

安琪超级酿酒酵母原生质体制备与再生条件研究

赵悦茗, 杜跃超, 罗 晨

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘 要: 应用正交试验研究预处理剂、酶种类和浓度、渗透压稳定剂和酶解时间对安琪超级酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 原生质体形成率和再生的影响。结果表明, 渗透压稳定剂在上述 4 种因素中对原生质体的形成和再生影响最大。最优组合为: 使用 β -巯基乙醇作预处理剂, 0.4% 蜗牛酶加 0.4% 纤维素酶, 使用 0.53 M 蔗糖做渗透压稳定剂, 28℃ 酶解 1 h。安琪超级酿酒酵母原生质体的形成率为 98.6223%, 再生率为 19.9904%。

关键词: 微生物; 安琪超级酿酒酵母; 原生质体; 制备与再生

中图分类号: TS261.1; Q93-3; TQ925 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2008)01-0017-04

Research on Protoplast Formation and Regeneration of "Angel Super Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)"

ZHAO Yue-ming, DU Yue-chao and LUO Chen

(College of Biological Science & Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The effects of pretreatment agents, enzyme type and density, osmotic pressure stabilizer and enzymeolysis time on protoplast formation rate (Fr) and regeneration rate (Rr) of "Angel Super Yeast" (*Saccharomyces cerevisiae*) were studied by orthogonal test. The results indicated that the osmotic pressure stabilizer had the strongest influence in the above four kinds of factors on protoplast Fr and Rr. The optimum conditions were summed up as follows: yeast cells which grow into the medium logarithmic growth phase were pretreated with 0.1% β -Mercaptoethanol, then 0.4% snailase and 0.4% cellulose were added at 28℃ for 1 h enzymeolysis by using 0.53 mol/L sucrose as osmotic pressure stabilizer. As a result, Fr reached 98.6223% and Rr reached 19.9904%.

Key words: microbe; Angel Super Yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; protoplast; formation and regeneration

在石油资源日益枯竭, 环境污染日益严重的形势下, 寻找新的可再生能源具有重大的战略及实际意义, 其中利用木质纤维素发酵生产燃料乙醇被认为是一种很有前途的方法。木质纤维素发酵生产乙醇分为一步法和两步法, 其中两步法需使用大剂量的纤维素酶, 在 18.9 美分/加仑的生产成本中, 纤维素酶生产占 9.85 美分/加仑^[1], 两步法同时也存在着酶解温度与发酵温度不统一等问题^[2]; 而利用一步法即物质联合生物加工 (consolidated bioprocessing, CBP) 生产成本仅为 4.23 美分/加仑, 不到两步法的四分之一。但一步法的难点在于寻找合适的发酵率高的菌株。

笔者拟采用酵母与白腐菌进行原生质体融合, 构建出生长速度快, 酒精耐受度高, 能用于直接发酵的新型工业菌种。安琪超级酿酒酵母, 具有耐高温 (主发酵温度 40~42℃)、耐酸 (pH2.5)、耐乙醇 (13% vol)、耐浓糖 (60% 葡萄糖) 等特点^[3], 是利用原生质体融合法构建

工程菌的理想亲本。本文利用正交试验方法, 探讨了安琪超级酿酒酵母原生质体制备和再生的最佳条件, 为下一步的原生质体融合提供了必要的技术准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

安琪超级酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 市售。

1.1.2 培养基

液体完全培养基 (YPD): 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L。

固体完全培养基 (YEPD): 在 YPD 中加琼脂 20 g/L, 同时加入 1 粒 (约 0.1 g) NaOH^[4]。

高渗固体完全培养基 (YEPDS): 在 YEPD 中分别加入 0.7 M NaCl, 0.6 M MgSO₄ 和 0.53 M 蔗糖。

以上培养基于 121℃ 灭菌 30 min。

基金项目: 北京林业大学生物学院本科创新基金资助。

收稿日期: 2007-09-26

作者简介: 赵悦茗 (1986-), 男, 北京人, 北京林业大学生物学院食品系在读本科生, 研究方向为食品发酵工程。

1.1.3 试剂

柠檬酸-磷酸缓冲液(CPB): 每 100 mL 含 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 36.85 mL 和 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液 63.15 mL。pH6.0, 分别内含 0.7 M NaCl(CPB- NaCl), 0.6 M MgSO₄(CPB- MgSO₄)和 0.53 M 蔗糖(CPB- 蔗糖)。

脱壁促进剂: 0.1 % L- 半胱氨酸 (L- Cys), 0.1 % - 巯基乙醇 (- ME), 0.5 % - 巯基乙醇 +0.5 % L- 半胱氨酸 (- ME+L- Cys), 内含 1 mg/mL 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na₂), 分别用 CPB- NaCl、CPB- MgSO₄ 和 CPB- 蔗糖配制。

1.1.4 酶制剂

酶制剂 1: 蜗牛酶: 2 %;

酶制剂 2: 蜗牛酶 + 纤维素酶: 0.4 % + 0.4 %^[5];

酶制剂 3: 蜗牛酶 + 纤维素酶: 2 % + 1 %。

分别用相应的缓冲溶液配制。蜗牛酶、纤维素酶 R-10 均购于拜尔迪生物技术有限公司。

以上酶制剂及预处理剂经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 生长曲线的测定

取斜面活化菌种接于含 50 mL YPD 的 250 mL 三角瓶中, 28 °C, 200 r/min 摇瓶培养, 每隔 2 h 测定其 OD₆₀₀ 值, 绘制生长曲线。

1.2.2 正交试验设计

以脱壁促进剂(A)、酶的种类和浓度(B)、渗透压稳定剂(C)和酶解时间(D)为设计因素, 每个因素选取 3 个水平, 用 L₉(3⁴) 正交表进行 4 因素 3 水平正交试验^[6], 共 9 种组合, 每种组合设置 3 个重复。

表 1 正交试验设计 L₉(3⁴)

水平	A 脱壁促进剂	B 酶的种类和浓度	C 渗透压稳定剂	D 酶解时间(h)
1	L-Cys	蜗牛酶 2 %	CPB-NaCl	1
2	β-ME	蜗牛酶+纤维素酶 0.4 % + 0.4 %	CPB-MgSO ₄	2
2	β-ME+L-Cys	蜗牛酶+纤维素酶 2 % + 1 %	CPB-蔗糖	3

1.2.3 原生质体的制备和再生

依据参考文献[7]的方法, 并作适当修改。取对数生长期的菌悬液 1.6 mL, 3500 r/min 离心 10 min, 用相应的渗透压稳定剂洗 2 次。取 1 mL, 用无菌水稀释到 10⁻⁵ 后, 取 100 μL 涂 YEPD 平板, 得“总菌数值(A)”。再次离心, 弃上清液, 加入相应的脱壁促进剂 1.6 mL, 先静置 10 min, 再 3500 r/min 离心 10 min, 除掉预处理剂后加入相应的酶制剂 1.6 mL, 摇匀后于 28 °C 温箱中 220 r/min 水解 1~3 h, 完成后 3000 r/min 离心 10 min,

加入相应的渗透压稳定剂后, 分别用水和相应的渗透压稳定剂稀释至适当倍数, 取 100 μL 涂 YEPD 平板得“未脱壁的细胞数(B)”及“酶处理后未脱壁的细胞数与原生质体再生的细胞数的和(C)”。

1.2.4 原生质体制备率和再生率的计算

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

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

2 结果与分析

2.1 安琪超级酿酒酵母生长曲线 见图 1)

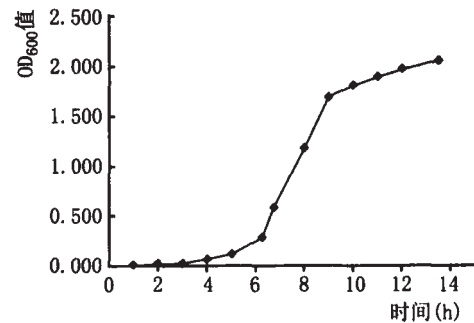


图 1 安琪超级酿酒酵母生长曲线

由图 1 的生长曲线可知, 安琪超级酿酒酵母的对数生长期为 6~9 h, 确定 7 h 为对数生长前期, 此时细胞壁对酶的作用敏感。

2.2 正交试验结果

将影响安琪超级酿酒酵母原生质体形成的几种因素的正交试验结果进行分析, 其结果见表 2。正交试验方差分析结果见表 3。

从表 2 可以看出, 影响安琪超级酿酒酵母原生质体形成的因素依次是: 渗透压稳定剂(C) > 酶的种类和浓度(B) > 酶解时间(D) > 预处理剂种类(A), 影响再生率的因素依次是: 渗透压稳定剂(C) > 酶的种类和浓度(B) > 预处理剂种类(A) > 酶解时间(D)。其中由值可见, 安琪超级酿酒酵母的原生质体最优形成条件为 A₃B₁C₂D₂, 最优再生条件为 A₂B₂C₃D₁, 但考虑到形成率相差不大(最小为 96.8889 %, 最大为 99.9806 %), 且在原生质体制备与再生试验中, 主要用形成率与再生率的乘积作为选择的指标^[8]。故选择乘积最高的组合 A₂B₂C₃D₁, 即选用 - 巯基乙醇作预处理剂, 酶种类和浓度为 0.4 % 蜗牛酶 + 0.4 % 纤维素酶, 使用 0.53 M 蔗糖做渗透压稳定剂, 酶解 1 h 为最优组合。

由表 3 可知, 因素 C, 即渗透压稳定剂在 4 个试验因素中对原生质体的形成与再生影响最为显著。选用最优组合进行试验, 得到安琪超级酿酒酵母原生质体形成率为 98.6223 %, 再生率为 19.9904 %, 乘积为 19.7150 %, 比正交试验中的最高值高出 7.3193 %。

表2 安琪超级酿酒酵母正交试验方案及结果分析^[6]

序号	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	原生质体形成率 (%)	原生质体再生率 (%)	乘积 (%)
1	1	1	1	1	99.9804	0.0298	0.0298
2	1	2	2	2	99.9806	0.0287	0.0287
3	1	3	3	3	97.2099	0.1524	0.1481
4	2	1	2	3	99.9942	0.0332	0.0332
5	2	2	3	1	96.8889	18.9602	18.3704
6	2	3	1	2	99.8595	0.0225	0.0225
7	3	1	3	2	98.9111	10.6318	10.5160
8	3	2	1	3	99.2519	0.3085	0.3062
9	3	3	2	1	99.9585	0.0005	0.0005
	-0.0580	0.5136	0.5823	-0.1724			
δ 形成	-0.2008	-0.4079	0.8628	0.4687			
	0.2588	-0.1057	-1.4450	-0.2964			
T 形成	0.4596	0.9215	2.3078	0.7651			
	-3.2816	0.2130	-3.2317	2.9782			
δ 再生	2.9867	3.0805	-3.3312	0.2091			
	0.2950	-3.2935	6.5629	-3.1873			
T 再生	6.2683	6.3740	9.8940	6.1655			
	-3.2039	0.2535	-3.1533	2.8607			
δ 乘积	2.8692	2.9623	-3.2520	0.2496			
	0.3347	-3.2158	6.4054	-3.1103			
T 乘积	6.0731	6.1781	9.6574	5.9711			

表3 正交试验方差分析结果

差异来源	方差	自由度	均方	F比	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
因素A	5.9329×10^{-5}	2	2.9665×10^{-5}	5.28*	3.37	5.53
因素B	6.1146×10^{-5}	2	3.0573×10^{-5}	5.44*	3.37	5.53
因素C	1.9383×10^{-2}	2	9.6917×10^{-3}	17.25**	3.37	5.53
因素D	5.7217×10^{-5}	2	2.8608×10^{-5}	5.09*	3.37	5.53
误差	1.0112×10^{-2}	18	5.6178×10^{-4}	-	-	-
总合	4.7265×10^{-2}	26	-	-	-	-

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.3 原生质体的观察^[9]

对得到的安琪超级酿酒酵母原生质体进行镜检观察,结果见图2和图3。

由图2可知,酵母处于对数生长期,细胞分裂旺盛。由图3可知,已形成原生质体的细胞由于缺少细胞壁反光,故颜色较未形成原生质体的细胞黯淡,且形状为非规则的球形。

3 讨论

3.1 预处理剂对酵母原生质体形成率与再生率的影响

- 巯基乙醇(-ME)为传统的制备酿酒酵母原生质体的预处理剂,但由于-ME对生物细胞存在一定毒性^[10],故本试验中设计使用了对细胞无毒害的L-半胱氨酸(L-Cys)作为备选预处理剂,但由试验结果可知,-ME在原生质体形成率与再生率方面均较L-Cys更有优势,故在最优组合中仍选用-ME为预处理剂,但应注意浓度与预处理时间。

3.2 酶的种类和浓度

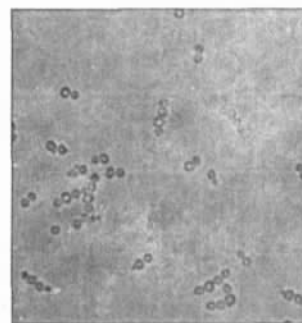


图2 酵母对数生长期细胞分裂情况

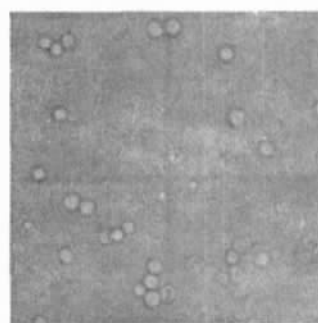


图3 原生质体细胞比较

由酶的种类和浓度可知,使用2%的蜗牛酶,原生质体形成率最高,但在其中再加入1%的纤维素酶后形成率并没有上升,并且再生率明显下降,推测可能是由于2%的蜗牛酶已能使绝大部分的酵母破壁,再加入纤维素酶会使原生质体表面残留的细胞壁进一步减少,从而造成再生率较低。研究报道,认为采用2%的蜗牛酶对酿酒酵母破壁效果良好,可不必添加其他酶^[11],但也

有学者认为单一酶的作用效果不如混合酶^[12]。由本次实验的正交试验结果(表2)可知,虽然0.4%蜗牛酶+0.4%纤维素酶形成率最低,但继续加大酶液浓度,形成率上升程度不大,且在该浓度下原生质体再生率最高。故笔者认为,若以原生质体的形成率与再生率的乘积作为判断指标,使用低浓度的混合酶效果要优于使用高浓度的单一酶。

3.3 渗透压稳定剂

由T值和方差分析可知,在设计4个因素中,渗透压稳定剂对原生质体的形成和再生影响最大。其中使用蔗糖做渗透压稳定剂,形成率最低,但再生率最高,分析可能由于蔗糖不仅可以作为渗透压稳定剂,同样是一种可被酵母利用的碳源,对酵母细胞起到了一定的保护作用,使酵母细胞可以较快恢复生长。这点从酵母在再生培养基上的生长速度亦可知(蔗糖培养基长出可见菌落约需24h, MgSO₄需36h而NaCl至少需60h)。

3.4 酶解时间

关于酶解时间,有学者认为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1h后,原生质体形成率均达到87%以上;再生率随酶解时间的增加而下降,其中在1.5~2h区间下降明显,2.5h后再生率几乎为零^[13]。本试验结论与之相同,在超过2h后,酵母的再生率远低于平均值。故选择1h为最佳酶解时间。

参考文献:

- [1] Lynd L R, Van Zyl W H, McBride J E, et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update[J]. Curr Opin Biotechnol. 2005, 16: 577- 583.
- [2] 于斌,齐鲁.木质纤维素生产燃料乙醇的研究现状[J].化工进展,2006,25(3): 244- 249.
- [3] 安琪超级酿酒酵母的特点[EB/OL].http://www.angel.com.cn/niangjiu/jiu1.htm.
- [4] Ausubel, F.M et al editor, Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1999. 550, 553.
- [5] 张建,高文静,谢慧,等.酒精酵母原生质体制备与再生条件研究[J].酿酒,2006,33(6): 40- 42.
- [6] 董如何,肖必华,方永水,等.正交试验设计的理论分析方法及应用[J].安徽建筑工业学院学报,2004,12(6): 103- 106.
- [7] 贾盘兴.微生物遗传学实验技术[M].北京:科学出版社,1992. 259- 262.
- [8] 魏明宝,张甲耀,王海,等.应用正交实验研究铜绿假单胞菌原生质体制备与再生[J].信阳师范学院学报(自然科学版), 2005,18(2): 169- 171.
- [9] 刘青,肖冬光,姜天笑,等.一种观察酿酒酵母原生质体的简易方法[J].酿酒科技,2005, (6): 123- 124.
- [10] 张华山,余响华,等.酿酒酵母与糖化酵母原生质体的形成与再生[J].武汉理工大学学报,2006,28(7): 27- 29.
- [11] 张华山,余响华,薛海燕,等.酵母属间融合构建直接转化淀粉生产燃料酒精的新型菌株[J].中国酿造,2006,(4): 28- 32.
- [12] 庞小燕,王吉瑛,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.
- [13] 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,(7): 51- 54.

贵州青酒集团新增万吨白酒扩建工程奠基仪式在青溪隆重举行



贵州省人民政府副秘书长陈训华讲话

方米。

配套新增不锈钢储酒灌、陶瓷酒坛、行车、酒甬、自动水处理设备、摊粮机、检测设备等设施设备。新征土地100亩。

项目计划总投资12413万元,其中固定资产投资10413万元。自筹资金1913万元,银行贷款6000万元,其他融资2500万元。

建设期:预计1.5年。

经济社会效益:项目建成达产后,可年产60%vol大曲基础酒6000吨,新增成品酒生产能力10000吨,年销售收入达到4亿元,新增税金5000万元,实现利润2000万元,新增就业岗位1000个。

奠基仪式后,领导、专家、经销商等对青酒集团的未来发展进行了座谈。(黄永光)

本刊讯:贵州青酒集团新增万吨白酒扩建工程奠基仪式于2007年12月16日中午1:30在黔东南州镇远县青溪隆重举行,贵州省人民政府副秘书长陈训华、贵州省经贸委副主任李保方、贵州省中小企业局局长龙超亚、黔东南州州委、州政府、地区人大、地区政协的领导及镇远县县委、县政府、县人大、县政协及相关政府职能部门的领导出席了奠基仪式。贵州省酿酒工业协会秘书长高士敏、副秘书长黄平等到会祝贺。

奠基仪式上省政府秘书长陈训华、黔东南州州委副书记、州长李飞跃发表了热情洋溢的讲话。青酒天津总经销刘家熙代表青酒销售商作了讲话。贵州青酒集团董事长文义长作了青酒集团新增万吨白酒扩建工程介绍。

青酒集团新增万吨白酒扩建工程建设内容:建设酿酒车间10个,发酵池1100口,建筑面积18000平方米;建设原辅材料库7200平方米,半成品库(洞藏酒窖)4000平方米;建设包装车间2栋(机械包装线4条),建筑面积8000平方米;建设10吨锅炉1台,建筑面积500平方米;总建筑面积37700平方米。



文艺表演