

酿酒酵母产孢培养基的筛选及单倍体的分离

李 华, 刘丽丽, 李 娟

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 为获得酿酒酵母 1450 遗传育种单倍体亲本, 采用不同的培养基对酿酒酵母 1450 进行了生孢培养实验, 通过优化得出, 葡萄酒酵母 1450 的最适宜的产孢条件是, Mcclary 培养基于 25~28℃ 条件下培养 6 d, 在此条件下, 酿酒酵母 1450 的产孢率为 70% 左右。子囊孢子分离得到单倍体菌株, 通过测定这些单倍体菌株的发酵力和发酵性能, 筛选出单倍体 S-3 为一株优良的酿酒酵母 1450 遗传育种单倍体亲本。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 产孢条件; 单倍体

中图分类号: Q93-3; TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2008)06-0022-03

The Screening of Sporogenous Medium and Haploid Separation of *Saccharomyces Cerevisiae*

LI Hua, LIU Li-li and LI Juan

(College of Enology in NWSUAF, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: To obtain a haploid genetics hybrid breeding of 1450 (*S.Cerevisiae*), Spore-producing cultivation experiments of 1450 were done by using different culture media and under different conditions. The results showed that the optimum sporulation medium and cultivation time were McClary medium and 6 days, the cultivation temperature must be controlled at 25~28℃. Under the above conditions, the sporulation rate could reach to about 70%. A yeast strain S-3 as a genetics hybrid breeding was isolated by comparasion of the fermentation capability and performance of haploid.

Key words: microbe; *S.Cerevisiae*; sporulation condition; haploid

诱导酵母产孢进而获得单倍体是进行酵母遗传学和育种工作极为关键的一步, 它既是性状遗传分析所必需, 又可为杂交作好亲本的准备。对于实验室用标准二倍体酿酒酵母的孢子产生条件, 国内外均有报道^[1~3]。孢子的获得必须要提供适当的产孢条件, 酿酒酵母营养体在营养缺乏等饥饿条件下, 经过减数分裂由二倍体变为单倍体, 形成子囊。在常用的酵母产孢培养基中没有一种产孢培养基能够适用于所有的酵母产孢。为此, 在几种不同生孢培养基的条件下进行酿酒酵母 1450 的生孢实验, 选择一种最适培养基进行单倍体分离, 并采用发酵法筛选出一株性能良好的单倍体。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae*) 1450, 由轻工部发酵研究所提供。

1.2 培养基

YPD 培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸膏 1%, 自然 pH, 固体加 2% 琼脂(需要时加入)。

基金项目: 陕西省 13115(2007ZDKG-09)资助项目。

收稿日期: 2008-04-22

作者简介: 李华(1959-), 男, 重庆梁平人, 西北农林科技大学葡萄酒学院教授、博士生导师, 研究方向: 葡萄与葡萄酒研究。

产孢培养基: McClary 培养基^[4]: 葡萄糖 0.1%, KCl 0.18%, NaAc 0.82%, 酵母膏 0.25%, 琼脂 2%; SPM 培养基^[5]: 葡萄糖 0.1%, KCl 1%, KH_2PO_4 5 mmol/L, 酵母膏 0.25%, 琼脂 2%; Kley 培养基: 蛋白胨 0.25%, 葡萄糖 0.062%, NaAc 0.5%, 琼脂 2%; 马铃薯条培养基: 马铃薯洗净切成条状斜面, 大头朝下放入试管中, 管底预先放入润湿的棉团, 高压蒸汽灭菌 20 min。

模拟发酵培养基: 葡萄糖 200 g/L, 酵母粉 0.5%, 蛋白胨 1%, 蒸馏水配制, pH3.0。

1.3 诱导孢子形成的方法^[6]

将酿酒酵母菌株接种于 YPD 培养基 28℃ 培养, 活化 2 次后接入产孢培养基上, 于 20℃、23℃、25℃、28℃、32℃ 5 个温度梯度下培养, 在 3~7 d, 每天在显微镜下观察子囊孢子的形成情况, 统计一个视野内酵母总数和子囊孢子数, 每个梯度观察 5 个视野, 计算产孢率。

$$\text{产孢率}(\%) = \frac{\text{子囊孢子数量}}{\text{总细胞数}}$$

1.4 子囊孢子的染色^[7]

取干净载玻片 1 张, 滴加少许蒸馏水, 用接种环取

菌少许涂片, 自然干燥; 在灯焰上通过火焰 2~3 次, 冷却; 滴加石炭酸复红液, 在火焰上方加热 5~10 min 至冒气为止, 冷却, 水洗; 加酸性酒精脱色 10~20 s, 水洗; 滴加美兰染色液染色 1min, 水洗, 干燥; 在低、高倍镜下观察, 子囊孢子为红色, 菌体为青蓝色。染色液的配制方法参见文献[8]。

1.5 子囊孢子分离和单倍体的获得^[9]

将酿酒酵母 1450 活化后接种至 YPD 培养基, 28 培养 2 d, 转接于产孢培养基, 28 培养 2 d 后涂片染色: 观察孢子形成与否。待孢子大量生成时, 用无菌生理盐水制成孢子悬液, 取无菌的 1.5 mL 离心管 1 只, 加入 1 mL 孢子悬液, 离心 5 min(5000 r/min) 收集菌体, 加入 20 mg/mL 的蜗牛酶液 1 mL, 33 水浴酶解 4 h, 58 水浴处理 8 min, 迅速冷却菌液, 倒入装有玻璃珠的无菌离心管中, 加适量无菌生理盐水和无菌液体石蜡, 振荡 20 min, 梯度稀释 10^5 倍, 取菌液涂在完全培养基平板上, 28 培养至长出明显菌落。将平板上各个菌落按上述方法在产孢前培养基和产孢培养基中再培养, 染色后镜检并拍照, 放大倍数为 10×100 , 凡不形成子囊孢子的基本确定为单倍体细胞。把确定为单倍体的菌株分别保种(YPD 斜面、甘油管)。

1.6 单倍体菌株发酵力的测定

活化菌株接种至 YPD 培养基隔夜培养后, 于 28 接种至发酵培养基。发酵过程中定时称重并记录数据, 计算发酵瓶失重量(即 CO_2 的释放量)。然后以发酵瓶失重为纵坐标, 发酵时间为横坐标, 绘制发酵速率曲线。

1.7 单倍体生长曲线的绘制^[10]

待测菌活化后转接至液体培养基, 培养温度 28 , 每 2 h 取样测定 OD_{600} 值。以培养时间为横坐标, 菌液的 OD_{600} 值为纵坐标, 绘制菌体生长曲线。

1.8 残糖和酒精度的测定

参照文献[11]所述的方法。

2 结果与分析

2.1 不同产孢培养基中酵母的产孢率

任取 5 个视野, 统计其中子囊数及未形成子囊的细胞数, 计算产孢率(表 1)。

表 1 不同产孢培养基中酵母的产孢率 (%)

产孢培养基	培养时间(d)				
	3	4	5	6	7
麦(Mcclary)琼脂培养基	34.88	43.54	51.73	69.18	75.79
SPM培养基	—	2.10	3.82	6.03	6.47
Kleyn培养基	4.18	9.33	15.45	15.49	15.54
马铃薯培养基	30.35	36.13	43.71	46.56	47.25

注: “—”表示几乎没有产孢。

从表 1 可知, 酿酒酵母在麦氏(Mcclary)琼脂培养基上的产孢量最大, 产孢效果最好, 马铃薯培养基次之。

SPM 和 Kleyn 培养基的产孢率很低, 在产孢基本结束时产孢率都在 20% 以下, 因此, 在对 1450 进行产孢时不推荐使用。随着时间的延长, 各产孢培养基的产孢率都在逐渐增加, 到 6 d 时, 子囊孢子的生长基本停止, 因而在酵母单倍体的分离制备时选用麦氏琼脂培养基培养 6 d 较好, 此时产生的孢子量大且活性较高。此外, 该结果也可以说明在产孢培养基中加入适量醋酸盐可诱导产孢, 缓冲液在产孢培养基中不仅可以维持一定的 pH 范围, 而且醋酸还有启动孢子形成的作用^[12]。

2.2 不同温度条件对酵母产孢的影响

一般来说, 温度过高或过低都会对产孢率有影响, 为此测定了在 20、23、25、28、32 下, 酿酒酵母 1450 在 Mcclary 产孢培养基中的产孢率随时间的变化情况, 结果见图 1。

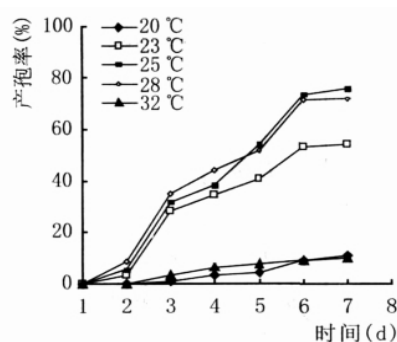


图 1 不同温度条件下酿酒酵母的产孢率

图 1 表明, 当温度低于 20 或者高于 32 时, 酿酒酵母 1450 的生孢子能力下降, 而在温度为 25~28 , 培养时间为 5~7 d 时, 生孢能力变化并不是很大, 到 6 d 时, 子囊孢子几乎停止生长, 这说明温度对酵母生孢能力的影响与相关酶的活性有关^[13]。

2.3 单倍体的获得

利用最佳产孢培养基 Mcclary 培养基, 在 25 对酿酒酵母 1450 进行产孢培养, 在 6 d 时按 1.4 所述的方法进行单倍体的制备及检验, 对检验结果染色鉴定后进行拍照, 见图 2 和图 3。

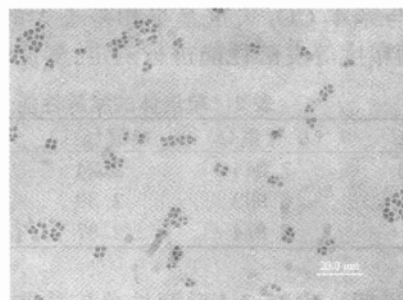


图 2 酵母孢子

由图 2 可知, 酿酒酵母 1450 的孢子多为 2 孢或 3 孢, 少数为 4 孢。这可能是由酿酒酵母的 2 倍体或准备体特性造成的。将在产孢培养基上不表现产孢的菌种

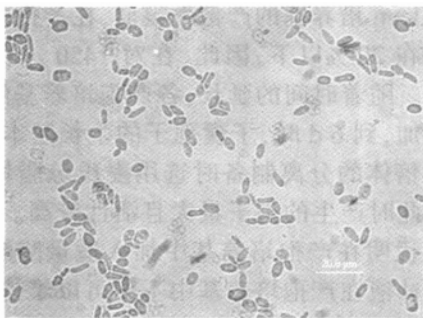


图 3 单倍体

(染色结果如图 3 所示)进行保藏,用来进行下一步实验。

2.4 单倍体酒精发酵力的测定

本实验中共获得酿酒酵母 1450 的单倍体 9 株。分别将其接入模拟发酵汁发酵,测定酒精发酵力并与亲本 1450 的发酵力进行比较,对与亲本 1450 CO_2 总失重基本相同的单倍体进行发酵力曲线的绘制,结果见图 4。

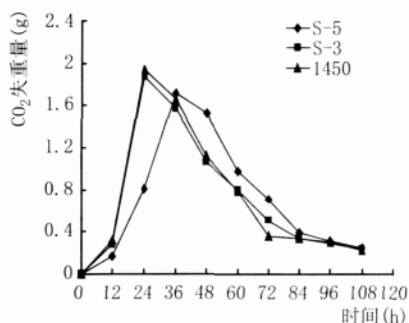


图 4 单倍体及亲本发酵曲线

由图 4 可知,单倍体 S-3 与亲本 1450 发酵力基本一致,都是在 24 h 时 CO_2 失重达到最大值,但 1450 在 72 h 后 CO_2 失重量基本稳定,而单倍体 S-3 和 S-5 都是到 84 h 时才开始达到一个稳定值,单倍体 S-5 较亲本和 S-3 来说 CO_2 失重的最大值在 36 h 时出现,但随后的失重值较其他菌株明显,说明其发酵力相对其他两株菌来说比较平稳。

2.5 单倍体发酵性能的测试

将单倍体接入模拟发酵培养基发酵 7 d 后对 S-3、S-5 两株与亲本 CO_2 失重基本相差不大的单倍体菌株的残糖、酒精度等发酵性能进行测定,测定结果见表 2。

表 2 单倍体的发酵性能

菌株	CO_2 失重(g)	残糖(g/L)	酒度(%vol)
1450	7.044	2.24	11.2
S-3	6.952	2.39	11.1
S-5	6.874	2.87	10.9

表 2 说明,发酵 7 d 后两株单倍体与亲本 1450 的 CO_2 失重基本相同,S-5 发酵后的残糖含量高于其他两株菌,酒度较其他两者低。而单倍体菌株 S-3 则较好地保持了亲本的优良发酵性能,发酵残糖含量及酒度均与亲本差别不大,因此,其可以作为进行性状遗传分析用

菌株,也可作为良好的杂交亲本供育种使用,接入甘油管后进行保藏。

综合比较单倍体菌株的发酵力及发酵性能可以得出,由同一个出发菌进行分离获得的单倍体菌株之间发酵性能差别较大,说明酿酒酵母的发酵能力由多个基因控制^[14]。

2.6 单倍体 S-3 生长曲线的绘制

微生物所处的生理状态对其应用于育种中的效果有很大影响,生长旺盛的对数期细胞对外界环境更敏感,选取对数生长中后期的单倍体进行遗传育种,成功率更高。测定的 S-3 的生长曲线见图 5。

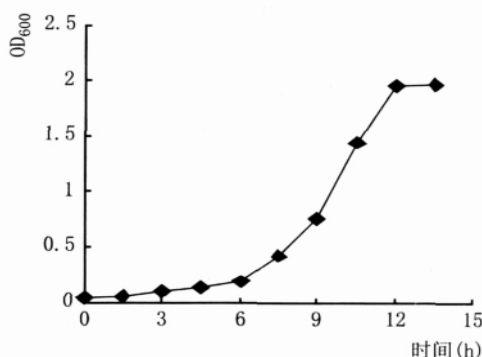


图 5 S-3 的生长曲线

由图 5 可知,单倍体菌株在 YPD 液体培养基中生长,于 6 h 开始进入对数期,12 h 进入稳定期。因此,在进行育种工作时选取 9 h 左右的菌体培养液较好。

3 结论

3.1 本实验对 4 种常用于酵母产孢的培养基进行生孢培养以筛选出最适合酿酒酵母 1450 产孢的培养基,结果表明,Mcclary 培养基用于 1450 的产孢效果最好,在培养至 6 d 时,产孢率达到 70 %。

3.2 用 Mcclary 培养基对 1450 进行产孢培养,温度控制在 25~28℃,培养 5 d 以上,产孢率可达 50 %,当培养到 6 d 时孢子生成量基本稳定在 70 %左右。说明温度对酵母生孢能力的影响与相关酶的活性有关。

3.3 在测定菌株的发酵力试验中,发现单倍体菌株的酒精发酵力差异较大,推测原因是酒酵母的发酵能力由多个基因控制。影响酒精发酵性能的因素很多,单倍体的细胞生长速度比亲本二倍体的生长速度稍慢,其发酵周期也较长。通过酒精发酵力和酒精发酵性能的综合筛选,得到 1 株性能良好的单倍体 S-3,可以作为以后杂交实验的亲本。

参考文献:

- [1] 朱旭芬,吴雪昌,曾云中,等.酿酒酵母产孢条件及核倍性分析[J].科技通报,2002,18(5): 303- 397.
- [2] 何秀良,段俊英,柴明,等.耐酸耐糖高产乙醇单倍体酵母菌

(下转第 27 页)

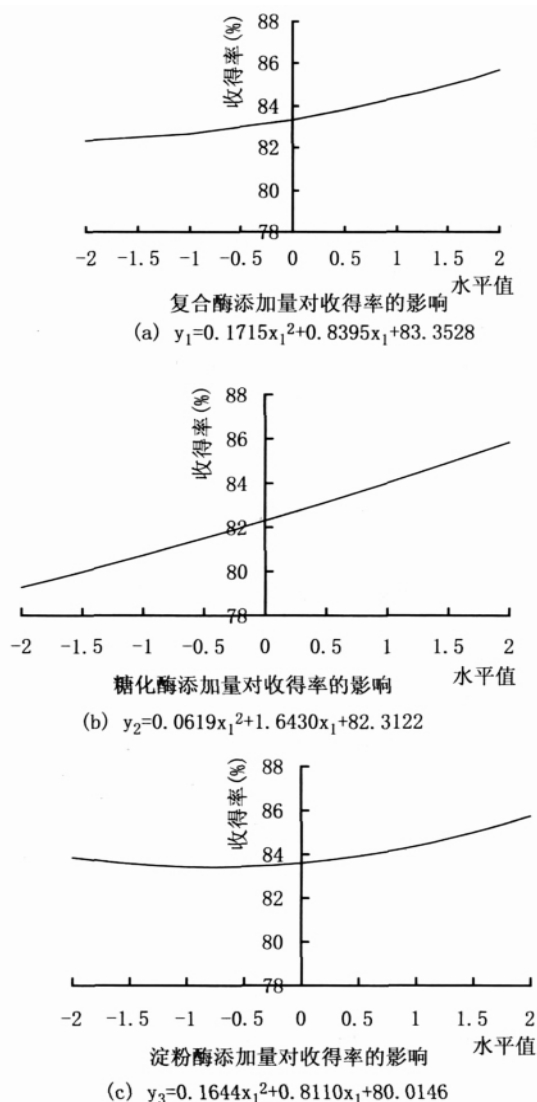


图1 麦汁收得率随试验因素变化规律

从图1可知,随着各种酶用量的增加,麦汁收得率也相应增加。主要是由于酶类的加入有利于淀粉类物质

的降解,使得原料利用率提高,收得率相应增加。但从经济效益角度考虑,酶用量不是越多越好,应该有一个发挥最大效益的用量水平。

3 结论

3.1 以麦汁收得率为考察指标,经过频数选优得出最佳糖化外加酶添加量的范围,为:复合酶用量为 1.95 ~ 2.24 mL;糖化酶用量 2.04 ~ 2.30 mL;淀粉酶用量 2.16 ~ 2.67 mL。

3.2 各因素对麦汁收得率的影响程度由因子贡献率 ($x_1=1.49$, $x_2=0.48$, $x_3=1.80$) 可知,其影响程度按从大到小的顺序依次为: $x_3 > x_1 > x_2$ 。其中,淀粉酶的用量对麦汁收得率的影响最显著,复合酶用量对麦汁收得率的影响也比较显著,而糖化酶用量对麦汁收得率的影响不显著。

参考文献:

- [1] 初彦翠.目前我国酿酒业概况及发展方向[J].食品科技,1999,(2): 6-8.
- [2] 李宏军,申德超.糖化工艺参数对膨化大米辅料麦汁过滤时间的影响[J].酿酒科技,2008,(1): 21-23.
- [3] Dale J.A. Unmalted cereal products for beer brewing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1989, 95: 271-276.
- [4] 申德超,侯旭杰,李宏军,等.膨化大米辅料酿造啤酒的中试生产研究[J].农业工程学报,2004,20(4): 212-215.
- [5] 申德超,左峰,段提勇,等.挤压蒸煮大米啤酒辅料的糖化过程分析[J].农业工程学报,2007,23(1): 242-245.
- [6] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:中国轻工业出版社,1986.184-216.
- [7] 李宏军.挤压膨化大米辅料与酶制剂酿造啤酒工艺的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2004.
- [8] 徐仲儒.农业试验最优回归设计[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1988.131-196.

(上接第24页)

- [3] 王英凯,王薇春.啤酒酵母和糖化酵母的产孢及其单倍体的制备[J].食品与发酵工业,1990,(3): 13-17.
- [4] 肖冬光,刘青,李静,姜天笑.酿酒酵母单倍体制备方法的优化[J].酿酒科技,2004,(4): 21-22.
- [5] 曾云中,张冬妮,吴雪昌.有淀粉糖化酶活性的耐高温酿酒酵母的构建研究[J].生物工程学报,1992,8(4): 363-370.
- [6] 朱旭芬,吴雪昌,林靛,等.耐高温酿酒酵母单倍体的 RAPD 分析[J].生物工程学报,2001,17(5): 557-560.
- [7] 程丽娟,薛泉宏.微生物学实验技术[M].北京:世界图书出版公司,2000.35-37.
- [8] 杨革.微生物学实验教程[M].北京:科学出版社,184-185.

- [9] 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.
- [10] 郝林.食品微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2001.56-89.
- [11] 王华.葡萄酒与葡萄酒实验技术操作规范[M].西安:西安地图出版社,1999.
- [12] Guthrie C, Fink G R. Guide to yeast genetics and molecular biology [M]. New York: Academic Press, Inc, 1991.
- [13] 曾洪梅,等.酿酒酵母子囊孢子的形成条件及细胞学研究[J].微生物学报,1993,33(2): 92-97.
- [14] 杨瑞娟.高产酒率酿酒酵母单倍体的分离与杂交育种[D].杭州:浙江大学,2007.