

酿酒酵母与粟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

高年发^{1*} 王淑豪² 李小刚¹ 杨 枫¹

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222) (天津大学化工学院生物化工系 天津 300072)

摘 要 采用赖氨酸缺陷型酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)L1 原生质与肌醇缺陷型粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)PM-5 原生质体融合选育了葡萄酒发酵性能良好且具有降解苹果酸能力的酵母菌株。对融合子菌落形态、遗传稳定性、降解苹果酸能力和葡萄酒发酵性能进行了研究。结果表明:用促融合剂[30% 聚乙二醇(MW6000)0.02mol/L CaCl₂ 和 17g/100mL 蔗糖]处理两亲本进行属间融合,获得 19 株融合子,融合率为 $4.7 \times 10^{-6} \sim 3.1 \times 10^{-7}$ 。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,证实了其杂种特征。

关键词 粟酒裂殖酵母 酿酒酵母 原生质体融合 融合子

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0718-05

在国内一些葡萄酒产区,由于成熟期多雨和平均气温低等不良条件均会引起葡萄中过多有机酸,从而使葡萄酒有酸涩感,酒味粗硬品质下降,所以降低酒中的有机酸,一直是酿酒师们研究的课题^[1,2]。目前,生产上采用两种方法达到降酸的目的:(1)速冻工艺。先添加晶种,速冻生成酒石沉淀,需要消耗大量能源从而使成本升高。(2)苹果酸-乳酸发酵。发酵后期添加乳酸细菌使葡萄汁中的苹果酸转变成乳酸和 CO₂ 从而降低酸度,往往减低酒的新鲜果香味,影响酒质。近年来,葡萄酒研究者把目标移向能分解苹果酸的粟酒裂殖酵母^[3],但是,葡萄酒是非纯种发酵,粟酒裂殖酵母因发酵速度慢,易被其它酵母所抑制,因此采用它发酵生产葡萄酒是不现实的。自 1977 年 Sipiczki 与 Ferenczy^[4]首次实现酵母菌的原生质体融合以来,相继做了酵母种间和属间的原生质体融合研究^[5~14]。但是采用单灭活法的酵母属间原生质体融合选育酿酒性能好,分解苹果酸强的酿酒酵母菌株未见报道。本研究通过酿酒酵母与粟酒裂殖酵母属间原生质体融合,获得了葡萄酒发酵性能好且具有降酸能力的融合子,具有工业应用价值。

1 材料与方 法

1.1 菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)L1 是从中

国长城葡萄酒有限责任公司使用的法国活性干酵母中分离纯化获得的酵母 A4,经细胞诱导产孢子后,酶解子囊壁获得的遗传性状稳定的单倍 D-22(α 型),再经紫外线(15W,波长 2537Å,距离 30cm)照射 120s,筛选获得的赖氨酸缺陷型 L1(Lys⁻)。粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)PM-5 为肌醇缺陷型(Ino⁻),由中国科技大学生物系潘仁瑞教授赠送。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 YPG、基本培养基 MM^[5],添加 17%蔗糖后成 YPGS 和 MMS,添加 1%赖氨酸母液后成 MML,添加 1%肌醇母液后成 MMI。

1.2.2 YNP 再生培养基、无氮基本培养基、2 倍氮源基本培养基和限制培养基同文献[6]。

1.2.3 降解苹果酸鉴定培养基上层:葡萄糖 2g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, YNB 0.67mL,完全培养基 0.5mL,苹果酸 0.06g,溴酚蓝指示剂 5 滴,分装琼脂 0.8g,去离子水 100mL。

1.3 龙眼葡萄汁

含还原糖 14.5%,总酸 11.6%,由中国长城葡萄酒有限公司提供。

1.4 试剂

1.4.1 磷酸缓冲液—蔗糖溶液(PBS):pH5.8~6.0,蔗糖 17g/100mL。

1.4.2 2%蜗牛酶液和 1%溶壁酶液:用 PBS 溶液

配制 $0.45\mu\text{m}$ 膜过滤除菌。

1.4.3 EDTA-巯基乙醇溶液:25mL 0.05mol/L EDTA 与 1mL 0.5mol/L β -巯基乙醇混合液。

1.4.4 促融合剂(PEGC):聚乙二醇(6000)30%, CaCl_2 0.02mol/L,蔗糖 17g/100mL。

上述培养基及试剂除酶液外都于 115°C 灭菌 25min。

1.5 方法

1.5.1 单倍体细胞制备和营养缺陷菌株的筛选及鉴定^[15] 获得单倍体 D-2X(α 型),进行紫外诱变,用生长谱法检出赖氨酸缺陷型酿酒酵母 L1(Lys^-)。PM-5 为一株天然肌醇缺陷型菌株(Ino^-)。

1.5.2 原生质体的制备^[15] 将亲株 L1 和 PM-5 于 28°C ,120r/min 培养 12h 和 18h,各取 7mL 在 3000r/min 下离心 5min,PBS 溶液洗涤 2 次,收集菌体。L1 菌体悬浮于 7mL EDTA-巯基乙醇溶液中,于 30°C ,100r/min 振荡 20min,3000r/min 离心 5min,弃去上清液加入蜗牛酶溶液 7mL 于 30°C ,100r/min 振荡 0.5~1h。PM-5 菌体直接加入溶壁酶溶液 7mL,于 30°C ,100r/min 振荡 0.5~1h。当 90% 以上细胞为原生质体后,3000r/min 离心 8~10min,PBS 溶液洗涤 2 次,收集原生质体于 7mL PBS 溶液中,活菌计数法测定细胞数。原生质体形成率 = $\frac{A-B}{A} \times 100\%$,式中 A 为破壁前每 mL 细胞总数, B 为破壁后每 mL 剩余细胞数。

1.5.3 原生质体的再生^[15] 将原生质体分别涂布于高渗再生培养基上,于 28°C 培养 3~4d,计算再生率。原生质体再生率 = $\frac{C-B}{A-B} \times 100\%$,式中 A 和 B 同前, C 为每 mL 菌体原生质体再生细胞数。

1.5.4 原生质体融合^[8] 将 PM-5 原生质体悬浮液 2.5mL 在 60°C 水浴保持 40min,将 L1 原生质体和灭活的 PM-5 原生质体(10^6 个/mL)等量混合,加入 PEGC 溶液 5mL,于 35°C ,100r/min 振荡处理 30min,PBS 溶液洗涤 1 次,用 PBS 溶液适当稀释,取 0.1mL 悬浮液与冷却至 $45\sim 50^\circ\text{C}$ 的上层高渗再生培养基 5mL(YNBS)混合均匀,迅速倒入下层高渗再生培养基平板上,于 28°C 培养 5~7d。同时将两亲株的原生质体于高渗再生培养基平板上作对照实验,对照平板不长出菌落而融合平板上长出菌落,即为融合子。融合率 = $\frac{D}{C-B} \times 100\%$,式中 B 和 C 同前, D 为每 mL 融合子数。

1.5.5 融合子的筛选 在上述菌落平板上均匀涂布

一层降解苹果酸鉴定培养基的上层的指标培养基,于 28°C 培养 2~3d,呈现蓝色菌落的即为融合子。

1.5.6 融合子与亲株细胞培养特性、形态、大小和 DNA 含量测定同文献 [6]。

1.5.7 融合子降解苹果酸能力的测定 将检出的融合子接种于 YNB 基本培养基平板上,再将降解苹果酸鉴定培养基的上层倾入平板,于 28°C 培养 2~3d,呈现蓝色菌落。

1.5.8 融合子与亲本的葡萄酒发酵及降解苹果酸性能的测定:将活化的融合子于完全培养基中, 28°C ,120r/min 培养 12h 和 14h,离心收集菌体,分别接入龙眼葡萄汁中,调整菌体浓度为 $10^6\sim 10^7$ 个/mL 20°C 封闭发酵,测定各菌株的发酵率(以降糖量计)滴定酸度变化(以酒石酸计)以及感官品尝。

1.5.9 细胞形态图像采集 在显微镜下,用 CCD 摄像机采集图像,通过图像采集卡将图像输入计算机,形成图片。细胞形态均放大 400 倍。

2 结果与讨论

2.1 亲本遗传标记的确定

将酿酒酵母 A-4 细胞诱导产孢后,酶解子囊壁获单倍体 D-22 株细胞,采用紫外线(15W , 2537\AA ,距离 30cm)照射 120s 筛选出单倍体菌株 L1 的细胞形态如图 1 所示。

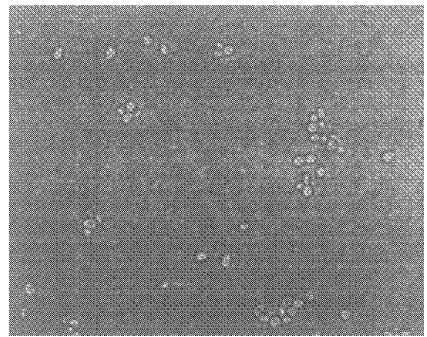


图 1 L1 的细胞形态

Fig. 1 Morphology of strain L1

将蘸有分组氨基酸混合液小纸片分别放于含 L1 菌的 MM 平板上,培养结果见图 2。可见,仅小纸片 2 周围有菌圈,由生长谱法可以确定 L1 为赖氨酸缺陷型,传代实验确认菌株遗传标记稳定,交配型测定为 α 型。

粟酒裂殖酵母是单倍体营养细胞,以裂殖方式进行无性繁殖,仅在某些特定的条件,如氮源枯竭或低温保存条件下发生接合而生产孢子^[9]。这些孢子在适当温度和营养条件下,萌发为单倍体营养细

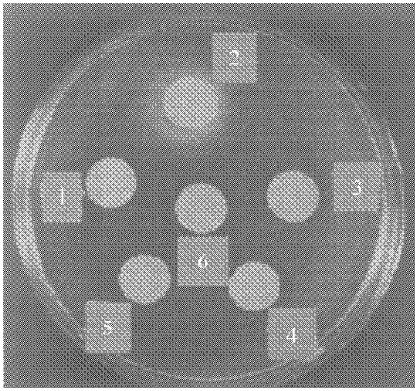


图 2 L1 赖氨酸缺陷型的检出

Fig.2 Determination of Lys^- of strain L1

胞,以裂殖方式进行繁殖。其形态呈椭圆和短圆柱状(见图3),经营养缺陷型检出于肌醇缺陷型,如图4所示。由图4可见,蘸有肌醇水溶液的小纸片A周围有菌圈,而蘸有去离子水的小纸片B无菌体生长,因此可以确定PM-5为肌醇缺陷型。

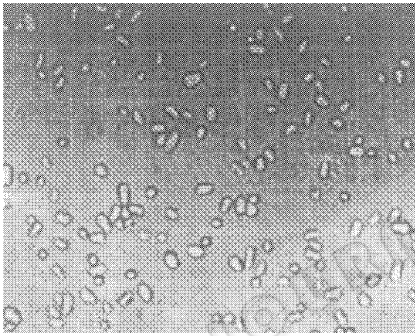


图 3 PM-5 菌的形态

Fig.3 Morphology of strain PM-5

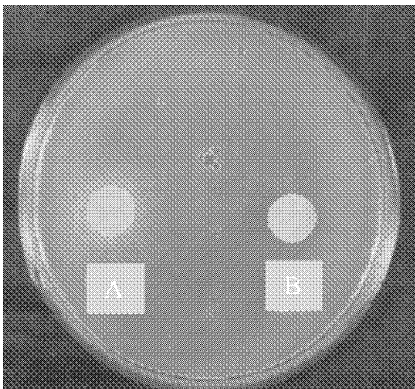


图 4 PM-5 肌醇缺陷型验证

Fig.4 Determination of Ino^- of strain PM-5

2.2 原生质体的形成率和再生率

原生质体的形成率和再生率结果见表1。

2.3 融合子鉴定和分析

2.3.1 融合子的检出 利用营养缺陷和降解苹果酸

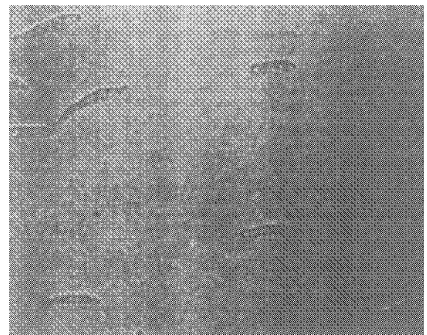
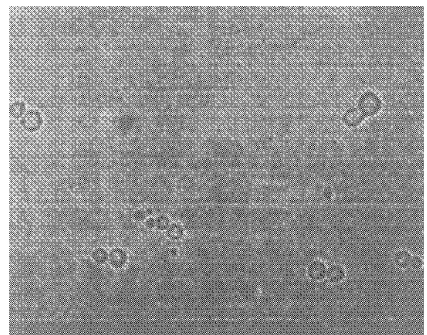
表 1 原生质体的形成率和再生率

Table 1 formation rate and regeneration rate of protoplast

Parental strain	Formation rate/%	Regeneration rate/%	t/min	Enzyme concentration/%
L1	97.9	21.8	120	α (Snailase)
PM-5	98.1	30.6	90	β (Zymolyase)

特征筛选。对粟酒裂殖酵母PM-5进行热灭活,酿酒酵母为赖氨酸缺陷(Lys^-),无苹果酸降解能力。双亲原生质体经融合处理后,涂布于高渗再生培养基上,于28℃培养3~4d,长出菌落覆盖降解苹果酸鉴定培养基,蓝色菌落即为融合株。L1在缺乏 Lys 的高渗再生培养基平板上不生长,即使回复突变,在降解苹果酸鉴定平板上不能降解苹果酸,使菌落变蓝。PM-5在缺乏 Ino 的高渗再生培养基平板上不生长,虽能在高渗再生培养基和降解苹果酸鉴定平板上使菌落变蓝,但它已被热灭活,从而淘汰两亲本及同源融合产物,筛选出融合株。

共检出融合子19株,融合率为 $4.7 \times 10^{-6} \sim 3.1 \times 10^{-7}$,经初筛和复筛获得2株优良性状的融合子 F_4, F_8 。两种典型的融合子细胞形态见图5和6。

图 5 融合子 F_6 细胞形态Fig.5 Morphology of fusant F_6 图 6 融合子 F_8 细胞形态Fig.6 Morphology of fusant F_8

由图 5 和图 6 可见,融合子细胞形态明显与亲株不同。F₈ 呈圆形,形态上与亲株 L₁ 相似,但体积明显增大。F₆ 呈“豆角”形,较长,两端尖,细胞较大,倾向于亲株 PM-5。

2.3.2 亲本及各融合子培养特性、大小和 DNA 含量的比较 将检出的融合子连续传代(15 代)后,进行培养特性、大小和 DNA 含量的比较,其结果如表 2 所示。

表 2 亲本及各融合子培养特性、大小和 DNA 含量的比较

Table 2 Comparison of culture characteristics, volumes and DNA contents of parental strains and fusants

Strain	MM	MML	MMI	Cell volume (μm^3)	DNA content ($\times 2 \times 10^{-8} \mu\text{g}/\text{cell}$)
L1	-	+	-	22.8	1.4
PM-5	-	-	+	31.2	2.6
F ₁	+	+	+	52.7	3.6
F ₂	+	+	+	34.9	1.3
F ₃	+	+	+	65.4	4.8
F ₄	+	+	+	68.0	3.6
F ₆	+	+	+	42.6	10.2
F ₇	+	+	+	30.9	2.8
F ₈	+	+	+	63.8	3.4
F ₁₁	+	+	+	20.9	2.4

2.3.3 融合子和亲本降解苹果酸性能的测定 将融合子连续传代(15 代)后,接种于 YNB 基本培养基平板上,再将降解苹果酸鉴定培养基的上层倾入平板,实际结果见表 3 和图 7 所示。

表 3 融合子和亲本在降解苹果酸鉴定培养基上变色情况

Table 3 Color change of parental strains and fusants on malic acid medium

Strain	A4	L1	PM-5	F ₃	F ₄	F ₇	F ₈	F ₁₁
Color	White	White	Blue+++	Blue+	Blue++	Blue+	Blue++	Blue+

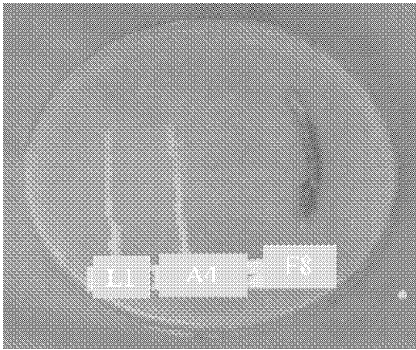


图 7 融合子 F₈, 亲本 L₁ 及葡萄酒酵母 A4 在降解苹果酸鉴定培养基上变色比较

Fig. 7 Comparison of color change of fusant F₈, parental strain L₁ and A4 on malic acid medium

由此可见, A4、L₁ 的菌体颜色为白色。F₈、F₄ 的菌体为蓝色,这时因为 F₈、F₄ 具有降解苹果酸能力从而导致其颜色由白色变为蓝色。

2.4 融合子与亲本的葡萄酒发酵及降解苹果酸性能的测定

将检出的融合子连续传代(15 代)后,具有降解苹果酸的能力,形态呈圆形和卵圆形,融合子与亲本的葡萄酒发酵、产醇和降酸性能,结果如图 8、9 所示。

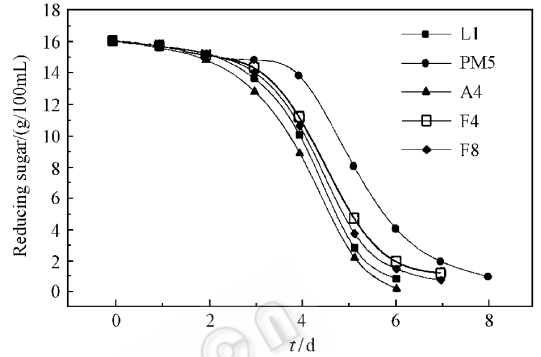


图 8 融合子与亲本的葡萄酒发酵性能

Fig. 8 Time course of glucose concentration in the fermented must of fusants and parental strains

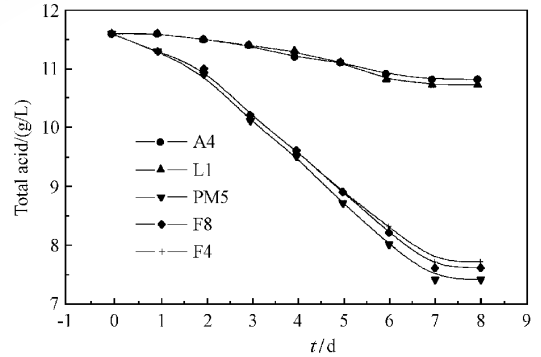


图 9 融合子与亲本的葡萄酒降酸性能

Fig. 9 Time course of glucose concentration in the fermented must of fusants and parental strains

由图 8、9 可见,融合子 F₄ 和 F₈ 发酵及降酸性能介于两亲株之间,其发酵性能接近亲株 L₁,而降酸性能接近亲株 PM5。

2.5 感官评价

在香气的评价上,对龙眼、贵人香品种,两融合子 F₄ 和 F₈ 发酵的酒均优于 PM-5 的酒,与 A4 和 L₁ 相近,表明是一个产香良好的菌种。

3 结论

对 PM5 原生质体作了不同方式的物理灭活进行融合,在预实验中设计了多种条件,最后确定了实

验方案,获得了19个融合子,其融合率与一般属间融合率 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 相一致。融合子筛选标记明确,有效的淘汰了同源融合产物。将两亲株的原生质体分别用融合条件处理,或未经融合条件处理的两亲株的原生质体混合物直接涂布于MMS平板,培养

后皆无菌落生长,从而排除了回复突变和由于两亲株原生质体混合后可能分泌营养成分至细胞外而达营养互补的可能。融合子经反复传代试验(15代),遗传性状稳定,发酵结果表明,融合子具有双亲本的优良性状。

参 考 文 献

- [1] 朱 梅,李文庵,郭其昌.葡萄酒工艺学,北京:中国轻工业出版社,1983
- [2] 朱宝镛.葡萄酒工业手册,北京:中国轻工业出版社,1995
- [3] 李记明,李 华,黄道平.微生物学通报,1999,26(3):198~200
- [4] Sipiczki M, Ferenczy L. *Molecular & General Genetics*, 1977, 151: 77~81
- [5] 张博润,王永红,刘书锋等.微生物学通报,1986,13(2):65~67
- [6] 楼纯菊,沈永强,焦瑞身.真菌学报,1985,4(2):118~124
- [7] 张 明,王元君,潘仁瑞.真菌学报,1996,15(3):204~209
- [8] 陈海昌,唐 屹,张岭花等.微生物学通报,1994,21(4):213~217
- [9] 文铁桥,赵学慧.菌物系统,1999,18(1):89~93
- [10] 文铁桥,赵学慧.微生物学报,1999,39(2):141~147
- [11] 周东坡,平文祥,孙剑秋等.微生物学报,1999,39(5):454~460
- [12] Benitez T, Ga sent-Ramirez J M, Castrejon F *et al.* *Biotechnol Prog*, 1996, 12: 149~163
- [13] Urano N, Sahara H, Koshin S *et al.* *J Biotechnol*, 1993, 28(2/3):237~247
- [14] Urano N, Sato M, Sahara H *et al.* *J Biotechnol*, 1993, 28(2/3):249~261
- [15] 杜连祥等.工业微生物实验技术,天津:天津科技出版社,1992

Construction of Yeast of Reducing Acid by Intergeneric Fusion between *Saccharomyces bayanus* and *Schizosaccharomyces pombe*

GAO Nian-Fa¹ WANG Shu-Hao² LI Xiao-Gang¹ YANG Feng¹

¹(Department of Food Engineering, Tianjin Institute of Light Industry, Tianjin 300222)

²(Department of Biochemical Engineering, College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract Intergeneric protoplast fusion between L1 (*Saccharomyces bayanus*) (Lys⁻) and PM-5 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Ino⁻) was studied. L1 has good fermentation capacity in winemaking and makes the wine with fragrant flavor, but total acid decreases hardly in the course of fermentation. PM-5 has strong capacity of reducing acid, but the fermentation rate of the strain is slower than PM-5. The protoplast of L1 was fused with the protoplast of PM-5 by treating with PEGC [30% PEG (MW6000) - 20 mmol/L CaCl₂ - 17g/100mL sucrose] for 30 min. 19 fusants was obtained, and the fusion frequency was $4.7 \times 10^{-6} \sim 3.1 \times 10^{-7}$. The fusants was tested in several aspects including cell morphology, physiological and biochemical feature, genetic stability and fermentation experiments. The result shows that the fusants greatly expressed fine properties of parental strains in reducing acid and fermentation speed.

Key words *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces bayanus*, intergeneric fusion, fusant