

微波诱变选育适量低产 SO₂ 啤酒酵母菌株

王 勇 程殿林 尹明浩 王亚楠

(青岛大学生物系, 山东 青岛 266071)

摘要: 采用微波诱变技术对啤酒酵母出发菌株 SY-9 进行处理, 通过不同硫源鉴别培养基的反复筛选, 得到适量低产 SO₂ 的菌株 DS-7。发酵实验结果显示 DS-7 的 SO₂ 生成量在 6 mg/L 左右, 与原始出发菌株相比产量明显降低, 其遗传物质经 RAPD 分析, 与出发菌株 SY-9 相比也有较大差异, 是一株适量低产 SO₂ 的新菌株。

关键词: 微生物; 啤酒酵母; 诱变; 二氧化硫

中图分类号: TQ93-3; TS261.1; TS262.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)11-0031-04

Breeding of A Low-SO₂-producing *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Beer Production by Microwave-induced Mutation

WANG Yong, CHENG Dian-lin, YIN Ming-hao and WANG Ya-nan

(Biology Department of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* strain SY-9 was used as original strain for microwave-induced mutation and a low-SO₂-producing mutant strain DS-7 was obtained through repeated screening of culture medium of different sulfur sources. The fermentation results showed that the production quantity of SO₂ by strain DS-7 was about 6 mg/L, much less than that by original strain. Besides, the genetic substances of the two strains were quite different by RAPD analysis. Accordingly, strain DS-7 was a new strain of low SO₂ production.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; mutation; sulphur dioxide

SO₂ 在啤酒中充当着天然抗氧化剂的角色, 是提高啤酒风味稳定性的关键物质之一^[1]。在啤酒酿造过程中, 通过啤酒酵母自身代谢产生的 SO₂ 在 10~15 mg/L 之间^[2], 而一些国外成品啤酒则要求 SO₂ 含量在 6 mg/L 左右^[3], 低于啤酒酵母正常的代谢积累量。目前, 国内外对于啤酒酵母产生 SO₂ 的代谢途径及相关的菌种选育研究工作已有一定进展, Ho-Yone 等^[4]对啤酒酵母 SO₂ 代谢调节机制进行了研究, 发现 S-蛋氨酸(SAM)对亚硫酸盐合成途径中的各种基因具有强烈的阻遏作用。Park 等^[5]和管敏等^[6]对 SO₂ 的分子机制也进行了研究, 发现其代谢受到硫酸盐跨膜转运相关基因 SUL1、SUL2、SUL3, 含硫氨基酸合成关键酶基因 MET3、MET14、MET16, 亚硫酸盐还原酶编码基因 MET5 和 MET10 等基因存在影响。程殿林^[2]和陈叶福等^[7]分别通过紫外诱变的方法成功筛选到了适量高产 SO₂ 和低产 H₂S 的啤酒酵母新菌株, 潘明等^[8]也曾利用微波诱变技术选育出了低产双乙酰的啤酒酵母菌株。然而, 国内对适量低产 SO₂ 的啤酒酵母菌种选育工作尚未见报道。本文以实验室保存的啤酒酵母

菌种 SY-9 作为出发菌株, 利用微波诱变技术, 进行适量低产 SO₂ 啤酒酵母菌株的选育。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)SY-9, 本实验室保存。

1.1.2 主要培养基^[2]与化学试剂

YEPD 固体培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母粉 1%, 琼脂 1.5%, pH 6.0。

不同硫源鉴别培养基:

① 葡萄糖 2%, NaCl 0.01%, KH₂PO₄ 0.15%, MgCl₂ 0.4%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, KI 0.01%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1%, 维生素母液 0.1%, 微量元素母液 0.1%, Na₂SO₃ mg/L, 琼脂 1.5%, pH 5.0~6.0。

② 葡萄糖 2%, NaCl 0.01%, KH₂PO₄ 0.15%, MgCl₂ 0.4%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, KI 0.01%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1%,

基金项目: 山东省自然科学基金(项目批准号 Y2006D05) 山东省教育厅科技项目(J07YJ19-1)。

收稿日期: 2009-09-15

作者简介: 王勇(1984-), 硕士研究生, 研究方向: 微生物工程。

通讯作者: 程殿林, 教授, E-mail: chengdianlin@163.com。

维生素母液 0.1%, 微量元素母液 0.1%, Na_2SO_3 30 mg/L, 琼脂 1.5%, pH5.0~6.0。

麦芽汁培养基: 大麦麦芽经粉碎糖化制得, 10°Brix, pH 6.0。

随机引物 (共 20 个引物): 由上海生物工程公司合成。

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Rnase: 购自大连宝生物工程公司。

其他常规试剂为国产分析纯。

1.1.3 仪器与设备

YXQ-LS-75S 立式压力蒸汽灭菌锅: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; Buhler DLFU 麦芽标准粉碎机: 德国 EBC; MG823ESJ-SA 微波炉: 中国美的; SHP 生化培养箱: 上海精宏实验设备有限公司; LD5-2A 型低速离心机: 北京医用离心机厂; BT25S 电子天平: 德国赛多利斯股份公司; 芬兰数字显示移液器: 上海雷勃分析仪器有限公司; SW-CJ-2G 超净工作台: 苏州净化设备有限公司; PHS-3D 型 pH 计: 上海精密科学有限公司; 1901 紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; PCR 扩增仪: 德国艾本德股份公司; 双恒电泳仪: 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 啤酒酵母发酵工艺^[2]

取斜面菌种接种于装有 5 mL 麦汁 (10°Brix, pH6.0) 的试管中, 28 °C 下培养 24 h 后全部转接于盛有 50 mL 麦汁的 250 mL 三角瓶中, 有氧摇床培养至对数生长期, 按 10% 接种量接种于 150 mL 麦汁中于 9 °C 发酵 8 d。

1.2.2 SO_2 测定

采用碘量法测定 SO_2 , 见参考文献[9-10]。

1.2.3 硫化氢测定^[11]

采用国标“水质硫化物的测定-亚甲基蓝分光光度法”(GB/T16489-1996)测定。

1.2.4 微波诱变及菌株筛选^[12-14]

取培养至对数生长期合适浓度的 SY-9 菌悬液 5 mL 于无菌培养皿中, 采用脉冲频率为 2450 MHz, 功率为 800 W 的微波炉对菌悬液分别处理 5 s、10 s、15 s、20 s、25 s、30 s、35 s、40 s、50 s 和 60 s, 然后各取菌悬液 0.1 mL 均匀涂布于 YEPD 平板, 置于 28 °C 培养 2 d, 以平板菌落记数法进行活菌计数, 绘制微波致死曲线。

选取致死率为 80% 左右的处理时间为微波诱变剂量, 将诱变处理后的菌液均匀涂布于 YEPD 平板上, 于 28 °C 恒温培养 2 d 后挑取单菌落, 分别一一对应点接于不同硫源鉴别培养基上, 挑取在以 Na_2S 为唯一硫源培养基上菌落较小、同时在以 Na_2SO_3 为唯一硫源培养基上菌

落生长也较小, 甚至不生长的菌株。

1.2.5 啤酒酵母基因组 DNA 的提取^[15]

①取培养 24 h 的酵母菌液 1 mL, 10000 r/min 离心 1 min, 沉淀以 500 μL TE 充分悬浮后加入 10 μL 溶菌酶于 37 °C 水浴保温 30 min。

②加 50 μL 10% 的 SDS 溶液和 5 μL 蛋白酶 K, 充分混匀后置 56 °C 水浴 3 h。

③加等体积的饱和酚, 充分混匀, 12000 r/min 离心 10 min, 抽取上清液加等体积的饱和酚: 氯仿 (1:1), 重复抽提 1 次。

④取上清液加 1/10 体积的 3 mol/L 的醋酸钠 (pH 5.2) 和 1 μL RnaseA 充分混匀, 37 °C 水浴 30 min 后, 加 2.5 倍体积的无水乙醇于 -20 °C 放置 2 h。

⑤12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后, 加入 500 μL 70% 的乙醇洗涤 2 次。

⑥12000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 置于超净工作台中干燥, 沉淀溶于 50 μL TE 中。

⑦将提取的各酵母菌株 DNA 按紫外吸收法检测 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ 和 $\text{OD}_{280\text{nm}}$, 并计算其浓度。

1.2.6 RAPD 分析^[16-18]

以提取各酵母菌株 DNA 为模板, 用不同的随机引物分别进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系中加入 10 ng DNA 模板, 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , 25 mmol/L Mg^{2+} 2 μL , Taq 酶 5 U, 2.5 mmol/L dNTPs 3 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物 1 μL , 加 ddw 至总体积 25 μL , 于基因扩增仪中进行扩增反应。反应程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 36 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 进行 35 个循环; 再 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, 取扩增产物 10 μL 于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色 30 min 后, 紫外灯下观察并拍照记录结果。

2 结果与分析

2.1 诱变菌种

挑取啤酒酵母菌株 SY-9 菌落于装有 50 mL 麦汁的 250 mL 三角瓶中, 28 °C 下培养不同时间, 在 600 nm 下测定 OD 值, 得到啤酒酵母生长曲线, 见图 1。

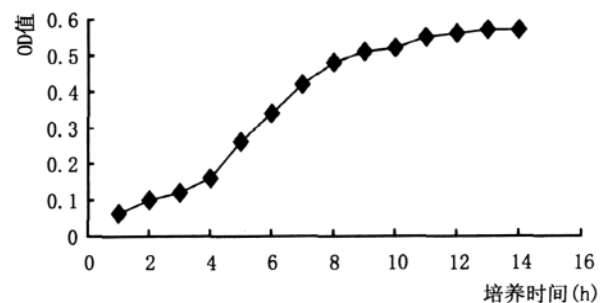


图 1 啤酒酵母 SY-9 生长曲线

由图 1 可看出,新接种的啤酒酵母 SY-9 在培养的前 4 h 中生长缓慢,28 °C 培养 4 h 后进入对数生长期,持续增长直到培养 8 h 后到达稳定期。参考图 1 所得结果,取培养 6 h 的对数生长期啤酒酵母 SY-9 菌悬液 5 mL,按照 1.2.4 中所述方法进行诱变处理,致死曲线见图 2。

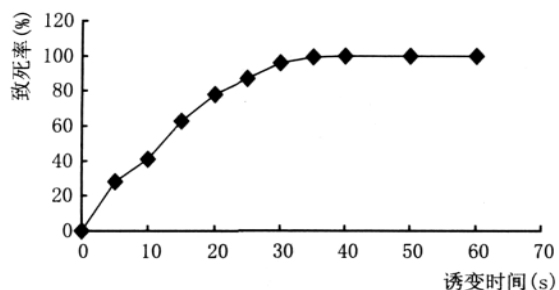
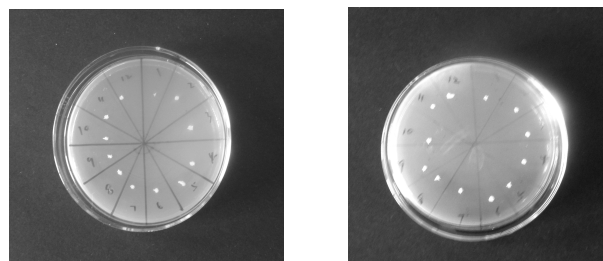
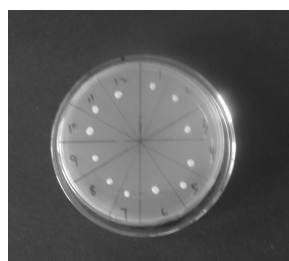


图 2 微波致死曲线

如图 2 所示,啤酒酵母菌悬液经过微波处理初始时,致死率变化较快,随着微波对菌液处理时间的延长,SY-9 的致死率保持不断升高的趋势,而在处理时间超过 25 s 后,致死率变化趋向平缓,处理 35 s 后致死率已达 100%。一般认为,酵母致死率为 75%~80% 时,诱变作用最为明显,酵母菌株发生正向突变的概率最高,诱变效果好^[2]。因此,选取啤酒酵母致死率为 80% 时,即微波处理时间 20 s 作为诱变条件,诱变菌株经不同硫源鉴别培养基反复筛选,得到 DS1~DS12 待选突变株(见图 3)。



A: 以 Na₂SO₃ 为唯一硫源的培养基 B: 以 Na₂S 为唯一硫源的培养基



C: YEPD 完全培养基

图 3 不同硫源鉴别培养基反复筛选所得突变菌株

2.2 发酵实验

出发菌株 SY-9 及诱变所得菌株 DS1~DS12 按照 1.2.1 中所述方法进行发酵实验,按 1.2.2 及 1.2.3 中所述方法测定 SO₂ 和 H₂S,结果见表 1。

表 1 各菌株发酵结果分析比较

菌株	H ₂ S		SO ₂	
	(μg/L)	(mg/L)	菌株	(mg/L)
SY-9	22.67	16.23	DS-7	10.83
DS-1	12.46	5.71	DS-8	18.76
DS-2	18.46	6.81	DS-9	12.79
DS-3	12.88	7.42	DS-10	15.29
DS-4	23.76	10.24	DS-11	19.6
DS-5	16.96	9.3	DS-12	16.54
DS-6	18.62	6.19		

由表 1 可以看出,经过反复筛选所得到的绝大部分菌株,在其他基础性能基本不变的前提下,其 SO₂ 产量均有不同程度的提高,其中以 DS-1、DS-6、DS-7 及 DS-9 菌株 SO₂ 的产量在 6 mg/L 左右,且菌株的 H₂S 产量水平也较低,较之其他啤酒酵母菌株具有很大的发酵优势,因此,选取该 4 株菌株进行遗传稳定性实验。

2.3 遗传稳定性实验

将诱变所得的 DS-1、DS-6、DS-7 及 DS-9 菌株在 YEPD 斜面上连续传代 20 次,取第 1 代、第 5 代、第 10 代、第 15 代及第 20 代按 1.2.1 所述方法进行发酵实验,按 1.2.2 及 1.2.3 所述方法测定 SO₂ 和 H₂S,结果见表 2。

表 2 DS-7 不同代数发酵结果分析比较

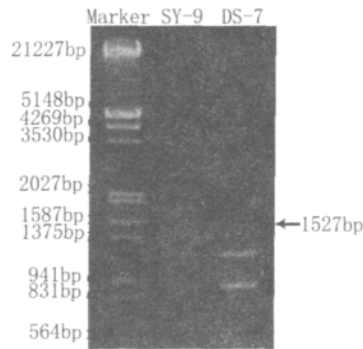
菌株 传代数	H ₂ S (μg/L)				SO ₂ (mg/L)			
	DS-1	DS-6	DS-7	DS-9	DS-1	DS-6	DS-7	DS-9
1	12.46	18.62	10.83	12.79	5.71	6.19	5.48	5.3
5	15.67	17.43	13.46	13.76	7.56	4.56	5.48	9.24
10	17.45	20.17	13.46	14.88	12.67	8.12	5.34	10.54
15	16.96	24.39	13.16	14.46	10.17	12.11	5.42	11.67
20	24.88	26.96	13.76	16.62	14.93	11.78	5.24	12.74

由表 2 可以看出,4 株啤酒酵母在连续传代过程中,SO₂ 产量都有一定幅动,其中以 DS-7 遗传稳定性最好,各代间差别较小,且在连续传代 20 次之后,其发酵产物中 SO₂ 含量仍保持在 6 mg/L 左右,具有作为生产菌株的潜力。因此,选取突变株 DS-7 与出发菌株 SY-9 进行遗传物质分析比较。

2.4 RAPD 实验结果

以按照 1.2.5 方法所提取 SY-9 及 DS-7 的基因组 DNA 为模板,20 个随机引物按照 1.2.6 中方法进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳比较发现,只有随机引物序列为“5' GGTGACGCAG 3'”的扩增产物有条带差异,实验重复 3 次,结果见图 4。

由图 4 可以看出,突变株 DS-7 与 SY-9 基因组 DNA 经 RAPD 扩增后产物确实存在条带差异,DS-7 比出发菌株 SY-9 多扩增出一条大小为 1527 bp 的 DNA 片断。由此,可以确定,DS-7 是适量低产 SO₂ 且遗传稳定性良好的啤酒酵母新菌株。



注:图中 maker 为 λ DNA, 左侧泳道为 SY-9RAPD 产物, 右侧为 DS-7RAPD 产物。

图 4 SY-9 与 DS-7 基因组 RAPD 实验结果比较

3 结论

目前, 啤酒酵母菌种的诱变育种多采取传统的紫外诱变和化学诱变等方法, 但此类方法对同一菌株反复处理后, 由于其作用方式及作用位点的相对单一性, 会出现钝化现象, 导致突变类型少, 诱变效果不佳^[19]。而微波诱变作为一种新型的诱变方法, 所需设备简单, 方法易行, 操作安全, 且诱变效果较好, 克服了紫外诱变容易光修复及化学诱变毒性大等缺点, 而且该方法较之基因工程育种成本更低, 在工业微生物菌种育种中具有较大的推广价值和广阔的应用前景^[20]。

本文以 SY-9 作为出发菌株, 经微波诱变并反复筛选后得到了突变株 DS-7。该菌株遗传稳定性良好, 经发酵实验测定其 SO_2 产量维持在 6 mg/L 左右。同时利用 RAPD 技术对出发菌株 SY-9 及 DS-7 进行遗传物质分析, 发现两者之间确实存在遗传物质差异, 其中突变株 DS-7 多扩增出一条片断大小为 1527 bp 的 DNA 条带。由此, 可确定得到了一株适量低产 SO_2 且遗传稳定性良好的啤酒酵母新菌株。

参考文献:

- [1] 王亚楠. 代谢控制提高啤酒风味稳定性的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2002.
- [2] 程殿林. 适量高产 SO_2 菌种选育与啤酒风味稳定性的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2005.
- [3] 程殿林. 酒文化[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2003.
- [4] Ho-Yone Sohn, Eun-Joo Kum, Gi-seok Kwon, et al. Regulation

- of branched-chain and sulfur-containing amino acid metabolism by Glutathione during ultradian metabolic oscillation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Microbiology, 2005, 43(4): 375.
- [5] Park H, Bakalinsky AT. SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2000, 16: 881.
- [6] 管敏, 姚冬生, 范秀英, 等. 啤酒中二氧化硫抗氧化作用的分子生物学研究进展[J]. 酿酒, 2003, (4): 53.
- [7] 陈叶福, 王艳, 丁书美, 等. 低产硫化氢啤酒酵母菌株的选育[J]. 酿酒科技, 2007, (7): 23.
- [8] 潘明, 周永进. 微波技术选育啤酒酵母菌种的探讨[J]. 中国酿造, 2008, (11): 78.
- [9] GB/T15038—94. 葡萄酒、果酒—总二氧化硫的测定——直接碘量法[S].
- [10] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1988.
- [11] GB/T16489—1996. 水质硫化物的测定——亚甲基兰分光光度法[S].
- [12] 赵国群, 杨利博, 葛世辉. 产菊粉酶酵母菌株的微波诱变选育[J]. 中国酿造, 2008, (10): 31.
- [13] 潘丽霞, 杨登峰, 黄世勇, 等. 利用木糖产油酵母的微波诱变选育[J]. 中国酿造, 2009, (3): 62.
- [14] 李豪, 车振明. 微波诱变微生物育种的研究[J]. 山西食品工业, 2005, (2): 5.
- [15] 曾大兴. 适于 RAPD 分析的真菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2003, (2): 20.
- [16] Bart Theelen, Massimiliano Silvestri. Identification and typing of Malas-seziyeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP[™]), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)[J]. FEMS Yeast Research, 2001, 1: 79.
- [17] Andrighetto, Psomas, Tzanetakis, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products [J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30: 5.
- [18] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(7): 666.
- [19] 韩丽丽, 刘敏. 诱变方法在微生物育种中的应用[J]. 酿酒, 2008, (5): 16.
- [20] Gos P, Eicher B, Kohli J, et al. Extremely high frequency electromagnetic fields at low power density do not affect the division of exponential phase *Saccharomyces cerevisiae* cells[J]. Bioelectromagnetics, 1997, 18(2): 142.

职业资格证书全国联网查询系统开通

本刊讯: 国家人力资源和社会保障部已开通职业资格证书全国联网查询系统, 酿酒行业人员如要查询, 请登录“zscx.nvq.net.cn/htm/7949/126681.html”网站或“zscx.nvq.net.cn”网站点击“轻工”输入相关内容即可查明。(唐小雨)