

高活力苹果酒酵母原生质体形成与再生条件研究^{*}

王林松,岳田利,袁亚宏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了优化高活力苹果酒酵母原生质体的形成与再生条件,利用酶解和超声波细胞脱壁两种方法,全面考察了菌龄、酶质量浓度、酶解温度、酶解时间、超声波功率、超声波温度、超声波作用时间等因素对原生质体形成和再生的影响,并对两种方法的脱壁效果进行了比较。结果表明: 超声波法脱壁效果优于酶解法; 优化的超声波法细胞脱壁的最佳条件为:菌龄 8 h,功率 240 W,温度 30℃,超声波作用时间 30 min; 采用优化的原生质体形成与再生条件参数时,原生质体形成率达到 95.21%,再生率达到 30.03%。通过试验可知,超声波法较酶解法操作简单,原生质体的形成率和再生率较酶解法均有一定的提高。

[关键词] 苹果酒酵母;原生质体;酶解法;超声波法;原生质体形成;原生质体再生

[中图分类号] TS262.7;TS261.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0194-05

Study on the conditions of protoplast formation and regeneration of high vigor cider yeast

WANG Lin-song, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to optimize the conditions of protoplast formation and regeneration of high vigor cider yeast, the effects of cell age, enzyme mass concentration, temperature of enzymatic hydrolysis, time of enzymatic hydrolysis, power of ultrasonic, temperature of ultrasonic, treating time of ultrasonic on protoplast formation and regeneration in cider yeast were systemically analyzed by using enzymatic hydrolysis and ultrasonic methods. The results showed: Ultrasonic was better than enzymatic hydrolysis on getting rid of cell wall. The optimum conditions by ultrasonic were: cell age 8 h, power 240 W, temperature 30℃, ultrasonic treating time 30 min. Under the optimum conditions, the formation rate of protoplast was 95.21%, and the regeneration rate of protoplast was 30.03%. It was concluded that ultrasonic was simpler than enzymatic hydrolysis in operating, and both the formation and regeneration rate improved distinctively compared with the enzymatic hydrolysis.

Key words: cider yeast; protoplast; enzymatic hydrolysis method; ultrasonic method; protoplast formation; protoplast regeneration

苹果酒是苹果汁发酵而成的健康饮品,其市场消费潜力巨大,但我国由于缺乏优良的苹果酒酵母及其配套的香气调控技术,使得苹果酒产业发展与市场需求之间严重失衡,并成为苹果酒产业快速

国际化发展的主要技术瓶颈。因此,选育与构建发酵性能、产香性能优良的高活力苹果酒酵母成为急需解决的关键技术。

自从 1953 年 Weibull 首次利用溶菌酶得到巨

^{*} [收稿日期] 2006-12-15

[基金项目] 农业部科技跨越计划项目“具有循环经济属性的苹果深加工产业链关键技术集成与示范”(2005-4.1);2005 年教育部新世纪优秀人才支持计划项目;陕西省科技重大专项(2006KZ09-G1);“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAKZ09-G1)

[作者简介] 王林松(1981-),男,陕西西安人,在读硕士,主要从事食品生物工程高新技术研究。

[通讯作者] 岳田利(1966-),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事食品生物工程技术及食品安全学研究。

大芽孢杆菌的原生质体以来^[1], Eddy, Emerson, Cocking 又以酶解法相继制备出了酵母菌、丝状真菌和番茄幼根细胞的原生质体^[2-3], 为微生物和植物的细胞融合开辟了道路。原生质体融合技术的不断发展进步, 使其已经成为一项非常重要的育种方法。

原生质体的形成与再生能力直接影响着融合率的高低, 进一步影响着目标菌株的选择^[4]。传统方法大多是通过酶解脱壁得到原生质体^[5], 而至今尚未见通过超声波法脱壁制备原生质体的报道。本文试图通过比较超声波法和酶解法脱壁的效果, 优化最佳的原生质体形成与再生条件, 旨在为后期原生质体融合构建新型高活力苹果酒酵母奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种 WF1-高活力苹果酒酵母由西北农林科技大学食品科学与工程学院发酵动力学实验室保藏。

1.1.2 培养基 完全培养基^[6]: 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L (固体加琼脂 20 g/L); 再生完全培养基: 在完全培养基的基础上加 170 g/L 蔗糖。

1.1.3 主要试剂 高渗缓冲液 (PBS) 由 0.2 mol/L、pH 8.0 的 PB 缓冲液加 1 mol/L 山梨醇, 0.45 μm 膜过滤除菌制得。蜗牛酶、0.05 mol/L EDTA-Na₂、1 mL/L β-巯基乙醇均用 PBS 溶液配制。

1.1.4 主要仪器设备 冷冻离心机 (美国 SIM 公司); SPX 智能型生化培养箱 (宁波市科技园区新江南仪器有限公司); BCN-1306B 生物洁净工作台 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); KQ-600DB 型数控超声波清洗器 (中国昆山市超声波仪器公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种生长曲线测定 将菌种进行液体活化, 取 5 mL 接种于 100 mL 液体完全培养基, 28 °C 恒温培养, 每隔 2 h 取样, 在 680 nm 波长下测定菌液的吸光度, 以时间为横轴、吸光度为纵轴绘制生长曲线。

1.2.2 菌种预处理 取活化好的菌液 5 mL 接种于 100 mL 液体完全培养基中, 28 °C 培养至对数生长期, 取 5 mL 种子液, 3 500 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 加入 0.05 mol/L 的 EDTA-Na₂ 和 1 mL/L 的 β-巯基乙醇各 1 mL, 28 °C 静置 10 min, 高渗缓冲液离心洗涤 2 次, 然后进行脱壁处理^[2]。

1.2.3 酶解法脱壁处理 无菌条件下, 将 20 g/L 蜗牛酶液加入装有菌体的离心管, 置于 30 °C 水浴中

酶解处理 60 min, 高渗缓冲液 2 500 r/min 离心洗涤 2 次, 作适当稀释后涂布于完全培养基平板, 28 °C 恒温培养, 2 d 后观察计数。

1.2.4 超声波脱壁处理 经过预处理后, 将装有菌悬液的离心管置于数控超声波清洗器中, 在功率 240 W 和温度 30 °C 条件下超声波处理 30 min, 然后作适当稀释后涂布于完全培养基平板, 28 °C 恒温培养, 2 d 后观察计数。

1.2.5 原生质体再生 将原生质体液作适当稀释后涂布于再生完全培养基平板, 28 °C 恒温培养, 2 d 后观察计数。

1.2.6 原生质体形成率与再生率计算^[7-8] 计算公式为: 原生质体形成率 = $(A - B) / A \times 100\%$; 原生质体再生率 = $(C - B) / (A - B) \times 100\%$ 。式中: A 为每 mL 对照菌液在完全培养基平板上长出的菌落数, mL⁻¹; B 为脱壁处理后每 mL 菌液在完全培养基平板上长出的菌落数, mL⁻¹; C 为脱壁处理后每 mL 菌液在再生完全培养基平板上长出的菌落数, mL⁻¹。

2 结果与分析

2.1 生长曲线特征分析

由图 1 可见, 在 28 °C 培养条件下, 当培养时间为 0~4 h, WF1 处于延迟生长期; 到培养的 4~14 h, 其处于对数生长期^[9], 这个阶段菌体对培养基的适应性增强, 自身代谢比较旺盛, 个体均一, 对外界环境比较敏感, 因此一般选择此阶段进行脱壁处理; 培养 14~20 h 进入稳定期, 此时酵母的细胞壁较厚, 性质比较稳定, 对各种外界刺激反应较小, 脱壁处理时形成率和再生率偏低, 因此, 一般不适合在此阶段进行脱壁处理。

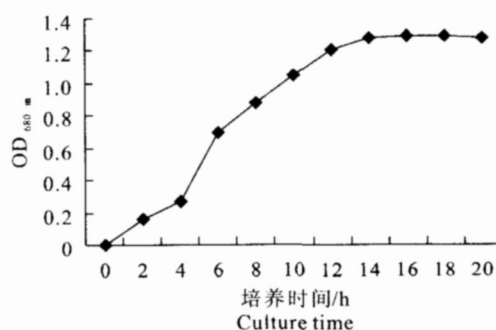


图1 WF1酵母在28 °C培养时的生长曲线

Fig.1 Growth curve of WF1 cultivated at 28 °C

2.2 菌龄对原生质体形成和再生的影响

图2显示, 在酶解脱壁试验中, 当酶质量浓度为

10 g/L、酶解温度为 30 、酶解时间为 60 min 时,原生质体形成率随菌龄的增加而减小,再生率随菌龄的增加先增大后减小;图 3 表明,超声波脱壁试验中,当功率为 240 W、温度为 35 、超声波处理时间为 30 min 时,菌龄对原生质体形成和再生的影响趋势和图 2 相似。这可能是因为在对数生长前期,菌体生长开始活跃,细胞壁比较脆弱,对外界环境较为

敏感,原生质体形成率较高,但在外界刺激使其细胞壁脱落的同时,还在一定程度上破坏了原生质体结构的完整性,使得再生率较低;在对数生长后期至稳定期,细胞壁结构趋于稳定和老化,导致再生率大幅度下降,且形成率也有一定的降低。综合图 2 和图 3 结果认为,后续试验的酵母菌龄选择 8 h 为宜。

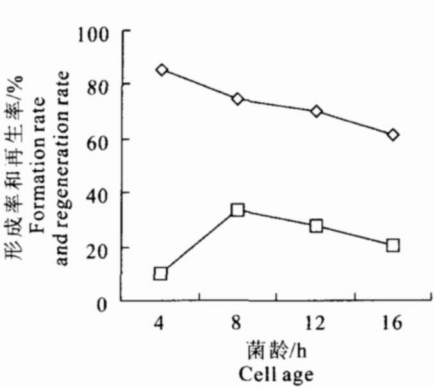


图 2 菌龄对酶解脱壁试验中原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 2 Effect of cell age on protoplast formation and regeneration in enzymatic hydrolysis experiment
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

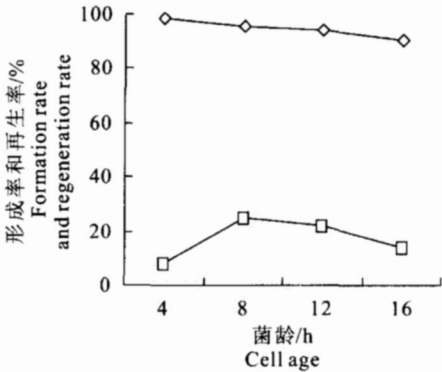


图 3 菌龄对超声波脱壁试验中原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 3 Effect of cell age on protoplast formation and regeneration in ultrasonic experiment
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

2.3 酶解脱壁条件的优化

2.3.1 酶质量浓度 由图 4 可见,当酶解温度为 30 、酶解时间为 60 min 时,随着酶质量浓度的增加,原生质体的形成率不断增大,再生率持续减小,尤其当酶质量浓度达到 25 g/L 时,再生率下降比较明显。这可能是由于酶中往往含有对原生质体有害

的酶类,随着酶质量浓度的增加,杂酶的质量浓度也随之增加,当杂酶达到一定质量浓度时,必然会影响到原生质体的活性^[10];另一方面,由于酶质量浓度的增加,会使细胞脱壁过于彻底,导致再生时细胞壁合成的引物被破坏^[11]。因此,后续试验选择酶的质量浓度为 20 g/L。

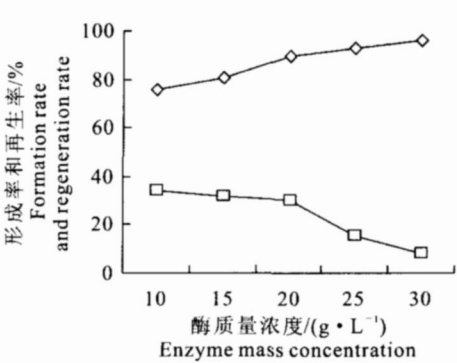


图 4 酶质量浓度对原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 4 Effect of enzyme mass concentration on protoplast formation and regeneration
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

2.3.2 酶解温度 由图 5 可知,当酶质量浓度为 20 g/L、酶解时间为 60 min 时,酶解温度对原生质

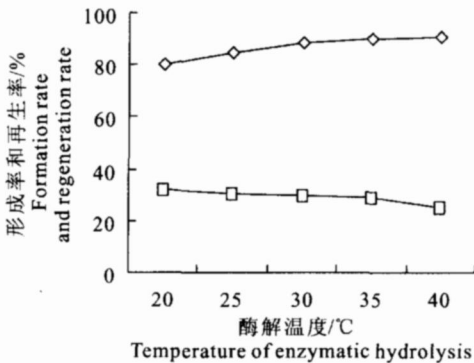


图 5 酶解温度对原生质形成与再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 5 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on protoplast formation and regeneration
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

体的形成和再生影响不大,这可能是由于选择的温度范围正好与蜗牛酶的活性范围相符所致。综合形

成率和再生率两方面因素,选择酶解温度为 35 ℃。

2.3.3 酶解时间 由图 6 可以看出,当酶质量浓度为 20 g/L、酶解温度为 35 ℃时,随着酶解时间的增加,原生质体形成率增大,再生率减小。酶解 90 min 时,原生质体的形成率为 92.80%,再生率为 29.68%,两项指标均达到较高水平;酶解 120 min

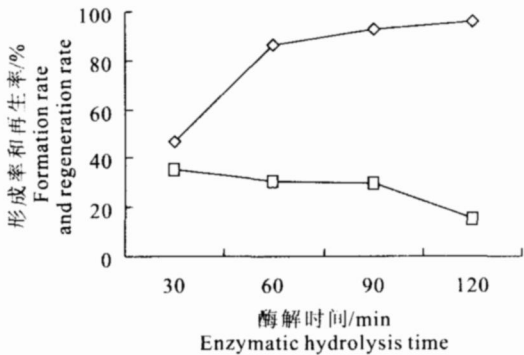


图 6 酶解时间对原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 6 Effect of enzymatic hydrolysis time on protoplast formation and regeneration
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

2.4 超声波脱壁条件的优化

2.4.1 超声波功率 由图 7 可知,当温度为 35 ℃、超声波作用时间为 30 min 时,原生质体形成率均超过了 95%,但是随着超声波工作功率的增加,再生率明显下降,原因可能是处理时间为 30 min 时,240 W 的功率已经足够使绝大多数的酵母形成了原生质体,继续增大功率,不但对原生质体形成率的提高作用不大,反而会破坏已经形成的原生质体的结构,使其再生能力降低。因此,后续试验选择超声波功

率 240 W。时,虽然原生质体的形成率达到 96.19%,但再生率仅为 14.98%,这可能是因为酶液中含有一些蛋白酶,酶解时间过长会对一些早期释放的原生质体膜造成损坏,从而导致原生质体破裂^[12]。因此,酶解时间以 90 min 为宜。

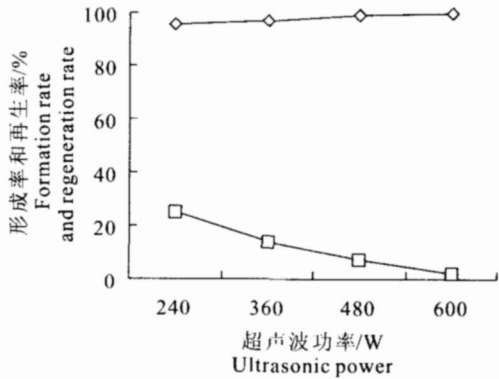


图 7 超声波功率对原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 7 Effect of ultrasonic power on protoplast formation and regeneration
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

率为 240 W。

2.4.2 超声波作用温度 图 8 结果表明,当超声波功率为 240 W、超声波作用时间为 30 min 时,随着工作温度的升高,原生质体的形成率略有上升,但涨幅不大;再生率随工作温度的升高先增大后减小,但变化趋势比较平缓。说明超声波处理的适宜温度为 25~40 ℃,其对原生质体形成和再生的影响不明显,考虑到酵母生长和酵母活性作的因素,综合形成率和再生率的大小,选择超声波处理温度为 30 ℃。

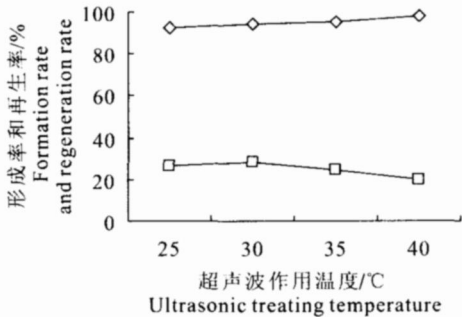


图 8 超声波温度对原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 8 Effect of ultrasonic temperature on protoplast formation and regeneration
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

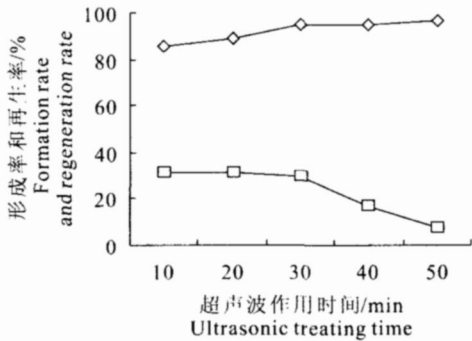


图 9 超声波作用时间对原生质体形成和再生的影响
- - -形成率; - □ -再生率

Fig. 9 Effect of ultrasonic treating time on protoplast formation and regeneration
- - - Formation rate; - □ - Regeneration rate

2.4.3 超声波作用时间 由图 9 可以看出,当超声波作用功率为 240 W、温度为 30 ℃ 时,随着超声波作用时间的延长,原生质体的形成率增大,再生率减小。处理时间为 0~30 min 时,超声波主要作用于原生质体的形成,对再生率的影响不大;处理时间为 30~60 min,形成率增幅不大,但原生质体的再生率明显降低,说明 30 min 为超声波处理的最佳时间,超声波作用时间超过 30 min,超声波会使早期形成的原生质体结构遭到破坏,导致原生质体的再生能力降低。

3 结 论

1) 酶解破壁较超声波法费时,而且处理后的菌液还需多次离心洗涤去酶,工序比较繁琐。

2) 超声波较酶解脱壁效果好,在其最佳条件,即菌龄 8 h、功率 240 W、温度 30 ℃、超声波作用时间为 30 min 时,原生质体形成率为 95.21%,再生率为 30.03%,均较酶解法有一定提高。

3) 本文重点考察了酶解法和超声波法脱壁时,菌龄、酶质量浓度、超声波功率及工作温度、时间等主要因素对原生质体形成和再生的影响,并未考虑菌体密度及渗透压调节剂等影响因素,这将是下一步研究的主要内容。

[参考文献]

- [1] 程东升,李国兰. 电诱导细胞融合仪的研制及在真菌原生质体融合中的应用[J]. 微生物学通报,1995,22(3):14-17.
- [2] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏,等. 酵母菌原生质体融合技术[J]. 西北农业学报,2004,13(1):101-103.
- [3] 唐孝宣,肖信发,徐京宁. 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.
- [4] 余沛涛,孙宇晖. 水稻悬浮细胞和油菜叶肉细胞融合的研究[J]. 江西农业大学学报,1993,15(1):12-15.
- [5] 罗立新. 细胞融合技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004:71.
- [6] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏,等. 优良苹果酒酵母的选育[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(5):81-84.
- [7] 甘志波,赵学慧. 酿酒酵母 *Rasse* 原生质体的形成与再生[J]. 微生物学杂志,1994,19(5):12-16.
- [8] 卫 军,陈春涛,王岁楼,等. 原生质体融合选育高产 β -胡萝卜素酵母菌[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版,2002,17(2):96-99.
- [9] Hilda R, Boris G, Odelsa A. Formation, regeneration, and fusion of protoplasts in a *Cellulomonas* strain[J]. *Current Microbiology*, 1991, 23:265-269.
- [10] 孙剑秋,周东坡. 微生物原生质体技术[J]. 生物学通报,2002,37(7):9-11.
- [11] 朱宏莉,宋纪蓉,张 嘉,等. 果胶酶产生菌 ZH-g 的原生质体形成与再生研究[J]. 食品科学,2006,27(8):68-71.
- [12] 周庆新,陈 静,于 恺,等. 疏松状嗜热丝孢菌原生质体的制备与再生[J]. 菌物研究,2006,4(2):1-5.

(上接第 193 页)

采用复合酶法制得的苹果籽油不仅出油率高,而且油的品质较好,可避免制油过程中营养成分的损失,其应用前景十分广阔。

[参考文献]

- [1] 于修烛,李志西,杜双奎. 苹果籽油脂脂肪酸组成分析初报[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(1):155-156.
- [2] 于修烛,李志西,杜双奎. 苹果籽油超声波辅助浸提及产品理化特性研究[J]. 农业工程学报,2005,21(9):155-159.
- [3] 李志西,李元瑞,于修烛,等. 苹果籽及其油的理化特性研究[J]. 中国油脂,2005,30(11):71-73.
- [4] 洪庆慈,汪海峰,杨晓蓉,等. 苹果籽营养成分测定[J]. 食品科学,2004,25(7):148-151.
- [5] 赵 兵,王玉春,欧阳藩. 超声波在植物提取中的应用[J]. 中草药,1999,30(9):1-3.

- [6] Hui Y H. 贝雷:油脂化学与工艺学(第四卷)[M]. 5 版. 北京:中国轻工业出版社,2001:115.
- [7] 魏义勇,李 珺. 水酶法提取玉米胚芽油的优化工艺研究[J]. 中国油脂,2005,30(8):17-19.
- [8] 杨慧萍,王素雅,宋 伟,等. 水酶法提取米糠油的研究[J]. 食品科学,2004,25(8):106-109.
- [9] 刘志强,贺建华,曾云龙,等. 酶及酶处理参数对水酶法提取菜籽油和蛋白质的影响[J]. 中国农业科学,2004,37(4):592-596.
- [10] 张惠敏. 低温萃取法提取杏仁油的研究[J]. 农业工程学报,2001,17(1):125-128.
- [11] Hamm W, Hamilton R J. Edible oil processing[M]. Sheffield England: Sheffield Academic Press,2000.