DOI:10.12441/spyswjs.20240910002 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0072-10

原生质体融合技术选育低甲醇果酒酵母

张会香 林 楠 吴佳儒 程 鑫 梁韦武 杨世军

(桂林理工大学化学与生物工程学院,广西 桂林 541004)

摘要:【目的】利用原生质体融合技术选育低甲醇果酒酵母。**【方法】**以酵母LAB和酵母XR为亲本酵母,通过原生质体融合技术选育可在果酒发酵中产生低甲醇质量浓度、高乙醇体积分数的酵母菌株。以原生质体形成率、再生率和制备率为指标,通过单因素与正交试验优化酵母原生质体制备工艺;采用紫外线照射和加热2种方式对双亲原生质体进行灭活,并采用35 g/dL的聚乙二醇6000(PEG-6000)对灭活后的原生质体进行化学融合。**【结果】**原生质体最佳制备条件为:蜗牛酶质量浓度2.0 g/dL、酶解时间2.0 h、EDTA-巯基乙醇质量浓度1.25 g/dL、EDTA-巯基乙醇处理温度30.0 ℃。在此条件下,原生质体形成率为(93.61±0.86)%、再生率为(24.23±0.52)%、制备率为(22.68±0.29)%。经化学融合后共获得19株融合子,通过酿酒试验筛选出融合子lx3;与亲本酵母XR相比,其发酵果酒中甲醇质量浓度降低了50.87%,乙醇体积分数维持稳定。**【结论】**该研究成功选育出一株酿造低甲醇质量浓度、高乙醇体积分数百香果壳果酒的酵母菌株。

关键词:原生质体融合;酿酒酵母;甲醇;果酒;百香果壳

Reduction of Methanol Content by Protoplast Fusion in Fruit Wine Yeast

ZHANG Huixiang LIN Nan WU Jiaru CHENG Xin LIANG Weiwu YANG Shijun

(College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to breed a fruit wine yeast strain with low methanol production by protoplast fusion. [**Method**] With yeast strains LAB and XR as parents, protoplast fusion was employed to breed the yeast strains for fruit wine fermentation with a low mass concentration methanol and a high volume fraction ethanol. The process of yeast protoplast preparation was optimized by single factor and orthogonal experiments with the formation rate, regeneration rate, and preparation rate of protoplasts as indicators. The parental protoplasts were inactivated by ultraviolet radiation and heating, and 35 g/dL PEG-6000 was used for chemical fusion after inactivation. [**Result**] The optimum conditions for protoplast preparation were as follows: a snailase mass concentration of 2.0 g/dL, enzymolysis time of 2.0 h, an EDTA-mercaptoethanol mass concentration of 1.25 g/dL, and an EDTA-mercaptoethanol treatment temperature of 30.0 ℃. Under these conditions, the formation rate, regeneration rate, and preparation rate of protoplasts were (93.61±0.86)%, (24.23±0.52)%, and (22.68±0.29)%, respectively. A total of 19 fusants were obtained by chemical fusion, and the fusant lx3 was screened out by the brewing experiment. The methanol mass concentration in the fermented fruit wine produced with lx3 was reduced by 50.87% on average compared with that produced with the parent strain XR, and the ethanol volume fraction was similar between lx3 and the parent strain. [**Conclusion**] This study bred a fruit wine yeast strain suitable for passion fruit shell fermentation with a low methanol mass concentration and a high ethanol volume fraction.

基金项目:广西重点研发计划项目(桂科AB24010183)。

通信作者:张会香(1975—),女,硕士,副教授,硕士研究生导师,主要从事工业微生物菌种选育及天然产物研究与开发。E-mail:2002093@glut.edu.cn

收稿日期:2024-09-10 **修回日期:**2024-11-02

Keywords: protoplast fusion; *Saccharomyces cerevisiae*; methanol; fruit wine; passion fruit shell

在果酒酿制过程中不可避免会产生甲醇，而甲醇对人体的毒性较强，长期饮用甲醇超标的果酒，会导致甲醇在体内积累，引发甲醇中毒。甲醇属于神经毒物，会麻痹人体神经系统，对脑组织造成损伤，严重时可导致中枢性呼吸衰竭；甲醇还对视网膜神经具有破坏作用，严重时会导致失明[1-4]。根据GB/T 15037—2006《葡萄酒》[5]规定，红葡萄酒中的甲醇质量浓度应低于400 mg/L，白葡萄酒或玫瑰葡萄酒中的甲醇质量浓度应低于250 mg/L。我国目前尚未针对饮料酒中的甲醇含量制定国家标准，但NY/T 1508—2017《绿色食品 果酒》[6]规定甲醇质量浓度不得超过400 mg/L。果酒中的甲醇质量浓度受多种因素影响，如水果成熟度、果渣浸渍条件、果胶酶添加量、酶活性和发酵条件等[7-13]。蒋成等[14]选用5株商业酵母发酵无花果制备果酒，发现不同酵母发酵产物的甲醇质量浓度存在显著差异。因此，选择适宜的酵母对控制果酒中的甲醇含量至关重要。

原生质体融合技术主要包括2个步骤：第一步是通过人工技术去除2株细胞的细胞壁，以获得原生质体；第二步是采用物理或化学方法诱导原生质体融合，进而获得兼具双亲遗传性状的稳定重组子[15]。该技术可使具有不同遗传性状的亲本菌株获得兼具双亲遗传特性的稳定融合子，同时兼具诱变育种和基因工程育种的优点[16-17]。目前，研究者已将该技术应用于细菌、酵母菌和霉菌的育种研究中[18-22]。原生质体融合技术在酵母菌的选育中发挥着关键作用，其选育方向主要包括高产酵母菌株及耐乙醇、降酸、耐高温酵母菌株等[23-24]。易弋等[25]以酿酒酵母GGFS16和GJ2008作为亲本酵母，通过原生质体融合技术选育出性能优于亲本酵母的高性能乙醇酵母。林小江[26]通过原生质体融合技术获得了低甲醇、高总酯的酵母融合子，相较于亲本酵母，该融合子发酵产物的甲醇含量降低了11.0%，总酯含量提升了51.4%，显著提升了白酒的综合品质。由此可见，原生质体融合技术在酿酒酵母育种中具有重要的应用价值。

作者所在课题组前期在百香果壳果酒发酵试验中发现：采用商业果酒酵母XR发酵的果酒，乙醇体积分数和甲醇质量浓度较高；而采用酵母LAB发酵的果酒，乙醇体积分数和甲醇质量浓度则相对较低。因此，作者以商业果酒酵母XR和LAB为亲本酵母，开展原生质体融合育种研究，并通过果酒发酵试验对融合子进行筛选，以期选育出适合百香果壳发酵的低甲醇质量浓度、高乙醇体积分数的果酒酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

紫果百香果壳：桂林市万禾农产品有限公司；葡萄酒通用型酵母LAB、高档陈酿红酒酵母XR：拉曼德酿酒酵母有限公司；无水甲醇、无水乙醇、叔戊醇：均为色谱纯，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；β-巯基乙醇、PEG-6000：均为分析纯，上海易恩化学技术有限公司；蜗牛酶：上海飞净生物有限公司；其他试剂：均为国产分析纯。

YPD液体培养基：葡萄糖2 g/dL、酵母浸粉1 g/dL、胰蛋白胨2 g/dL，121 ℃灭菌20 min。高渗再生培养基：在YPD培养基中加入17 g/dL的蔗糖。

pH 6.0的磷酸盐缓冲液（PBS）：取0.2 mol/L的磷酸二氢钾溶液86.8 mL和0.2 mol/L的磷酸氢二钾溶液13.2 mL，充分混匀，121 ℃灭菌20 min。高渗缓冲液：在PBS中添加1 mol/L的山梨醇。

1.2 仪器与设备

紫外-可见分光光度计：VIS-7220N型，北京瑞利分析仪器有限公司；蒸汽灭菌器：BXM-30R型，上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；超净工作台：ZHJH-C112C型，上海智城分析仪器制造有限公司；振荡培养箱：LRH-250-Z型，广东泰宏君科学仪器股份有限公司；光照培养箱：LRH-600A-G型，广东泰宏君科学仪器股份有限公司；气相色谱仪：GC1690型，杭州捷岛科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 生长曲线的测定

将2株亲本酵母菌株分别接种于YPD液体培养基进行活化，制备亲本菌株菌悬液，28 ℃培养24 h。将菌悬液以体积分数2%接种于YPD液体培养基，28 ℃摇瓶培养24 h；每隔2 h在600 nm处测

定菌悬液的吸光度，以未接种的YPD液体培养基为空白对照。以培养时间为横坐标，吸光度为纵坐标，分别绘制2株亲本酵母菌株的生长曲线。

1.3.2 原生质体制备的单因素试验

1）原生质体制备方法：将亲本酵母菌株接种于YPD液体培养基，28 ℃恒温振荡培养至对数生长早期。吸取菌悬液至离心管中，于8 000 r/min离心5 min，弃去上清液。加入生理盐水清洗3次，于8 000 r/min离心5 min，弃去上清液，保留菌体。向菌体中加入3 mL EDTA-巯基乙醇预处理液，保温10 min后于8 000 r/min离心5 min，弃去上清液，保留菌体，再加入3 mL生理盐水洗涤1次，离心后弃去上清液。随后加入3 mL蜗牛酶液，于38 ℃水浴酶解；酶解结束后于2 000 r/min离心20 min，弃去上层酶液。用5 mL高渗液清洗，于2 000 r/min离心20 min，弃去清洗液，重复3次。最后加入5 mL高渗缓冲液，于4 ℃避光保存。

2）单因素试验条件：以蜗牛酶质量浓度（1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/dL）、蜗牛酶酶解时间（1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 h）、EDTA-巯基乙醇处理温度（25.0、27.5、30.0、32.5、35.0 ℃）、EDTA-巯基乙醇质量浓度（0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 g/dL）为单因素变量，对处于对数生长期的酵母XR进行酶解破壁处理。以原生质体形成率、再生率及制备率为评价指标，确定各因素的最佳处理条件。

3）原生质体形成率、再生率与制备率的测定：吸取1 mL原生质体菌悬液，用高渗缓冲液分别稀释1 000倍和10 000倍，涂布于高渗再生培养基上，28 ℃培养48 h后进行平板计数。吸取1 mL原生质体菌悬液，用无菌蒸馏水分别稀释1 000倍和10 000倍，涂布于YPD固体培养基上，28 ℃培养48 h后进行平板计数。吸取1 mL未酶解时的菌悬液稀释10 000倍，涂布于YPD固体培养基上，28 ℃培养48 h后进行平板计数。原生质体形成率按式（1）计算。

$$X=\frac{L-M}{L}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

X——原生质体形成率，%；

L——未酶解的菌悬液在YPD固体培养基上的菌落数，CFU；

M——无菌水稀释后的原生质体在YPD固体培养基上的菌落数，CFU。

原生质体再生率按式（2）计算。

$$Y=\frac{N-M}{L-M}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

Y——原生质体再生率，%；

N——高渗缓冲液稀释后的原生质体在高渗再生培养基上的菌落数，CFU；

L——未酶解的菌悬液在YPD固体培养基上的菌落数，CFU；

M——无菌水稀释后的原生质体在YPD固体培养基上的菌落数，CFU。

原生质体制备率按式（3）计算。

$$Z=(X\times Y)\times 100\% \quad (3)$$

式中：

Z——原生质体制备率，%；

X——原生质体形成率，%；

Y——原生质体再生率，%。

4）原生质体制备的正交试验设计：在单因素试验的基础上，以原生质体形成率、再生率与制备率为指标，设计正交试验。

1.3.3 原生质体的融合

1）双亲原生质体灭活条件试验：采用紫外线照射和加热2种方式分别对双亲原生质体LAB和XR进行灭活，再用35 g/dL的PEG-6000对灭活后的原生质体进行化学融合。

2）紫外线照射时间的确定：吸取1 mL亲本酵母LAB原生质体悬浮液，用高渗缓冲液稀释10倍，吸取3 mL稀释后的亲本酵母LAB原生质体悬浮液，置于35 W紫外灯下，在垂直距离30 cm处分别照射30、40、50、60、90、120、180 s。取照射后的悬浮液，用高渗缓冲液稀释至适宜浓度，涂布于高渗再生培养基，28 ℃培养48 h后进行平板筛选，以未经紫外线照射处理的酵母LAB原生质体悬浮液作为空白对照。不同紫外线照射时间下酵母原生质体的灭活率按式（4）计算。

$$A=\frac{Q_1-H_1}{Q_1}\times 100\% \quad (4)$$

式中：

A——紫外线照射下酵母LAB原生质体的灭活率，%；

Q_1——紫外灭活前酵母LAB原生质体的菌落数，CFU；

H_1——紫外灭活后高渗再生培养基中检出的菌落数，CFU。

3）加热灭活时间的确定：吸取1 mL亲本酵母XR原生质体悬浮液，用高渗缓冲液稀释10倍，吸取5 mL稀释后的亲本酵母XR原生质体悬浮液于离心管中，在65 ℃水浴中分别加热5、10、15、20、25 min。取处理后的悬浮液，用高渗缓冲液稀释至适宜浓度，涂布于高渗再生培养基，28 ℃培养48 h后进行平板筛选，以未经加热灭活处理的酵母XR原生质体悬液作为空白对照。不同处理时间下酵母原生质体的灭活率按式（5）计算。

$$B=\frac{Q_2-H_2}{Q_2}\times 100\% \quad (5)$$

式中：

B——加热处理后酵母XR原生质体的灭活率，%；

Q_2——加热灭活前酵母XR原生质体的菌落数，CFU；

H_2——加热灭活后高渗再生培养基中检出的菌落数，CFU。

4）原生质体的融合与保存：分别吸取2种亲本原生质体悬浮液各1 mL，用高渗缓冲液稀释10倍，随后按最优灭活方式对双亲原生质体进行完全灭活。将灭活后的2种原生质体悬浮液等体积混合加到离心管中，2 000 r/min离心20 min，弃去上清液，加入2 mL PEG促融剂，于28 ℃振荡融合2 h，期间可通过镜检观察原生质体融合情况。融合结束后，4 000 r/min离心20 min，以去除上层促融剂，在沉淀中加入5 mL高渗缓冲液，4 000 r/min离心20 min，重复冲洗3次（目的是去除残留的促融剂）。向沉淀中加入2 mL高渗缓冲液，重悬融合子。吸取100 μL重悬液涂布于高渗再生固体培养基上，同时以未融合的灭活原生质体作为对照，28 ℃培养3 d。若对照组培养基上无菌落生长，而试验组出现菌落，则初步判定为融合子。将获得的融合子分别接种至YPD液体培养基和固体斜面培养基中培养。将在固体斜面培养基中培养成熟的菌株置于4 ℃冰箱保存；将在液体培养基中培养成熟的菌悬液，与质量分数20%的甘油按体积比1∶1混合，随后置于−80 ℃冰箱保存。

1.3.4　融合子发酵能力比较

将亲本酵母XR、LAB及融合子lx1~lx19同时进行果酒酿造试验，比较各菌株发酵果酒的甲醇质量浓度和乙醇体积分数。配制若干份50 mL YPD液体培养基，用接种环各取一环亲本酵母XR、LAB及筛选好的融合子，接种至液体培养基中活化，28 ℃摇瓶培养24 h。分别取各菌株活化后的菌悬液，以体积分数3%接种至预处理的果酒原料中，发酵工艺流程参照张会香等[27]的方法进行。发酵前和发酵第3天取样测定糖度；发酵结束后，测定乙醇体积分数和甲醇质量浓度，筛选适合酿造低甲醇质量浓度、高乙醇体积分数百香果壳果酒的酵母菌株。

2　结果与讨论

2.1　酵母LAB和酵母XR的生长曲线

随着培养时间的延长，液体培养基中酵母数量持续升高，见图1。其中，酵母LAB在培养8 h后进入对数生长期，并持续至16 h；酵母XR在培养4 h后进入对数生长期，且该阶段一直持续至12 h。在对数生长期内，酵母生长代谢旺盛，遗传物质快速复制，细胞出芽频率高、芽体数量多，细胞壁代谢处于活跃状态。在此期间对酵母细胞进行破壁酶解处理，有助于提高原生质体的制备率[28]。因此，选择培养至12 h的酵母开展原生质体制备试验。

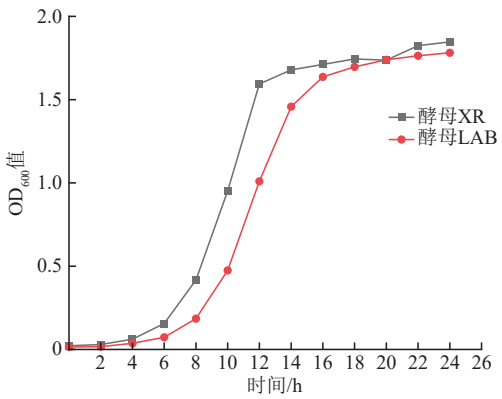


图1　酵母LAB和酵母XR的生长曲线

Fig. 1　Growth curves of yeast strains LAB and XR

2.2　原生质体制备的单因素试验结果

2.2.1　蜗牛酶质量浓度与酶解时间对原生质体制备的影响

蜗牛酶质量浓度与酶解时间对原生质体制备的影响见图2。原生质体形成率随蜗牛酶质量浓

度的升高和酶解时间的延长呈上升趋势，而再生率和制备率呈下降趋势。当蜗牛酶质量浓度为1.0 g/dL时，原生质体形成率为43.36%、再生率为16.35%、制备率达到最大值7.58%；但该条件下原生质体形成率过低，不利于后续原生质体融合试验的开展。因此，选择蜗牛酶质量浓度2.0 g/dL作为原生质体制备的最优蜗牛酶质量浓度，此时原生质体制备率为5.53%。蜗牛酶是一类包含过氧化物酶、核糖核酸酶等成分的复合酶制剂。随着蜗牛酶酶解时间的延长，破壁酵母的数量逐渐增多，原生质体制备率逐渐上升；当酶解持续至一定时间后，酵母细胞破壁进程基本完成，但体系中其他水解酶的持续作用会破坏原生质体结构，使其丧失再生能力。同时，酶解时间过长也会使较早破壁的原生质体发生凋亡，导致原生质体再生率进一步下降[29]。当蜗牛酶酶解时间为2.0 h时，原生质体形成率为90.14%、再生率为21.35%、制备率达到最大值19.25%。因此，确定2.0 h为原生质体制备的最优蜗牛酶酶解时间。综上所述，制备原生质体的最优蜗牛酶质量浓度为2.0 g/dL，最优酶解时间为2.0 h。

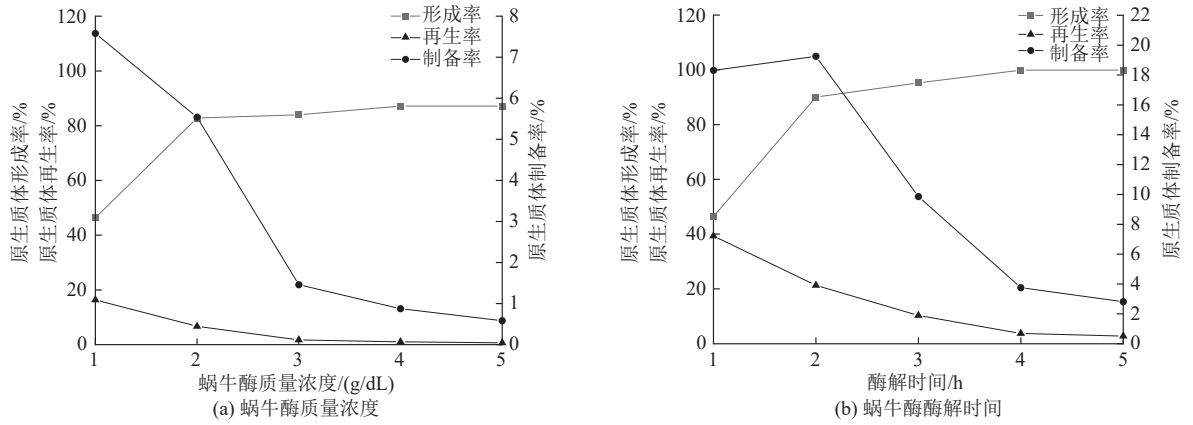


图2 蜗牛酶质量浓度与酶解时间对原生质体制备的影响

Fig. 2 Effects of snailase mass concentration and enzymolysis time on protoplast preparation

2.2.2 EDTA-巯基乙醇质量浓度与处理温度对原生质体制备的影响

EDTA-巯基乙醇质量浓度与处理温度对原生质体制备的影响见图3。当EDTA-巯基乙醇处理温度为25.0 ℃时，原生质体制备率达到最大值11.59%，因此确定25.0 ℃为原生质体制备的最优EDTA-巯基乙醇处理温度。酶解前适当的预处理可以提高原生质体形成率，这是因为EDTA螯合金属离子后可以避免其对酶产生抑制作用，进而提升酶的破壁效果[30]。预处理温度会影响酵母细胞的活性，进而导致预处理效果存在差异。此外，预处理剂对细胞和原生质体具有一定的毒性，浓

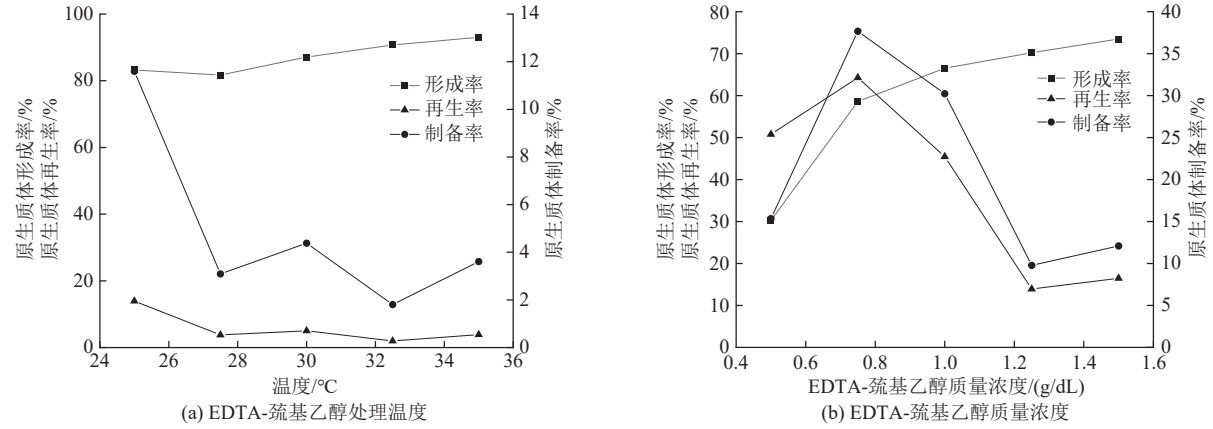


图3 EDTA-巯基乙醇质量浓度与处理温度对原生质体制备的影响

Fig. 3 Effects of EDTA-mercaptoethanol mass concentration and treatment temperature on protoplast preparation

度过高会抑制原生质体再生，浓度过低则会导致原生质体形成率显著降低，因此预处理阶段需确定预处理剂浓度[31]。当EDTA-巯基乙醇质量浓度低于0.75 g/dL时，原生质体再生率较高但形成率较低；当质量浓度高于1.25 g/dL时，原生质体形成率较高但再生率较低。当EDTA-巯基乙醇质量浓度为0.75 g/dL时，原生质体制备率达到最大值。因此，确定0.75 g/dL为原生质体制备的最优EDTA-巯基乙醇质量浓度。综上所述，制备原生质体的预处理剂EDTA-巯基乙醇的最优质量浓度为0.75 g/dL，最优处理温度为25.0 ℃。

2.3　原生质体制备的正交试验结果

根据单因素试验的结果，选取EDTA-巯基乙醇质量浓度（*A*）、蜗牛酶质量浓度（*B*）、酶解时间（*C*）、EDTA-巯基乙醇处理温度（*D*）4个因素进行正交试验，因素水平见表1。

表1　正交试验因素水平表

Table 1　Factors and levels of orthogonal experiments

水平	因素			
	EDTA-巯基乙醇质量浓度/（g/dL）	蜗牛酶质量浓度/（g/dL）	酶解时间/h	EDTA-巯基乙醇处理温度/℃
1	0.75	2.0	2.0	27.5
2	1.00	3.0	3.0	30.0
3	1.25	4.0	4.0	32.5

由表2可以看出，以原生质体形成率为指标，4个因素的影响顺序为*B*>*C*>*D*>*A*，最优组合为$A_3B_2C_2D_3$；即原生质体形成的最优条件为：EDTA-巯基乙醇质量浓度1.25 g/dL、蜗牛酶质量浓度3.0 g/dL、酶解时间3.0 h、EDTA-巯基乙醇处理温度32.5 ℃。以原生质体再生率为指标，4个因素的影响顺序为*B*>*C*>*A*>*D*，最优组合为$A_1B_1C_1D_1$；即原生质体再生的最优条件为：EDTA-巯基乙醇质量浓度0.75 g/dL、蜗牛酶质量浓度2.0 g/dL、酶解时间2.0 h、EDTA-巯基乙醇处理温度27.5 ℃。以原生质体制备率为指标，4个因素的影响顺序为*B*>*C*>*A*>*D*，最优组合为$A_3B_1C_1D_2$；即原生质体制备的最优条件

表2　正交试验结果及极差分析

Table 2　Orthogonal experimental results and range analysis

编号	*A*	*B*	*C*	*D*	原生质体形成率/%	原生质体再生率/%	原生质体制备率/%
1	1	1	1	1	85.31	24.30	20.73
2	1	2	2	2	97.84	1.57	1.54
3	1	3	3	3	98.25	1.04	1.02
4	2	1	2	3	94.14	11.55	10.88
5	2	2	3	1	96.91	1.69	1.64
6	2	3	1	2	93.83	3.39	3.18
7	3	1	3	2	94.14	19.52	18.37
8	3	2	1	3	95.99	5.24	5.03
9	3	3	2	1	97.94	0.41	0.41
K_1	93.80	91.20	91.71	93.39			
K_2	94.96	96.91	96.64	95.27			
K_3	96.02	96.67	96.43	96.13			
R	2.22	5.72	4.93	2.74			
K_1'	8.97	18.46	10.98	8.80			
K_2'	5.54	2.83	4.51	8.16			
K_3'	8.39	1.61	7.42	5.94			
R'	3.43	16.84	6.47	2.86			
K_1''	7.76	16.66	9.65	7.59			
K_2''	5.23	2.74	4.28	7.70			
K_3''	7.94	1.54	7.01	5.64			
R''	2.70	15.12	5.37	2.05			

注：*K*、*R*为以原生质体形成率为指标的极差分析结果；*K'*、*R'*为以原生质体再生率为指标的极差分析结果；*K''*、*R''*为以原生质体制备率为指标的极差分析结果。

为：EDTA-巯基乙醇质量浓度 1.25 g/dL、蜗牛酶质量浓度 2.0 g/dL、酶解时间 2.0 h、EDTA-巯基乙醇处理温度 30.0 ℃。

由表 3 可知，在筛选所得的最优组合条件下进行原生质体制备，原生质体形成率为（93.61±0.86）%、再生率为（24.23±0.52）%、制备率为（22.68±0.29）%，明显高于正交试验中的最高制备率（20.73%）。结果表明，通过极差分析筛选出的最优组合确定为原生质体制备的最优方案。综上，确定原生质体制备的最优条件为：蜗牛酶质量浓度 2.0 g/dL、酶解时间 2.0 h、EDTA-巯基乙醇质量浓度 1.25 g/dL、EDTA-巯基乙醇处理温度 30.0 ℃。

表 3　正交试验验证结果

Table 3　Validation of orthogonal experimental results

单位：%

编号	原生质体形成率	原生质体再生率	原生质体制备率
1	92.49	24.80	22.93
2	94.57	23.56	22.28
3	93.79	24.34	22.82
平均值	93.61±0.86	24.23±0.52	22.68±0.29

2.4　紫外线照射时间对亲本原生质体灭活率的影响

由图 4 可知，当紫外线照射时间为 120 s 时，灭活率达到 100%，原生质体全部死亡。因此，确定 120 s 为最佳紫外线照射时间。

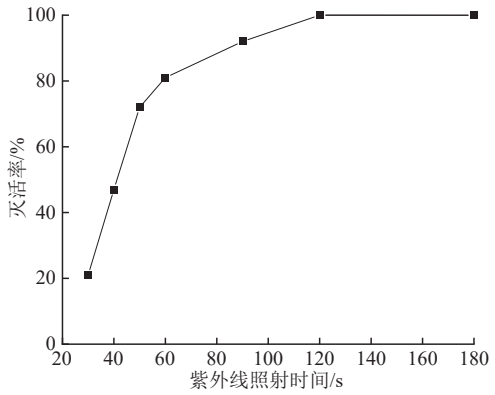


图 4　紫外线照射时间对亲本原生质体灭活率的影响

Fig. 4　Effect of ultraviolet irradiation time on the inactivation rate of parental protoplasts

2.5　加热灭活时间对亲本原生质灭活率的影响

由图 5 可知，当加热灭活时间为 20 min 时，灭活率达到 100%，原生质体全部死亡。因此，确定 20 min 为酵母 XR 原生质体的最佳灭活时间。

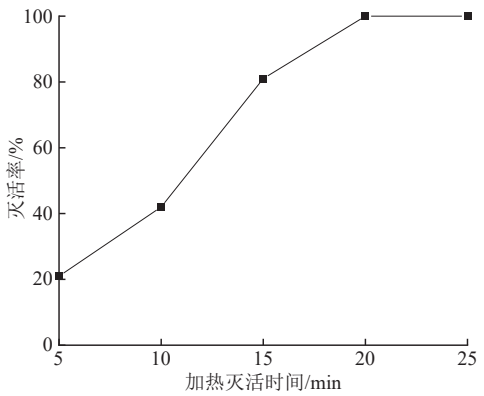


图 5　加热灭活时间对亲本原生质体灭活率的影响

Fig. 5　Effect of thermal inactivation time on the inactivation rate of parental protoplasts

2.6　融合子发酵能力分析

亲本酵母 XR、LAB 及 lx1~lx19 融合子用于百香果壳酒酿造时，发酵前糖度、发酵第 3 天糖度、发酵结束时乙醇体积分数及甲醇质量浓度见表 4。发酵前 3 d 为酵母繁殖阶段，此阶段酵母利用发酵体系中的糖分以满足自身生长繁殖需求，总糖含量随酵母生长逐渐下降，而酵母活菌数逐步增加；当酵母繁殖到一定密度后，糖含量趋于稳定[32-33]。在糖度方面，酵母 XR 在 0~3 d 由 15 °Brix 下降至 5 °Brix，表明其在 0~3 d 的糖分利用率较高；酵母 LAB 在 0~3 d 糖度由 15 °Brix 下降至 9 °Brix，糖分利用率相对较低。在发酵第 3 天，融合子 lx1、lx2、lx5、lx8、lx9、lx10 的糖度均不高于 5 °Brix，说明这些融合子能充分利用糖分。多数融合子在整个发酵期间糖度下降速率较快，据此可判断该类融合子的环境适应性较强，发酵速率较高。

在乙醇生成方面，酵母 XR、LAB 酿造的果酒中乙醇体积分数分别为 17%、7%。有 9 株融合子酿造的果酒中乙醇体积分数为 16%~17%，说明该类融合子的产乙醇基因表达更接近酵母 XR，具备优良的酿造性能；另有 9 株融合子酿造的果酒中乙醇体积分数为 14%~15%，表明其产乙醇基因结合了酵母 XR 与酵母 LAB 的特性，同样拥有较好的酿造性能。

在甲醇生成方面，酵母 XR、LAB 酿造的果酒中甲醇质量浓度分别为 849.82、218.66 mg/L。lx1、lx2、lx3 等 9 株融合子的甲醇质量浓度为

表4 亲本酵母与各融合子酿造果酒的性能比较

Table 4 Brewing performance of parent yeast strains and fusants for fruit wine

酵母	发酵前糖度/°Brix	第3天糖度/°Brix	乙醇体积分数/%	甲醇质量浓度/（mg/L）
酵母XR	15	5	17	849.82
酵母LAB	15	9	7	218.66
lx1	15	5	14	463.43
lx2	15	3	15	426.07
lx3	15	7	15	417.51
lx4	15	7	14	464.05
lx5	15	4	15	442.30
lx6	15	7	17	501.32
lx7	15	6	17	700.48
lx8	15	5	17	676.70
lx9	15	4	17	467.56
lx10	15	5	16	728.60
lx11	15	6	17	878.33
lx12	15	8	11	540.40
lx13	15	8	14	444.82
lx14	15	11	14	793.98
lx15	15	6	15	625.91
lx16	15	7	16	873.31
lx17	15	7	15	823.53
lx18	15	8	16	752.12
lx19	15	7	17	797.86

400~600 mg/L，说明该类融合子的产甲醇基因表达更接近酵母LAB，同时保留了部分酵母XR的特性，整体产甲醇水平较低，具备优良的酿造性能。

在所有融合子中，lx3融合子用于百香果壳酿酒时表现最优，其酿造的果酒中甲醇质量浓度最低，且乙醇体积分数较高。该诱变筛选获得的低产甲醇酿酒酵母lx3，甲醇质量浓度比亲本酵母XR低，乙醇体积分数比亲本酵母LAB高。综上，该研究成功融合出的lx3，可作为百香果壳酿酒工艺的优选菌种。

3 结论

作者以酵母LAB和酵母XR为亲本酵母进行酵母的原生质体融合试验。结果表明，原生质体制备的最优条件为：蜗牛酶质量浓度2.0 g/dL、酶解时间2.0 h、EDTA-巯基乙醇质量浓度1.25 g/dL、EDTA-巯基乙醇处理温度30.0 ℃。在此条件下，原生质体形成率为（93.61±0.86）%、再生率为（24.23±0.52）%、制备率为（22.68±0.29）%。原生质体的最佳灭活时间为：紫外线照射灭活的最佳时间是120 s，加热灭活的最佳时间是20 min。采用化学融合对灭活原生质体进行融合处理，共获得19株融合子。融合子发酵酿造的果酒中乙醇体积分数主要分布在14%~17%。最终筛选出性能最优的融合子lx3，其发酵产生的甲醇质量浓度较亲本酵母XR降低了50.87%。作者通过原生质体融合技术选育出一株低甲醇果酒酵母菌株，可有效降低发酵果酒中的甲醇质量浓度，但该菌株在发酵过程中的培养温度、pH等条件是否会影响果酒中的甲醇质量浓度，以及该菌株发酵对果酒的其他品质指标的影响仍需进一步探究。

参考文献

[1] CABAROGLU T，YILMAZTEKIN M. Methanol and major volatile compounds of Turkish Raki and effect of distillate source[J]. Journal of the Institute of Brewing，2011，117（1）：98-105.

[2] 于清琴，张颖超，王咏梅，等. 葡萄酒及果露酒中的甲醇及降低措施[J]. 中外葡萄与葡萄酒，2019（4）：64-67.

YU Q Q, ZHANG Y C, WANG Y M, et al. Methanol in fruit wine and its reducing measures[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2019(4): 64-67. (in Chinese)

[3] 孙娅芸. 苦荞酒中甲醇的来源[J]. 现代食品, 2020, 26(8): 188-189.
SUN Y Y. Source of methanol in Tartary buckwheat wine [J]. Modern Food, 2020, 26(8): 188-189. (in Chinese)

[4] HANG Y D, WOODAMS E E. Limiting the formation of methanol in wines and distilled fruit spirits[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2008, 59(3): 333A.

[5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 葡萄酒: GB/T 15037—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[6] 中华人民共和国农业部. 绿色食品 果酒: NY/T 1508—2017[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.

[7] 严红光, 林莉, 符洋, 等. 不同成熟度青梅果实发酵果酒品质分析[J]. 食品科技, 2019, 44(8): 77-81.
YAN H G, LIN L, FU Y, et al. Effect of fruit maturity on chemical quality of plum wine [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(8): 77-81. (in Chinese)

[8] 张晓晴, 吕真真, 刘慧, 等. 不同品种桃果酒品质特性与酿酒适宜性评价[J]. 果树学报, 2021, 38(8): 1368-1380.
ZHANG X Q, LÜ Z Z, LIU H, et al. Characteristics of peach wines made from different cultivars and evaluation on their suitability for wine brewing[J]. Journal of Fruit Science, 2021, 38(8): 1368-1380. (in Chinese)

[9] 孙凯. 果胶酶与果酒品质关系的研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2018.

[10] 汪沙, 卢红梅, 陈莉, 等. 不同方式发酵桑葚果酒的功能性及香气成分比较[J]. 现代食品科技, 2021, 37(7): 278-285.
WANG S, LU H M, CHEN L, et al. Comparison of functionality and aroma components of mulberry wine fermented by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37 (7): 278-285. (in Chinese)

[11] HE L, YAN Y F, WU M, et al. Advances in the quality improvement of fruit wines: a review[J]. Horticulturae, 2024, 10(1): 93.

[12] 李晓娟. 双酵母混合液态发酵生产杨梅果酒[J]. 食品工业, 2021, 42(6): 82-87.
LI X J. Liquid state fermentation process of red bayberry wine with two yeasts [J]. The Food Industry, 2021, 42(6): 82-87. (in Chinese)

[13] LU S Y, ZHENG F, WEN L K, et al. Yeast engineering technologies and their applications to the food industry [J]. Food Biotechnology, 2021, 35(3): 252-271.

[14] 蒋成, 赵江林, 刘路, 等. 5种商业酵母对无花果酒质量的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(11): 5066-5072.
JIANG C, ZHAO J L, LIU L, et al. The effect of five commercial yeasts on the quality of fig wine [J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38 (11): 5066-5072. (in Chinese)

[15] 陆欢, 刘建雨, 尚晓冬, 等. 金针菇原生质体杂交菌株游离氨基酸多样性[J]. 食品与机械, 2023, 39(8): 25-33, 41.
LU H, LIU J Y, SHANG X D, et al. Amino acid characteristics and nutritional evaluation of *Flammulina filiformis* protoplast hybrid strains [J]. Food & Machinery, 2023, 39(8): 25-33, 41. (in Chinese)

[16] 颜佳, 张立钊, 熊香元, 等. 微生物原生质体融合育种技术及其在发酵食品生产中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8455-8462.
YAN J, ZHANG L Z, XIONG X Y, et al. Microbial protoplast fusion breeding technology and its application in fermented food production [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(22): 8455-8462. (in Chinese)

[17] 徐奎栋. 原生质体融合选育低醇增香苹果酒酵母[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

[18] Xin Y, Yang M, Yin H, et al. Improvement of ethanol tolerance by inactive protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. BioMed Research International, 2020: 1979318.

[19] GODA D A, SHAKAM H M, METWALLY M E, et al. Enhancement of cellulolytic enzyme production from intrageneric protoplast fusion of *Aspergillus* species and evaluating the hydrolysate scavenging activity [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 73.

[20] STEENSELS J, SNOEK T, MEERSMAN E, et al. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(5): 947-995.

[21] 陈娟, 阚建全, 杨蓉生, 等. 原生质体融合技术及其在果酒酵母育种上的应用[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(9): 163-166.
CHEN J, KAN J Q, YANG R S, et al. Protoplast fusion technology and its application in wine yeast breeding[J]. Food Research and Development, 2010, 31(9): 163-166. (in Chinese)

[22] 廖劲松, 郭勇, 庄桂. 原生质体融合技术选育高效菌株降解聚乙烯醇[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 34-37.

LIAO J S，GUO Y，ZHUANG G. The breeding of high efficient strain with the technique of protoplast fusion to degrade polyvinyl-alcohol[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2005，24(2)：34-37.(in Chinese)

[23] 李娟. 酿酒酵母与酒酒球菌原生质体融合条件的研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2009.

[24] 金海炎. 猕猴桃酒优良酿酒菌株的选育及混菌发酵工艺优化研究[D]. 南阳：南阳师范学院，2022.

[25] 易弋，黎娅，程谦伟，等. 双亲灭活原生质体融合选育高性能酒精酵母菌的研究[J]. 中国酿造，2012，31(4)：75-78.

YI Y，LI Y，CHENG Q W，et al. Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol fermentation by fusion of biparental inactivated protoplasts[J]. China Brewing，2012，31(4)：75-78.(in Chinese).

[26] 林小江. 低甲醇高总酯酿酒酵母的选育及其应用研究[D]. 广州：华南理工大学，2014.

[27] 张会香，程鑫，林楠，等. 百香果果壳发酵低甲醇含量果酒工艺优化[J]. 食品研究与开发，2023，44(12)：153-159.

ZHANG H X，CHENG X，LIN N，et al. Process optimization on low methanol content of fermented fruit wine with passion fruit shells[J]. Food Research and Development，2023，44(12)：153-159.(in Chinese).

[28] 蔡爱华，陈海珊，周玉恒，等. 库德毕赤酵母原生质体制备与再生[J]. 可再生能源，2012，30(5)：47-53.

CAI A H，CHEN H S，ZHOU Y H，et al. Preparation and regeneration of *Pichia kudriavzevii* protoplasts [J]. Renewable Energy Resources，2012，30(5)：47-53.(in Chinese)

[29] 刘璐，高原，杜双田，等. 香菇YJ-01原生质体制备与再生条件的优化[J]. 食用菌，2017，39(5)：16-23.

LIU L，GAO Y，DU S T，et al. The Optimization for protoplast preparation and regeneration conditions of *Lentinula edodes* YJ-01[J]. Edible Fungi，2017，39(5)：16-23.(in Chinese)

[30] KANG Y，KIM J H，RYU D D Y. Protoplast fusion of *Lactobacillus casei* [J]. Agricultural and Biological Chemistry，1987，51(8)：2221-2227.

[31] 张琇，孙谧，王清印，等. 海洋低温蛋白酶生产菌YS-9412-130原生质体的制备与再生[J]. 中国水产科学，2006，13(1)：106-111.

ZHANG X，SUN M，WANG Q Y，et al. Protoplasts formation and regeneration in marine low temperature protease producing strain YS-9412-130 [J]. Journal of Fishery Sciences of China，2006，13(1)：106-111.(in Chinese)

[32] 张雪儿，杨建，刘振宇，等. 不同原料及预处理方法对复合甘蔗果酒品质的影响[J]. 中国酿造，2024，43(3)：163-169.

ZHANG X E，YANG J，LIU Z Y，et al. Effects of different raw materials and pretreatment methods on the quality of compound sugarcane fruit wine[J]. China Brewing，2024，43(3)：163-169.(in Chinese)

[33] 吴均，吴俊葶，黄传书，等. 桑葚玫瑰果酒发酵工艺优化及体外抗氧化活性测定[J]. 食品研究与开发，2023，44(22)：93-100.

WU J，WU J T，HUANG C S，et al. Optimization of fermentation process of mulberry rose wine and determination of its *in vitro* antioxidant activity[J]. Food Research and Development，2023，44(22)：93-100.(in Chinese)

（责任编辑：张馨文）