

酿酒酵母单倍体制备方法的优化

肖冬光,刘 青,李 静,姜天笑

(天津科技大学食品与生物技术学院,天津 300222)

摘 要: 研究了酿酒酵母单倍体的制备方法。对酿酒酵母 BY-6 的产孢条件进行了优化,产孢培养基为 McClary 培养基,培养时间为 7 d,培养温度为 25~28 ℃,在此条件下,酿酒酵母的产孢率可达 98.5 %。蜗牛酶浓度及酶解时间是影响孢子释放的关键因素,最适酶浓度为 3 %,酶解时间为 60 min。酶解后,50 ℃热处理 10 min 杀死营养体,有利于单倍体的检出。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 产孢条件; 单倍体

中图分类号: Q93-33; TS262.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2004)04-0021-02

Optimization of Sporulation and Haploidization of *S.Cerevisiae* BY-6

XIAO Dong-guang,LIU Qing,LI Jing and JIANG Tian-xiao

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology,Tianjin 300222, China)

Abstract: The optimum sporulation condition for *S. Cerevisiae* baker's yeast BY-6 was confirmed by the optimization test. The results showed that the optimum sporulation medium and cultivation time were McClary medium and 7 days, the cultivation temperature must controlled at 25~28 ℃, the sporulation rate will decrease above 28 ℃ or under 25 ℃. Under the above conditions, the sporulation rate could reach 98.5 %. The concentration of enzyme and time of treatment are the key factors for the preparation of haploid of *S.Cerevisiae* baker's yeast, they are 3 % and 60 min respectively; For killing double haploids, heat treatment 10 min at 50 ℃ simplified the method of haploidization of *S.Cerevisiae* baker's yeast BY-6.

Key words: microbe; *S.Cerevisiae*; the 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。酿酒酵母营养体在营养缺乏条件下,经过减数分裂由二倍体变为单倍体,形成含有四个孢子的子囊。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],国外对孢子形成过程中基因调控^[4]、酶活性^[5]、糖的吸收活性^[6]和孢子壁特异性组成^[7]等方面也有深入的研究,但对于生产面包用酿酒酵母的孢子形成条件研究很少。我们对生产面包用酿酒酵母的产孢情况进行研究,得出了最佳产孢条件,提高了产孢率,并简化了单倍体制备方法。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母(*S.Cerevisiae*)BY-6。

1.2 培养基

YEPD 培养基:蛋白胨 2 g,葡萄糖 2 g,酵母膏 1 g,琼脂 2 g,水 100 ml。

生孢子培养基:(1)棉子糖培养基:NaAC 0.5 g,棉子糖 0.04 g,琼脂 2 g,水 100 ml。(2)kley 培养基:蛋白胨 0.25 g,葡萄糖 0.062 g,NaCl 0.062 g,NaAC 0.5 g,琼脂 2 g,水 100 ml。(3)McClary 培养基:葡萄糖 0.1 g,KCl 0.18 g,NaAC 0.82 g,酵母膏 0.25 g,琼脂 2 g,水 100 ml。

1.3 试剂

蜗牛酶,联星生物公司。

1.4 实验方法

1.4.1 诱导孢子形成的方法

将酿酒酵母于 YEPD 液体培养基 28 ℃培养 48 h,离心洗涤 3 次,弃上清液,将酵母泥接种在产孢培养基上,28 ℃培养 4~7 d,在显微镜下观察子囊孢子的形成情况,采用血球计数板记酵母总数和子囊孢子数,并计算产孢率。

产孢率(%)=子囊孢子数量/总细胞数

1.4.2 孢子的分离和单倍体的制备

采用改进的孢子群体分离方法,从生孢子培养基上取适量已形成子囊的菌体,制成含 10^8 个/ml 子囊孢子的菌悬液,取一定量的菌悬液,加入最终浓度为 2 %的蜗牛酶,30 ℃水浴 60 min,使子囊壁破裂释放出单孢子,然后 50 ℃水浴处理 10 min,用以杀死营养体细胞,用微量移液器将菌悬液吹吸几次,将孢子打散,迅速稀释 3 个稀释度,涂布于 YEPD 培养基上,28 ℃培养 2~3 d。

1.4.3 单倍体的鉴定

挑取所有菌落至产孢培养基上,28 ℃培养 7 d 后镜检。产孢者为双倍体,不产孢子者为单倍体。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基对孢子形成的影响

没有一种产孢培养基能够适于所有酵母产孢,为了找到酿酒

收稿日期 2004-04-28

作者简介:肖冬光(1956-),男,湖南人,硕士,天津轻工业学院教授、博士生导师,中国食品科学技术学会青年委员会理事、中国发酵工业协会酵母专业委员会技术组委员,《酿酒科技》杂志编委,长期从事生物工程方面的教学与科研,在生物反应器、活性干酵母和现代酿造技术的研究与应用方面有精深研究,代表著作有《酿酒活性干酵母生产与应用》等 3 部,发表科研论文 40 余篇。

酵母的最适产孢培养基,选择 McClary 培养基、棉子糖培养基以及 Kleny 培养基,在 28℃下培养 7 d,观察在各种产孢培养基下的产孢情况,计算产孢率。结果如表 1 所示,在 McClary 培养基中,酿酒酵母产孢率高达 98.49%,而在棉子糖培养基和 Kleny 培养基条件下产孢率都较低。在 McClary 培养基条件下,3 孢、4 孢的产孢率也高于棉子糖培养基和 Kleny 培养基条件下的产孢率。由此可见,McClary 培养基是酿酒酵母的最适产孢培养基。

产孢培养基	3 孢产孢率	4 孢产孢率	总产孢率
McClary 培养基	35.76	42.34	98.49
棉子糖培养基	25.08	20.75	77.88
Kleny 培养基	16.23	23.22	61.03

在产孢培养基中加入适量醋酸盐可诱导产孢,适量的营养物质对产孢也十分重要。葡萄糖为孢子形成提供碳源骨架和其他前体物质,同时也提供细胞进行减数分裂的能源,但葡萄糖浓度过高会抑制孢子形成,大大降低孢子的形成能力。适量的氮源可增加产孢率,过量氮源会导致菌株营养体的生长,同样大大降低孢子的形成能力^[8]。本实验的实验结果与此观点相符。

2.2 培养温度和培养时间对孢子形成的影响

一般来说,温度过高或过低都会对孢子形成有影响,在 20℃,25℃,28℃,32℃,37℃下,酿酒酵母 BY-6 在 McClary 培养基中的产孢率如图 1。

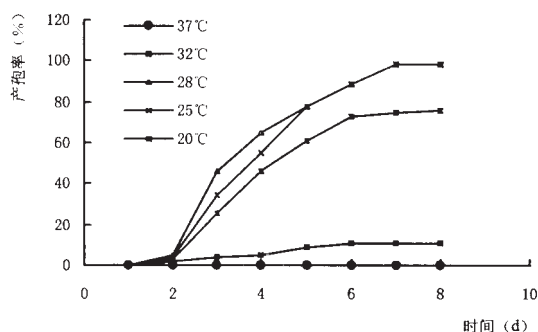


图 1 不同培养温度下的酿酒酵母产孢率

图 1 表明,温度小于 20℃或大于 32℃,酿酒酵母的生孢能力明显下降,37℃时完全不生孢。只要培养温度控制在 25~28℃之间,培养时间达到 7 d 以上,产孢率差别并不大,都能达到 90%以上。温度对生孢的影响可能与酶有关,高温不适于孢子的生成^[9]。

2.3 蜗牛酶浓度与处理时间对孢子释放的影响

对于酵母菌子囊孢子破壁释放孢子,蜗牛酶的浓度和处理时间是关键因素。子囊孢子的破壁情况通过镜检观察,结果发现 2%蜗牛酶处理 120 min,3%蜗牛酶处理 60 min,4%蜗牛酶处理 30 min 都能使子囊孢子完全破壁。蜗牛酶浓度过低,子囊需要很长时间才能破壁,而且破壁不完全。酶浓度过高,处理时间必须缩短,时间再稍稍延长,孢子就会受到损伤而破裂,因此,最适蜗牛酶浓度和处理时间为 3%蜗牛酶处理 60 min。图 2 为蜗牛酶处理时子囊孢子破裂释放孢子的过程。

2.4 热处理对孢子检出的影响

蜗牛酶处理菌液后,菌液中存在大量单孢子和少数营养体细胞,杀死营养体细胞会易于单倍体的检出。由于酵母菌孢子比其营养体细胞热耐受性强,所以选择热灭活杀死营养体细胞,热灭活温度分别为 40℃,45℃,50℃,55℃,60℃处理 10 min 后,适当稀释

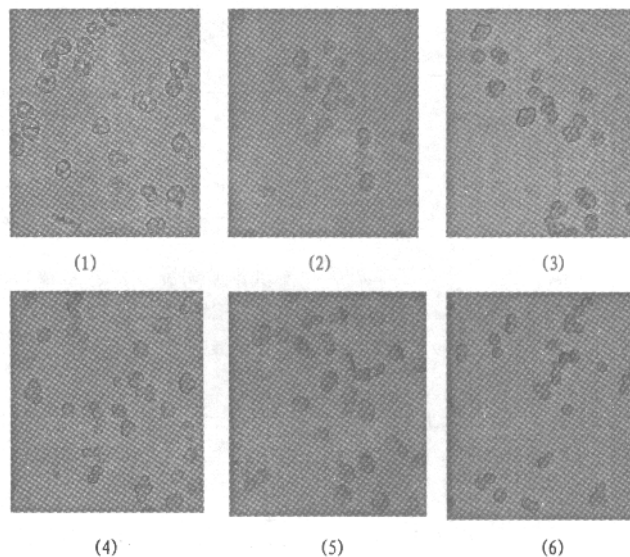


图 2 蜗牛酶处理的孢子释放过程

涂 YEPD 平板,挑取平板上菌体在产孢培养基上进行鉴定,结果见表 2。

项目	热处理温度(℃)				
	40	45	50	55	60
单倍体存活数	143	131	20	3	1
双倍体存活数	15	8	0	0	0

从表 2 可见,温度低于 50℃时,双倍体存活数较多,温度等于或高于 50℃时,双倍体存活数为 0,温度高于 50℃时,单倍体的存活数又会随温度增高而减少。为了既易于挑选又能得到更多的单倍体,选择热处理温度 50℃处理 10 min。

3 结论

3.1 实验表明,最适于酿酒酵母产孢的培养基为 McClary 培养基,产孢温度控制在 25~28℃,在产孢培养基上培养 7 d,产孢率可达 98.5%。

3.2 制备单倍体时,蜗牛酶能使子囊壁破裂释放出孢子,蜗牛酶浓度要控制在 2%~4%,酶处理时间随蜗牛酶浓度增加而减少,最适蜗牛酶浓度和处理时间分别为 3%和 60 min。

3.3 蜗牛酶处理后,菌液中存在大量孢子和少量营养体,为了易于单倍体的挑选,选择 50℃热处理 10 min 杀死营养体。

参考文献:

- [1] 朱旭芬,等.酿酒酵母产孢条件及核倍性分析[J].科技通报,2002,18(5):393-397.
- [2] 何秀良,等.耐酸耐糖高产乙醇单倍体酵母菌株的选育[J].微生物学杂志,1989,9(3):50-54.
- [3] 王英凯,等.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] Percival-Smith,et al[J].Mol.Cell.Biol.,1986,(6):2443-2451.
- [5] Van Ryk,D.L.et al[J].J.Gen.Microbiol.,1985,31:1095-1102.
- [6] Ota,A[J].Microbio.,1986,48:17-26.
- [7] Briza,P[J].J.Bio.Chem.,1986,261:4288-4296.
- [8] 徐志彦,王敏.啤酒酵母孢子形成研究的新进展[J].遗传,1989,11(3):43-45.
- [9] 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.