酿酒酵母菌单倍体分离及其呼吸缺陷型的选育

吕艳蓓[1],王昌禄[2],陈 军[1]
(1.天津津酒集团有限公司,天津 300131;2.天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津 300222)

摘 要: 采用不同培养基对MT09酿酒酵母进行不同条件下的生孢培养实验,通过菌体前培养和诱导生孢子、单倍体细胞的分离、单倍体生孢能力的确认、菌体生长曲线的绘制、单倍体菌株的诱变和营养缺陷型的筛选,得出单倍体菌株D3作为最好的诱变出发菌株。最后筛选出菌株D3-02为遗传稳定性的呼吸缺陷型突变株。(孙悟)

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 单倍体; 呼吸缺陷型; 选育
中图分类号: TS261.1;Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2005)05-0045-03

Haploid Separation of Distillers Yeast and Breeding of Its Respiration Defect Type

LU Yan-bei[1], WANG Chang-lu[2] and CHEN Jun[1]
(1.Tianjin Jinjiu Group Co. Ltd., Tianjin 300131; 2.School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin 300131, China)

Abstract: Spore-producing experiments of MT09 (distillers yeast) were done (using different culture mediums and under different conditions). As a result, haploid strain D3 was obtained through thallus culture and inducement, separation of haploid cells, identification of spore-producing capability of haploid, drawing of thallus growing curve, mutation of haploid strain, and breeding of haploid respiration defect type. D3 was used as the best mutation startup strain and finally D3-02 was screened as respiration defect mutant strain of genetic stability. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; distillers yeast; haploid; respiration defect type; breeding

酿酒酵母属的特征为营养细胞主要是双倍体,子囊由双倍体营养细胞直接转化而来[1]。很难通过药物或放射线处理而得到二倍体突变株,这是因为当酵母细胞为二倍体时,对它进行诱变处理,得到的只是显性突变,而许多隐性突变则被漏掉了[2]。随着工业微生物育种的发展,原生质体融合技术应用的领域越来越多,原生质体融合技术可以在不受接合型限制的条件下进行微生物的育种工作,而生孢及带有遗传标记的单倍体菌株的获得是利用原生质体融合进行育种的重要环节。

酵母线粒体基因组缺失突变而导致菌体氧化磷酸化功能缺失的一类突变型,通常称之为呼吸缺陷型。这类突变型不会发生回复突变,因此是遗传稳定的[3]。它们的生理生化特征包括:不能利用非发酵性碳源(如甘油、乙醇等),只能利用发酵性碳源(如葡萄糖、果糖等),进行糖酵解产生乙醇来提供生长代谢所需要的能量。而野生型则可以利用发酵性和非发酵性两类碳源产能和生长:在耗氧条件下既可以利用发酵性碳源进行酵解和三羧酸循环及氧化磷酸化产能,也可以利用氧化非发酵性碳源产能;厌氧条件下则只能利用发酵性碳源进行糖酵解和乙醇发酵产能和生长。呼吸缺陷型酵母菌株是酵母中丧失呼吸能力的突变体,酒精脱氢酶活力比野生型高,对酒精发酵有益,同时呼吸缺陷型也是育种工作的一个有效的选择标记。筛选呼吸缺陷型酵母菌株常采用TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)显色鉴别快速筛选,TTC是一种显色剂,能与氧气竞争呼吸链中的还原氢,其还原产物三苯基甲腈(TF)以红色结晶存在于细胞内,使呼吸正常的酵母呈红色,而呼吸链发生突变的酵母菌因缺少还原氢而不能与2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)结合生成三苯基甲腈(TF)而呈白色[4]。

本文在几种不同生孢培养基的条件下进行生孢实验,选择一种最适培养基进行单倍体分离,发酵法筛选出一株性能良好的单倍体,并通过紫外线诱变用TTC平

收稿日期:2004-11-05; 修回日期:2005-01-24
作者简介:吕艳蓓(1972-),女,天津市人,硕士,工程师。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

板筛选出带有呼吸缺陷型遗传标记的单倍体突变株,为进一步的融合育种提供前提条件。

1 材料

1.1 菌种

MT09,实验室保藏菌种。

1.2 培养基

YEPD培养基:葡萄糖2%,酵母膏1%,蛋白胨2%,固体培养基加2%琼脂,pH6.0,121℃,20 min湿热灭菌。

生孢培养基A:氯化钾0.76%,醋酸钠0.84%,葡萄糖0.1%,酵母膏0.25%,琼脂2%,pH自然。

生孢培养基B:醋酸钠0.4%,棉子糖0.04%,琼脂2%,pH6.0。

生孢培养基C:醋酸钠0.82%,氯化钾0.18%,琼脂2%,pH6.0。

生孢培养基D:氯化钠0.062%,醋酸钠0.5%,胰蛋白胨0.25%,琼脂2%。

生孢培养基E:醋酸钠0.82%,氯化钾1.86%,硫酸镁0.022%,葡萄糖0.1%,琼脂2%,pH6.0。

TTC上层培养基:葡萄糖0.5%,琼脂1.5%,TTC0.05%。

TTC下层培养基:葡萄糖1%,蛋白胨0.2%,酵母膏0.15%,磷酸二氢钾0.15%,硫酸镁0.04%,pH5.5~5.7,琼脂2%。

糖发酵培养基:葡萄糖10%,酵母膏0.5%,蛋白胨0.3%。

2 实验方法[1]

2.1 菌体前培养和诱导生孢子

取经纯化的酵母斜面菌种一环,接于装有5 mL YEPD液体培养基试管中,28℃培养24 h。取2 mL培养液接于装有20 mLYEPD液体培养基的250 mL三角瓶中,28℃培养24 h。3000 r/min,10 min离心处理收集菌体,用生理盐水离心洗涤2次。将菌泥堆积于生孢子培养基平板上,25℃培养3~4 d,在显微镜下观察子囊孢子形成的情况。

2.2 单倍体细胞的分离

酶解子囊壁:从生孢子培养基上取适量已形成子囊的菌体,于1 mL浓度为1 mg/mL Zymolyase酶液中,30℃水浴振荡处理40~50 min,在显微镜下观察子囊壁的水解情况。

单倍体细胞分离:待子囊壁去除后,将全部菌液转移至装有9 mL生理盐水和玻璃珠的100 mL三角瓶中,58~62℃水浴处理10 min,之后加入2 mL无菌液体石蜡,激烈振荡40~60 min,使子囊孢子充分散开。将菌液移入离心管,离心(2000 r/min,5 min)分离,用移液管小心地吸取石蜡层,适当稀释后,取0.1 mL涂布于完全培养基平板上,28℃培养2~4 d。挑取小菌落于完全培养基斜面中保存,待鉴定用。

2.3 单倍体生孢能力的确认

单倍体细胞不具有生成子囊孢子的能力,在生孢培养基上不形成子囊。因此,将待鉴定的菌株按前述诱导生孢子的方法,在生孢培养基平板上测定其生孢能力。一般在22~25℃条件下,培养14 d以上,镜检不生孢子的菌株可确认为单倍体。

2.4 菌体生长曲线的绘制(比浊法)

将待测菌接种于YEPD斜面培养基,活化后再转接于液体培养基内,28℃培养,每隔2 h取样测定OD值。以培养时间为横坐标,菌液OD值为纵坐标,绘制菌体生长曲线。

2.5 单倍体菌株的诱变和营养缺陷型的筛选

2.5.1 存活率曲线的测定

选取对数生长中后期的菌体,离心去除发酵液(3000 r/min),以生理盐水洗涤2次,悬浮于12 mL生理盐水中,吸取1 mL适当稀释,活菌计数法测定细胞悬浮液浓度。另取10 mL菌液于带有磁棒的培养皿中,将皿放置于诱变箱的磁力搅拌器上,分别照射20 s,40 s,60 s,80 s,100 s,120 s,140 s,160 s,180 s,取不同时间诱变处理菌液1 mL适当稀释进行活菌计数,测定处理液中存活细胞浓度,绘制存活率曲线。

2.5.2 检出呼吸缺陷型菌落

按照与存活率测定相同的方法,选取存活率在20%~30%的处理时间照射,吸取1 mL适当稀释后涂布于YEPD平板,待长出菌落后,作好标记,用无菌牙签挑取小且干燥的白色菌落于TTC下层平板培养2 d后,倒入TTC上层培养基培养1~3 h,找出TTC上层平板上的白色菌落即是呼吸缺陷型菌落,转接入YEPD固体斜面待鉴定。

3 结果与讨论

3.1 生孢培养基的选择

经过几批生孢实验,镜检发现出发菌株MT09均是在生孢培养基E上生孢最好。

3.2 单倍体菌株的获得和发酵筛选

进行单倍体分离并确认后得到了9株单倍体,进行发酵实验,用生物传感仪测定残糖浓度,蒸馏法测定酒精度[4]。结果如表1。

由表1可知,单倍体菌株D3可作为最好的诱变出

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　9 株单倍体的残糖浓度、失重、酒精度

菌株编号	残糖(g/L)	失重(g)	酒精度(%, v/v)
MT09	0	2.776	2.5
D1	31	1.963	2.6
D2	51	1.578	0.6
D3	7	2.797	3.3
D4	24	2.221	2.4
D5	0	2.585	2.4
D6	9	2.672	2.4
D7	6	2.699	2.3
D8	7	2.560	2.4
D9	16	2.533	2.4

发菌株。

3.3　生长曲线的绘制

微生物所处的生理状态对诱变效果有很大影响，生长旺盛的对数期细胞对诱变剂敏感，突变率高且重现性好，同时为保证诱变处理时具有一定的细胞浓度以增加变异细胞总数，为此选用对数生长中后期的细胞进行诱变处理。按 2.4 所述方法测定的 D3 生长曲线如图 1。

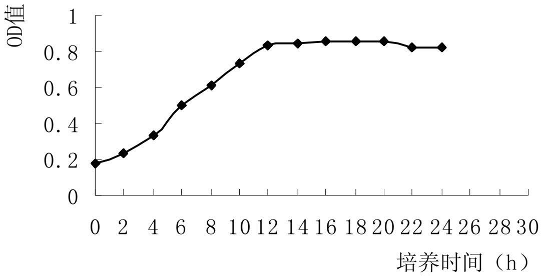

图 1　单倍体菌株 D3 在 YEPD 液体培养基中的生长曲线

由图 1 可见，单倍体菌株 D3 在 YEPD 液体培养基中生长，于 4 h 开始进入对数期，14 h 进入稳定期。因此，选取 10 h 菌体培养液进行紫外线照射致死率曲线测定和诱变。

3.4　紫外诱变选育呼吸缺陷型突变株

3.4.1　诱变剂量的选择

任何诱变剂都同时具有致死和诱变的双重效应。因此需要测定单倍体菌株 D3 经紫外线照射后的存活率曲线，确定最佳诱变时间。按照 2.5 所述方法将单倍体菌株 D3 培养至对数生长中后期 10 h 后，测得其紫外线照射的存活率曲线，如图 2。

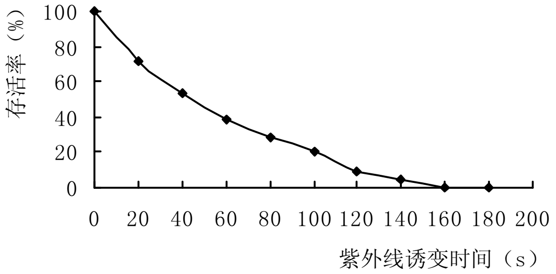

图 2　单倍体菌株 D3 经紫外线照射后的存活曲线

近年来，通过紫外线、X 射线和乙烯亚胺等多种诱变剂诱变效应的研究发现，正向突变较多地出现在偏低剂量中。因此选择紫外线照射时间为 70~90 s（存活率为 20 %~30 %）作为诱变剂量。

3.4.2　紫外诱变及呼吸缺陷型突变株的筛选

按照 2.5.2 所述方法得到的菌落中根据菌落形态、显微形态的观察与鉴定挑选出特征较典型的候选呼吸缺陷型突变株 5 株，并在 YEPD 和甘油为唯一碳源的固体和液体培养基中对照培养，进一步确定它们均是在 YEPD 中生长而在甘油中不生长的呼吸缺陷型突变株。并进行发酵实验，挑选菌株 D3-02 进行反复传代，确保其遗传稳定性。

在工业微生物育种中，原生质体融合技术是摆脱接合型及双亲遗传差异等限制因素影响较好的选择。呼吸缺陷适合作为融合育种中单倍体菌株的遗传标记，方便融合子的检出。传统的化学诱变方法筛选呼吸缺陷型突变株对 DNA 的破坏比较剧烈，常导致多基因突变，且化学诱变剂多为强致癌物质，给操作者带来极大的不便；而本方法采用的紫外诱变比较温和，而且 TTC 鉴别性筛选周期较短，是呼吸缺陷型突变株的一种快速简便的筛选方法。

参考文献：

[1] 白逢彦.酿酒酵母属的分类学研究进展[J].微生物学通报，2000，27（2）：139-140.

[2] 丁友方，陈宁.普通微生物遗传学[M].天津：南开大学出版社，1990，194.

[3] 金建玲，等.酿酒酵母呼吸缺陷型和野生型酒精发酵特性的比较分析[J].微生物学通报，2003，30（5）：9-10.

[4] 冯友军，等.酒精酵母的紫外诱变呼吸缺陷型突变株的筛选[J].广西轻工业，2002，（5）：17-18.

[5] 杜连祥，等.工业微生物学实验技术[M].天津：天津科学技术出版社，1992，218-219.

[6] 天津轻工业学院，等.工业发酵分析[M].北京：中国轻工业出版社，1980.

《中国酒后处理技术》出版发行

本刊讯　沈祖志院长编著的《中国酒后处理技术》一书，近日由四川出版集团·四川科学技术出版社出版发行。

该书从酒的主要成分分析、出现浑浊的原因，异杂味的处理方法和酒的催熟陈化等方面进行了全面的分析研究，并对酒用水的处理、酒的勾兑与调味进行详细阐述，是近年来关于酒类生产技术的较为详尽的参考书之一。（小凡）

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net