

原生质体融合技术及其在酿酒酵母菌株选育中的应用

魏运平,叶俊华,赵光鳌

(江南大学生物工程学院酿酒科学系,江苏 无锡 214036)

摘要: 酵母是发酵工业的灵魂,优质酵母对于其产品的产量、质量、生产效率等方面都有决定性的作用。论述了这些年新兴的酵母育种技术——原生质体融合技术在酿酒酵母菌种选育中的原理、应用和发展方向。

关键词: 原生质体融合; 酿酒酵母; 菌种选育

中图分类号: TS261.1; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2003)01-0087-03

Application of Protoplast Fusion Technology in the Breeding of *Saccharo Sac.Cerevisiae*

WEI Yun-ping, YE Jun-hua and ZHAO Guang-ao

(Department of Brewing Science School of Bio-technology Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036 China)

Abstract Yeast is the soul of brewing industry. The outstanding yeast is of great importance as to its quantity, productive efficiency and so on. This review demonstrates the principle, application and developmental orientation of protoplast fusion technology in the breeding of *Saccharo sac.cerevisiae*.

Key words protoplast fusion technology; *Saccharo Sac.Cerevisiae*; breeding

酵母有发酵工业的灵魂之称,其发酵性能的好坏直接影响发酵产品的质量,同时也决定着发酵工艺流程和运转周期及运转费用。因此,选育优良的酵母菌种在发酵工业中具有重要的意义^[1]。对酿酒酵母的选育始终是酿酒工作者所从事的重要工作之一。好的酿酒酵母能够提高酒的质量和产量,赋予酒良好的风味,能够简化工艺流程,减少设备投资,能够缩短发酵周期,降低运转费用。

传统的对酿酒酵母的选育方法主要有自然分离、连续培养和诱变育种。近年来重组DNA技术,基因工程和原生质体融合技术迅速发展,得到了广泛应用。本文重点对PF(Protoplast Fusion,原生质体融合)技术的原理及其在酿酒酵母选育中的应用做一概述。

1 发展及原理

1.1 PF技术的发展

PF技术起源于20世纪50年代。1958年,日本的Okada发现并证明了灭活的仙台病毒可诱发体内艾氏腹水癌细胞彼此融合,从而开始了细胞融合的探索;1977年,Sipiczki与Ferenczy^[2]首次实现酵母菌的原生质体融合;1978年,第三届国际工业微生物遗传学讨论会上,把原生质体融合作为一种新的基因重组手段提出来,引起全世界的关注;1980年,Zimmermann等报道了用电场诱导细胞融合新技术;1988年张闻迪又报道了激光诱导动物细胞融合。1999年,Gniewosez^[3]等人用电场诱导法获得一嗜杀性酵母菌株,2002年国内孙君社等^[4]利用电场诱导原生质体融合技术对产酒率高的菌株Sbl和产酒率低但耐高温的No.30菌株进行融合,得到45℃时产酒精能力达7.28%的融合子,应用于纤维素的同步糖化发酵。

原生质体融合技术,在酵母菌种优良性能的整合方面越来越显示它特有的优越性^[5]。

1.2 技术特点和原理

原生质体融合技术又称细胞融合技术,是指两种不同的亲株酶法去壁后,得到的原生质体(球),置于高渗溶液中,在一定融合剂的促融作用下使两者相互凝集并发生细胞之间的融合,进而导致基因重组,获得新菌株的育种方法。

与其他育种技术相比,它具有杂交频率较高、受接合型或致育型的限制较小和遗传物质更为完整,并且存在着两株以上亲株同时参与融合形成融合子的可能性等优点^[1],提高菌株产量和品质的潜力较大。

2 技术要点

原生质体融合技术的操作分为3个主要的部分。制备原生质体、原生质体的融合及优良融合子的检出^[6]。

2.1 原生质体的制备与再生

原生质体的制备即去除细胞壁,形成裸露的原生质体。当然前提是细胞应具有我们所需要的某一或某些特定的优良性能,并具有稳定的遗传标记。

原生质体的制备主要采用生物酶法^[6]。不同的菌种应用不同的酶,例如,放线菌和细菌多用溶菌酶,而酵母和霉菌主要用蜗牛酶、Zymolyase或纤维素酶。

原生质体制备前一般需用EDTA或EDTA和 β -巯基乙醇做预处理;制备过程中要注意始终维持适当的渗透压,防止细胞的破裂,并且也有助于酶与底物的结合,还应注意原生质体化率并非越高越好,太高往往会导致再生率的降低。

2.2 原生质体融合

融合的最终目的是性能整合,等量的原生质体加合适的融合方法是原生质体的融合的基本原则。促进细胞融合的方法主要有生物学法(即采用病毒促进融合)、化学融合法和电处理融合法。表

收稿日期 2002-10-14

作者简介:魏运平(1977-),男,山东人,硕士,发表论文数篇。

面活性剂聚乙二醇(PEG)是最常用的融合剂。

2.3 优良融合子的检出

融合子的检出主要依靠原生质体制备前的亲株的选择性遗传标记来进行的。优良融合子的检出方法很多^[1,6],主要有利用营养缺陷型、抗药性、荧光染色等。

在检出的过程中,一般要进行数代的自然分离、选择,以防止异核体的存在。

3 PF法选育优良酵母菌株的方向

3.1 耐高浓度酒精及底物的酵母菌株

在传统的酒精发酵工艺中,所用糖质量浓度一般为0.16~0.25 g/ml,所用的酵母菌只能产生体积分数为6%~12%的乙醇,更高的底物浓度和乙醇浓度对酵母菌生长和发酵会产生抑制作用。选育耐高浓度酒精及底物的酵母,在超浓醪发酵生产高浓度酒精方面具有良好的前景。这种工艺可以节省发酵和蒸馏过程中的能量消耗,提高设备利用率,减少劳动强度和提高酒精产量。

Legmann^[7]将酿酒酵母(不耐高渗)与蜂蜜酵母(*S.mellis*.) (能耐40%以上的葡萄糖)作为亲株进行原生质体融合获得融合子在35%葡萄糖培养基中产乙醇的速度为亲株的3倍和7倍。国内侯红漫等人利用原生质体融合技术将清酒酵母(*Saccharomyces sake* Yabe)与K氏酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* K)融合也获得了耐较高酒精浓度的融合株^[8]。

3.2 构建糖化型的酵母菌株

传统的发酵工艺中,糖化和发酵一般是分别进行的。生产中需将麦芽中的淀粉和糊精水解成可发酵性糖,淀粉和糊精的水解可以通过外加酶法来实现,而通过遗传改良,进行原生质体融合,使啤酒酵母具有水解淀粉和糊精的能力,不仅可以缩短工艺过程,而且可以节约设备和投资,增强了市场竞争能力。

近年来应用原生质体融合技术构建既能糖化又能发酵的酵母菌株已有不少成功的例子^[9-11],其转化淀粉能力可与添加酶进行糖化的方法媲美。如庞小燕等以酒精酵母和热带假丝酵母为亲本,通过单亲灭活原生质体融合技术,获得了既具有糖化酶活性又能高产酒精的稳定的酵母融合株F-1和P-5,两株融合子酒精发酵产量分别达8.8%和11.5%,具有良好的应用前景。此外,通过原生质体融合技术构建能够直接发酵棉子糖、乳糖等多糖的酵母菌株在国外也有报道。

3.3 耐高温酿酒酵母菌株的选育

在地域环境高温,或季节因素,及发酵过程排放热能等很多情况下,普通酵母难以进行正常的乙醇发酵^[8,12],或出酒率下降,或发酵速度减缓,甚至彻底丧失发酵功能,必须配以制冷设备才能维持正常生产,增加了设备投资和运行费用,每年酿酒厂不得不支付大量的冷却设备及耗电的费用。由此可见,高温菌种的选育具有重要的现实意义。

传统的高温菌株的选育主要集中于高温驯化和自然界筛选,但工作量都非常大,而采用原生质体融合技术进行高温菌的选育的研究时有报道^[8,13-14]。如Sedi^[13]等人采用原生质体融合技术将酿酒酵母TJ1与某一Awamori酿造菌株融合得到的融合株在40℃下产酒精12.4%(w/v)且该菌株表现出良好絮凝性。国内另有研究者^[14]通过PEG诱导碘乙酸灭活呼吸缺陷克鲁维酵母(*Kluyveromyces* sp.)原生质体与酿酒酵母(*Saccharomyces Cerevisiae*)原生质体融合,获得45℃发酵产酒率高达8.7%的高温酵母菌株。

3.4 提高酿酒酵母的絮凝性

细胞絮凝性是选育啤酒酵母的一个很重要的指标。良好的絮凝性不仅可使啤酒发酵液澄清速度加快,降低酵母分离的能量消耗,而且可防止酵母细胞因长时间悬浮于发酵液中致使细胞自融,有损啤酒风味。而絮凝性很好的啤酒酵母往往发酵度偏低,如何解决絮凝性和发酵度两者之间的关系一直是酿酒工作者关注的焦点之一。

Javadekar^[15]等人将经过紫外灭活的具有嗜杀特性的酿酒酵母NCIM 3578与具有高度絮凝特性的酿酒酵母NCIM 3528原生质体融合,获得的融合子既具有良好絮凝特性,又具有嗜杀特性。这样在提取工序中容易沉淀分离,减少或避免离心、压滤等工序,可缩短工艺流程,降低生产成本。国内在提高啤酒酵母絮凝性方面的研究也有很多^[16]。

3.5 降解苹果酸的葡萄酒酵母的选育

葡萄酒中过多的有机酸会使葡萄酒酸涩,酒味粗硬、品质下降。尤其是葡萄酒中的苹果酸酸味尖刻,且含量较高。目前,生产上多采用苹果酸-乳酸发酵进行降酸^[17],在发酵后期添加或利用葡萄酒中本身的乳酸细菌使葡萄酒中的苹果酸转变成乳酸和CO₂,从而降低酸度,但往往也使葡萄酒的新鲜果香味受到影响,并且不易控制。若污染了乳酸腐败菌,对酒质有毁灭性的影响。选育降解苹果酸能力强的葡萄酒酵母,成为了酿酒师们研究的方向。

高年发等^[18]采用赖氨酸缺陷型酿酒酵母原生质与肌醇缺陷型粟酒裂殖酵母原生质体融合,结果表明,融合子具有降解苹果酸能力和葡萄酒发酵性能好的双亲优良特性。黑龙江的高玉容用原生质体融合技术构建降酸葡萄酒酵母也获得了成功^[19]。

此外,在嗜杀性酵母菌株的选育^[3,20],产生合成酶的酵母菌株、双乙酰还原能力强的酵母等的选育中,原生质体融合技术也显示了其优越性。

4 PF技术在酿酒工业中的应用上存在的主要问题和前景

4.1 PF技术的前景

相对于常用的诱变育种,PF技术用于微生物育种的目性强,成功的几率较大。单亲灭活原生质体融合法^[11,21]更大提高了筛选的效率;此外,有研究显示,融合子若有两个位点缺陷应为2个亲株融合的产物,如果融合子是原养型的,则为4个亲株同时融合而成,这对优良性能的整合势必达到空前的水平。由于它所具有的一系列特点,原生质体融合技术越来越为国内外酵母选育专家和其他微生物育种学者广泛研究和应用。

4.2 存在的主要问题

4.2.1 融合子用作生产,常发生分离回复和单核菌株单链突变的分离回复的现象,导致其性能的退化。

4.2.2 单亲灭活原生质体可显著缩短融合工序和时间,提高筛选效率,但融合的频率明显低于两亲株原生质体全活的情况。

4.2.3 现行的酿酒酵母,某些方面的性能已趋于完善,通过原生质体融合技术实现其他优良性能的整合,势必以原有的部分优良性能为代价。

参考文献:

- [1] 无锡轻工大学. 微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [2] Spiczki M., L. Ferenczy. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type[J]. *Molecular & General Genetics*. 1977, 151 (1) 77-81.
- [3] 杜金华, 张开利, 张锦丽, 等. 嗜杀苹果酒酵母的构建[J]. 食品与发酵工业, 2001, 28 (2) 20-23.

[4] 孙君社,李雪,李军席.原生质体融合构建耐高温酵母菌株[J].食品与发酵工业,2002,28(5) :1-5.

[5] JF Peberdy, Developments in protoplast fusion in fungi[J]. Microbiol Sci,1987, 4(4) :108-114.

[6] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京 :中国轻工业出版社,1994.466-473.

[7] Legmann, R. and Margalith, P., Intracellular and extracellular ethanol[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1986, 23(5) :198-200.

[8] 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.

[9] Alfonso P. Isable L.C. Tahia B. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion[J]. Appl Environ Microbiol, 1986,51(5) :995-1003.

[10] 刘长祥.采用原生质体融合法选育优良啤酒酵母[J].山东食品发酵, 2001,(2) 20-22.

[11] 庞小燕,王吉瑛,赵凤生,等.构建直接发酵淀粉产生酒精的酵母融合菌株的研究[J]. 生物工程学报, 2001,17(2) :165-169.

[12] Anderson P.J., Meneil K., Watson K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperature above 40 °C by *kluveromyces marxianus* Var. *marxianus* isolated from sugar mills[J]. Appl Environ Microbiol, 1986,51(6) :1314-1320.

[13] Seki T.S. Mykga S.,Genetic construction of yeast [*Saccharomyces cerevisiae*] strains for high ethanol production[J]. Biotechnol. Let.. 1983,5(5) :351-356.

[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] VS Javadekar, H SivaRaman, and DV Gokhale. Industrial yeast strain improvement : construction of a highly flocculent yeast with akiller character by protoplast fusion[J].J. Ind Microbiol,1995, 15(2) :94-102.

[16] 陈海昌,刘波,张岭花,等.原生质体融合技术提高啤酒酵母凝聚性的研究[J].微生物通报,1997,(3) :159-161.

[17] Roger B. Boulton Vernon L. Singleton Linda F. Bisson Ralph E. Kunkee. Principles and Practices of Winemaking[M]. Gaithersburg, Maryland U.S.A, PUBLISHERS,INC., 1997.238-263.

[18] 高年发,王淑豪,李小刚,等.酿酒酵母与栗酒裂殖酵母属间原生质体融合选育降解苹果酸强的葡萄酒酵母[J]. 生物工程学报, 2000, 16(6) :71-72.

[19] 高玉荣.原生质体融合葡萄酒酵母用于葡萄酒降酸[J]. 酿酒科技, 2001,(3) :59-60.

[20] Gniewosz, Malgorzata, A. Raczynska-cabaj. Modification of wine yeasts from *Saccharomyces cerevisiae* species by electrofusion of protoplasts[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences,1996, 8(3) :17-25.

[21] Wooding E.W. The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors[J]. Exp Cell Res, 1978,112(4) :395-407.

+++++

中国轻工业出版社图书邮购目录

书 名	定 价 (元/册)	邮 费 (元/册)	书 名	定 价 (元/册)	邮 费 (元/册)
酒精工业手册	30.00	5.00	葡萄酒工业手册	48.00	8.00
酒精与蒸馏工艺学	55.00	10.00	*白兰地工艺学	20.00	4.00
酒精工艺学 (中专教材)	18.00	3.00	*新版配制酒配方	20.00	4.00
酒精蒸馏技术 (第二版)	56.00	10.00	果酒工艺学 (中专教材)	20.00	4.00
*生料酿酒技术	36.00	6.00	特种啤酒酿造技术	24.00	4.00
*玉米酒精生产新技术	50.00	10.00	啤酒工业手册	98.00	12.00
白酒生产技术全书	120.00	18.00	啤酒生产问答 (修订版)	32.00	6.00
固态法白酒生产技术	12.00	2.00	啤酒生产工艺 (技工教材)	48.00	10.00
白酒生产指南	32.00	5.00	啤酒工艺学 (中专教材)	36.00	7.00
白酒工人培训教程	55.00	10.00	黄酒工艺学 (中专教材)	18.00	3.00
低度白酒生产技术	30.00	6.00	黄酒生产工艺 (第二版)	36.00	7.00
白酒勾兑技术问答	16.00	3.00	*药酒生产实用技术	28.00	5.00
小曲白酒生产指南	22.00	4.00	药酒配方 800 例	15.00	3.00
白酒工艺学 (中专教材)	15.00	3.00	酶制剂应用手册	28.00	5.00
白酒生产问答	40.00	6.00	酶制剂应用技术	20.00	4.00
酿造酒工艺学 (第二版)	50.00	10.00	新编调酒师手册	36.00	7.00
*英汉意法葡萄酒词典	45.00	7.00	调酒师教程	40.00	6.00
*葡萄酒酿造学—原理及应用 (引进版)	88.00	14.00	工业微生物实验技术手册	30.00	6.00
*国际葡萄酒药典——葡萄酒辅料标准	28.00	5.00	英汉发酵工业词汇	30.00	6.00
*葡萄酒品尝法	20.00	4.00	*发酵食品微生物学 (引进版)	85.00	12.00
葡萄酒酿造与欣赏	16.00	3.00	生物工程设备	50.00	8.00

(1) 邮购办法:
收款地址: 北京东长安街 6 号
中国轻工业出版社·发行部
收款人: 读者服务部
邮政编码: 100740
联系电话: 010-65241695
传真: 010-65129020
(2) 字迹务必清楚, 以免误投。在汇款单的“附言”栏内注明所购书名和册数。
(3) 有*号为近期出版的新书。