

降解苹果酸葡萄酒酵母融合株的构建及特性研究*

史东健,张 伟**,林 杨,张 旻,朱亚辉

(河北农业大学食品学院,河北 保定 071000)

摘要: 以葡萄酒酵母和降解苹果酸裂殖酵母为亲本,通过正交实验优化了亲本原生质体的制备、再生以及融合的最佳条件,融合率为 1.76×10^{-6} ,经筛选获得一株降解苹果酸能力强且发酵性能优良的融合菌株。融合株的体积较亲株大,为 $47.5489 \mu\text{m}^3$,融合子的DNA含量约为二亲株之和,为 $7.36 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$,证明确为融合子,连续15次传代,融合子各项性能稳定。

关键词: 葡萄酒酵母; 裂殖酵母; 原生质体融合; 正交实验

中图分类号:TS261.1;TS262.6;TQ920 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)06-0028-08

Construction of Malic Acid-Reducing Yeast Fusants and Study on their Properties

SHI Dong-jian, ZHANG Wei and LIN Yang et al.

(Food College of Hebei Agriculture University, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Grape wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and fission yeast (*Schizosaccharomyces malidevorans*) of malic acid degradation were used as parent strains in the experiments. The preparation and the optimal conditions for regeneration and fusion of parent protoplast were optimized through orthogonal test (fusion rate as 1.76×10^{-6}). Then a fusion strain with high fermenting performance and strong malic acid-degrading capability was obtained. Such strain was larger in volume than parent strain ($47.5489 \mu\text{m}^3$), and DNA content of fusant was about the sum total of the two parent strains ($7.36 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$), which proved it was really a fusant. The properties of the fusant remained unchanged even after 15 times consecutive passage. (Tran. by YUE Yang)

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; *Schizosaccharomyces malidevorans*; protoplast fusion; orthogonal test

苹果酸含量高会使葡萄酒有酸涩感,酒味粗硬,如何降解葡萄酒中的苹果酸一直是葡萄酒酿造中一个亟待解决的问题^[1-4]。自从1977年Sipiczki与Ferenzy首次实现酵母菌的原生质体融合以来^[5],原生质体融合技术已在工业上得到广泛应用,特别是酵母的原生质体融合技术应用更广^[6-23],为利用原生质体融合技术培育新的葡萄酒酵母工程菌为葡萄酒的生物降酸提供了新的思路。葡萄酒酵母具有良好的发酵性能,但分解苹果酸能力差;降解苹果酸裂殖酵母具有极强的降解苹果酸能力,但发酵性能极差,且易产生异味^[24],将这二亲本的优秀性状融于一株菌中,正是本研究的目的所在。原生质体融合育种的整个过程受到诸多因素的影响,多数文献资料皆研究单因子的影响^[25],而综合分析各因素的研究报道较少。本研究采用双灭活法进行亲本原生质体的遗传标记,将葡萄酒酵母与降解苹果酸裂殖酵母进行属间

融合,正交实验获得了原生质体形成、再生及融合的最佳条件,并在此基础上得到一株降解苹果酸能力高达31.7%,且发酵性能优良的融合菌株。同时,对酵母融合株的部分特性进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 出发菌株

葡萄酒酵母 C1 (*Saccharomyces cerevisiae*):由长城葡萄酒有限公司提供的法国干酵母。

降解苹果酸裂殖酵母 M1 (*Schizosaccharomyces malidevorans*):购自中科院菌种保藏中心,菌号 2.1621。

1.1.2 培养基

YPD 液体培养基:蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 10 g,蒸馏水定容至 1000 mL,115 °C 灭菌 30 min。

收稿日期:2005-01-24

* 河北省“十五”重大科技攻关专项(03220171D)

作者简介:史东健,女,河北省石家庄市人,硕士研究生,研究方向:食品微生物。

** 张伟为本文通讯作者,电话:0312-7528192

YPD 固体培养基:蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1000 mL,115 °C 灭菌 30 min。

原生质体再生完全培养基(HYPD):在 YPD 固体中添加 KCl 至 0.7 mol/L,115 °C 灭菌 30 min。

降解苹果酸指示培养基:YPD 3 mL, NH_4SO_4 0.5 g, 苹果酸 0.3 g,葡萄糖 2 g,琼脂 2 g,溴酚兰指示剂 1 mL, 蒸馏水定容至 100 mL,115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 其他试剂及原料

KCl 高渗缓冲液 pH6.8 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液添加 KCl 至 0.7 mol/L。

促融剂:聚乙二醇(6000)40 g 加入至 100 mL PB 溶液中,使氯化钙为 0.4 mol/L。

β -巯基乙醇:蒸馏水稀释,浓度 0.2 %。

蜗牛酶 2.0 % 的蜗牛酶溶于高渗缓冲液中,0.45 μm 膜过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 亲本单倍体的分离和验证

将活化二代的亲本葡萄酒酵母 C1 出发株分别转接于产孢培养基上,28 °C 培养 7~10 d,离心收集菌体,洗涤悬浮后加 2 % 蜗牛酶,37 °C 酶解 4 h,经 10 倍稀释后再置于 70 °C 保温 10 min,离心再悬浮后,以玻璃珠用力摇振 10 min。将已基本分散的孢子悬液适当稀释,涂于 YPD 平皿上,28 °C 培养 7 d,从平皿上挑取小菌落,移至 YPD 斜面上。将该培养好的菌株再转接至产孢培养基上,培养 3~7 d,染色镜检证明不产生子囊孢子,即为单倍体细胞^[25-26]。因裂殖酵母为单倍体营养细胞,故不需分离其单倍体。

1.2.2 原生质体的制备

将上述两个单倍体细胞亲株分别经 YPD 斜面两次活化,从活化好的菌种斜面上分别取一环接种于 100 mL YPD 液体培养基上,28 °C 200 r/min 摇床培养 12~16 h,收集对数生长期细胞,各取 5 mL 加入离心管中,3500 r/min 离心 5 min,用磷酸盐缓冲溶液洗两次,加入 0.2 % β -巯基乙醇溶液,28 °C 静置处理 10 min,用高渗缓冲液洗涤 3 次,离心弃去上清液,然后加入蜗牛酶液 10 mL,30 °C 水浴,每隔 0.5 h 镜检观察,待视野中 90 % 以上为原生质体时,2000 r/min 离心 10 min,用高渗 PB 缓冲液洗涤 2 次,离心收集原生质体^[27-31]。

1.2.3 原生质体形成率和再生率测定

将制备的原生质体经适当稀释后涂布于普通 YPD 和高渗 YPD 平板,同时将未去壁菌体溶液按同一稀释度、同一接种量涂布于普通 YPD 平板上,28 °C 培养 3 d 后计菌落数,得出菌株的原生质体形成率与再生率^[32-35]。

计算公式:形成率(%)=(A-B)/A×100 %

再生率(%)=(C-B)/(A-B)×100 %

注:A 为酶解前菌体稀释液在普通 YPD 培养基上的菌落数;

B 为原生质体稀释液在普通 YPD 培养基上长出的菌落数;

C 为原生质体稀释液在高渗 YPD 培养基上长出的菌落数。

1.2.4 原生质体灭活

各取原生质体悬液 5 mL,将 C1 菌株置 70 °C 水浴中灭活 10 min,将 M1 用 UV 灯(30 W,垂直距离 20 cm)灭活 5 min,再稀释至 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 倍,倾注于 HYPD 平板,以确定致死率。

1.2.5 原生质体融合

分别取上述灭活的 C1 原生质体悬浮液、M1 原生质体悬浮液各 10 mL,等量混合,离心去上清液,加入 10 mL 40 % 的 PEG 高渗缓冲液,30 °C 保温 20 min,镜检并观察融合情况,融合后稀释成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 后分别涂布 HYPD 平板。28 °C 培养 3 d,待融合子长出后计算融合率。融合率(%)=D/C-B×100 % 其中 D 为原生质体融合液稀释后在高渗 YPD 培养基上长出的菌落数。

1.2.6 单因素对原生质体形成和再生的影响

对菌龄、酶浓度、酶解时间、酶解温度 4 个因素分别进行单因素试验,固定其他 3 个因素,观察单个因素对原生质体形成与再生的影响。

1.2.6.1 菌龄对原生质体形成与再生的影响

活化菌种接种 YPD 液体培养基后分别培养 6 h,12 h,24 h,36 h,48 h,2 % 的蜗牛酶液 30 °C 酶解 2 h,采用甘露醇高渗缓冲液,再生平板培养基采用 HYPD1,计算原生质体形成率与再生率。

1.2.6.2 酶解时间对原生质体形成与再生的影响

活化菌种接种 YPD 液体培养基后培养 12 h,分别采用 2 % 的蜗牛酶液 30 °C 酶解 0.5 h,1.0 h,1.5 h,2.0 h,2.5 h,采用甘露醇高渗缓冲液,再生平板培养基采用 HYPD1,计算原生质体形成率与再生率。

1.2.6.3 酶浓度对原生质体形成与再生的影响

活化菌种接种 YPD 液体培养基后培养 12 h,分别采用 0.5 %,1.0 %,1.5 %,2.0 %,2.5 % 的蜗牛酶液 30 °C 酶解 2 h,采用甘露醇高渗缓冲液,再生平板培养基采用 HYPD1,计算原生质体形成率与再生率。

1.2.6.4 酶解温度对原生质体形成与再生的影响

活化菌种接种 YPD 液体培养基后培养 12 h,分别采用 2 % 的蜗牛酶液酶解 2.0 h,温度梯度为 24 °C,26 °C,28 °C,30 °C,32 °C,34 °C,采用甘露醇高渗缓冲液,再生平板培养基采用 HYPD1,计算原生质体形成率与再生率。

1.2.7 正交试验

为观察菌龄、酶浓度(酶系统)、酶解时间、酶解温度、稳渗剂5个因素对C1和M1原生质体形成率与再生率的协同影响,以确定菌体的最佳去壁与再生条件,试验采用正交设计,通过预试验和单因素试验,确定正交试验的各因素水平。本试验设菌龄(A)、酶浓度或酶系统(B)、酶解作用时间(C)、酶解温度(D)和稳渗剂(E)5个因素,每个因素设4个水平,进行原生质体去壁再生,寻找原生质体去壁再生的最佳工艺条件。试验用 $L_{16}(4)^5$ 正交表安排设计。对融合实验设PEG浓度(A)、处理温度(B)、处理时间(C)、pH值4个因素,每个因素设3个水平,进行融合最佳工艺条件的选择。试验选用 $L_9(3)^4$ 正交表^[36]。

试验因素水平对照表见表1~3。

表1 C1原生质体形成的因子水平

水平	A 菌龄 (h)	B 酶浓度 (%)	C 酶解作用时间 (h)	D 酶解温度 (°C)	E 稳渗剂
1	6	1.0	1.0	26	甘露醇
2	12	1.5	1.5	28	蔗糖
3	24	2.0	2.0	30	NaCl
4	36	2.5	2.5	32	KCl

表2 M1原生质体形成的因子水平

水平	A 菌龄 (h)	B 酶浓度 (%)	C 酶解作用时间 (h)	D 酶解温度 (°C)	E 稳渗剂
1	6	B1	1.0	26	甘露醇
2	12	B2	1.5	28	蔗糖
3	24	B3	2.0	30	NaCl
4	36	B4	2.5	32	KCl

注: B1: 1.2%蜗牛酶+0.8%纤维素酶; B2: 1.5%蜗牛酶+0.5%纤维素酶; B3: 1.8%蜗牛酶+0.2%纤维素酶; B4: 1%蜗牛酶+0.5%纤维素酶。

表3 原生质体融合的因子水平

水平	A (PEG浓度, %)	B 处理温度 (°C)	C 处理时间 (min)	D (pH值)
1	30	20	20	5
2	35	25	30	6
3	40	30	40	7

1.2.8 融合子的检出与鉴定

将在降解苹果酸指示培养基上变蓝的融合子连续传代15次,选择无性状分离者,进行细胞体积及DNA含量的测定。

细胞体积的测定:用显微测微尺测量细胞的长轴(a)、短轴(b),按公式 $v=4/3 \times \pi \times a/2 \times (b/2)^2$ 计算。

细胞DNA含量的测定:见文献^[37],并用小牛胸腺DNA测得的标准曲线,计算其DNA含量,同时测定所提取酵母菌的细胞数,计算出每个细胞DNA含量的近似值。求出3次测定结果的平均值。

1.2.9 融合子性能的测定

1.2.9.1 融合子与亲株生长速率的比较

将融合子与亲本分别接种于灭菌葡萄汁中,28℃ 140 r/min 培养14 h,再转接至250 mL葡萄汁中,接种后使菌数达到 $7 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 个/mL,每隔2 h取样测定OD值。

1.2.9.2 融合子与亲株发酵性能的测定

将融合子与亲本分别接种于灭菌葡萄汁中,28℃ 140 r/min 培养14 h,再转接至250 mL葡萄汁中,接种后使菌数达到 $7 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 个/mL,28℃发酵,每8 h取一次样,测定其降糖能力、产酒精能力、降酸性能。

测定方法见GB-15037。

2 结果与讨论

2.1 酿酒酵母的C1原生质体制备

2.1.1 菌龄对C1原生质体形成与再生的影响

测定菌龄对原生质体形成率与再生率的影响,结果见图1。

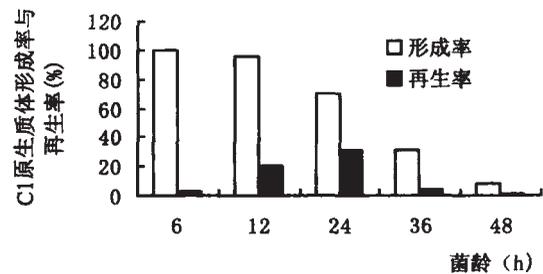


图1 菌龄对C1原生质体形成与再生的影响

由图1可知,菌龄以对数生长期早期10~12 h为宜,低于10 h虽然原生质体形成率较高,但再生率很低,超过20 h后,菌体已进入稳定期,细胞壁结构趋于稳定和老化,不易去壁形成原生质体,原生质体形成率显著降低,而且再生率也有所下降。

2.1.2 酶浓度对C1原生质体形成与再生的影响

测定酶浓度对原生质体形成率与再生率的影响,结果见图2。

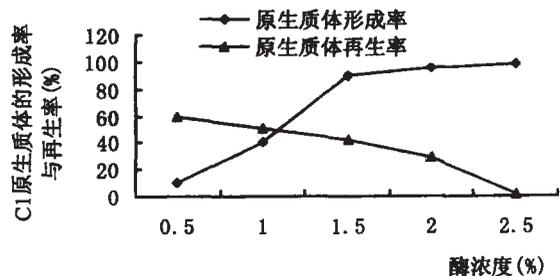


图2 酶浓度对C1原生质体形成与再生的影响

由图2可看出,原生质体的形成率随着酶浓度的增加而显著升高,当酶浓度达到1.5%时,原生质体形成率

均能达到 90 % 以上；而再生率则随着酶浓度的增加而下降,当酶浓度超过 1.5 % 时,原生质体再生率下降特别明显,酶浓度为 2.5 % 时,再生率下降为 2 %。

2.1.3 酶解时间对 C1 原生质体形成与再生的影响

测定酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响,结果见图 3。

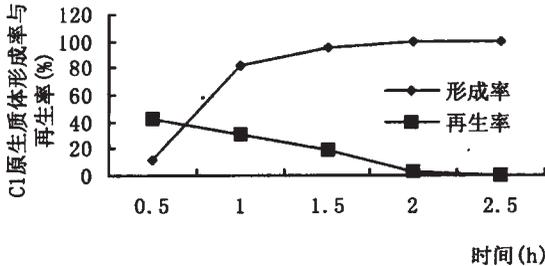


图 3 酶解时间对 C1 原生质体形成与再生的影响

由图 3 可以看出,原生质体的形成率随酶解时间的增加而升高,在酶解时间超过 1 h 后,原生质体形成率均达到 82.5 % 以上；再生率随酶解时间的增加而下降,其中在 1.5~2 h 区间下降明显,由 19.3 % 下降至 3.2 %, 2.5 h 后下降为 0.3 %。

2.1.4 酶解温度对 C1 原生质体形成与再生的影响

测定酶解温度对原生质体形成率与再生率的影响,结果见图 4。

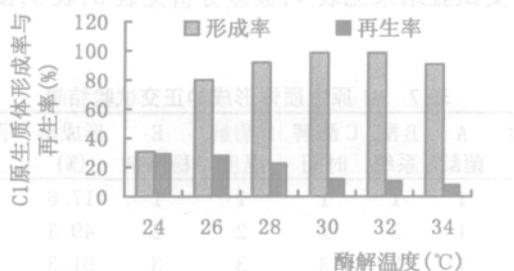


图 4 酶解温度对 C1 原生质体形成与再生的影响

由图 4 可以看出,在 26 °C 以下,随着酶解温度的增加,原生质体形成率显著增加,但是在 26~34 °C 之间,原生质体形成率没有明显差异,而再生率则随酶解温度的增加缓慢下降,到 30 °C 时已经降至 20 % 以下。

2.1.5 C1 原生质体形成与再生最佳条件的正交试验结果

正交试验设菌龄(A)、酶浓度(B)、酶解作用时间(C)、酶解温度(D)和稳渗剂(E) 5 个因素,每个因素设 4 个水平,进行原生质体去壁再生,寻找原生质体去壁再生的最佳工艺条件。试验用 $L_{16}(4)^5$ 正交安排设计^[35]。正交试验结果见表 4,极差分析见表 5,图 5,表 6,图 6。

由图 5 可看出,酶浓度的极差值最高,其次为菌龄,然后依次为稳渗剂、酶解时间、酶解温度,后四者对原生质体形成率影响不大,酶浓度为影响原生质体形成的主

表 4 C1 原生质体形成的正交试验结果

试验号	A 菌龄	B 酶浓度	C 酶解时间	D 酶解温度	E 稳渗剂	形成率 (%)	再生率 (%)
1	1	1	1	1	1	21.3	0.8
2	1	2	2	2	2	60.4	0.5
3	1	3	3	3	3	92.5	0.3
4	1	4	4	4	4	98.1	0.2
5	2	1	2	3	4	18.5	25.6
6	2	2	1	4	3	79.4	21.4
7	2	3	4	1	2	95.3	8.2
8	2	4	3	2	1	97.1	0.7
9	3	1	3	4	2	17.1	9.3
10	3	2	4	3	1	42.6	9.5
11	3	3	1	2	4	63.2	14.5
12	3	4	2	1	3	90.4	0.9
13	4	1	4	2	3	31.4	7.2
14	4	2	3	1	4	56.4	6.3
15	4	3	2	4	1	61.6	8.1
16	4	4	1	3	2	64.5	1.2

注:每个处理中高渗缓冲液和原生质再生培养基均采用相同稳渗剂。

表 5 C1 原生质体形成率极差分析

名称	A 菌龄	B 酶浓度	C 酶解时间	D 酶解温度	E 稳渗剂
K1	272.3	88.3	228.4	263.4	222.6
K2	290.3	238.8	230.9	252.1	238.3
K3	213.3	312.6	263.1	218.1	293.7
K4	213.9	350.1	292.4	256.2	236.2
极差	77	262	64	45.3	71.1

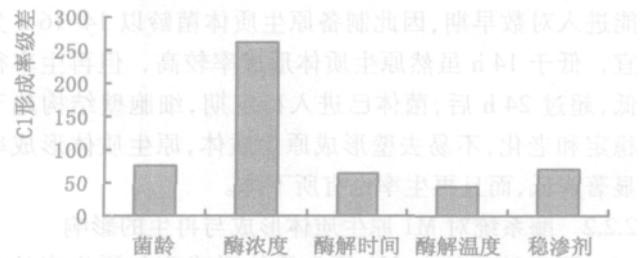


图 5 C1 原生质体形成率各因素极差

表 6 C1 原生质体再生率极差分析

名称	A 菌龄	B 酶浓度	C 酶解时间	D 酶解温度	E 稳渗剂
K1	1.8	42.9	37.9	16.2	19.1
K2	55.9	37.7	35.1	22.9	19.2
K3	34.2	31.1	16.6	36.6	29.8
K4	22.8	3	26.5	39	46.6
级差	54.1	39.9	21.3	22.8	27.5

要因素。

由图 6 可看出,除酶解时间对原生质体再生率影响较小外,其余均对原生质体的再生有较大的影响,影响力依次为菌龄、酶浓度、稳渗剂、酶解温度。

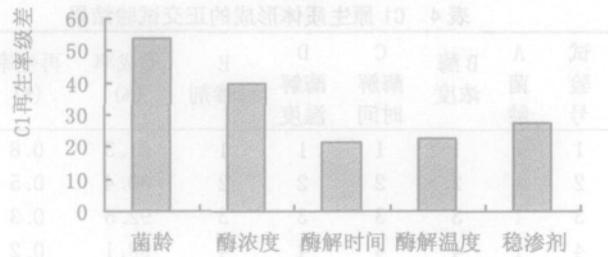


图6 C1原生质体再生率各因素极差

综合考虑原生质体形成率与再生率的情况,得出最佳去壁条件:菌龄为12h,酶浓度为1.5%,酶解时间为1h,酶解温度为28℃,稳渗剂选用KCl,原生质体形成率为92.3%,再生率为19.6%。

2.2 影响裂殖酵母M1原生质体制备与再生的因素

2.2.1 菌龄对M1原生质体形成与再生的影响

测定菌龄与M1原生质体形成率与再生率的关系,结果见图7。

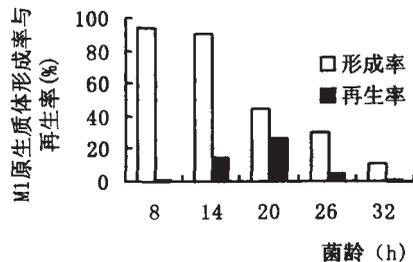


图7 菌龄对M1原生质体形成与再生的影响

由图7可知,裂殖酵母M1的延滞期较长,14h才能进入对数早期,因此制备原生质体菌龄以14~16h为宜,低于14h虽然原生质体形成率较高,但再生率很低,超过24h后,菌体已进入稳定期,细胞壁结构趋于稳定和老化,不易去壁形成原生质体,原生质体形成率显著降低,而且再生率也有所下降。

2.2.2 酶系统对M1原生质体形成与再生的影响

测定酶系统与M1原生质体形成率与再生率的关系,结果见图8。

- A: 1.2%蜗牛酶+0.8%纤维素酶;
- B: 1.5%蜗牛酶+0.5%纤维素酶;
- C: 1.8%蜗牛酶+0.2%纤维素酶;
- D: 1%蜗牛酶+0.5%纤维素酶;
- E: 2%蜗牛酶。

由于裂殖酵母M1的细胞壁含纤维素较高,所以去壁困难,使用单一的蜗牛酶去壁效果较差,形成率还不到30%。纤维素酶和蜗牛酶是微生物细胞脱壁常用的效果较好的酶。如图8所示,我们比较了不同浓度的混合酶系统的去壁效果,结果表明,单酶处理的效果不如混合酶处理的效果好。原生质体的形成率随着酶系统中

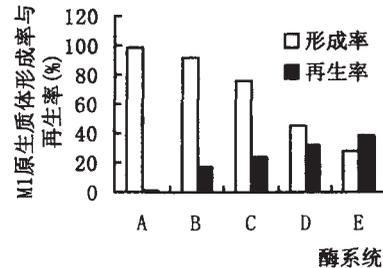


图8 不同酶系统对原生质体形成与再生的影响

纤维素酶浓度的增加而显著升高,当纤维素酶浓度达到0.5%时,原生质体形成率能达到90%以上,而再生率则随着纤维素酶浓度的增加而下降,当该酶浓度超过0.5%时,原生质体再生率下降特别明显,酶浓度为0.8%时,再生率下降为1.5%。对于裂殖酵母M1,最佳酶系统为1.5%蜗牛酶+0.5%纤维素酶,在此条件下酶解2h, M1的原生质体形成率和再生率均较高。

2.2.3 M1原生质体形成与再生最佳条件的正交试验结果

正交试验设菌龄(A)、酶系统(B)、酶解作用时间(C)、酶解温度(D)和稳渗剂(E)5个因素,每个因素设4个水平,进行原生质体去壁再生,寻找M1原生质体去壁再生的最佳工艺条件。试验用 $L_{16}(4)^5$ 正交表安排设计^[35]。正交试验结果见表7,极差分析见表8,表9,图9,图10。

表7 M1原生质体形成的正交试验结果

试验号	A 菌龄	B 酶系统	C 酶解时间	D 酶解温度	E 稳渗剂	形成率 (%)	再生率 (%)
1	1	1	1	1	1	17.6	19.2
2	1	2	2	2	2	49.3	1.2
3	1	3	3	3	3	91.3	0.8
4	1	4	4	4	4	98.1	0.2
5	2	1	2	3	4	45.3	32.1
6	2	2	1	4	3	76.4	22.3
7	2	3	4	1	2	92.5	17.3
8	2	4	3	2	1	98.9	0.7
9	3	1	3	4	2	19.5	9.5
10	3	2	4	3	1	32.6	8.4
11	3	3	1	2	4	65.2	14.5
12	3	4	2	1	3	78.6	0.9
13	4	1	4	2	3	31.4	11.2
14	4	2	3	1	4	56.7	8.1
15	4	3	2	4	1	60.8	6.3
16	4	4	1	3	2	62.7	1.2

注:每个处理中高渗缓冲液和原生质再生培养基均采用相同稳渗剂。

由图9可看出,酶系统的极差值最高,其次为菌龄,然后依次为稳渗剂、酶解时间、酶解温度,后四者对原生质体形成率影响不大,酶系统为影响原生质体形成的主

表 8 M1 原生质体形成率极差分析

名称	A 菌龄	B 酶系统	C 酶解时间	D 酶解温度	E 稳渗剂
K1	256.3	113.8	221.9	245.4	209.9
K2	313.1	215	234	244.8	226.4
K3	195.9	309.8	266.4	231.9	277.7
K4	211.6	338.3	279.9	254.8	265.3
极差	117.2	224.5	58	22.9	67.8

表 9 M1 原生质体再生率极差分析

名称	A 菌龄	B 酶系统	C 酶解时间	D 酶解温度	E 稳渗剂
K1	21.4	72	57.2	45.5	34.6
K2	72.4	40	40.5	27.6	29.2
K3	33.3	38.9	19.1	42.5	35.2
K4	26.8	3	38.5	38.3	54.9
级差	51	69	38.1	17.9	25.7

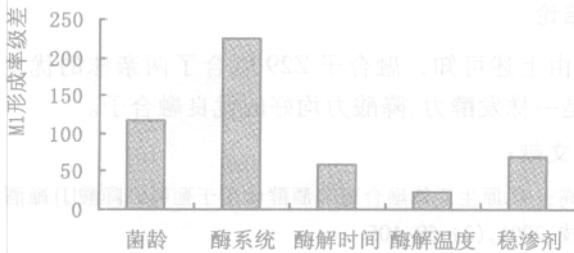


图 9 M1 原生质体形成率各因素极差

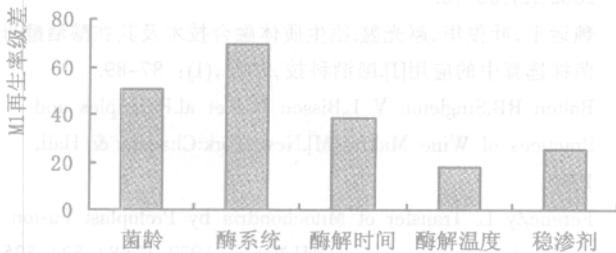


图 10 M1 原生质体再生率各因素极差

要因素。

由图 10 可看出,除酶解温度对原生质体再生率影响较小外,其余均对 M1 原生质体的再生有较大的影响,影响力依次为酶系统配比、菌龄、酶解时间、稳渗剂。

综合考虑原生质体形成率与再生率的情况,得出最佳去壁条件:菌龄为 14 h,酶浓度为 1.5% 蜗牛酶+0.5% 纤维素酶,酶解时间为 2.5 h,酶解温度为 28℃,稳渗剂选用 KCl,原生质体形成率为 94.6%,再生率为 13.4%。

2.3 原生质体融合条件优化的正交试验结果

融合正交试验设 PEG 浓度(A)、处理温度(B)、处理时间(C)、pH 值 4 个因素,每个因素设 3 个水平,进行原生质体融合。寻找融合的最佳工艺条件。试验用 $L_{16}(4)^5$ 正交表安排设计^[35]。正交试验结果见表 10,表 11。

由表 11 可知,PEG 浓度对原生质体的融合影响最大,而其他几个因素对原生质体融合作用差异不大。PEG 是原生质体融合诱导剂,其 PEG 浓度与原生质体

表 10 原生质体融合条件的正交试验结果

试验号	A PEG 浓度	B 处理温度	C 处理时间	D pH 值	融合率 ($\times 10^6$)
1	1	1	1	1	1.8
2	1	2	2	2	2.2
3	1	3	3	3	2.5
4	2	1	2	3	5.2
5	2	2	3	1	6.3
6	2	3	1	2	9.1
7	3	1	3	2	1.7
8	3	2	1	3	2.1
9	3	3	2	1	2.6

表 11 原生质体融合率级差分析

	A PEG 浓度	B 处理温度	C 处理时间	D pH 值
K1	6.5	8.7	13	10.7
K2	20.6	10.6	10	17.2
K3	6.4	14.2	10.5	9.8
极差 R	14.2	5.5	3	7.4

的存活率和融合率有一定的关系^[39]。PEG 浓度过低,由于不能起到足够的渗透压稳定作用,致使原生质体存活率降低;PEG 浓度过高,对原生质体有一定毒性。所以,要控制适当。实验结果表明,PEG 35% pH6.0 30℃下处理 30 min 的条件融合效果最好,融合率达 1.76×10^{-6} 。这对不同属间酵母融合来说,属于较高融合率。

2.4 融合子细胞结构特征

融合子细胞体积和 DNA 含量的测定结果见表 12。

表 12 亲本及融合子细胞体积和 DNA 含量的比较

菌株	细胞体积 (μm^3)	DNA 含量 ($\times 2 \times 10^{-8} \mu g/cell$)
M1	31.7776	2.68
C1	22.0320	1.55
Z2	45.2302	3.21
Z5	43.2345	3.42
Z13	46.2123	4.01
Z15	38.1400	3.87
Z19	49.1412	4.11
Z21	34.4501	2.82
Z29	47.5489	3.68
Z31	36.94	2.97
Z35	33.94	1.82

由表 12 可知,Z2,Z5,Z21,Z31 的 DNA 含量都大于单一亲株的 DNA 含量,但明显小于二亲株 DNA 含量之和,这可能是其中一亲株的核物质结合了另一亲株的 DNA 片断形成的融合子。Z13,Z15,Z19,Z29 的 DNA 含量与二亲本的 DNA 含量之和相近,可能是两亲株的核物质融合在一起的结果。且连续传代稳定,因此认定它们是稳定的融合子。

共检出融合子 8 株,经初筛和复筛获得一株降酸及发酵性能均优的融合子 Z29,进行下一步生理生化性能

的测定。

2.5 融合子的性能测定

2.5.1 融合子与亲株生长速率的测定

融合子与亲株生长速率的测定结果见图 11。

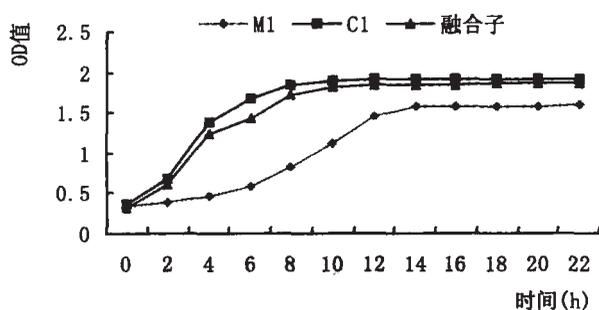


图 11 亲株与融合子生长速率的比较

由图 11 可知,融合子 Z29 的生长速率介于两亲本之间,明显大于裂殖酵母 M1,而接近于亲株葡萄酒酵母 C1,表现为极强的增殖能力。

2.5.2 融合子发酵性能的测定

测定融合子与亲株的降糖能力、产酒精能力、降酸性能。测定结果见图 12,图 13 和表 13。

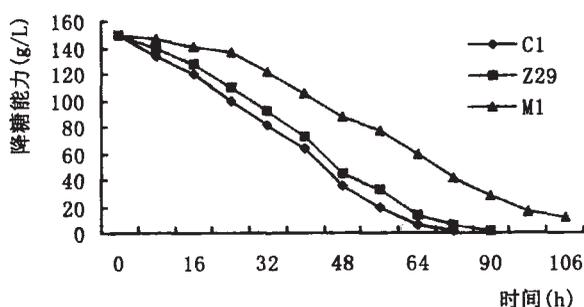


图 12 融合子 Z29 与亲株发酵降糖能力的比较

由图 12 可知,融合子 Z29 的发酵降糖曲线接近于亲本葡萄酒酵母 C1,72 h 发酵完毕,降糖速度快,发酵力强,而亲本 M1 发酵 3 d 尚残留 10 g 左右的还原糖。

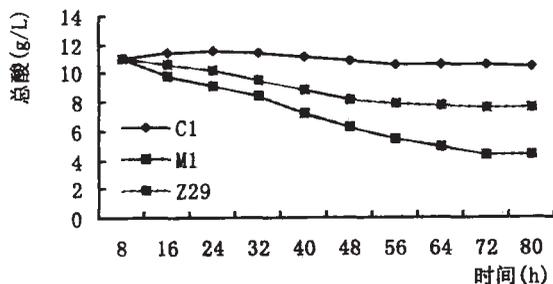


图 13 融合子 Z29 与亲株总酸降解能力的比较

由图 13 可知,亲本 C1 的发酵液中总酸含量基本上不发生变化,而亲本降解苹果酸裂殖酵母 M1 的发酵液中 72 h 总酸含量从 11 g/L 降至 4.3 g/L,降酸幅度明显,融合子 Z29 的降酸能力接近于亲本降解苹果酸裂殖

表 13 融合子及亲株产酒精能力的比较

菌株	时间(h)	CO ₂ 失重	酒精度%(v/v)	残还原糖(%)
C ₁	72	30.1	8.40	0.12
M ₁	72	17.6	5.42	4.19
Z29	72	28.5	8.00	0.61

酵母 M1,发酵性能接近于亲本 C1,说明其融合了双亲本优良性状。

由表 13 可知,由发酵结果可看出,融合子 Z29 的酒精度与亲本 C1 相近,达到 8%(v/v);残还原糖较低,仅残留 0.61%;且发酵力较高,72 h 失重为 28.5 g。因发酵用葡萄汁的含糖量仅为 150 g/L,故发酵酒精度较低,但已达到葡萄酒的国家标准(7%~13%),说明该融合子有较好的发酵潜力。

3 结论

由上述可知,融合子 Z29 融合了两亲株的优良性状,是一株发酵力、降酸力均好的优良融合子。

参考文献:

- [1] 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):59-105.
- [2] 张春晖.微生物降酸技术在葡萄酒酿造中的应用[J].酿酒科技,2002(2):66-70.
- [3] 魏运平,叶俊华,赵光鑫.原生质体融合技术及其在酿酒酵母菌株选育中的应用[J].酿酒科技,2003(1):87-89.
- [4] Bolton RB,Singleton V L,Bisson L F,et al.Principles and Practices of Wine Making[M].New York:Chaman & Hall,1995.
- [5] Ferenczy L. Transfer of Mitochondria by Protoplast Fusion in *Saccharomyces cerevisiae*[J].Nature,1977(268):524-525.
- [6] 张博润,王永红,刘书锋,等.酿酒酵母原生质体的融合[J].微生物学通报,1986,13(2):65-67.
- [7] 楼纯菊,沈永强,焦瑞身.酿酒酵母单倍体与双倍体原生质体的融合[J].真菌学报,1985,4(2):118-124.
- [8] 张明,王元君,潘仁瑞.酿酒酵母和粟酒裂殖酵母属间融合和融合子特性[J].真菌学报,1996,15(3):204-209.
- [9] 陈海昌,唐屹,张岭花,等.原生质体融合技术提高啤酒酵母絮凝性的研究[J].微生物学通报,1994,21(4):213-217.
- [10] 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[J].菌物系统,1999,18(1):89-93.
- [11] 文铁桥,赵学慧.酵母菌属间原生质体融合构建高温酵母菌株[J].微生物学报,1999,39(2):141-147.
- [12] S Harashima, A Takagi, and Y Oshima. Transformation of Protoplasted Yeast Cells is Directly Associated with Cell Fusion[J]. Mol. Cell. Biol., 1984, 4(4): 771-778.
- [13] AQ Fang, SL Li, YW Chen, and P Li. Study on the Protoplast Fusion between a Thermotolerant Yeast and *Saccharomyces cerevisiae*[J].Chin J Biotechnol, 1990 6(3): 207-213.

- [14] T Wen and X Zhao. Construction of Thermotolerant Ethanol-producing Yeast by Protoplast Fusion[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 1999 ,39(2): 141-147.
- [15] N Lima,C Moreira, JA Teixeira, and M Mota .Introduction of Flocculation into Industrial Yeast,*Saccharomyces cerevisiae* sak? by Protoplast Fusion[J]. Microbios,1995 81 (328): 187-197.
- [16] K Kavanagh, M Walsh, and PA Whittaker.Enhanced Intraspecific Protoplast Fusion in Yeast[J].FEMS Microbiol Lett, 1991 ,65(3): 283-286.
- [17] D Zhou, W Ping, J Sun, B Zhang, C Wang, and X Guo . Breeding of Yeast for Beer Manufacturing by Inactivated Protoplast Fusion[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 1999 , 39(5): 454-460.
- [18] AJ Morgan.Yeast Strain Improvement by Protoplast Fusion and Transformation[J].Experientia Suppl, 1983 (46) :155-166.
- [19] JM Delgado and LS Herrera.Protoplast Fusion in the Yeast *Candida Utilis*[J].Acta Microbiol Acad Sci Hung, 1981 , 28(4): 339-345.
- [20] CT Evans and D Conrad. An Improved Method for Protoplast Formation and Its Application in the Fusion of *Rhodotorula rubra* with *Saccharomyces cerevisiae*[J].Arch Microbiol, 1987 ,148(1):77-82.
- [21] E Reeves, K Kavanagh, and PA Whittaker.Multiple Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Protoplast Fusion [J].FEMS Microbiol Lett, 1992 ,78(2-3): 193-197.
- [22] XY Pang, JY Wang, and FS Zhao. Construction of Yeast Fusants of Directly Transform Starch into Ethanol[J].Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2001 ,17(2):165-169.
- [23] AS Gupthar.Segregation of Altered Parental Properties in Fusions between *Saccharomyces cerevisiae* and the D-xylose Fermenting Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* [J].Can J Microbiol, 1992 ,38(12): 1233-1237.
- [24] 高年发,李小刚,杨枫.葡萄及葡萄酒中的有机酸及降酸研究[J].中外葡萄与葡萄酒 ,1999 (4) 6-11.
- [25] 杜连祥,等.工业微生物实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.
- [26] 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) :454-460.
- [27] 赵华.原生质体紫外诱变提高生香酵母产酯能力的研究[J].天津微生物 ,1996 (2) :13-18.
- [28] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:中国轻工业出版社,1986.
- [29] 唐孝宣,肖信发,徐克宁.微生物原生质体融合技术的进展[J].工业微生物 ,1987 ,17(5) 23-29.
- [30] 黎碧莲,涂桂洪.酿酒酵母与扣囊拟内孢霉属间原生质体融合的研究[J].暨南大学学报(自然科学版).1998 ,19(5) : 120-124.
- [31] 甘志波,赵学慧.酿酒酵母 RasseXII 原生质体的形成与再生[J].微生物学杂志.1994 ,19(5) :12-16.
- [32] 郭秀军,郭立志,等.酵母融合菌株的构建及其特性研究[J].生物工程学报(增刊),1996 ,12 :254-260.
- [33] 邱雁临,曾莹,等.原生质体融合子代的筛选和鉴定.生物技术[J].2003 ,13 (6)17-19.
- [34] 卫军,等.原生质体融合选育高产 β -胡萝卜素酵母菌[J].生物技术 ,2001 ,112 23-25.
- [35] 唐孝宣,肖信发,徐克宁.微生物原生质体融合技术的进展[J].工业微生物 ,1987 ,17(5) 23-29.
- [36] 明道绪.生物统计附试验设计[M].北京:中国农业出版社,1989.
- [37] Farahnak F Seki T, Ryll D DY et al ,Construction of Lactose-assimilating and High-ethanol-producing Yeast by Protoplast Fusion[J].Appl Environ Microbiol ,1986 ,51(2): 362-367.

中国食品工业协会声明

近来,中国食品工业协会白酒专业委员会和国家发展改革委等有关部门相继接到一些白酒骨干企业反映,有人以“中国中小企业技术合作协调中心”的名义,向白酒骨干企业广泛散发编制《中国白酒工业企业百强》说明的文件,招徕白酒企业刊登广告,收取广告费,还有人假借国家发展改革委和国家统计局等部门的名义反复拨打企业领导的电话、手机,索要广告费。

为此,中国食品工业协会白酒专业委员会声明,上述行为与国家发展改革委经济局、国家统计局工业交通统计司和中国食品工业协会白酒专业委员会无任何关系,该三家单位从未委托任何机构编辑出版白酒行业刊物,请广大白酒骨干企业谨慎处理。

中国食品工业协会白酒专业委员会
二〇〇五年五月十六日