

苹果酒酵母菌的诱变试验^{*}

宋安东¹, 贾翠英², 陈红歌¹, 吴云汉¹

(1 河南农业大学 生物技术与食品科学学院, 河南 郑州 450002; 2 中国科学院 过程工程研究所, 北京 100080)

[摘 要] 以野生型苹果酒酵母菌 Y₀₂ 为出发菌株, 以 $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 注入剂量对出发菌株 Y₀₂ 进行诱变处理, 得到 1 株形态特征具有明显差别的特异突变株 DN^{II}-11 dry。发酵试验表明, 该特异突变株的产酒率比出发菌株提高 22.4%, 是一株优良的产苹果酒酵母菌菌株。对特异突变株与出发菌株在碳源同化、氮源同化、酵母菌体蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳等方面的研究结果表明, 特异突变株 DN^{II}-11 dry 是一株与出发菌株 Y₀₂ 有显著差别的优良菌株。

[关键词] 苹果酒; 酵母菌; 离子注入; 诱变处理

[中图分类号] TS261.1⁺1; S661.109⁺.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2004)04-0029-04

苹果作为我国的主产水果之一, 年产量近 2 000 万 t。目前苹果的销售以鲜食为主, 但还有大量的非优质鲜食类苹果, 如秦冠等需要进行深加工才能提高果农的收入。苹果中含有大量的糖类、丰富的氨基酸和维生素类, 以苹果为原料生产新兴的果酒——苹果酒, 是当前苹果深加工的一个重要途径^[1]。在苹果酒的生产过程中, 酵母菌的发酵性能直接决定了发酵产品的产量和质量。目前用于苹果酒生产的酵母菌, 多数存在产酒率低、产品风味欠佳的缺点, 诱变苹果酒酵母菌是解决这一问题的关键所在。

离子注入是 20 世纪 80 年代兴起的一种材料表面处理技术, 其具有能量沉积、动量传递、质量沉积、电荷中和与交换的联合作用, 从而对生物体有明显的诱变优势^[2,3]。我国科学工作者把离子注入这一高新技术率先应用于作物品种改良和生物效应研究, 获得了损伤轻、突变率高、突变谱广的结果, 为工农业生产选育高产、优质的新品种或新型基因材料提供了一个新方法^[4,5]。本研究采用离子注入法, 对河南农业大学生物技术与食品科学学院生物技术教研室筛选的苹果酒酵母菌 Y₀₂ 进行诱变处理, 同时对特异突变株的生物学特性进行了详尽研究, 获得了比出发菌株产酒率高 22.4% 的优良酵母菌菌株。

1 材料与方法

1.1 出发菌株^[6]

苹果酒酵母菌 Y₀₂, 由河南农业大学生物技术

与食品科学学院生物技术教研室从苹果渣中分离纯化获得。

1.2 离子注入法对酵母菌的诱变操作^[7]

每个无菌平皿中吸入 0.2 mL 在苹果清汁中培养 36 h 的苹果酒酵母菌 Y₀₂, 涂布均匀, 然后经无菌风吹干制成菌斑。采用 30 kV N⁺ 离子束源进行注入, 束流强度为 200 mA, 脉冲宽度为 400 μs , 脉冲频率为 25 Hz, 注入剂量为 $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 。离子机为俄罗斯生产的脉冲式全元素 Titan 离子机。

1.3 特异突变株发酵试验^[6]

对经离子注入诱变处理后的菌种进行涂布培养试验, 发现有特异突变菌落。在接种量为 7%, 20 $\text{pH} 5.0$ 的条件下, 对含糖 140 g/kg 的无菌澄清苹果汁进行发酵, 每天取样对发酵过程中发酵液的糖分、酒精度进行分析。

1.4 特异突变株的部分生物学特性研究^[8]

1.4.1 碳源同化试验 取 125 g/L 豆芽汁基础培养液, 分装杜氏管于 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min, 备用。测试的碳源(葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉)用无菌蒸馏水配成 100 g/L 的溶液, 煮沸 15 min, 稍冷却后用无菌吸管吸取一定量的糖液分装于杜氏管, 使糖浓度达 20 g/L。将新鲜培养的出发菌株 Y₀₂ 和最优突变株 DN^{II}-11 dry 分别接种于杜氏发酵管, 在 25~28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养, 每天观察小管顶部收集到的 CO₂ 气体, 持续 2~3 d。根据酵母菌能发酵某种糖类就一定能同化该糖的规律, 判断其同化碳源的

^{*} [收稿日期] 2003-03-31

[基金项目] 2003 年度河南省杰出人才创新基金项目(321001300); 河南省高等学校农业生物技术与工程技术重点开放实验室项目

[作者简介] 宋安东(1972-), 男, 河南宜阳人, 讲师, 博士, 主要从事发酵工程、环境与能源工程研究。

情况。

1.4.2 氮源同化试验 基础培养基: 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 酵母膏 0.2 g/L, 琼脂 20 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, 115 °C 灭菌 15 min, 制成无菌平板。挑取新鲜苹果酒酵母菌 Y_{02} 和最优突变株 $\text{DN}^{\text{II}}-11$ dry 的培养物各 1 环, 分别接入 1 mL 无菌生理盐水中, 摇匀制成细胞菌悬液。吸取一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 KNO_3 进行涂布, 再吸取一定量的菌悬液涂布, 同时设置对照(即无氮培养基)。将涂布好的平板于 25 °C 培养 2~3 d, 观察酵母的平板生长情况。

1.4.3 酵母菌菌体蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳 YPD 培养基。细菌培养用酵母抽提 10 g, 细菌培养用蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 细菌培养用琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。ESB 缓冲液配制: 20 g/L SDS, 80 mmol/L Tris HCl (pH 6.8), 100 g/L 甘油, 15 g/L 二巯基苏糖醇, 0.1 mg/mL 溴酚蓝。酵母菌的蛋白质提取。将苹果酒酵母菌 Y_{02} 和最优突变株 $\text{DN}^{\text{II}}-11$ dry 细胞接种到 5 mL YPD 培养基中,

过夜培养后获得 $\text{OD}_{600} = 2.0$ 的培养物。在冰浴上将该培养物转到含有 2 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L 叠氮化钠溶液的 13 mm 离心管中, 离心沉淀细胞。用 25 号针头吸出上清液, 再用 30 μL ESB 缓冲液悬浮细胞。快速转入离心管中, 于 100 °C 下保温 3 min, 使蛋白酶失活之后, 样品存放于 -20 °C 冰箱中。加入 0.1 g 的 0.2 mm 玻璃珠, 或装入玻璃珠直到液体刚好浸没, 剧烈振荡混合 2 min。加入 70 μL ESB 缓冲液, 稍加振荡, 置 100 °C 保温 1 min。取 5~20 μL 抽提液上样进行 SDS 凝胶电泳。

酵母菌蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳。样品先在 100 V 的浓缩胶中电泳后, 再在 220 V 的分离胶中电泳。电泳结束后拔出胶染色 3 h, 脱色 10 h, 然后观察电泳结果。

2 结果与讨论

2.1 特异菌落的发现

对出发菌株和特异突变株的菌落和形态特征进行平板和显微照相, 结果见图 1 和图 2。

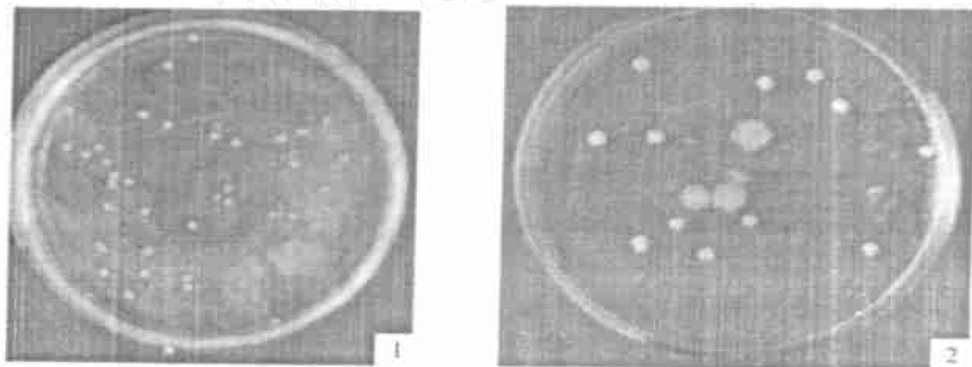


图 1 苹果酒酵母菌平板菌落观察

Fig 1 Plate colony of apple wine yeast

1. Y_{02} ; 2. $\text{DN}^{\text{II}}-11$ dry

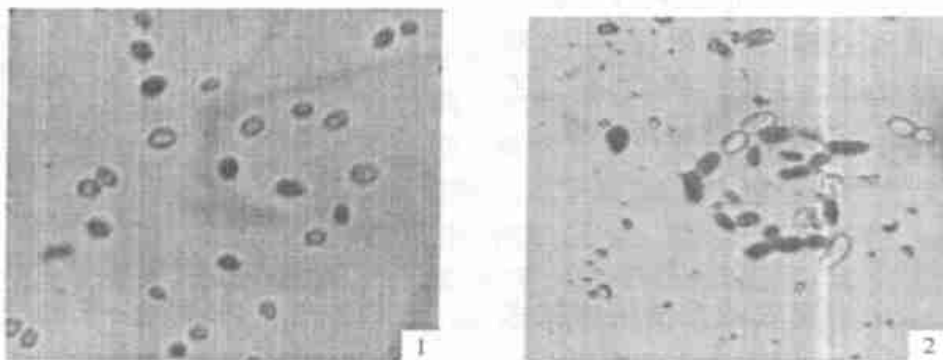


图 2 苹果酒酵母菌形态观察(10×40)

Fig 2 Morphology of apple wine yeast

1. Y_{02} ; 2. $\text{DN}^{\text{II}}-11$ dry

从图 1 可以看出, 原来苹果汁琼脂平板上有光泽、湿润、隆起、边缘整齐的酵母菌, 经过离子注入后出现了一些菌落边缘不整齐、表面干燥、无光泽的特异菌落, 记作 DN^{II}-11 dry。对特异突变株进行显微观察, 发现有的细胞形态发生了变化, 由原来的单个椭圆型细胞变成了 2~ 4 个连在一起并有分枝的酵

母菌形态(图 2)。这说明经过离子注入诱变后, 酵母菌形态特征发生了变化。

2 2 发酵试验

用出发菌株和特异突变株分别进行苹果酒的发酵试验, 结果见图 3, 图 4。

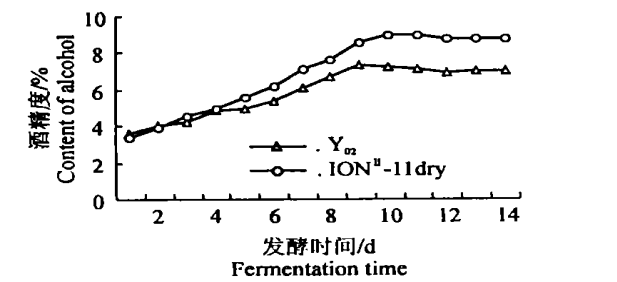


图 3 发酵过程中苹果酒酒精度的变化曲线
Fig 3 Changing curve of apple wine
producing rate in fermentation process

从图 3 可以看出, 特异突变株在发酵至第 10 天时产酒率最高, 达到 9 0%, 比出发菌株在发酵至第 9 天时的最高产酒率(7. 35%)高 22. 4%。从图 4 可以看出, 随着发酵时间的延长, 糖分逐渐下降直到发酵接近终了时, 糖度不再发生变化, 最后残糖为 2 1%, 特异突变株发酵能力强, 能够较为彻底地发酵糖类。

采用上述工艺生产的苹果酒在 16~ 18 的环境下密闭后发酵 4 个月, 经皂土下胶处理、并经

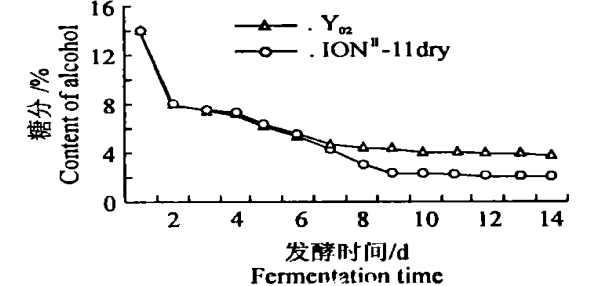


图 4 发酵过程中残糖的变化曲线
Fig 4 Changing curve of content of
sugar in fermentation process

- 4 5~ 5 5 冷冻处理 7 d 后, 勾兑产品呈金黄色, 澄清透明, 无悬浮物, 无沉淀物, 果味酸怡, 果香浓郁, 酒体醇厚, 具有甜型苹果酒的典型风格, 风味协调, 口感良好。发酵试验结果表明, 该特异突变株是一种优良的生产苹果酒的酵母菌菌株。

2 3 菌株部分生物学特性比较

对特异突变株和出发菌株的部分生物学特性进行研究, 结果见表 1。

表 1 部分生物学特性比较
Table 1 Compare of partial biocharacters

菌株 Strains	碳源同化 U tility of carbohydrates					氮源同化 U tility of nitrogen	
	葡萄糖 Glucose	乳糖 L actose	麦芽糖 M altose	蔗糖 Sucrose	淀粉 Starch	(NH ₄) ₂ SO ₄ Ammonia sulphate	KNO ₃ Potassium nitrate
Y ₀₂	++	-	+	+++	-	+	-
DN ^{II} -11 dry	+++	+	++	++++	+	++	-

表 1 结果表明, 对于碳源同化而言, 出发菌株 Y₀₂ 只能利用葡萄糖、蔗糖和麦芽糖, 对乳糖和淀粉则不能利用; 经诱变处理后的特异突变株 DN^{II}-11 dry 对葡萄糖、蔗糖、乳糖和麦芽糖等 4 种糖类和淀粉均可利用, 同时, 利用能力明显增强。氮源同化测试结果表明, 特异突变株 DN^{II}-11 dry 除同化 (NH₄)₂SO₄ 能力有所增强外, 其他生物学特性与出发菌株基本保持一致。

采用淀粉酶活力平板检测法进一步验证了诱变前后菌株同化淀粉的性能, 在以淀粉为唯一碳源的固体培养基上, 分别均匀涂布 0. 2 mL 出发菌株和

特异突变株菌悬液, 25℃ 恒温培养 24 h, 然后加入已配好的革氏碘液, 发现出发菌株 Y₀₂ 无透明水解圈, 而特异突变株 DN^{II}-11 dry 则有透明水解圈产生, 说明该特异突变株能够产生水解淀粉的酶类, 表明该菌株可以利用淀粉。苹果中含有少量的淀粉, 因此采用该菌株发酵生产苹果酒可以提高原料的苹果酒产率。

2 4 酵母菌菌体蛋白 SDS-PA GE 凝胶电泳

对出发菌株和特异突变株的菌体蛋白进行 SDS-PA GE 凝胶电泳分析, 结果如图 5 所示。

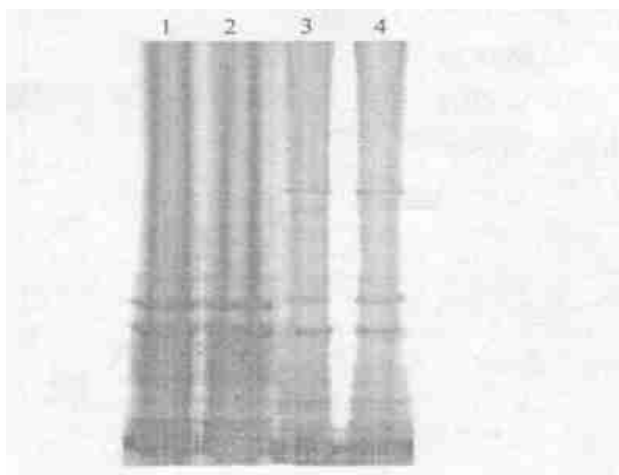


图 5 菌体蛋白 SDS-PA GE 电泳分析

Fig 5 SDS-PA GE electrophoresis
analysis of mycelium protein
1, 2 Y₀₂; 3, 4 DN^{II}-11 dry

由图 5 可见, 3, 4 泳道(即最优突变株 DN^{II}-11 dry 的蛋白泳带)明显比 1, 2 泳道(即出发菌株 Y₀₂

的蛋白带)多出 1 条低分子质量的蛋白带, 而原来的 2 条带仍然存在, 但表达量明显减少。从而可以说明, 最优突变株 DN^{II}-11 dry 是不同于原出发菌株 Y₀₂的 1 个新菌株。

3 结 论

本试验用最佳注入剂量 $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 对苹果酒酵母菌进行了诱变研究, 并获得特异突变株 DN^{II}-11 dry。对特异突变株的发酵试验表明, 特异突变株产苹果酒的能力较出发菌株提高 22.4%。对特异突变株与出发菌株在碳源同化、氮源同化、酵母菌体蛋白 SDS-PA GE 凝胶电泳等方面的研究结果表明, 特异突变株 DN^{II}-11 dry 是 1 株与出发菌株 Y₀₂有显著差别的优良菌株, 是苹果酒生产的优良酵母菌种。

[参考文献]

- [1] 宋安东, 李艳梅, 吴云汉, 等. 苹果酒高产酵母菌株的诱变选育[J]. 河南农业大学学报, 2001, 35(1): 36- 39
- [2] Yu Zeng-liang. Introduction of ion beam biotechnology[M]. He Fei, An Hui An Hui Science & Technology Press, 1998 (in Chinese).
- [3] Yu Zeng-liang. China nuclear science & technology report CN IC-00746, A SIPP-0036[M]. Beijing: Atomic Energy Press, 1999. 3- 8
- [4] 王 纪, 姚建铭, 余增亮. 离子注入麦角甾醇酵母选育研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(2): 1- 3
- [5] 姚建铭, 王 纪, 王相朝, 等. 离子注入花生四烯酸产生菌诱变选育[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 478- 481
- [6] 宋安东, 胡 渝, 刘 勇, 等. 甜型苹果酒发酵条件研究[J]. 河南农业科学, 2001, (8): 32- 33
- [7] 邓玉清. H⁺、N⁺、Ar⁺注入对啤酒酵母存活率的影响[J]. 激光生物学报, 2001, 10(3): 170- 173
- [8] 宋安东, 吴云汉, 李艳梅, 等. 产苹果酒优良酵母菌株的选育研究[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(2): 183- 186

Study on mutation of apple wine yeast

SONG An-dong¹, JIA Cui-ying², CHEN Hong-ge¹, WU Yun-han¹

(1 Biotechnology and Food Science College, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: The wild-type apple wine yeast Y₀₂ was treated by ion-implantation with the dose of $8 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$. A special mutant strain DN^{II}-11 dry was obtained. The fermentation test shows, the special mutant strain can increase 22.4% of the apple wine producing rate than original strain. This strain is an excellent strain for producing apple wine. Through the tests of carbohydrates and nitrogen utilization, SDS-PA GE electrophoresis analysis of mycelium protein, we can see that the special mutant strain DN^{II}-11 dry was much distinctively to the original strain Y₀₂.

Key words: apple wine; yeast; ion-implantation; mutation treatment