science and Bioengineering, 2001, 91(5): 482-486.
- [9] KIDA K, KUME K, MRIMURA S, et al. Repeated batch fermentation process using a thermotolerant flocculation yeast constructed by protoplast fusion [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 74(3): 169-173.
- [10] 侯红漫,吴怡莹.清酒酵母与酿酒酵母原生质体融合的研究 [J].生物技术,1995,5(1):16-19.
- [11] JANDEROVA B, CVRCKOVA F, BENDOVA O. Construction of the dextrin degrading of brewing yeast by protoplast fusion [J]. Journal of Basic Microbiology, 1990, 30: 499-505.
- [12] SEONG HYUN CHOI, CHANG SUNG, MAN JIN OH, et al. Intergeneric Protoplast Fusion in *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 84(2): 158-161.
- [13] SPENCER J F T, LAUD P, SPENCER D M. The use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids involving industrial yeast strains. II. Isolation of hybrids obtained by protoplast fusion [J]. CurrGenet, 1980, 178: 651-654.
- [14] 齐铁桥,赵学慧.克鲁维酵母与酿酒酵母属间原生质体融合构建耐高温酵母菌株 [J].菌物系统,1999,18(1):89-93.
- [15] 王明兹,施巧琴,周晓兰,等.提高酵母菌原生质体制备与再生的方法研究 [J].微生物学杂志,2005,25(3):10-13.
- [16] 余新大,张富国,李建萍.细胞工程 [M].北京:科学普及出版社,1988.42-54.
- [17] DAWE A L, WILLINS D A, MORRIS N R. Increased transformation efficiency of *Aspergillus nidulans* protoplasts in the presence of dithiothreitol [J]. Analytical Biochemistry, 2000, 28: 111-112.
- [18] 罗立新.细胞融合技术与应用 [M].北京:化学工业出版社,2004.70-75.

更正

酿酒科技编辑部老师:

贵刊 2009 年第 3 期 40~42 页刊发我的“高耐性高产酒精酵母的分离和筛选”一文,由于我的疏忽,文中“摘要”和“讨论”部分“成熟醪酒精的体积分数达到 16.2%(实际数据为 12%)”打印时出错误,给读者带来错误信息。敬请贵刊声明,予以更正,并代表作者向读者致歉。

作者 张怀东 2009.04.10