

Genome shuffling 技术选育高耐性酿酒酵母

陆筑凤¹, 李超², 王昌禄³, 龚国利³, 郭坤亮

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 华润雪花啤酒河北有限公司, 河北 廊坊 065201;

3. 天津科技大学食品生物技术实验室, 天津 300457)

摘要: 酿酒酵母对温度和乙醇的耐受性对于茅台酒糟再利用工艺是至关重要的。通过紫外诱变方法和筛选, 获得了 5 个耐性有所提高的正突变株, 以这些菌株作为出发菌, 进行连续融合, 复合筛选融合子, 最终获得了能耐受 46 和 16 %vol 乙醇浓度的酵母菌。耐高温和耐酒精能力分别提高了 7 %和 33 %。经过摇瓶发酵实验后证明, 该菌株在 30 °C 下发酵 4 d 酒精度达 13.87 %vol, 总酯产量为 0.637 g/L, 42 °C 下发酵 4 d 酒精度达 5.30 %vol, 总酯产量为 0.313 g/L。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 耐高温; 耐乙醇; 基因组改组; 特性分析

中图分类号: Q93- 3; TS261.1; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1001- 9286(2008) 07- 0023- 03

Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with High Temperature and Ethanol Tolerance by Genome Shuffling Techniques

LU Zhu-feng¹, LI Chao², WANG Chang-lu³, GONG Guo-li³ and GUO Kun-liang

(1. Life Science College of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Huarun Xuehua Beer Co.Ltd., Langfang, Hebei 065201;

3. Lab of Food Biotech, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Temperature and ethanol tolerance of *saccharomyces cerevisiae* is of vital importance for the reuse of distiller's grains of Maotai Liquor. Through UV mutation and screening, five mutants with improved tolerance were obtained. Then these mutants shuffled with different phenotypes by recursive protoplast fusion. The fusants were screened under YEPD plates. Finally, new strains, capable of growing at up to 46 and 16 %vol ethanol concentration, were obtained. Its temperature and ethanol tolerance increased by 7 % and 33 % respectively. Flask fermentation experiments showed that ethanol yield of this fusant at 30 °C reached at 13.87 %vol and total esters concentration was up to 0.637 g/L and both the two indexes reached at 5.30 %vol and 0.313 g/L respectively at 42 °C.

Key words: microbe; *saccharomyces cerevisiae*; temperature tolerance; ethanol tolerance; genome shuffling; character analysis

茅台酒的生产取决于其独特的工艺、特殊的地理环境以及复杂的微生物体系^[1~2]。其生产注重季节性提升酒糟处理的压力。由于酒糟酸度大, 水分含量在 65 %以上, 可生化性强, 极易腐败, 不便贮存, 若不及时处理, 对环境会造成极大的污染^[3]。另一方面, 白酒糟中含有丰富的营养成分, 若能及时有效利用, 既能解决环境污染的问题, 又能取得显著的经济效益, 是白酒酒糟综合利用的最优选择。茅台集团利用茅台酒酒糟, 开辟了纯种碎沙酱香白酒生产技术与茅台酒高温酿酒工艺结合并对茅台酒酒糟进行综合利用的新路子, 取得了良好的经济效益^[4]。但是, 目前存在的问题是该工艺要求功能菌株具有耐高温(45 °C 以上能生长繁殖)、高产酒精(酒糟再利用的经济价值)和风味物质(良好的酒质要求)的特性。

但目前实际生产中使用的菌株尚不具备上述多项特性, 造成了再利用的产量和质量提高以及工艺简化方面的局限性。

培育新菌种的方法很多, 包括传统筛菌、诱变、基因工程等技术方法。但是在耐高温和耐酒精机理尚不完全明确时, 基因工程方法是不切实际的, 而 Genome shuffling 正是针对机理复杂又不明确的微生物育种的一种理想方法^[5]。因此, 采用了紫外诱变和 Genome shuffling 技术相结合的方法选育符合酒糟利用新工艺的耐性酵母菌。

1 材料与方法

1.1 菌种

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字 2006102 号)。

收稿日期: 2008- 04- 14

作者简介: 陆筑凤(1984-), 女, 浙江嘉兴人, 硕士研究生, 主要研究方向为应用微生物。

通讯作者: 郭坤亮, 贵州茅台酒股份有限公司, Email: guokunliang@sohu.com。

初始菌株为茅台酒厂生产用菌 AS2109 和神舟 5 号飞船搭载的茅台大曲中筛得的 Y14, 均为实验室保藏菌种。

1.2 培养基

1.2.1 发酵培养基(FM): 玉米糖化醪液, 葡萄糖浓度为 15 %, 固形物浓度 17 Brix。

1.2.2 筛菌培养基(SM)^[6]: 灭菌后的麦芽汁中加入一定比例的乙醇配制成的培养基, 用于筛选耐酒精性及兼耐高温菌株; YEPD 培养基用于筛选耐高温菌。

其余融合用的再生培养基和试剂参阅文献[6]。本实验用的蜗牛酶浓度为 2.0 %。

1.3 实验方法

1.3.1 紫外诱变原始菌株

对数生长期的酵母细胞离心后悬浮于无菌水中, 大约 1×10^4 个 /mL, 诱变致死率达到 97 % ~ 99 %。经过数小时的黑暗培养后, 分别涂布到一定乙醇浓度的 SM 和 YEPD 平板, 置于不同温度条件下培养。为了降低平板培养基中的乙醇挥发, 采用透明胶带将培养皿封住, 同时将平板上生长出菌落的时间也作为衡量菌株耐受性的初筛标志。最先生长出菌落的菌株, 在同等条件下, 其耐受性能最好。

凡 SM 固体平板上生长出来的菌株经过相同乙醇浓度的液体 SM 培养基验证耐受性, 并考虑乙醇挥发对实验的影响。循序提高温度和乙醇浓度后, 分离获得正突变菌株, 并转接到发酵培养基进行性能分析, 将这些紫外诱变正突变菌作为 shuffling 育种的出发菌株。

1.3.2 基因组改组参阅文献[7]和[8]

所谓 Genome shuffling 是将各正突变株分别制备原生质体后等量混合, 在 35 %PEG- 6000 的促融下对各正突变株的全基因组进行随机 shuffling, 并通过定向筛选的方法获得了在耐高温或耐乙醇性状上有提高的融合株。然后, 在获得有提高的突变株的基础上, 再将提高的突变株与通过诱变获得的正突变株随机组合, 进一步用同样方法进行 shuffling, 通过筛选以获得耐高温或耐乙醇性状上更进一步提高的融合株。多次重复上述方法后, 筛选获得性能有大幅度提高的菌株。

1.3.3 乙醇和总酯产量测定

发酵液蒸馏后, 用附温比重瓶测得与水的比重后查出发酵液在 20 ℃ 时对应的浓度。蒸馏液先中和再皂化后用酸滴定计算总酯的含量^[9]。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变突变株

微生物次级代谢产物的合成很大程度上受限于产物, 因此, 高产乙醇的菌株必能耐受高浓度的乙醇。采用

温度和乙醇强制压力筛选耐受性酵母, 最低抑制浓度和温度作为酵母的最高耐受浓度(MIC)和温度(MIM), 筛选得到了 5 株性能有所提高的酵母: 2 株耐高温菌、2 株耐乙醇菌、1 株既耐高温又耐乙醇的酵母菌, 但该方法很难实现发酵性能的大幅度提升。将这 5 株正突变株接入发酵培养基发酵 4 d 后, 结果见表 1。

表 1 正突变株和原始菌的性能

酵母	MIC (%vol)	MIM (℃)	总酯产量 (乙酸乙酯计, g/L)	酒精体积分数 (%)
AS2109	11	42	0.415	7.03
Y14	12	43	0.287	8.32
M1-1	10	44	0.475	7.35
M12-1	13	44	0.273	8.87
M2-1	13	42	0.351	8.73
M2-2	13	41	0.340	10.30
M1-3	8	44	0.425	7.05

2.2 融合与筛菌

将突变株随机组合同时制备原生质体后等量混合, 用 35 %的 PEG- 6000 介导进行 shuffling。采用含乙醇浓度为 13 %vol ~ 17 %vol 的 5 个梯度的平板筛选, 培养温度为 44 ~ 48 ℃, 每一浓度的 SM 培养基灭菌后加入乙醇再倒到 6 个平板中, 一次融合筛菌就配制 5 × 6 = 30 个 SM 平板; 其余再配制 YEPD 培养基的 6 个平板。

筛菌方法同紫外诱变筛菌, 即将融合后的菌液涂布到各个平板培养, 第一组: 30 ℃ 下, 1 个 YEPD 平板和 5 个不同乙醇浓度的 SM 平板; 第二组: 44 ℃ 下, 1 个 YEPD 平板和 5 个不同浓度的 SM 平板, 依次类推, 分成 6 组在不同条件下筛选性能提高的菌株。

多次组合 shuffling 后, 筛选到一些耐性提高的菌株, 又将这些菌株与诱变突变株一起随机组合 shuffling, 10 个轮次的融合筛菌后, 得到了 100 株性能有所提高的酵母菌, 表 2 为筛选到的 20 株性能大幅度提高的菌株。

2.3 摇瓶发酵

上述 20 个菌株与原始的出发菌株相比, 在平板上生长无论是耐高温还是耐乙醇浓度都有了较大提高。为了检验所筛选的菌株在发酵过程中产乙醇的能力, 在 30 ℃ 常温和 40 ℃ 高温条件下用摇瓶进行发酵实验, 对比各个菌株发酵液中的最高乙醇浓度。从表 1 已经知道最初的原始菌株在 30 ℃ 摇瓶发酵过程中的最高乙醇浓度仅为 8.32 %vol, 紫外诱变菌株在 30 ℃ 时的最高乙醇浓度仅为 10.30 %vol, 提高了 2 % 左右。而经过 Genome shuffling 技术获得的 20 个性能大幅度提高的菌株在 30 ℃ 摇瓶发酵后发酵液中的最高乙醇浓度又比其出发菌株提高了 2 % ~ 3 %, 相比原始菌株提高了 5 % 左右。最高乙醇浓度达到了 13.87 %vol, 其总酯含量

表 2 多次基因组改组得到的 20 株性能大幅度提高的突变株特性

编号	菌株	亲本菌株	温度 (°C)	乙醇 (%vol)	生长时间 (d)
1	SU1-2-43	Y14, M1-1, M12-1, M2-1	44	14	7
2	SU2-2-49	2109, M1-1, M12-1, M2-1	44	14	6
3	SU2-3-41	2109, M1-1, M12-1, M2-1	45	14	6
4	SU3-2-46	2109, M1-1, M12-1, M2-2, M1-3	44	14	6
5	SU3-3-42	2109, M1-1, M12-1, M2-2, M1-3	45	14	6
6	SU4-3-58	M1-1, M12-1, M2-1, M2-2, M1-3	45	15	7
7	SU4-4-37	M1-1, M12-1, M2-1, M2-2, M1-3	46	13	5
8	SU4-2-45	M1-1, M12-1, M2-1, M2-2, M1-3	44	14	5
9	SU5-1-53	Y14, 2109, M12-1, M2-1, M2-2	30	15	3
10	SU5-3-44	Y14, 2109, M12-1, M2-1, M2-2	45	14	5
11	SU6-2-47	SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1, M2-2	44	14	4
12	SU6-2-50	SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1, M2-2	46	15	6
13	SU7-3-43	M1-1, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1, M2-2	45	14	5
14	SU7-3-51	M1-1, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1, M2-2	45	15	7
15	SU8-1-66	M1-1, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1	30	16	3
16	SU8-2-58	M1-1, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1	44	15	4
17	SU9-3-53	SU8-1-66, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1	45	15	6
18	SU9-4-42	SU8-1-66, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1	46	14	6
19	SU10-4-59	SU8-1-66, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1, M2-2	45	15	5
20	SU10-4-60	SU8-1-66, SU4-4-37, SU5-1-53, M12-1, M2-2	46	16	6

SU10-4-60 在 42 ℃ 时仍能产酒精度达 5.30 %vol, 总酯含量 0.313 g/L。SU10-4-60 菌经过 7 次传代, 冷冻保存 3 个月后再经摇瓶发酵检测后, 其发酵液中最高乙醇浓度为 13.78 %vol 和 13.85 %vol, 表明获得的菌株的遗传性状基本保持稳定。因此, 将 SU10-4-60 作为功能菌株进行更深入的研究和应用。

3 结论

通过 Genome shuffling 的方法可以筛选得到既耐高温又耐乙醇的酵母菌, 选育出高温下能高产乙醇和香味物质的酿酒酵母。从高产乙醇的酵母就必定能耐受较高浓度的乙醇的这一思路, 先筛选耐受乙醇的高温酵母, 在经过摇瓶发酵实验, 筛选获得耐性

高产酵母。该方法是一条选育耐性高产优良酵母的途径。当然, 离最终得到优良酿酒酵母还有一定的距离, 我们将对筛选到的菌株进一步研究和鉴定。

参考文献:

- [1] 熊子书. 中国三大香型白酒的研究(二) 酱香茅台篇[J]. 酿酒科技, 2005, (4): 25-30.
- [2] 熊子书. 贵州茅台酒调查研究的回眸[J]. 酿酒科技, 2000, (4): 26-29.
- [3] 蒋莹, 黄美英. 从酒糟中提取复合氨基酸及微量元素[J]. 食品工业科学, 1991, (6): 14-16.
- [4] 季克良, 郭坤亮, 王和玉, 等. 酿酒酵母工程菌及其应用[P]. 中国专利: 2005100032130.
- [5] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V et al, Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 707-711.
- [6] 杜连祥, 等. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 231-232.
- [7] Gong GL, Sun X, Liu XL et al, Mutation and a high-throughput screening method for improving the production of Epothilones of *Sorangium*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34: 615-623.
- [8] 王灏, 王航, 孟春, 等. 基因组改组技术选育耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 705-708.
- [9] 朱新茹. 白酒中总酯的测定[J]. 安徽科技, 2000, (5): 41.

为 0.637 g/L。但是从图 1 也不难看出, 这 20 株菌种在 30 ℃ 发酵后发酵液中的乙醇浓度差别不是很大, 总酯含量的差别相对较明显, 见图 2。

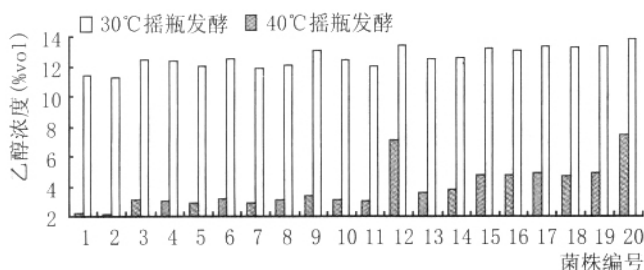


图 1 常温和高温发酵后发酵液中的最高乙醇浓度

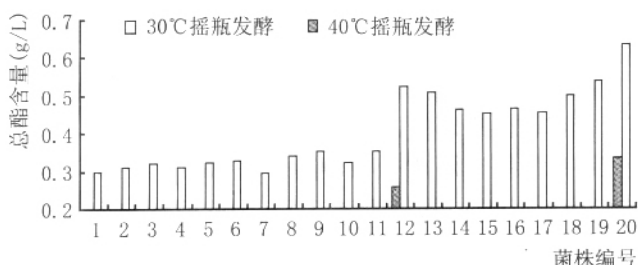


图 2 常温和高温发酵后发酵液中的总酯含量

在 40 ℃ 高温发酵后, 最高乙醇浓度明显不同, 且大部分菌株在高温时产酒精甚低, 只有编号 12 的 SU6-2-50 和编号 20 的 SU10-4-60 在 40 ℃ 下产酒精度超过 7 %vol, 产酯分别为 0.258 g/L 和 0.335 g/L, 其余各菌株产酯均在 0.100 g/L 以下, 不适合高温产酒。其中