

# 细胞融合重组子酵母的研究

高瑞伦,周丽萍,张盛东,吴凡

(四川省成都市宏亿集团,四川 成都 610110)

**摘要:** 葡萄酒酵母 S.C.5 与克勒克柠檬形酵母 Klo 10 作为亲株进行属间融合,交换重组获得重组子 46510。生长繁殖快,能在 22 h 内达 3 亿个/mL 以上,很快进入厌氧后发酵,抑制许多需氧菌生长;在 25~32 °C 发酵 15 d,絮凝快,沉积紧,澄清透明,酒体醇厚圆润,酸甜适口;并可提高酒精度 2%;为酿造果酒提供了一个优良菌种。

**关键词:** 细胞融合;重组子;酵母

中图分类号:TS261.1

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2005)04-0038-02

## Research on Recon Yeast by Cell Fusion

GAO Rui-lun, ZHOU Li-ping, ZHANG Sheng-dong and WU Fan

(Chengdu Hongyi Group, Chengdu, Sichuan 610040, China)

**Abstract:** Recon 46510 was developed through intergeneric interfusion and exchange recombination of *Saccharomyces carlsbergensis* S.C.5 and its parent strain *Kloeckera apiculata* Klo 10. The recon grew and propagated rapidly (its quantity achieved 0.3 billion/mL within 22 h), and then marched into anaerobic fermentation stage quickly, which could inhibit the growth of lots of aerobe. In addition, it flocculated rapidly and deposited tightly after 15 d fermentation under 25~32 °C, which could make wine clear and transparent with mellow and enjoyable taste and increase wine alcoholicity by 2%. The recon was quality bacteria species for fruit wine manufacturing. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** cell fusion; recon; yeast

细胞融合是遗传重组培育菌种的一项技术。Sipiczki 等(1976)首次报道裂殖酵母的融合成功,之后在国内外有酿酒酵母与乳酸克鲁维酵母、酿酒酵母与耐高渗酵母、糖化酵母与高絮凝酵母、啤酒酵母与产朊假丝酵母等在种间、属间的融合成功的报道。

本文以葡萄酒酵母与克勒克氏酵母(*Kloeckera apiculata*)进行属间细胞融合,已取得重组子酵母,现报道如下。目的是让同仁智士从培育优良菌种入手,改善果酒品质,把果酒发展推向一个新台阶。

### 1 材料

出发亲株:*Saccharomyces carlsbergensis* NO.5(以下简称 S.C.5)及 *Kloeckera apiculata* NO.10(以下简称 Klo10)由宏亿集团技术中心微生物研究室提供。

蜗牛酶(Snailase):北京百泰生物技术公司出品。

聚乙二醇(PEG):成都科龙化工试剂厂(分析纯)出

品。

巯基乙醇(ME):成都科龙化工试剂厂(分析纯)出

品。

酵母膏:北京双旋微生物培养基制品厂出品。

琼脂粉:北京微生物试剂有限公司出品。

蛋白胨:北京奥博星生物技术责任有限公司出品。

葡萄糖:成都金山化工试剂厂(分析纯)出品。

牛血清白蛋白:上海百奥生物科技有限公司出品。

乳糖:成都科龙化工试剂厂(分析纯)出品。

枇杷汁:由宏亿集团技术中心微生物研究室自制。

蔗糖:成都金山化工试剂厂(分析纯)出品。

CaCl<sub>2</sub>:成都科龙化工试剂厂(分析纯)出品。

MgCl<sub>2</sub>:成都科龙化工试剂厂(分析纯)出品。

### 2 细胞融合方法

2.1 先试验选定具有遗传标记的出发菌株(S.C.5 及 Klo 10),分别接种于 YPD 液体培养基(酵母膏 0.6%,蛋白

收稿日期:2004-08-02

作者简介:高瑞伦(1931-),男,高级工程师,从事生物技术研究 40 余年,获农业部科技进步二等奖 1 项,四川省科技进步二等奖 1 项,发表论文 70 余篇。

豚 0.8% ,葡萄糖 2% )中,在 32℃ 培养 24 h (达 3 亿个/mL),放入尖底离心管,离心(3000 r/min, 30 min),收集沉降菌体。

2.2 按收集菌体与 SMM 稳定液(蔗糖 103 g/L, MgCl<sub>2</sub> 2.03 g/L, pH 6.7)1:1 等量混合在 32℃ 感受 1 h, 离心(3000 r/min, 10 min),收集沉降菌体,配成 5 mL SMM 菌悬液。

2.3 取菌悬液 1 mL+SMM 稳定剂 1 mL,稀释成 2×10<sup>-6</sup>/0.1 mL,接种在 YPD 平板上,在 32℃ 培养 24 h,计数其未经酶处理的总菌落数。

2.4 加酶剥除细胞壁:加 3% 蜗牛酶溶液 1 mL(相当于 30 mg),再加 ME 0.2% 0.5 mL 置 34℃ 水浴锅中酶解 1.5 h,镜检原生质球形成。

2.5 离心(2000 r/min, 10 min),收集原生质体化沉降物,配成 5 mL SMM 悬浮液。稀释成 10<sup>-5</sup>/0.1 mL 或 10<sup>-6</sup>/0.1 mL,接种于 YPD 平板上,在 32℃ 培养 24~48 h,计数其经酶处理后的菌落数。

2.6 分别取原生质体化各亲株(S.C.5 及 Klo 10)1 mL,混合后加入 PEG(4000)1.8 mL,加 SMM 液 0.2 mL,加 CaCl<sub>2</sub>(3.68%)1 mL,加 1% 牛清白蛋白 1 mL,混合后在 36℃ 水浴锅中融合 30 min,离心(2000 r/min, 10 min),收集沉降融合子。

2.7 融合子加 SMM 液 5 mL,稀释成 10<sup>-5</sup>/0.1 mL,分别接种于 YPD 及 CMS(再生培养基:蔗糖 17%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%,琼脂 2%——是酵母菌专用)平板上铺匀,又再用相同 YPD 及 CMS 培养基 6 mL 覆盖一层(45~50℃ 时加),在 32℃ 培养 24~48 h,选出重组子菌落。

2.8 分别选定重组子菌落,在 YPD 及 CMS 斜面试管上移传 2~3 代或在 YPD 与 CMS 培养基上交叉遗传 2 代,进行重组子鉴定。获得两个以上遗传标志,叫重组子。

### 3 重组子检定(见表 1)

### 4 讨论与结论

4.1 据文献<sup>[1]</sup>记载 *Kloeckera* 酵母是柠檬形酵母的典型代表。虽说是称之为野生酵母,然而确确实实在酿酒中,十之八九都有其柠檬形酵母参与(果中带有此菌)。柠檬形酵母既有发酵作用,又有氧化功能。其有害方面是:产酒精少(4%~5%),耐酒精度高(11%~12%),使果酒变酸,酒液微浑。但繁殖快,繁殖一代周期只需要葡萄酒酵母的一半时间,初始时大大超过葡萄酒酵母;适温范围广(25~32℃)等,这是可利用之处。针对此点出发,选 Klo 10 与葡萄酒酵母 S.C.5 作出发亲株,两亲株进行融合,使之交换重组,获得重组子 46510。46510 重组子的遗传标记为:

① 生长繁殖快,能在 22 h 以内达 3 亿个/mL 以上,很快转入厌氧发酵,抑制许多需氧菌生长,纯洁了发酵环境。

② 在 25~32℃ 自然温度下发酵 15 d,絮凝快,沉积紧,酒液澄清明亮。

③ 赋有醇厚圆润、酸甜可口的果酒口感(残糖在 0.11% 以下)。

④ 产生酒精度提高 2% 以上(指在相同含糖的条件下)。

4.2 46510 重组子在液体浅层培养时,14 h 后长一层白色似孢子样菌体,附管壁一圈,深层培养时却未见此现象。

4.3 46510 重组子在 25~32℃ 培养产生的 CO<sub>2</sub> 很多,经常冲脱塞子。

4.4 46510 重组子需生物营养物质尚不够稳定,可能与 Klo 10 亲本类型有关。待后进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 赫尔姆特,等. 宋尔康译,翁呈华校. 葡萄酒微生物学(第一版)[M]. 北京:轻工出版社,1989.
- [2] 焦瑞身,等. 生物工程概论(第一版)[M]. 北京:化学工业出版社,1991.
- [3] 焦瑞身,等. 细胞工程(第一版)[M]. 北京:化学工业出版社,1989.
- [4] 郑善良,等. 微生物学基础(第一版)[M]. 北京:化学工业出版社,1992.
- [5] 陈陶声,等. 微生物学工程(第一版)[M]. 北京:化学工业出版社,1987.

表 1 遗传标记

项目	出发菌株		重组子
	S.C.5	Klo 10	
乳糖	+	-	+
絮凝性	絮凝快,澄清	絮凝慢,微混	絮凝快,沉底紧,澄清明亮
适温(℃)	15~20	25~32	25~32
生长	一般	很快	很快
赖氨酸	-	+	-/±
形态	圆形,椭圆形	小圆形,两断尖形	圆形,椭圆形,尖圆形
口感	一般	不好	(醇厚圆润,酸甜可口)很好
酒精度(%)	10	5	12

热烈祝贺《酿酒科技》获第三届全国期刊奖百种重点期刊