

高耐性酿酒酵母的杂交育种

吴 帅 陈叶福 沈 楠 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

摘 要: 利用不同特性的酿酒酵母 AY-15 M1 进行生孢培养和孢子分离试验, 得到 185 株产酒、153 株耐渗单倍体。其接合型 a 型约占 1/4, α 型约占 1/2, 其余为不确定株。经筛选试验后得到 13 株产酒性能良好的单倍体和 19 株耐渗性能良好的单倍体。利用酒精发酵试验进行复筛, 得到两株性能最优良的单倍体, 作为杂交试验的亲本。杂交试验后, 经耐渗、耐酒精杜氏管试验和发酵性能测定, 得到一株能够在高渗环境中仍然保持较高产酒精能力的酿酒酵母, 在含盐 5% 的培养基中发酵产酒精能力分别比 AY-15 M1 提高 19.6% 和 15.4%。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 杂交; 高耐性; 酒精产率

中图分类号: TS261.1; TS262.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2006)10-0020-03

Construction of *S. cerevisiae* with Good Osmo-tolerance and High Ethanol-production Characteristic

WU Shuai, CHEN Ye-fu, SHEN Nan and XIAO Dong-guang

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

Abstract: 185 high ethanol-production haploids and 153 good osmo-tolerant haploids were obtained through spore separation test and spore culture of *S.cerevisiae* AY-15 and M1 of different properties. Among all the mating types, a type accounted for about 1/4, α type accounted for about 1/2, and others were uncertain strains. By measuring the endurance of yeast haploids, 13 high ethanol-production haploids and 19 good osmo-tolerant haploids were selected. After the fermentation, two haploids were selected as the parents for the hybridization. 236 diploid strains were constructed by crossing the parents. At last, one strain was obtained through the measurement of their osmo-tolerance capacity and fermenting power and alcohol-resistant test, which could maintain high ethanol-production capacity under hyperosmotic environments. Its ethanol-production capacity in culture medium containing 15% salt increased by 19.6% than AY-15 and by 15.4% than M1 respectively.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; hybridize; osmotolerance; ethanol production

随着酒精发酵工业的发展, 浓醪发酵技术获得普遍的成功和不断得到认可。浓醪发酵可使企业获得最大产率, 提高企业生产能力, 同时还可以相应地降低生产成本。目前, 浓醪发酵的研究主要集中在高产菌株的选育和发酵工艺两个方面, 前者的目的主要是提高菌株的耐性, 包括耐渗性和耐酒精性能等。对于淀粉质原料, 通常采用边糖化边发酵工艺, 如废液不回用则不存在高渗问题。但为了节约生产用水和减少酒精废液的处理量, 大多数工厂都采用部分废液回用工艺。而酒精废糟中含有大量对酵母菌的生长和发酵有抑制作用的物质, 如无机盐等, 随着回用次数的增加, 发酵液的渗透压会因为这

些物质的多次积累有所增高^[1], 也会影响酵母的生长和繁殖, 这就需要菌株具有较好的耐渗性。另一方面, 由于酒精浓醪发酵得到的酒精浓度较高, 酵母菌的发酵会受到影响, 以往的研究显示, 乙醇浓度达 8% 时对酵母细胞有害, 乙醇浓度达 11% 左右时, 酵母发酵完全受到抑制^[2]。为了使酵母能够在浓醪发酵中更好地利用可发酵性糖, 有必要同时增强其耐渗性和耐酒精性能。

本试验采用杂交育种手段对酵母菌进行改造。1950 年酵母菌接合系统的遗传控制原理已经得到详细阐述。到目前为止, 杂交试验已经取得了不少成果, 例如, 日本的小田等人用酒精酵母和卡尔斯伯杂交获得的杂交株,

基金项目: 天津市重点科技攻关资助项目 (06YFGZSH00500)。

收稿日期: 2006-07-18

作者简介: 吴帅 (1979-), 女, 山东人, 博士研究生, 研究方向: 现代酿造技术。

通讯作者: 肖冬光, 天津科技大学教授, 博导, xdg@ust.edu.cn。

其乙醇产量和菌体生长量都比亲本有显著的提高,且发酵麦芽糖的能力比亲株明显增强,亲株既可用于酒精生产,也可用于面包发酵^[3];采用不能完全利用绵子糖的糖蜜酒精酵母与能完全发酵绵子糖的卡尔斯伯酵母杂交后所形成的杂合二倍体再复合杂交,获得具有双亲优良性状的杂交株,生长速度和乙醇产量也显著超过亲本。在酵母杂交选育的试验中,首先筛选出具有高耐性和高产酒性能的杂交亲株(已在相关文章中发表)。本试验中,为了提高酵母在浓醪发酵中的发酵能力,用两株分别具有高耐性和高产酒精特性的酿酒酵母进行杂交,获得了在高渗条件下产酒精性能良好的酿酒酵母。

1 材料与方 法

1.1 菌株

酿酒酵母 AY-15; 薛瓦酵母 M1; 标准接合型 a₁ 菌株,均为本试验室保存。

1.2 主要仪器

生化培养箱; 光学显微镜。

1.3 主要培养基

YEPA 培养基; 微量元素产孢培养基; TTC 培养基; 种子培养基: 10Brix 玉米水解液, 0.5% 酵母粉; 发酵培养基: 玉米水解液, 0.15% 酵母粉, 0.1% 硫酸铵, 5% 氯化钠。

1.4 实验方法

1.4.1 单倍体的制备^[4]

将酿酒酵母 AY-15, M1 分别于 YEPA 液体培养基中于 28℃ 培养 48 h, 离心洗涤, 弃上清液, 将酵母泥接种于微量元素培养基平板上, 于 25℃ 培养 5 d, 在显微镜下可以观察到有子囊孢子的形成, 收集平板培养基上的菌体。制备菌悬液(10⁶), 用 2% 的蜗牛酶于 30℃ 水浴处理 60 min, 然后于 50℃ 水浴振荡处理 10 min, 杀死二倍体营养细胞, 将粘连的孢子打散后涂布 YEPA 培养基平板, 挑取小菌落点接在生孢培养基上, 于 25℃ 培养 6 d 后镜检, 不生孢子者为单倍体, 将单倍体分别挑至斜面, 统一编号, 于 4℃ 下保存。

1.4.2 单倍体接合能力及接合型的鉴定

将获得的单倍体菌株分别与标准 a₁ 型、a₂ 型菌株混合培养, 与 a₁ 型菌株形成哑铃形接合子的待测菌株为 a₁ 型, 与标准 a₂ 型菌株接合的待测菌株为 a₂ 型, 与 a₁ 型、a₂ 型菌株均不接合的为不育型菌株。

1.4.3 单倍体菌株的筛选

取装有麦汁的试管(内装杜氏管), 加入无水乙醇, 使麦汁中酒精含量为 16%, 混匀。将 AY-15 的单倍体菌株分别接入麦汁中, 于 30℃ 培养, 根据产气情况判断酵母的耐酒精性能, 选出耐性好的菌株。然后利用 TTC 平板进行复筛。菌株点接到 TTC 平板下层培养基上, 于 30℃ 培养 2~3 d, 待菌落长大后, 倒入 TTC 上层培养

基, 覆盖原有的菌落, 在 30℃ 下避光培养 2~3 h, 由菌落呈色的深浅判断酵母的产酒精能力, 颜色较深的菌落为产酒精性能好的菌株。将 M1 的单倍体菌株分别接种到装有麦汁的试管中(内装杜氏管, NaCl 含量为 13%), 于 30℃ 培养, 以亲本菌株作对照, 产气速度快、产气量多的酵母为耐渗性好的菌株。

1.4.4 单倍体菌株发酵性能的筛选

菌株活化后, 进行种子培养, 然后接入发酵培养基, 发酵一段时间后补加 10% 的葡萄糖。于 30℃ 静置培养, 每隔 24 h 测 CO₂ 失重。发酵结束后测定发酵液的酒精度和残糖含量。根据产酒精能力选出发酵性能优良的单倍体菌株。

1.4.5 单倍体杂交及杂交株的检出^[4]

将 a₁ 型与 a₂ 型单倍体菌株混合接种于 YEPA 液体培养基中, 于 30℃ 摇床培养, 观察接合子的形成情况, 培养 20 h 后收集菌体, 涂布 YEPA 平板, 挑取较大的单菌落, 在微量元素培养基上鉴定菌株的产孢能力, 能够产孢的菌株为二倍体杂交株, 编号保存。

1.4.6 杂交菌株的筛选

利用耐酒精和耐渗杜氏管试验对杂交菌株进行筛选。首先将菌株分别接入含有酒精的麦汁中, 于 30℃ 恒温培养, 根据产气情况判断酵母的耐酒精性能, 选出耐酒精性能良好的菌株。将选出的菌株接入含有氯化钠的麦汁中, 于 30℃ 培养, 根据菌株的产气情况判断其耐渗性, 选出耐渗性能较好的菌株。

1.4.7 杂交菌株发酵性能检测

将筛选得到的菌株活化后, 进行种子培养, 转入耐盐发酵培养基, 于 30℃ 静置培养, 每隔 24 h 测 CO₂ 失重, 用 CO₂ 失重来衡量酵母的发酵速度。发酵结束后测定发酵液的酒精度和残糖含量, 比较不同菌株的产酒精能力, 选出在高渗条件下发酵性能优良的酵母菌株。

1.5 分析方法

1.5.1 酒精度的测定

采用蒸馏法测定。取 100 mL 成熟发酵液到蒸馏瓶中, 加入 100 mL 水, 混匀后蒸馏。取馏出液 100 mL。用酒精比重计测定馏出液中的酒精浓度。

1.5.2 残糖的测定

采用斐林试剂滴定法测定^[9]。

2 结果与分析

2.1 单倍体的制备、接合型鉴定及菌株的筛选

制备酿酒酵母 AY-15, M1 的单倍体, 经过产孢培养基鉴定分离后, 分别得到 185, 153 株单倍体菌株。鉴定单倍体的接合型, 结果表明, a₁ 型所占比例约为 1/4, a₂ 型约占 1/2, 不确定株约占 1/4, 这可能与二倍体带有隐性致死基因或带有能使孢子不育的遗传因子有关^[9]。菌株 AY-15 是一株产酒精性能优良的酵母, 所以在其单

倍体筛选时对其耐酒精、产酒精性能进行比较。酵母菌进行酒精发酵的主要途径包括葡萄糖酵解和丙酮酸的无氧降解,在此过程中糖-酒精转化酶起主要作用,TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)能对酵母的代谢产物产生呈色反应,通过它可以判断酵母中转化酶活力的大小,即酵母产酒精能力的高低^[7,9]。将在一定的培养基上培养的酵母菌落上覆盖一层TTC显色剂,TTC会显不同的颜色,产酒精能力强的酵母会显现深红色,依照此原理筛选出产酒精能力强的单倍体。经两次筛选后共得到13株优良的单倍体菌株。菌株M1是一株耐渗性能优良的酵母,其单倍体根据耐渗性的差异进行筛选。在耐渗杜氏管试验中,约有20%的单倍体在高渗培养基中的发酵情况好于二倍体。最终选出19株耐渗性较好的单倍体。

2.2 单倍体菌株发酵性能的筛选

分别对AY-15和M1的单倍体菌株进行发酵性能测定。比较单倍体的菌株发酵能力,结果发现,由同一株二倍体得到的单倍体之间产酒精的能力差别很大,这表明酿酒酵母的发酵能力由多个基因控制。AY-15的绝大多数单倍体菌株产酒精量大于二倍体。根据发酵速度(数据略)和产酒精量(见表1)选取A5作为杂交试验的亲本。M1的单倍体菌株产酒精能力参差不齐(见表2),差别较大,选择M1-2作为杂交亲本。本试验分两次进行,由于两批试验醪液初始糖度及试验条件不同,因此两组数据之间不能进行比较。

表1 AY-15单倍体菌株的产酒精量 (%Vol)

菌株	酒精度	菌株	酒精度
A1	10.40	A8	10.23
A2	10.41	A9	10.39
A3	9.60	A10	10.00
A4	10.42	A11	10.19
A5	10.41	A12	10.39
A6	10.40	A13	10.21
A7	9.45	AY-15	10.03

表2 M1单倍体菌株的产酒精量 (%Vol)

菌株	酒精度	菌株	酒精度	菌株	酒精度
M1-1	10.00	M1-8	8.98	M1-15	9.71
M1-2	11.98	M1-9	11.80	M1-16	11.70
M1-3	7.60	M1-10	11.24	M1-17	10.34
M1-4	12.85	M1-11	10.79	M1-18	10.41
M1-5	11.99	M1-12	8.75	M1-19	11.65
M1-6	11.01	M1-13	7.51	M1	10.64
M1-7	10.09	M1-14	8.67		

2.3 杂交菌株的检出及杂交株的筛选

将来源于不同亲本的单倍体A5(MATa)和M1-2(MAT)进行杂交试验,挑选出具有产孢能力的杂交株共236株。首先,比较各菌株在耐渗平板上菌落的生长情况,选出生长速度较快和菌落较大的菌株,然后进行

耐渗杜氏管试验。经过两次耐渗筛选后得到98株单倍体。在试验中发现,许多杂交株明显比亲本更耐高渗,试验中氯化钠浓度为14%,高于单倍体筛选时的氯化钠含量。将98株菌株进行耐酒精性能试验,比较杂交株和亲本的耐酒精能力,结果发现,约76%的杂交株耐酒精性能高于亲本,15%的杂交株耐酒精性能与亲本相差不大,仅有9%的杂交株耐酒精性能略低于亲本(数据略),部分菌株可耐21%Vol的酒精度。选出34株耐酒精性能最好的杂交株进行发酵试验。试验结果中耐性的差异表明,在营养体的单倍体化与单倍体杂交过程中,与耐性相关的基因通过分离、移动和重排进行了重新分布,导致不同杂交株的耐酒精和耐渗性能出现差异。绝大多数菌株耐酒精性能较好,可能是因为与耐性相关的基因经过杂交后在新的菌株中重新分布,并在菌株的发酵性能方面得到了很好的体现。

2.4 杂交菌株发酵性能筛选

将得到的34株杂交株和原始亲株进行发酵性能试验,产酒精量高于出发菌8%以上的杂交株见表3。比较菌株的产酒精量和残糖含量两项指标,结果显示,菌株AM-5在高渗透压条件下的产酒精能力最强,产酒精量为8.25%Vol,分别比亲株AY-15和M1提高了19.6%和15.4%,这表明杂交二倍体菌株AM-5既获得了亲株AY-15的高产酒量的性状,又获得了M1的耐高渗性状,杂交菌株在高渗玉米液中发酵表现出了较高的发酵能力。

表3 杂交株的发酵性能

菌株	产酒量 (%Vol)	残糖 (g/100mL)	菌株	产酒量 (%Vol)	残糖 (g/100mL)
AM1	7.75	4.82	AM-7	8.08	4.26
AM2	7.85	4.57	AM-8	8.02	4.30
AM3	8.01	4.31	AM-9	7.93	4.52
AM-4	7.96	4.56	AM10	7.76	4.76
AM-5	8.25	3.98	AY-15	6.90	6.11
AM-6	8.05	4.32	M1	7.15	5.79

3 结论

3.1 通过耐性试验和TTC平板筛选,分别得到13株产酒精性能好的单倍体和19株耐渗性能好的单倍体,利用酒精发酵试验进一步筛选,得到两株性能较好的单倍体,作为杂交试验的亲本。

3.2 对杂交株的耐性筛选发现,与亲本相比,部分杂交株的耐酒精性能和耐渗性能显著提高。菌株在含盐5%的培养基中发酵,筛选得到一株在高渗条件下发酵性能优良的杂交株AM-5,产酒精量为8.25%Vol,分别比亲株AY-15和M1提高了19.6%和15.4%。

3.3 杂交育种可以通过基因的分离、移动和重排进行重新分布,有可能改善酿酒酵母的发酵特性。本试验中,
(下转第26页)

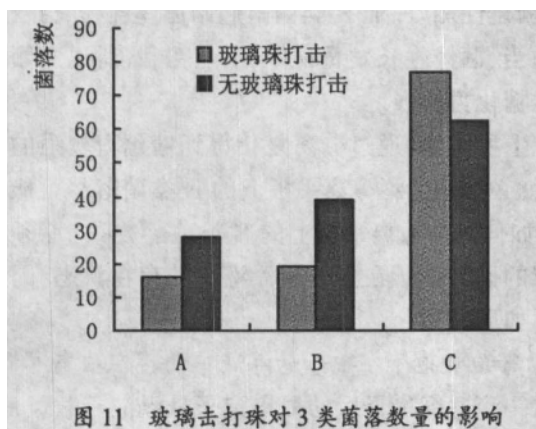


图 11 玻璃击打珠对 3 类菌落数量的影响

浮液分离培养后萌发的 A, B 类菌落比用玻璃珠击打过的明显更多。C 类菌落则是用玻璃珠击打过的更多。

从 2.4 可知, B 类菌落繁殖出来的菌株菌丝疏密有致、粗壮、糖化力也较高, 生长速度也较快, 因此在根霉菌的分离纯化复壮工作中不采用玻璃珠击打震荡的方法来制备孢子悬浮液, 分离复壮的成功率会更高, 更易分离到复壮菌株。

3 结论

在对根霉 F6 分离复壮工作时, 用 PDA 营养液代替生理盐水作根霉分离源的活化液, 制备稀释分离孢子悬

浮液时不用玻璃珠击打分散, 分离培养 16 h 后选择直径为 0.8~1.0 cm 的菌落为初筛对象较容易获得复壮菌株。因为分离源经玻璃珠震荡分散后, 玻璃珠会打散许多孢子团, 使得根霉孢囊孢子绝大部分以单孢子或由 2~3 个孢囊孢子组成的孢子团的形式存在, 而它们萌发菌丝生长而成的微菌落被转移后又易夭折, 从而很难分离到复壮菌株。另外分离培养后在挑取初筛菌落时, 由于有了较强的针对性, 目标明确, 避免盲目挑取大量的菌落去做生产性能的测定, 从而在分离选育工作中可少走弯路、节省实验原料、降低工作强度, 并以较快的速度获得复壮菌株, 从而达到提高根霉菌种分离复壮效率的目的。

参考文献:

- [1] 刘云秀, 刘清斌, 周健. 华根霉纯种筛选的初步研究[J]. 四川食品与发酵, 2003, 39(3): 31-34.
- [2] SKORY CD. Lactic acid production by *Saccharomyces Cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30(8): 22-27.
- [3] 唐丽杰. 微生物实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2005.
- [4] 陈卫平. 制曲工艺[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1993.

(上接第 19 页)

参考文献:

- [1] 顾国贤. 论啤酒风味类型[J]. 酿酒科技, 2005, 128(2): 26-28.
- [2] 王文甫. 啤酒生产工艺[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] 汪志君, 高庆, 方维明, 姜涌明, 颜荣林, 周红. 紫外诱变筛选低高级醇和双乙酰含量的啤酒酵母[J]. 中国酿造, 2005, 142(1): 13-17.
- [4] 胡金成, 李德超, 曹又新. 低嘌呤啤酒的酿造工艺[J]. 啤酒科技, 2004, (11): 10-11.
- [5] Olsson L, Nielsen J. The role of metabolic engineering in the improvement of *S. cerevisiae*: utilization of industrial media[J]. Enzyme Microbiol Biotechnol, 2000, 26: 785-792.
- [6] Stephanopoulos G, Aristos AJ, Nielson J. Metabolic Engineer-

ing-Principles and Methodologies[M]. 赵学明, 白冬梅译. 北京: 化学工业出版社出版, 2003.

- [7] Liao JC, Hou SY, Cho YP. Pathway analysis engineering and physiological considerations for redirecting central metabolism[J]. Biotechnol Bioeng, 1996, 52(1): 129-140.
- [8] 白冬梅, 付卫明, 赵学明, 代海霞, 李鑫刚, 徐世民. 代谢通量分析优化米根霉 R1021 发酵生产 L(+)-乳酸过程[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(6): 554-558.
- [9] A. Vanrolleghem, J.J. Heijnen. A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 58(2&3): 133-138.

(上接第 22 页)

杂交株的产酒精能力和耐渗性均比亲株有所提高, 通过此方法可以达到合并工业菌株特性的目的。

参考文献:

- [1] 肖冬光, 等. 酒精废液回用理论的探讨[J]. 酿酒科技, 2001, 108(6): 76-78.
- [2] A.N. 格拉泽, 等著. 陈守文, 等译. 微生物生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [3] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

- [4] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物试验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [5] 天津轻院, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [6] 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.
- [7] 祖若夫, 等. 微生物学实验教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [8] 王梅, 张彭湃, 等. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, 28(5): 62-64.