

# 具有杀伤能力之啤酒酵母的选育

王正祥 诸葛健

(发酵工程系)

**摘要** 运用原生质体融合技术成功地将杀伤质粒转入啤酒酵母中,并使其能十分稳定地表达杀伤性能。经发酵试验确认胞质融合株 kSC-2<sub>r</sub>-11 具有与亲株相似的发酵性能。所生产出的嫩啤酒与亲株相似且能保持较长时间的杀菌活力。

**关键词** 杀伤质粒转移;啤酒酵母;原生质体融合;发酵试验

## 0 前 言

优质啤酒酵母是酿制优质啤酒的基础;防止非生产菌进入发酵过程中则是酿制优质啤酒的重要保证。我国中小型啤酒厂,病害微生物污染是极为常见的。病害微生物污染后,轻者会引起啤酒质量下降、发酵延迟或再发酵;重者可使发酵异常乃至终止。啤酒病害微生物主要有野生酵母和细菌,以前者常见。迄今为止,啤酒病害微生物污染特别是野生酵母污染的防治尚无特别有效的方法。杀伤酵母具有杀伤敏感酵母的能力,此由胞质杀伤质粒介导<sup>[1]</sup>。为此,我们运用原生质体融合术将这一性状转移给啤酒酵母并探索在实际应用中的可行性。本研究在安徽圣泉啤酒厂无锡轻工业学院联合育种实验室完成。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

a. 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 40075 (ahis4 kar 1-1 [KIL-K<sub>2</sub>] [NEX-0]) 作为供体菌株,由日本岐阜大学堀津教授赠送。

b. 糖化酵母 (*Saccharomyces diastaticus*) No. 7-25, 为 K<sub>2</sub> 标准敏感株,由堀津教授赠送。

c. 啤酒酵母(工业生产菌株) SC-002, S26, SC-004; 由联合育种实验室保存。

d. 其它试验菌株除注明外皆为本院菌种室保藏。

### 1.2 培养基

a. MM<sub>甘</sub> YNB w/O (Difco) 6.7g/L, 甘油 20.0ml/L, 琼脂 20.0g/L.

收稿日期: 1991-04-01

- b. YEPD 酵母膏 20.0g/L, 蛋白胨 10.0g/L, 葡萄糖 20.0g/L, 琼脂 20.0g/L.  
c. MYGP YEPD 培养基中补加 30.0ml/L 麦芽汁。

### 1.3 受体菌株呼吸缺陷突变株的筛选

按[2]介绍的方法进行。

### 1.4 杀伤酵母杀伤性能检测

按[3]介绍的方法进行。

### 1.5 原生质体制备、融合及再生

按文献[4]介绍的方法加以改进。一般步骤为取 18~24h 供体及受体菌株之 YEPD 培养液 5ml, 离心收获细胞并洗涤, 用 Zymolyase 20T (日本通产省工微所 Miyake 博士赠) 酶液悬浮细胞至  $10^7$  个/ml, 原生质体化 80min 后收获原生质体。将供、受体亲株原生质体等量混合, 用 10m mol/L  $Ca^{2+}$  高渗缓冲液洗涤一次, 加入 4ml 30% PEG (聚乙二醇, 分子量 4000) 和 10mmol/L  $Ca^{2+}$ , 室温放置 25min, 涂布或包埋融合物于以 0.7mol/L KCl 为渗透压稳定剂之 YEPD 中于 30℃ 培养 3~7d. 生长菌落再于 MM<sub>H</sub> 上选择。

### 1.6 杀伤质粒提取及电泳

按[5]报道的方法进行。提取物用琼脂糖凝胶电泳(1%琼脂糖, 80V, 3~4h)鉴定。

### 1.7 发酵试验

12°麦芽汁无菌分装于 2L 三角烧瓶内, 每瓶 1L, 接入于 23℃ 培养 3d 之酵母, 接种量为 2g 湿酵母/L, 再于 12℃ 培养 24h 后转入 6 只 500ml 三角烧瓶中, 每瓶 150ml, 继续于 12℃ 下发酵培养。

## 2 结 果

### 2.1 受体菌株原生质体化条件

2.1.1 Zymolyase 20T 最适使用浓度及作用时间 分别以 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mg/ml 的 Zymolyase 20T 处理  $10^7$  个/ml 酵母细胞, 结果如图 1, 2 所示。从中可以看出不同菌株, 对 Zymolyase 20T 的敏感性不完全相同, 以原生质体形成率 90% 计, 则 ATCC 44075 需在 1mg/ml 浓度下用 80min, S26 需在 1.5mg/ml 酶浓度下作用 60min. 同一菌株对 Zymolyase 20T 存在一最适浓度。

2.1.2 EDPA,  $Ca^{2+}$ , 2-巯基乙醇 (2-ME) 对原生质体化的影响: 以 0.1mol/L EDTA, 0.1mol/L EDTA 与 0.1mol/L 2-ME 及 20m mol/L  $CaCl_2$  在 30℃ 下

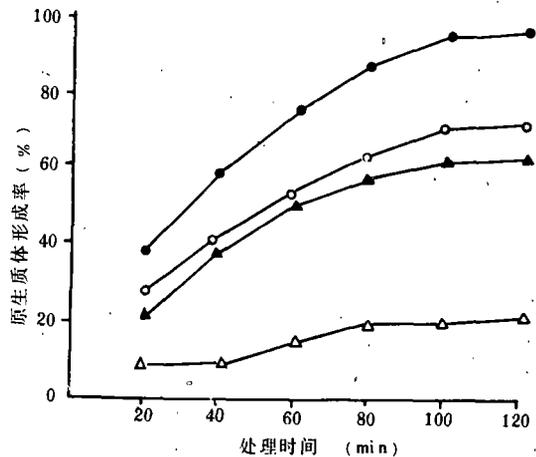


图1 不同酶浓度下 ATCC 44075 原生质体形成百分率

△—△: ▲—▲: ●—●: ○—○ 为分别使用  
0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml Zymolyase 20T

预处理经 22h 培养的 S26 酵母细胞, 然后用 0.8mg/ml 的酶液原生质体化。结果显示在原生质体化初期, EDTA 及 2-ME 预处理可以加速原生质体形成, 对原生质体化后期几无作用, 而 20m mol Ca<sup>2+</sup> 则能显著抑制 S26 原生质体化(图 3)。

**2.1.3 培养时间对原生质体的影响** 将 S26、SC-002 及 ATCC 44075 接入 YEPD 培养基中于 30℃ 培养 6, 13, 18, 20, 22, 24h, 收获细胞后以 1.5mg/ml 酶液处理 80min, 计数原生质体形成率, 结果如图 4 所示。

**2.1.4 培养基组成对原生质体的影响** 将 ATCC 44075 及 S26 接种至 YEPG、PYG 及 12° 麦芽汁中于 30℃ 培养 18~24h, 然后用 1.5mg/ml 酶液处理 100min, 结果表明酵母细胞在 YEPD 及 PYG 中生长时, 原生质体化较易, 两者无明显差异, 而在麦芽汁中生长时, 则对原生质体形成不利。

**2.2 影响原生质体再生的因素**

**2.2.1 原生质体化对再生的影响** 以 1.5mg/ml 酶液处理 S26 和 SC-002,

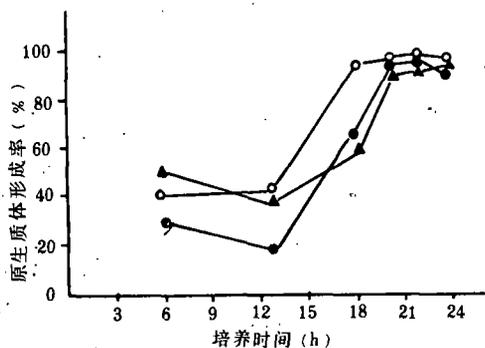


图 4 培养时间对原生质体形成的影响

▲—▲为 S26, ○—○为 ATCC44075, ●—●为 SC-002

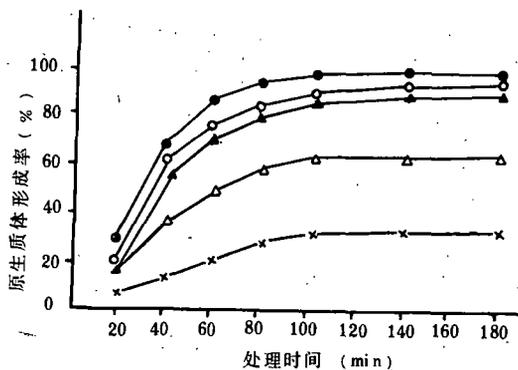


图 2 不同酶浓度下 S26 原生质体形成百分率

△—△、▲—▲、●—●、○—○为分别使用 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml Zymolyase 20T

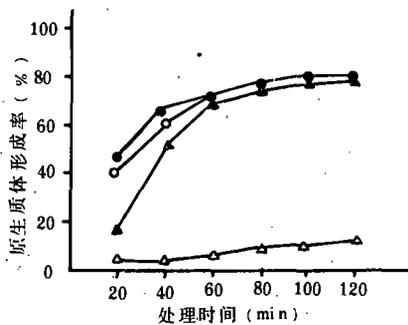


图 3 不同预处理后 S26 在 0.8mg/ml Zymolyase 20T 原生质体形成率

▲—▲为对照; ○—○为 0.1mol/L EDTA 预处理; ●—●为 0.1mol/L EDTA-0.1mol/L 2-ME 预处理; △—△为 20m mol/L Ca<sup>2+</sup> 预处理

定时取样镜检、计数以及经无菌蒸馏水处理后涂布 YEPD 平板及直接涂布高渗 YEPD, 计数生长出的菌落。如以 90% 原生质体化计, 则 S26 原生质体再生率为 8.25%, SC-002 为 1.17%。

**2.2.2 再生培养基对再生的影响** 将 S26 原生质体涂布或包埋于高渗 MM<sub>H</sub> 时及高渗 YEPD 中, 于 30℃ 培养 2~7d。S26 原生质体在高渗 MM<sub>H</sub> 中不能再生。渗透压稳定

剂以 10% 蔗糖最好。包埋比涂布原生质体再生率高 2~10 倍。

### 2.3 原生质体融合

将受体菌株原生质体与 ATCC 44075 原生质体以 1:1 等量混合,然后在 PEG 及  $Ca^{2+}$  介导下诱导细胞膜融合,融合产物涂布或包埋于再生培养基中于 30℃ 再生。生长菌落分别点种或涂布 MM<sub>H</sub>,划线分离纯化后作杀伤活性检测,结果如表 1 所示。将具有杀伤活性之啤酒酵母接种于保藏斜面(分别命名为 kS26<sub>r</sub>-1, kSC-2<sub>r</sub>-1, …)。

表 1 单倍体杀伤酵母( $K_2$ )啤酒酵母( $\rho^-$ )间原生质体融合

供体	受体	结果	
		胞质融合子数	杀伤酵母数
ATCC 44075	$\rho$ S26 <sub>r</sub>	0	0
	$\rho$ S26 <sub>r</sub> -3	18	0
	$\rho$ S26 <sub>r</sub> 10	4	4
	$\rho$ SC-2 <sub>r</sub> 1	43	33

### 2.4 构建菌株发酵性能

以 150ml 发酵规模对 SC-002 之衍生菌株作发酵试验,结果如图 5 所示。从中可以看出 kSC-2<sub>r</sub>-11 之发酵性能与亲株相似,由此生产出的嫩啤酒经三杯品评法品评,除略带酸酚异味外未见明显差异,而 kSC-2<sub>r</sub>-1, kSC-2<sub>r</sub>-8 之发酵性能与亲株有差异,生产出的嫩啤酒含有明显酸酚异味。

### 2.5 嫩啤酒抗菌效应及其构建菌株杀伤性能表达稳定性

将 kSC-2<sub>r</sub>-11 接入 12° 麦芽汁中于 10℃ 发酵 10d,离心取上清液,再经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除酵母细胞后置 4℃ 存放,定期取样加入一定数目的敏感酵母细胞置 20℃ 孵育 3h 后分析活细胞数。发酵液在 4℃ 存放 4 周后仍保持较高杀伤活性。kSC-2<sub>r</sub>-11 在斜面上于 20℃ 连续传代 15 次仍保持完好的杀伤性能。

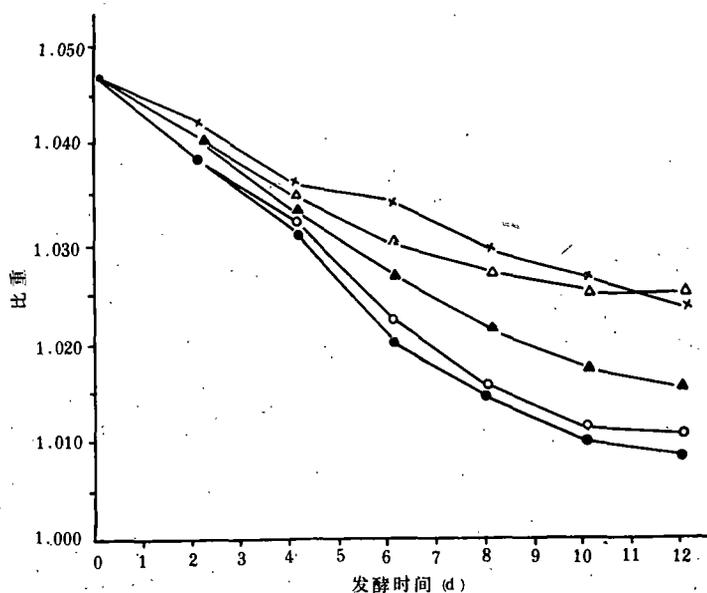


图 5 杀伤 SC-002 发酵试验

—•— 为 SC-002(Control); ○—○ 为 kSC-2<sub>r</sub>-11; ▲—▲ 为 kSC-2<sub>r</sub>-18; △—△ 为 kSC-2<sub>r</sub>-1; ×—× 为 kSC-2<sub>r</sub>-8

### 3 讨 论

啤酒酵母通常为双倍体或多倍体,几乎不能形成孢子,交配能力极为低下甚至缺如,通过诱变极难获得染色体遗传标志,且即便获得了染色体遗传标志,也可能同时破坏了亲株原有的优良特性。因此,运用啤酒酵母的现代育种手段,主要有胞质介导法<sup>[6]</sup>、原生质体技术及基因工程技术。杀伤酵母表达杀伤性能是由其胞浆中的 M-dsRNA 介导,因此,杀伤啤酒酵母的选育,其基点就是 M-dsRNA 转移与稳定表达。

原生质体融合技术中原生质体化步骤至关重要。一般认为,待原生质体化酵母细胞需用 EDTA 等预处理以便提高原生质体化率或缩短原生质体化时间,但在我们的实验中发现 EDTA 及 2-ME 预处理时所试菌株的原生质体化无显著影响,而离子成分特别是  $\text{Ca}^{2+}$  则能抑制原生质体化。细胞的菌龄、生长培养基、酶使用浓度对原生质体化也有极显著的影响。

运用原生质体融合技术获得的具有杀伤性能之 SC-002 衍生菌株能十分稳定地表达杀伤性能,核酸电泳分析法显示杀伤质粒的转移。其中 kSC-2-11 具有与亲株相似的发酵性能,所产生出的嫩啤酒可保存数周的杀伤活力。因此,运用有杀伤性能的啤酒酵母不但可以防止发酵过程中野生酵母的污染,且可有效地防止贮藏期野生酵母的污染。

在研究中也发现构建的杀伤啤酒酵母中多数出现发酵性能改变,发酵液中带有较明显的酸酚异味,这可能与供体线粒体及胞质其它遗传物质有关<sup>[7,8]</sup>。

#### 致 谢

本研究得到了方惠英、章文琦等老师和圣泉啤酒厂秦武、明明、姜惠珠等同志的支持与帮助在此一并致谢。

#### 参 考 文 献

- 1 Makowe M and Bevan E A. Proc Inst Conger Genet, 1963; XI(1): 202
- 2 诸葛健. 发酵微生物学实验技术, 江苏: 江苏调味品站, 1985; 199~200
- 3 王正祥. 天津微生物, 1987; 21(4)
- 4 焦瑞身. 微生物生理代谢实验技术. 北京: 科学出版社, 1990; 291~295
- 5 Kitano K, et al. J Ferment Technol, 1984; 62: 1
- 6 Spencer J F T and spencer D M. J Inst Brew, 1977; 83: 287
- 7 Hammonnd J R M and Eckersley R W. J Inst Brew, 1984; 90: 167
- 8 Goodey A R and Tubb R S. J Gen Microbiol, 1982; 128: 2615

## Breeding of Brewing Yeast with Killing Characteristic

Wang Zhengxiang    Zuge Jian

(Dept. of Fermentation. Eng.)

**Abstract** Brewing yeasts with killing characteristic were constructed by protoplast fusion. The killing characteristic could be expressed steadily. Experiments showed that the new producer, kSC-2<sub>f</sub>-11, had the same fermentation property as its parent. The quality of the beer produced by kSC-2<sub>f</sub>-11 was nearly the same as that of its parent, SC-002, in three tastings and its antiseptic power maintained for at least 4 weeks at 4°C.

**Key-words** Killer; Yeast; Protoplast; Fermentation