

利用细胞质导入法选育嗜杀啤酒酵母

杜连祥 王昌禄 鲁梅芳

(天津轻工业学院 天津 300222)

摘要 利用细胞质导入 (Cytoduction) 法中的核融合缺陷细胞融合技术, 在对酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) D518 菌株不做任何遗传标记, 将嗜杀酵母 5045 菌株的嗜杀质粒转移到受体菌 D518 中, 获得了具有两亲株优良性状的融合子 KD102 菌株。对融合子分析表明: 融合子遗传性状稳定, 不仅含有供体菌 5045 的嗜杀质粒, 而且受体菌 D518 的核基因被原封不动地保留下来, 为异质体细胞 (Heteroplasmon)。将融合子 KD102 菌株用于小型、中型及生产性酿酒试验, 结果表明, 具有与亲株 D518 同样的酿造特性。在发酵过程中, 能抑制野生酵母污染, 净化发酵体系。对于保证啤酒纯种酿造及提高成品酒的生物稳定性具有明显效果。

关键词 嗜杀酵母, 嗜杀质粒, 细胞质导入, 细胞融合

在啤酒酿造中, 人们发现容易污染的微生物是细菌和酵母菌, 并在生产实践中提出许多防治细菌污染的有效方法。但是, 由于野生酵母具有与培养酵母相似的细胞形态、生理状及培养条件, 因此防治野生酵母的污染较之防治细菌更难。

酵母菌株间存在着相互杀死现象^[1]。据此将酵母菌分为嗜杀 (Killer) 酵母、中性 (Neutral) 酵母和敏感 (Sensitive) 酵母三种类型。嗜杀株能杀死同族及亲缘酵母; 敏感株能被嗜杀株杀死; 中性株不能杀死其它酵母, 也不被嗜杀株杀死。目前啤酒生产中使用的酵母, 几乎都是敏感株。因此, 选育既有优良酿造特性, 又能抑制野生酵母污染的嗜杀啤酒酵母用于啤酒酿造, 对于防治野生酵母污染, 净化发酵体系有重要意义。

嗜杀酵母在其生长繁殖中, 向体外分泌嗜杀毒素 (Killer toxin)^[2]。该毒素是由存在于核染色体之外的质粒支配的^[3,4], 其化学本质是线状双链 RNA (ds-RNA), 通常被外壳蛋白包裹着, 以直径为 35nm~40nm 病毒粒子 (VLP) 的状态存在于细胞质中。但是, 至今许多实验证明, 该质粒虽然具有病毒粒子特征, 但不具有体外感染能力, 因此只能借助细胞间的接触, 如杂交、原生质体融合等方法转移嗜杀质粒。

本文以核融合缺陷突变株 5045 ($\alpha \cdot his4 \cdot Kar1-1 [KIL-k_1] \rho^+$) 作为嗜杀质粒供体, 以优良酿酒酵母 D518 为受体进行原生质体融合, 其特点是: ①受体菌可不做任何遗传标记, 直接用二倍体或多倍体细胞, ②为了避免融合子杂种化, 使用含有嗜杀质粒的核融合缺陷突变株作为嗜杀质粒供体, ③融合子为异质体细胞。

1 材料与方 法

1.1 材料

本文于 1994 年 7 月 15 日收到。

1.1.1 菌株：用于实验的菌株列于表 1。

表 1 实验用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Phenotype	Matetype	Ploid	Genotype	Notes	Sources
Killer yeast 5045	K ⁺ R ⁺	α	n	his4Kar1-1 [KIL-K ₁] ρ ⁺	Killer plasmid of donor strain	Japan
<i>S. cerevisiae</i> D518	K ⁻ R ⁻	a/α	2n	[KIL-O] ρ ⁺	Receptor strain	Laboratory
Sensitive yeast 1296	K ⁻ R ⁻	a/α	2n	[KIL-O] ρ ⁺	Sensitive strain to killer yeast	Laboratory
Killer yeast K1	K ⁺ R ⁺	a/α	2n	[KIL-k1] ρ ⁺	The standard killer yeast	Japan

Notes, Kar1-1; Defective for nuclear fusion, ρ⁺; Breather with normal.

R⁺/R⁻; Toxin immunity, have/no, K⁺/K⁻; Killer active, have/no

[KIL-k]; Genotype of killer gene, [KIL-O]; Genotype of sensitive gene

1.1.2 培养基：YPAD 培养基⁽⁶⁾；基本培养基 (MM,%)；YNB⁽⁶⁾0.67、葡萄糖 2、处

理琼脂 2、pH4.5~5.5；选择培养基 (%)；YNB0.67、葡萄糖 2、氨基酸混合液 (缺少组氨酸) 5、pH4.5~5.5、处理琼脂 2；再生选择培养基；在选择培养基中加入山梨醇 18.2%；再生完全培养基；YEPD 培养基⁽⁶⁾中加入山梨醇 18.2%；嗜杀活性检出用培养基 (MBM)⁽⁶⁾；酵母孢子培养基⁽⁶⁾。

1.1.3 溶液：ST 缓冲液：1mol/L 山梨醇、0.01mol/L Tris-HCl (pH7.5)；酶 (Zymolyase) 混合液：ST 液 10ml、0.05mol/L EDTA (pH7.5) 0.2ml、Zymolyase-20 000 0.5mg、过滤除菌；STC 溶液：ST 液中加 0.01mol/L CaCl₂；PTC 溶液：PEG-4000 35%、0.01mol/L Tris-HCl (pH7.5)、0.01mol/L CaCl₂；0.05mol/L EDTA 液 (pH7.5)；0.5mol/L β-巯基乙醇液；氨基酸混合液 (缺组氨酸)：100ml 溶液中含有 (mg) Try、Arg、Met 各 48, Tyr、leu、Iso 各 72, Phe 120, Asp 200, Val 300, Thr 400, Ade 200。

1.2 方法

1.2.1 原生质体制备与细胞融合：采用细胞质导入法中的核融合缺陷细胞融合技术⁽⁴⁾，其育种程序如图 1 所示。将 5045 和 D518 菌株分别于 YPAD 中，25℃ 振荡培养 8~12h，离心集菌以无菌水洗涤离心两次，将菌体分别悬浮于 10ml (0.05mol/L EDTA 液 25ml、

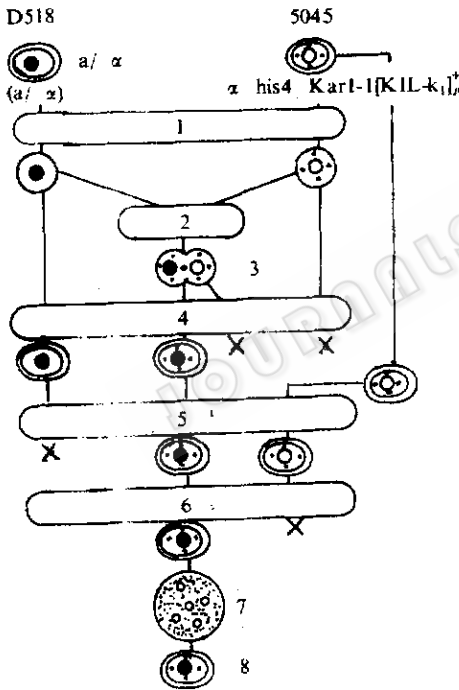


图 1 利用细胞质导入法选育嗜杀啤酒酵母的育种程序

Fig. 1 The Breeding steps of killer beer yeast by the use of the cytoduction technique

1. Protoplasting, 2. Cell fusing, 3. Heterokaryon,
4. Regenerating, selectable medium, 5. Sifting out a parent D518. 6. Sifting out a parent 5045, 7. Picking out fusants from MBM plates, 8. Killer beer yeast

0.05mol/L β -巯基乙醇液 1ml 混合) 溶液中, 30℃处理 10min, 离心集菌后, 各加入 10ml 含 50 μ g/ml 酶混合液, 于 30℃振荡处理 40~60min, 使细胞充分原生质体化。离心收集原生质体, 以 ST 液洗涤离心, 分别悬浮于 1ml STC 液中。取等量 (细胞数 10^7 /ml) 两亲株的 STC 液混合, 30℃振荡处理 15min, 离心集菌并悬浮于 1ml PTC 液中, 30℃处理 20min, 离心集菌, 用 STC 液洗涤离心后再悬浮于 0.2~0.4ml STC 液中, 取 0.1ml 与上层再生选择培养基混合, 倾注于底层再生选择培养基平板上, 25℃培养 5~7d。将平板上生成的菌落连同培养基一起捣碎, 取 5ml 液体移入 50ml 选择培养基中, 25℃振荡培养 24h, 取 2ml 培养液接入 50ml YPAD 培养基中, 并接入对数期的 5045 菌株培养液 2ml, 25℃振荡培养 24h, 离心集菌并以无菌水洗涤两次。将菌体适当稀释, 取 0.1ml 涂于选择培养基平板上, 25℃培养 2~3d。将生长的菌落对应地影印接种于基本培养基和预先涂有敏感菌 1296 的 MBM 培养基平板上。25℃培养 2d。凡在 MM 平板上生长, 并且在相对地 MBM 平板上呈现抑菌圈者为融合子。

1.3 测定方法

1.3.1 嗜杀活性检测: 交叉法^[7]、孔穴法^[4]。

1.3.2 酿酒酵母发酵力及凝集力的测定: 参考文献 [8] 所述的方法。

1.3.3 生长曲线绘制: 于波长为 650nm 处测 OD 值。

1.3.4 融合子的鉴定: 见文献 [9] 所述的方法。

1.3.5 ds-RNA 嗜杀质粒提取及琼脂糖凝胶电泳: 见文献 [10]。

1.3.6 成品啤酒质量鉴定: 见 GB4928-91 的方法。

2 结果与讨论

2.1 亲株发酵力及对嗜杀株敏感性的测定

以发酵过程中 CO₂ 失重为指标, 按常规啤酒酿造方法^[8]观察亲株发酵能力, 结果如图 2。5045 菌株发酵力极差, 只能作为嗜杀质粒的供体。融合时必须避免其核基因对受体菌核基因的影响。D518 菌株发酵性能好。双乙酰含量低, 凝集力强, 并且对嗜杀株 5045 敏感。

2.2 亲株生长曲线的测定

细胞的生理状态对原生质体的形成及融合频率有较大影响。亲株生长曲线如图 3 所示。D518 菌株生长规律为: 当 OD 值为 0.2 时, 细胞生长进入对数期 (6h); 当 OD 值为 0.87 时, 对数期结束进入稳定期 (12h)。5045 菌株培养 6h (OD 值 0.1) 进入对数期, 培养到 18h (OD 值 1.26), 对数期结束。

2.3 影响原生质形成率及融合频率因素

2.3.1 细胞培养: 实验中观察到, 细胞处于对数期 (培养 8~12h, 细胞数约为 3~7 \times 10⁷/ml), 细胞壁易被酶解形成原生质体。因此, 取对数期的细胞作为原生质体制备材料。

2.3.2 预处理对原生质体形成率的影响: 实验结果如表 2。预处理对数期的细胞, 能有效地提高原生质体形成率。在使用酶对酵母细胞进行破壁时, 用 EDTA 与 β -巯基乙醇混合液预处理效果明显。

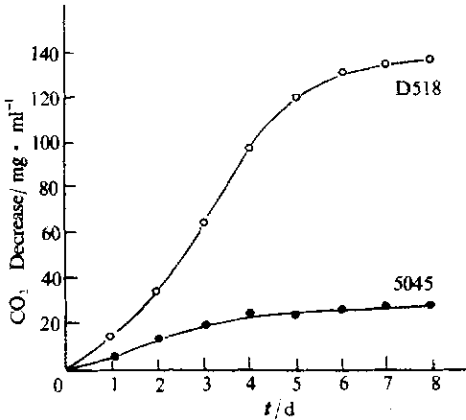


图 2 亲株 D518 和 5045 菌株
发酵过程中 CO₂ 失重曲线

Fig. 2 Double dioxide decrease curves of both strains
D518 and 5045 during the fermentation course

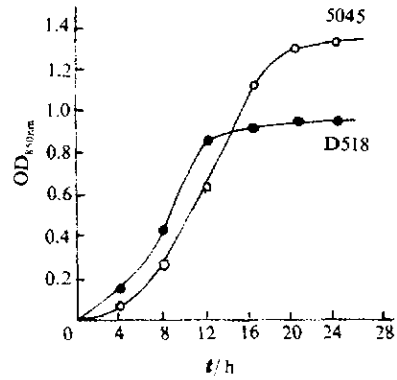


图 3 亲株 D518 和 5045 菌株的生长曲线
Fig. 3 Growth curves of both strains
D518 and 5045

表 2 预处理对 5045 菌株原生质体形成的影响

Table 2 Effect of pretreatment on protoplast formation of 5045 strain

Pretreatment way	The rate of protoplast formation/%	
	Enzyme action time/min	
	30	60
No pretreatment	90.14	95.79
Mixtural pretreatent by 50mol/L EDTA and β-mercaptoethanol	95.38	99.99
Pretreatment by 0.5mol/L Na ₂ SO ₃	99.99	99.99

Notes: The conc. of enzyme 0.05mg/ml

2.3.3 酶浓度及酶解时间对原生质体形成率的影响:实验结果见表 3.采用浓度为 50μg/ml 的酶破 5045 菌株的胞壁,酶解 40min,在显微镜下观察几乎全部细胞形成了原生质体。为了提高细胞融合频度,适当增加酶解时间,形成更多的“真”原生质体,有利于细胞间的融合^[11],因此,本实验以酶浓度为 50μg/ml,酶解时间:5045 菌株为 60min;D518 菌株为 90min。

表 3 酶解条件对亲株原生质体形成率的影响

Table 3 Effect of enzyme action condition on the rate of protoplast formation of 5045 strain

Enzyme conc. /mg · ml ⁻¹	The rate of protoplast formation/%							
	Enzyme action time/min							
	30		40		60		90	
	5045	D158	5045	D518	5045	D518	5045	D518
0.05	95.97	92.50	98.90	95.40	99.99	98.20	99.99	99.90
0.10	97.98	95.00	99.99	98.20	99.99	99.90	99.99	99.90

2: 4 融合子的检出与鉴定

2.4.1 融合子的检出:在选择培养基平板上共生成 181 个菌落,将其对应地影印至 MM 平板和预先涂有敏感菌 1296 的 MBM 平板上,培养后在 MM 平板上生长并且在 MBM

平板上形成抑菌圈者有 128 个菌落。嗜杀质粒转移频率为 70%。将 128 株融合子分别进行小型啤酒酿造试验结果表明, 其中发酵力高于 D518 株者为 10%, 与 D518 株相当者 72%, 不及 D518 株者占 18%, 但都优于 5045 菌株。分析上述结果的原因认为: 亲株 5045 是核融合缺陷突变 (Kar1-1) 在细胞融合中, 只提供细胞质基因。根据 Conde^[14] 提出的酵母细胞融合模型认为, 两细胞间融合首先依赖“逼近”阶段, 此时两个核以准确方位并在一起。其次依赖两核“整合”阶段形成合子。Kar1-1 突变型的性质显示其“逼近”阶段是缺失的 (即核不亲合), 因此形成异核体 (Heterocaryon) 之后多数分离为异质体细胞 (Heteroplasmon)。但是 Kar1-1 突变株是遗传渗漏的, 即在细胞融合过程中, 极少数异核体发生核融合形成杂合细胞, 其频率为 0.3%^[12]。通过多次小型酿酒试验, 最终选出 3 株发酵性能好、酒质纯正的融合子 KD41、KD102、KD127。见表 4。

表 4 融合株和亲株的小型啤酒酿造试验结果

Table 4 Laboratory scale brewing of the fusants and the parents

Strains	Double dioxide decrease/g	Attenuation appraet degree/%	Concervation	Residual sugar/°Bx	Diacetyl /mg · ml ⁻¹
D518	12.4	76.3	1.5	2.8	0.14
5045	1.6	12.1	1.2	10.6	0.20
KD41	12.6	76.4	1.5	2.8	0.14
KD102	13.2	79.4	1.6	2.4	0.13
KD127	12.5	76.4	1.5	2.8	0.13

Notes: conc. of malt 12.1°Bx, fermentation temperature, 15°C, fermentation time/10d

2.4.2 融合子特性分析

分别测定亲株与融合子 (KD102) 的细胞大小、体积, 营养要求, 生孢能力及呼吸缺失等性状 (结果见表 5)。结果表明, 融合株诸性状与亲株 D518 相同。

表 5 亲株与融合子 KD102 特性比较

Table 5 The comparison of parents and fusants' characteristics

Characteristic	Strains		
	Donor5045	Receptor D518	Fusant KD102
Killer activity	+	-	+
Growth in MM (YNB)	-	+	+
Growth in YNB+His	+	+	+
Dyed with TTC	Red	Red	Red
The ability of Sporing	-	-	-
The mean size of cell/ μm	5.30×5.22	10.98×8.82	10.96×8.82
The mean volume of cell/ μm	75.580	447.180	446.190
Axis ratio/%	0.985	0.803	0.804
The form of cell	Circle	Ellipse	Ellipse
The characteristics of fermentaion	Very bad	Good	Good

2.4.3 融合子的嗜杀质粒: 采用改进的 Fried 和 Fink 方法^[13] 提取亲株及融合株细胞的嗜杀质粒 (ds-RNA)。其琼脂糖凝胶电泳图谱如图 4 所示。D518 菌株的提取物中不含有 L-ds-RNA 和 M-dsRNA; 5045 菌株的提取物中含有 L-dsRNA 和 M-dsRNA; 融合株的提取物中含有与 5045 菌株相同的 L-ds RNA 和 M-ds RNA。从而证明融合子的嗜杀质粒

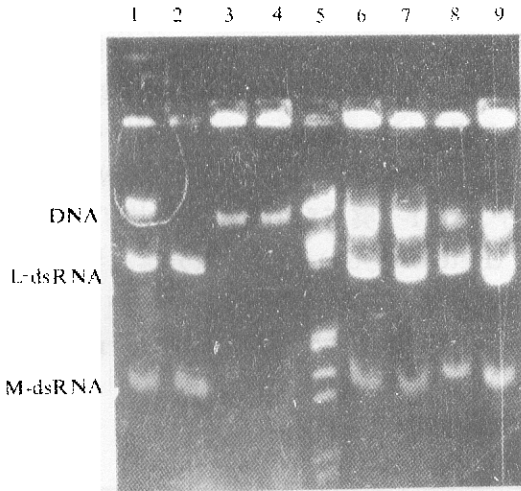


图4 ds-RNA 嗜杀质粒琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 The agarose gel electrophoreses of dsRNA killer plasmid

- 1, 2. The standard strain of k_1 killer yeast
- 3, 4. The receptor strain D518
5. The molecular mark of λ DNA Hind III + EcoK I
- 6, 7. The killer plasmid of donor strain 5045
- 8, 9. The fusion strain KD102

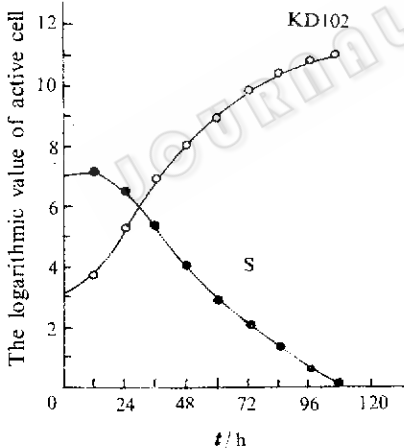


图5 以1:5比例接种KD102和糖化酵母混合培养的各菌消长曲线

Fig. 5 The growth and decline curve of inoculating the mixture of strain KD102 and *S. diastaticus* by proportion 1:5

(见图5)。使用选育的嗜杀啤酒酵母进行啤酒发酵时,即使污染5倍量的野生酵母,在5d内也会被全部杀死,保证发酵体系统种发酵的进行。因此可以认为,选育嗜杀啤酒酵母用于啤酒酿造,具有重要的应用价值。

是由亲本5045菌株提供的。

2.4.4 融合子遗传稳定性:将融合子KD102菌株在麦芽汁斜面上连续传代15次,以1L规模发酵试验测定各代菌株的发酵性能变化及其嗜杀活性,结果如表6所示。

由表6可知,融合株KD102在传代过程中发酵性及嗜杀活性无差异,说明其遗传性状稳定。在10t规模的传统啤酒酿造中,一年内未见性能发生变化。

表6 融合子KD102转代稳定性

Table 6 The stability of fusant strain KD102

Aspects	Regeneration/th			
	1	5	10	15
CO ₂ loss in weight/g · (dL) ⁻¹	13.20	13.10	13.30	13.15
Apparent attenuation/%	79.80	79.40	79.30	79.50
Activity of killer	+	+	+	+

2.5 融合株的嗜杀毒素的活性及热稳定性

嗜杀酵母在生长繁殖过程中,向体外分泌嗜杀毒素,其分子量约为11470的单纯蛋白质^[4]。以融合株培养液的无菌滤液为样品,以敏感菌1296为检测嗜杀活性标准菌,按孔穴法^[4]测定。结果表明,滤液具有显著地抑制1296株活性的作用。从而说明融合株在其细胞繁殖中,也能向体外分泌毒素。将该滤液在35℃下处理15min仍有活性,40℃处理活性完全丧失。经北京市卫生防疫站对K₁型嗜杀酵母及发酵液全面毒理学检验证明,该毒素对人畜无害^[6]。

2.6 发酵过程中融合株对野生酵母的抑制

在常规啤酒酿造条件下,以1:5比例接种融合株KD102和糖化酵母(啤酒发酵中主要杂菌)进行酿造实验,每12h取样,测定两菌株细胞数变化并绘制细胞消长变化曲线

参 考 文 献

- [1] Bevan E A, Makower M. Proc. 11 Int. Con Genet, 1963, (1); 203~205.
[2] Palfree R, Bussey H. Eur J Biochem, 1970, (93); 487~493.
[3] Herring A J, Bevan E A. J Gen. Virol, 1974, (22); 387~394.
[4] 杜连祥, 王昌禄. 嗜杀酵母在酒类酿造中的应用, 北京: 中国食品出版社, 1989.
[5] 北京市卫生防疫站毒理报告书. 嗜杀酵母的毒理学实验报告, 北京: 1985.
[6] 杜连祥, 王昌禄, 鲁梅芳等. 工业微生物实验技术, 天津: 天津科技出版社, 1992.
[7] 王昌禄, 张兆朵, 杜连祥. 食品工业, 1992, (2); 19~23
[8] 管敦仪主编. 啤酒工业手册, 北京: 轻工业出版社, 1989; (中册) 209~216.
[9] 王昌禄, 杜连祥, 张兆朵等. 天津微生物, 1991, (4); 8~13.
[10] 鲁梅芳, 路福平, 王昌禄等. 天津微生物, 1992 (1); 9~13.
[11] Jacek K, Zoigniew K. Acta Microbiologic Polonica, 1984, 33 (1); 25~35.
[12] 邢家德郎; 醸协, 1984, 79 (4); 210~215.
[13] Howard M, Grealid R, Fink. H. Nae Acad sci., USA, 1987, 75 (9); 4224~4228.
[14] 刘淑英, 杜连祥, 张国政等; 食品与发酵工业, 1989, (6); 17~22.

The Breeding of Killer Beer Yeast by the Use of the Cytoduction Technique

Du Lianxiang Wang Changlu Lu Meifang

(Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222)

Abstract On condition that don't make any genetic marks for receptor *Saccharomyces cerevisiae* D518, killer plasmid of donor strain-killer yeast 5045 was introduced into it by use of the cytoduction technique and one stable fusant in genetics KD102 which to contain the good characters of both parents was obtained. Analyzing the results showed that KD102 was a heteroplasmon which contained the killer plasmid of donor strain 5045 and the nuclear gene of receptor D518. The KD102 strain had been applied in laboratory scale, medium-size and large scale beer brewing the results indicated that it can inhibit the contamination of wild yeast during the period of fermentation, purify the fermenting system and improve the biochemical stability of beer.

Key words Killer yeast, killer plasmid, cytoduction, protoplast fusion