

酿酒酵母与酒类酒球菌融合子特性 及分子生物学研究^{*}

李 华, 游 玲, 刘晓晴, 刘延琳

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)与酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)的跨界融合子 F-20-7 进行抗生素筛选、降酸试验、生长试验等生产性能测试及相关基因鉴定研究。结果表明, 氨基青霉素对融合子的影响较小, 融合子对 L-苹果酸的降解率在 54.06%~78.81%, 在挑选出的融合子中仅有 4 株能够在 YNB、模拟葡萄汁及天然葡萄汁中生长, 其生长力较葡萄酒酵母差。PCR 扩增结果显示, 融合子质粒 DNA 中存在苹果酸-乳酸发酵的两个关键酶基因, 即苹果酸-乳酸酶基因 *MleA* 和苹果酸-乳酸通透酶基因 *MleP*, 测序结果表明 *MleP* 基因与 GenBank 中 *MleP* 基因序列的同源性高达 97%, 较好的解释了融合子的降酸行为。

[关键词] 酿酒酵母; 酒类酒球菌; 跨界融合子

[中图分类号] Q933

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0133-04

苹果酸是葡萄中常见的固定酸, 其含量过高会引起葡萄酒感官质量下降, 且苹果酸作为乳酸菌代谢的底物, 易引起葡萄酒的微生物病害, 因此降酸是葡萄酒酿造过程中必不可少的步骤^[1]。何忠宝^[2]于 2002 年首次采用跨界融合技术将葡萄酒酵母 1450 及酒类酒球菌 SD-2a 进行细胞融合, 并获得 1 株融合子 F-20-7。本研究以融合子 F-20-7 为材料, 对其进行抗生素筛选、降酸试验、生长试验等生产性能测试及相关基因鉴定, 以为细胞融合在超远缘杂交中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

菌种: 葡萄酒酵母 1450, 由轻工业部菌种保藏中心提供; 酒类酒球菌 SD-2a, 由西北农林科技大学葡萄酒学院筛选保存; 1450 与 SD-2a 的跨界融合子 F-20-7, 由西北农林科技大学葡萄酒学院保存。

培养基: YPD, YNB, 模拟葡萄汁, 天然葡萄汁。

主要仪器: 超净工作台、恒温摇床、霉菌培养箱、微波炉、天平、显微镜、-20℃及常温冰箱、高速台式离心机、高速冷冻离心机、UV-紫外分光光度计、自动 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统。

药品: 葡萄糖、L-苹果酸、柠檬酸、酒石酸、琼脂、酵母粉、蛋白胨、盐酸半胱氨酸、蜗牛酶、溶菌酶

EDTA、β-巯基乙醇、D-山梨醇、氨基青霉素、放线菌酮、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、顺丁烯二酸、PCRmix 试剂盒等。

1.2 抗生素筛选试验

在 YPD 培养基中分别加入 L-苹果酸 3 g/L, 氨基青霉素 20 μg/mL (酒类酒球菌致死质量浓度)、放线菌酮 50, 100 μg/mL (葡萄酒酵母致死质量浓度), 以 YPD 为对照, 接入融合子 F-20-7, 重复两次, 定期观察液体培养基的 CO₂ 失重情况和菌悬液 OD₆₀₀ 值变化情况, 以及平板生长状况。CO₂ 失重采用称重法, 在发酵过程中每天定时称重, 计算失重情况; OD₆₀₀ 值采用 UV-紫外分光光度计法。

1.3 降酸试验

在上述抗生素筛选固体平板上随机挑选 47 株生长势良好的单菌落, 编号进行活化及扩大培养, 并接种到苹果酸-乳酸发酵培养基 (YPD 液体 100 mL, 添加 3 g/L L-苹果酸、溴甲酚蓝指示剂) 中进行降酸试验, 根据指示剂颜色变化挑选出 pH 变化显著的 4 株菌株, 编号分别为 2-9, 2-19, 2-20 和 3-20。将这 4 株菌株接入含有 10 g/L 苹果酸的 YPD 培养基中, 28℃ 恒温发酵。在发酵过程中采用苹果酸-乳酸纸层析法监测发酵过程, 当层析纸上的乳酸斑点不再扩大, 苹果酸斑点不再减小时视为发酵结束; 然后采用 HPLC 法检测发酵液中 L-苹果酸和 L-乳酸

^{*} [收稿日期] 2006-01-10

[作者简介] 李 华(1959-), 男, 重庆梁平人, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄与葡萄酒研究。E-mail: putj@263.com

含量^[3]。

1.4 生长试验

分别在 YPD、YNB、模拟葡萄汁及天然葡萄汁中接种融合子 F-20-7, 观察其生长状况。

挑取融合子隔夜活化, 按 1% 接种量接种到 YPD 培养基中, 28 ℃、150 r/min 振荡培养, 每隔 1.5 h 取样测定其 OD₆₀₀, 绘制生长曲线。

1.5 相关基因定位

1.5.1 DNA 提取 葡萄酒酵母 1450 及融合子核 DNA 的提取参考文献[4]的方法, 酒类酒球菌 SD-2a 核 DNA 的提取参考文献[5]的方法, 质粒 DNA 的提取参考文献[6]的方法。

1.5.2 引物设计 针对苹果酸-乳酸酶基因 *MleA* 和苹果酸-乳酸通透酶基因 *MleP* 设计特异引物^[5]。

MleA 上游引物: 5'-CGG AAT TCA TGA CAG ATC CAG TAA GTA T-3';

MleA 下游引物: 5'-TAG GTA CCA CAC TCT CAA CAC TCG TAA T-3';

MleP 上游引物: 5'-GCG AAT TCA TGA ATG CTT TTA TTA CGA GT-3';

MleP 下游引物: 5'-TCG GTA CCA TTA GAC AAA CTG CAT CAA G-3'。

1.5.3 PCR 扩增 应用 PCR Taq Mix 试剂盒对提取的 8 个 DNA 样品进行 PCR 扩增。

反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 40 s, 56 ℃ 2 min, 72 ℃ 3 min, 29 次循环; 72 ℃ 15 min。

测序由上海英骏生物公司完成。

2 结果与分析

2.1 融合子抗生素筛选试验结果

由表 1 可以看出, 加入 100 μg/mL 放线菌酮的菌液 10 d 后仍然保持清亮, 平皿培养也无菌落出现, 表明融合子不能生长; 加入 50 μg/mL 放线菌酮的菌液生长也很少; 而加入氨苄青霉素后对融合子的影响较小, 表明融合子主要以酿酒酵母的遗传物质为主, 这与形态观察的结论一致。

表 1 融合子 F-20-7 的抗生素筛选试验结果

Table 1 Experiment of antibiotic on fusant F-20-7

培养基 Medium	重复 1 生长状况 State of growth 1			重复 2 生长状况 State of growth 2		
	CO ₂ 失重	OD ₆₀₀	平皿生长	CO ₂ 失重	OD ₆₀₀	平皿生长
YPD	4.052	2.181	+	4.521	2.063	+
YPD+Mal	2.602	2.057	+	-	-	-
YPD+Mal+ Amp	5.296	2.057	+	-	-	-
YPD+ Amp	5.740	2.107	+	3.870	2.075	+
YPD+ Chx2	1.478	0.219	-	1.938	0.323	-
YPD+ Chx1	1.964	0.260	-	1.676	0.355	-
YPD+Mal+ Chx1	1.454	0.288	-	3.376	0.727	-
YPD+ Amp Chx2	3.346	0.281	-	1.424	0.228	-
YPD+Mal+ Chx2	2.068	0.164	-	2.543	0.347	-
YPD+ Amp+ Chx1	3.349	0.449	-	2.007	0.220	-
YPD+Mal+ Amp+ Chx1	3.258	0.422	-	2.895	0.168	-
YPD+Mal+ Amp+ Chx2	2.695	0.346	-	1.054	0.312	-

注: Mal L-苹果酸 3 g/L; Amp. 氨苄青霉素 20 μg/mL; Chx1 放线菌酮 50 μg/mL; Chx2 放线菌酮 100 μg/mL; “-” 污染, 忽略不记; “+” 有生长; “-” 无生长。

Note: Mal L-malic acid 3 g/L; Amp. ampicillin 20 μg/mL; Chx1 cycloheximide 50 μg/mL; Chx2 cycloheximide 100 μg/mL; “-” contaminated, neglect; “+” growth; “-” no growth.

2.2 融合子降酸试验结果

在 54.06%~78.81%, 平均降解率为 68.54%。

从表 2 可以看出, 融合子对 L-苹果酸的降解率

表 2 融合菌株对苹果酸的降解情况

Table 2 Degradation of malic acid

融合菌株编号 Number of fusant	L-苹果酸/(g·L ⁻¹) Content of L-malic acid	L-乳酸/(g·L ⁻¹) Content of L-lactic acid	L-苹果酸降解率/% Degrading rate of L-malic acid
2.9	2.119	3.819	78.81
2.19	3.527	2.441	64.73
2.20	2.345	3.581	76.55
3.20	4.594	2.072	54.06

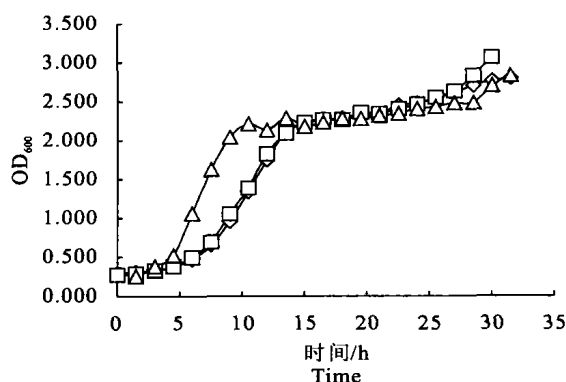


图1 融合子和葡萄酒酵母 1450 的生长曲线

- - - 融合子生长曲线 1; - □ - 融合子生长曲线 2;
- - - 酵母 1450 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of the fusant

- - - Fusant growth curve 1; - □ - Fusant growth curve 2;
- - - Wine yeast 1450 growth curve

2.3 融合子生长试验结果

观察发现, 所有融合子能够在 YPD 培养基中生长, 但仅有 2.9, 2.19, 2.20 和 3.19 这 4 个融合子

单株能够在 YNB、模拟葡萄汁及天然葡萄汁中生长。说明在融合过程中, 葡萄酒酵母 1450 丢失了部分生长代谢基因, 形成了一些生长缺陷型菌株。

由图 1 可以看出, 两个重复具有一致性。在培养 6 h 后进入对数生长期, 持续 8 h 左右到达稳定期, 之后曲线趋于平稳。与葡萄酒酵母 1450 相比, 融合子达到对数生长期的时间稍晚, 变化趋势较缓慢, 说明融合子的生长力较葡萄酒酵母差。

2.4 融合子相关基因鉴定结果

2.4.1 苹果酸-乳酸酶基因 *MleA* 葡萄酒酵母 1450、酒类酒球菌 SD-2a 及融合子 F-20-7 核 DNA 的 PCR 结果(图 2)表明: 仅酒类酒球菌 SD-2a 出现了大小约 1.6 kb 的条带, 说明融合子核基因中无 *MleA* 基因。

葡萄酒酵母 1450 及融合子 F-20-7 质粒 DNA 的 PCR 扩增结果(图 3)表明: 部分融合子(2.6, 2.20 和 2.9)出现了大小为 1.6 kb 的条带, 说明这些融合子的质粒中可能带有 *MleA* 基因。



图2 葡萄酒酵母、酒类酒球菌及融合子 F-20-7 核 DNA *MleA* 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplifies of Nucleus of DNA *MleA* between the parents and fusant

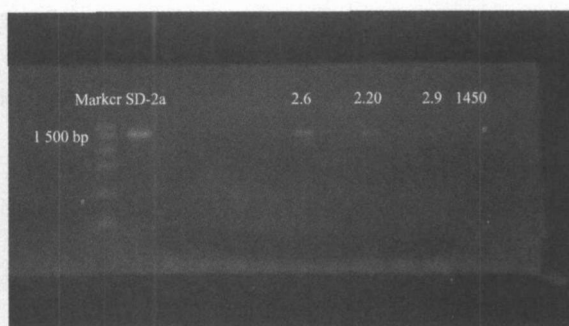


图3 葡萄酒酵母和融合子 F-20-7 质粒 DNA *MleA* 的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplifies of plasmid of DNA *MleA* between the parents and fusant

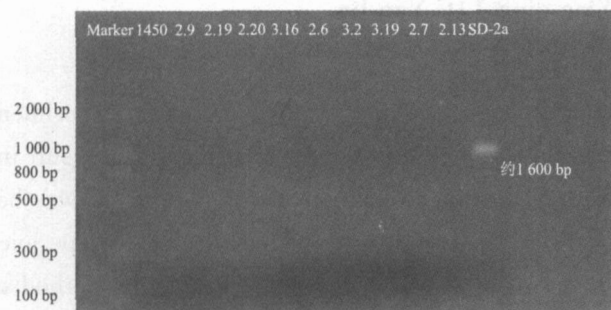


图4 葡萄酒酵母、酒类酒球菌及融合子 F-20-7 核 DNA *MleP* 的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplifies of Nucleus of DNA *MleP* between the parents and fusant

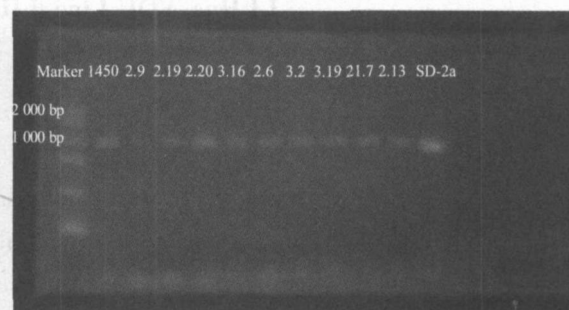


图5 葡萄酒酵母和融合子 F-20-7 质粒 DNA *MleP* 的 PCR 扩增结果

Fig. 5 PCR amplifies of plasmid of DNA *MleP* between the parents and fusant

2.4.2 苹果酸-乳酸通透酶基因 *MleP* 葡萄酒酵母 1450、酒类酒球菌 SD-2a 及融合子 F-20-7 核 DNA 的 PCR 扩增结果(图 4)表明: 仅酒类酒球菌 SD-2a 出现了大小为 1.0 kb 的条带, 说明融合子核基因中无 *MleP* 基因。

葡萄酒酵母 1450 与融合子 F-20-7 质粒 DNA 的 PCR 扩增结果(图 5)表明: 所有融合子都出现了与对照大小相同(约 1.0 kb)的条带。说明融合子质粒 DNA 中可能含有 *MleP* 基因。

2.4.3 PCR 产物测序结果 对 *MleA* 基因, 可能由于产物浓度过低未能测出; 对 *MleP* 基因, 融合子 2.20 质粒 DNA 测出 613 bp 的碱基序列, 与 GenBank 中编号为 gi|55793547|gb|AY786175.1|的苹果酸-乳酸通透酶基因的同源性高达 97%, 但其余碱基段因有复杂结构未能测出; 对照 SD-2a 核 DNA 也仅测出 621 bp 的碱基序列, 与 GenBank 中已发表序列的同源性为 98%。

3 结果与讨论

融合子 F-20-7 从 2002 保存至今, 虽然原始菌种污染严重, 但挑选的融合子单株仍具有良好的降酸性能, 证明融合酵母具有很好的遗传稳定性。从融合子质粒 DNA 得到苹果酸-乳酸通透酶基因, 与 GenBank 中登录的 *MleP* 基因序列同源性高达 97%。

本实验充分证明细胞融合作为跨界融合杂交育种的一种方法是可行的, 从食品安全的角度来说较转基因方法更可靠。后期可以考虑采用融合子与亲本再次融合, 并扩大筛选规模, 以得到融合了两个关键基因的稳定的融合子。

对融合子还可以考虑采用放射性同位素标记^[6]的 L-苹果酸, 跟踪 L-苹果酸在酵母细胞中的代谢过程, 如果能够在细胞膜内发现标记的苹果酸, 细胞膜外发现标记的代谢产物 L-乳酸, 则可以从代谢的角度证实融合子的功能, 这有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 李 华 现代葡萄酒工艺学[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2000
- [2] 何忠宝 原生质体融合构建葡萄酒降酸酵母的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2003
- [3] 王 华 葡萄酒分析检测[M]. 西安: 西安地图出版社, 2004
- [4] 刘玉方, 朱邦民, 蔡金科 酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶基因(PGK1)启动子片断的亚克隆[J]. 微生物学报, 1995, 35: 21-27
- [5] Zavaleta A J, Martinea Murcia A J, Rodriguez-Valera F, et al. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 1261-1267
- [6] Ausubel F M, Kingston R E, Seidman J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999: 39-42, 698-699

Study of the fusant between *saccharomyces cerevisiae* and *Oenos oeni*

L I Hua, YOU L ing, L IU Xiao-qing, L IU Yan-lin

(College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The fusant from *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenos oeni* was studied, including experiment of antibiotic, deacidification, growth experiment, and some interrelated genes were identified. The result indicated that, the influence of ampicillin was small, the L-malic acid degeneration rate of the fusant was between 54.06% - 78.81%, and only four fusants could grow in the medium of YNB, simulation grape juice and natural grape juice. Compared with the wine yeast, the growth was a little feeble. By the method of PCR amplifying, the key enzyme gene (*MleA* and *MleP*) was found in the plasmid of the fusant. The result showed that the homologous between gene *MleP* and the *MleP* gene of GenBank was up to 97%, explaining the behavior of fusant's deacidification.

Key words: *S. cerevisiae*; *O. oeni*; fusant