

# 原生质体融合选育乳清发酵生产燃料乙醇的酵母菌种

王瑞生,肖冬光,郭学武,张翠英,马文强

(工业微生物教育部重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

**摘要:** 以酿酒酵母 AY-5 和克鲁维酵母 TY-13 为出发菌株进行原生质体融合选育乳清发酵优良菌种。通过对原生质体融合条件的优化获得 152 株初筛菌株,经麦芽糖和乳糖杜氏管试验复筛得 4 株融合子。对 4 株融合子进行乳清发酵实验,从中选出 1 株发酵优良的菌株 R-1,与亲本比较,发酵速度明显提高。

**关键词:** 微生物; 乳清; 燃料乙醇; 原生质体融合

中图分类号: TQ93-3; TQ813; TS262.2

文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)11-0028-03

## A Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Efficient Conversion of Lactose in Cheese Whey into Ethanol

WANG Rui-sheng, XIAO Dong-guang, GUO Xue-wu, ZHANG Cui-ying and MA Wen-qiang

(Key Lab of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Intergeneric protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* AY-5 and *Kluyveromyces marxianus* TY-13 was carried out to obtain quality strains for lactose fermentation in whey. 152 fusants were selected from the fusion plates. Among these fusants, 4 strains were finally obtained through maltose and lactose Durham test. Then the 4 fusants were used for whey fermentation experiments and strain R-1 with satisfactory fermentation performance was selected finally. Compared with parent strains, strain R-1 had quicker fermentation speed.

**Key words:** microbe; whey; fuel ethanol; protoplast fusion

乳清是生产干酪及干酪素时产生的副产物,具有很高的生物学价值与良好的功能特性<sup>[1]</sup>。目前,世界上每年有上亿吨乳清产生,但其资源利用程度不高,仅有 50% 的乳清得到重新利用<sup>[2]</sup>;尚有 40%~50% 的乳清未被利用,直接被排放掉,不仅浪费资源还污染环境。目前,微生物对于乳清的利用主要是通过克鲁维酵母、乳酸菌等来实现的<sup>[3-4]</sup>,其中以克鲁维酵母发酵乳清生产酒精的报道较多<sup>[5]</sup>,但至今尚未实现工业化生产。存在的问题主要是,克鲁维酵母虽然具有较高的乳糖酶活性,但其半乳糖发酵能力较低,导致乳清发酵速度缓慢,生产成本低。另一方面,酿酒酵母具有较高的半乳糖发酵能力,但由于不具有乳糖酶活性而不能发酵乳糖。本实验通过克鲁维酵母与酿酒酵母原生质体融合的方法选育乳糖酶活性高和半乳糖发酵速度快的菌种,从而提高乳清酒精发酵的速度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(09JCZDJC17900)资助;天津科技大学科学研究基金(20080203)资助。

收稿日期:2009-09-07

作者简介:王瑞生(1985-),男,天津人,硕士研究生,研究方向:现代酿造技术。

通讯作者:肖冬光(1956-),教授、博士生导师,xdg@tust.edu.cn。

### 1.1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AY-5;克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)TY-13。

### 1.1.2 主要试剂

蜗牛酶,普博欣公司;PEG6000,普博欣公司。

### 1.1.3 主要培养基

YEPD 培养基。

YEPD 再生培养基。

CPB 高渗缓冲液(g/L):磷酸氢二钠 36,柠檬酸 21,氯化钾 52。

乳清发酵培养基:乳清粉 12%,pH6.0,65℃,灭菌 30 min。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 原生质体的制备<sup>[6]</sup>

首先将菌株 AY-5、TY-13 由斜面转接到 30 mL YEPD 液体培养基中 30℃ 静置培养 24 h。然后将活化的菌株 AY-5、TY-13 以 10% 接种量接种于 90 mL YEPD 液体培养基,30℃ 150 r/min 培养 5.5 h 后,各取 AY-5

和 TY-13 5 mL 用生理盐水,高渗缓冲液以 3500 r/min、5 min 各离心洗涤 2 次。加入用高渗缓冲液配制的 0.5% 蜗牛酶 5 mL、于 22 °C 150 r/min 摇床振荡酶解 1 h。接着用高渗缓冲液 2000 r/min 离心洗涤 2 次,弃上清液便得到酵母原生质体。

### 1.2.2 原生质体灭活<sup>[7]</sup>

将 TY-13 原生质体 5 mL,于 65 °C 水浴锅中水浴不同时间。菌液冷却后涂于再生板上,直至所涂平板不再有菌落长出,可认为此处理时间为 TY-13 原生质体的灭活时间。

### 1.2.3 原生质体融合<sup>[8]</sup>

将灭活的原生质体 TY-13 5 mL 与原生质体 AY-5 5 mL 混合,加入 5 mL 40% 的 PEG6000,于 30 °C 保温 30 min。然后用高渗缓冲液洗掉融合液。适当稀释后涂布于再生培养基,45 °C 培养 3 d 后观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 克鲁维酵母原生质体热灭活条件的确定

按 1.2.2 的方法对克鲁维酵母 TY-13 的原生质体进行灭活,结果见表 1。

表 1 克鲁维酵母原生质体灭活时间的确定

项目	时间(min)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	
TY-13	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

注: +代表有菌落长出; -代表无菌落长出。

从表 1 可以看出,在 65 °C 下灭活时间小于 30 min 时均有菌落长出,当灭活时间大于 35 min 时无菌落长出。

### 2.2 原生质体融合条件的确定

融合的最终目的是亲株优良性状的整合,等量的原生质体加适合的融合方法是原生质体融合的基本原则。促进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。表面活性剂聚乙二醇(PEG)是常用的融合剂,原生质体在 PEG 中会脱水,细胞壁变皱而增加接触面积,促进融合的发生。本实验采用 40% 聚乙二醇作为促融剂,对  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和融合时间进行优化。

#### 2.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对原生质体融合的影响

$\text{Ca}^{2+}$  浓度对原生质体的融合有明显的促进作用,不同浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  对融合的影响不同,实验采用添加  $\text{CaCl}_2$  浓度分别为 1 g/L、2 g/L、3 g/L 和 4 g/L 4 种处理,比较不同浓度下的融合率,结果见图 1。

从图 1 可以看出,当  $\text{CaCl}_2$  浓度在 3 g/L 时的融合率最高,达  $1.5 \times 10^{-6}$ ,在以后的实验中采用 3 g/L 的  $\text{CaCl}_2$ 。

#### 2.2.2 融合时间对原生质体融合的影响

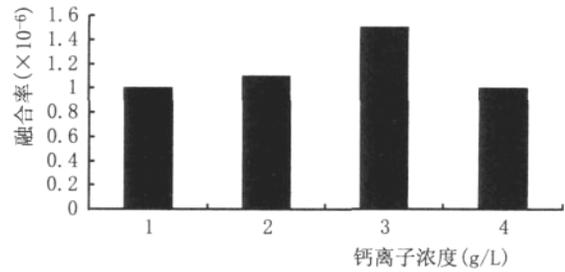


图 1 钙离子对融合率的影响

PEG 虽然可以促进原生质体融合,但是 PEG 对原生质体有毒害作用,作用时间过长会造成原生质体的破坏;但如果作用时间太短,细胞间遗传物质未完全融合,达不到融合的目的。不同作用时间对融合的影响结果见图 2。

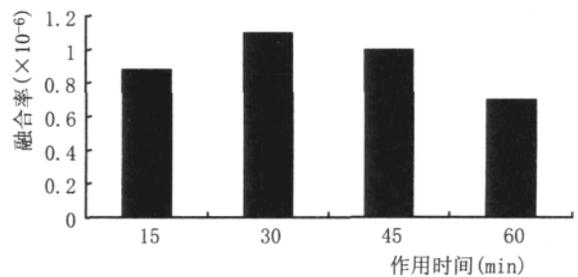


图 2 PEG 作用时间对融合率的影响

从图 2 可以看出,PEG 融合 30 min,融合率最高,为  $1.1 \times 10^{-6}$ 。

### 2.3 融合子的初筛

温度灭活原生质体的作用主要在细胞质中,使核糖体或核糖体 RNA 受到损伤,结果使细胞内的功能蛋白或酶蛋白的合成受到影响或使其变性失活,产生致死作用。由于 TY-13 在 45 °C 下可正常生长,而 TY-13 由于热灭活不能生长,这样只有融合子才能在 45 °C 下的再生培养基上长出。根据这一原理从初筛板上挑取菌株 152 株。

### 2.4 融合子复筛

本实验采用双亲株本身的内在特性选择融合子,AY-5 能利用麦芽糖,却不能发酵乳糖,TY-13 能发酵乳糖却不能利用麦芽糖。因此,在杜氏管实验中既能利用乳糖又能利用麦芽糖的菌株即为融合株。对初筛得到的 152 株菌株分别进行乳糖和麦芽糖为唯一碳源的杜氏管实验,测出 4 株具有双亲本的特性,分别编号 R-1、R-2、R-3 和 R-4。

### 2.5 融合子的发酵试验

于 150 mL 三角瓶中加入 135 mL 乳清液,以 10% 接种量接种,结果见图 3 及表 2。

酵母在发酵乳清生成酒精的同时产生  $\text{CO}_2$ ,因此可以根据  $\text{CO}_2$  排放量来衡量发酵速度。从图 3 的结果可以看出,融合子 R-2、R-4 的发酵速度低于 TY-13, R-3 的

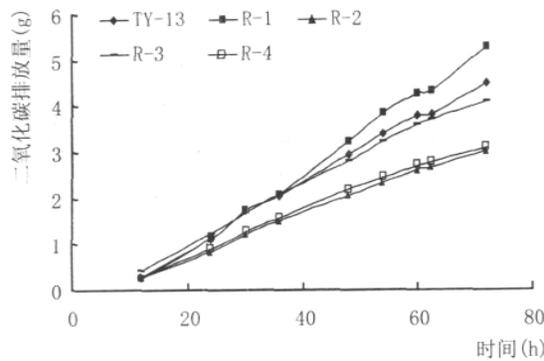


图3 融合子乳清发酵失重实验

表2 融合子发酵乳清残糖及产酒精度

菌株	乳糖利用率(%)	酒精度(%vol)	发酵周期(h)
TY-13	87.5	3.1	72
R-1	90.3	3.2	62
R-2	66.3	1.6	84
R-3	77.3	2.8	74
R-4	65.7	1.6	80

发酵速度与亲本 TY-13 接近, 而融合子 R-1 的发酵速度优于 TY-13。

从表 2 可以看出, 在乳糖利用率、酒精度、发酵周期这 3 个方面, 融合子 R-1 优于 TY-13, R-3 与 TY-13 相比略有下降, 而 R-2、R-4 在这 3 个方面均不如 TY-13。

### 3 结论

通过克鲁维酵母与酿酒酵母原生质体融合的方法选育出了乳糖酶活性高和半乳糖发酵速度快的菌株 R-1, 与亲本 TY-13 比较, 发酵酒精度略有提高, 乳糖利用率提高 2.8%, 发酵周期缩短 10 h。从结果看, 融合子的乳清发酵速度有了明显提高, 为工业化乳清发酵生产燃料乙醇打下了一定的基础。

### 参考文献:

- [1] 严宝兴. 乳清资源的综合利用[J]. 草业与畜牧, 2008, 154(9): 52-55.
- [2] Bajpai, P. Utilization of cheese whey for production of  $\alpha$ -amylase enzyme[J]. J. Biotechnol, 1991, 18(3): 265-270.
- [3] Moulin, G., Guillaume, M., Galzy, P., [J]. Biotechnol. Bioeng. 1980, 22, 1277-1281.
- [4] Irvine, D. M., Hill, R. M., in: Young, M. (Ed.) [J]. Comprehensive Biotechnology, Pergamon, Oxford 1985, (3): 523-565.
- [5] Rogosa, M., Browne, H. H., Whittier, E. O., [J]. Dairy Sci. 1947, 30, 263-269.
- [6] 李英军, 马晓燕, 赵红梅, 等. 马克斯克鲁维酵母原生质体制备和再生条件的研究[J]. 酿酒科技, 2006, 145(7): 51-54.
- [7] 周东坡, 平文祥, 孙剑秋. 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, 1999, 39(5): 455-459.
- [8] 文铁桥, 赵学慧. 克鲁维酵母与酿酒酵母属间原生质体融合构建高温酵母菌株菌物系统[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 89-93.

## 九·九储酒·新疆第三届储酒文化节在新疆奇台举行

本刊讯: “九·九储酒·新疆第三届储酒文化节”于 2009 年 10 月 26 日在新疆奇台县举行。本次文化节的主题是“祝福祖国·感恩古城”, 中国酿酒工业协会秘书长王琦、中国酿酒工业协会白酒分会副理事长、黑龙江酒业协会理事长栗永清、新疆酿酒工业协会理事长戚升科、陕西省酿酒工业协会副会长白希智等行业协会的领导和专家应邀出席了文化节活动, 新疆自治区、昌吉州、奇台县的有关领导以及兄弟州县的领导出席了文化节活动, 新疆自治区电视台、广播电台、昌吉州、奇台县的主流媒体到会采访报道, 业内主流媒体负责人出席了文化节活动。

新疆第一窖古城酒业有限公司董事长周文贵致辞, 本届文化节的主题是“祝福祖国·感恩古城”, 目的是将新疆的白酒生产工艺和酒文化继承创新、发扬光大。新疆第一窖古城酒业有限公司是新疆白酒和酒文化的发源地, 具有 600 多年的酿酒历史, 坐落于天山北麓、准葛尔东南缘的古丝绸之路的名镇奇台县, 主营白酒, 产品有清、浓、酱、兼 4 个香型, 200 多个品种, “古城大曲”等产品荣获多项国家、自治区银爵奖等殊荣, “古城”商标荣获新疆“著名商标”, 古城白酒被认定为“新疆名牌”产品。

乌鲁木齐市书协名誉主席赵国柱等向储酒文化节献上书画作品 3 幅。中国酿酒工业协会秘书长王琦发表讲话, 肯定了储酒文化节的积极作用, 希望白酒行业关注消费模式, 关注健康安全。新疆第一窖古城酒业有限公司有着悠久的历史 and 厚重的酒文化, 应发挥其积极作用, 促进新疆酒业的健康发展。奇台县委书记王炳炬宣布“祝福祖国·感恩古城——新疆第三届储酒文化节”开幕。文化节上举行了隆重的 36 年陈酿酒开坛仪式、祭酒神仪式、登高祈福仪式、封坛仪式和储酒仪式, 并举行了 3 坛分别为 30 年窖藏的清香型、浓香型和酱香型酒的拍卖, 3 坛酒全部成交。文化节上还演出了丰富多彩的文艺节目。与会代表参观了新疆第一窖古城酒业有限公司, 对其酒文化留下深刻的印象。(小雨)



储酒文化节开幕式