

原生质体融合技术构建糖化型啤酒酵母的研究

陈海昌 刘 波 张苓花 柳冰雄

(大连轻工业学院食品工程系 大连 116001)

摘要 融合亲株 B_{6-5} (Ala^- , Cys^- a) 和 T_{3-4} (His , Thr^- a) 细胞于 35%PEG(6000) - 50mmol/L CaCl_2 溶液, 28℃ 下诱导融合 30min, 筛选出融合株, 融合频率为 6.2×10^{-5} 。融合株细胞的体积和 DNA 含量均为两亲株细胞之和。融合株有水解淀粉的能力, 又有发酵度高于生产用酵母的特点。

关键词 原生质体, 融合, 淀粉水解

低糖啤酒又称干啤酒, 因其热量低而深受国内外广大饮用者的欢迎。其主要特点是发酵度高, 碳水化合物含量低。生产中为达到此目的, 需将麦芽中的淀粉和糊精水解为可发酵性糖。淀粉和糊精的水解可以通过外加酶法来实现, 但这会导致增加工艺过程和设备。通过遗传改良法使啤酒酵母自身具有水解淀粉和糊精的能力, 将会在不改变原有工艺和设备的情况下生产低糖啤酒。本文用啤酒酵母和糖化酵母进行原生质体融合, 筛选出融合株, 既有较高的发酵度和凝絮性, 又能水解淀粉和糊精的适宜生产低糖啤酒的菌株。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

啤酒酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* B, 由大连渤海啤酒厂提供。糖化酵母 *Saccharomyces diastaticus* T, 由山东威海啤酒厂提供。*Saccharomyces cerevisiae* ZF-15 (Leu^- Lys^- a) *Saccharomyces cerevisiae* ZF-18 (His^- Lys^- a), 均由中国科学院微生物研究所提供。

1.2 培养基

产孢前培养基(%): 葡萄糖 2, 酵母膏 1, 蛋白胨 1.5, NaCl 0.3, 蕃茄汁 15, 自然 pH。产孢培养基 (SPM, %): 葡萄糖 0.1, 酵母膏 0.25, KCl 0.18, NaAC 0.8, 琼脂 2, pH 6.0。基本培养基 (MM, %): 葡萄糖 2.0, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 琼脂

2, pH 6.0。完全培养基 (CM, %): 葡萄糖 2.0, 酵母膏 1.0, 蛋白胨 2.0, 琼脂 2.0, pH 6.0。高渗基本培养基 (HMM, %): MM + 0.8M 甘露醇。高渗完全培养基 (HCM, %): CM + 0.8M 甘露醇。水解淀粉培养基 (YEPSF, %): 可溶性淀粉 2.0, 酵母膏 0.3, 蛋白胨 0.35, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, pH 6.0。

1.3 实验方法

1.3.1 单倍体细胞制备: 见参考文献 [1]。

1.3.2 营养缺陷型标记菌株的制备: 见参考文献 [1]。

1.3.3 接合型的确定: 见参考文献 [2]。

1.3.4 融合株细胞性能测定: 淀粉水解能力的测定: 见参考文献 [3]。凝絮性的测定: 见参考文献 [4]。DNA 含量的测定: 采用改良的 Schneider 法提取 DNA^[5]。二苯胺法测 DNA 浓度^[6]。小牛胸腺 DNA 标准液作对照, 595nm 处读光密度值。啤酒发酵试验: 见参考文献 [7]。

2 结果与讨论

2.1 遗传标记的认定

两亲株细胞 B 和 T 诱导产孢后, 用 DES 对单倍体细胞进行诱变处理, 筛选出单倍体营养缺陷型 B_{6-5} 和 T_{3-4} 菌株。遗传标记分别为 B_{6-5} (Ala^- Cys^-) 和 (His^- Thr^-)。传代实验确认

菌株遗传标记稳定, 支配型测定均为 a 型。

2.2 原生质体的制备与再生

选择对数生长期的融合亲株细胞用正交试验法考察酶浓度、酶作用时间及作用温度对原生质体形成与再生的影响。

K 值法分析, 比较 R 值得出, 蜗牛酶浓度是影响亲株细胞原生质体形成和再生的主要因素, 酶解时间次之, 酶解温度影响最小。根据正交试验结果, B₆₋₅ 菌株的最佳酶解条件为: 酶浓度 0.5%, 作用时间 40min, 作用温度 30℃; T₃₋₄ 菌株的最佳酶解条件是酶浓度 1.0%, 作用时间 40min, 作用温度 30℃。在上述试验条件下, B₆₋₅ 和 T₃₋₄ 菌株的原生质体形成率与再生率分别为 80.0%, 6.9% 和 83.5%, 9.7%。

2.3 原生质体的融合

用 35% PEG (M. W 6000) 浓度, 50mmol/L CaCl₂ 融合液, 28℃ 诱导融合 30min, 选择高浓度琼脂(3%)的 HMM 和 HCM 培养基做融合后的夹层培养。结果表明亲株 B₆₋₅ 和 T₃₋₄ 细胞在 HMM 培养基上均不生长, 而融合株细胞因营养互补在 HMM 培养基上生长。

2.4 融合株的性能测定

2.4.1 营养要求测定: 对融合亲株和筛选出的三个融合株 F₁, F₂, F₃ 细胞进行营养要求的测定。结果见表 1。

表 1 亲株和融合株的营养要求

菌株	MM						
	MM	His	Thr	Ala	Cys	+His	+Ala
	MM	His	Thr	Ala	Cys	+Thr	+Cys
T ₃₋₄	-	-	-	-	-	+	-
B ₆₋₅	-	-	-	-	-	-	+
F ₁	+	+	+	+	+	+	+
F ₂	+	+	+	+	+	+	+
F ₃	+	+	+	+	+	+	+

2.4.2 细胞大小的测定: 对亲株和融合株分别随机挑取 50 个细胞测定其细胞长轴(a)和短轴(b), 取其平均值, 按公式

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{a}{2} \cdot \left(\frac{b}{2}\right)^2$$

计算细胞的体积, 结果见表 2。

表 2 亲株和融合株细胞大小比较

菌株	平均长轴(a)	平均短轴(b)	平均体积(V)
	(μm)	(μm)	(μm) ³
T ₃₋₄	4.25	4.22	39.61
B ₆₋₅	4.03	4.03	37.91
F ₁	5.62	4.78	67.20
F ₂	6.05	4.85	74.48
F ₃	5.65	5.21	80.26

融合株 F₁, F₂, F₃ 细胞的体积明显大于两亲株单倍体细胞, 细胞体积约为两亲株单倍体细胞体积之和。

2.4.3 细胞 DNA 含量的测定: 测定亲株和融合株细胞的 DNA 含量表明: T₃₋₄, B₆₋₅, F₁, F₂, F₃ 菌株细胞的 DNA 含量分别为 3.07, 2.25, 4.76, 5.08, 5.29 (× 10¹¹g/细胞)。融合株细胞的 DNA 含量约为两亲株的含量之和。

2.4.4 巨大菌落的形态比较: 将亲株和融合株细胞分别点种于麦汁平板中央, 28℃ 培养

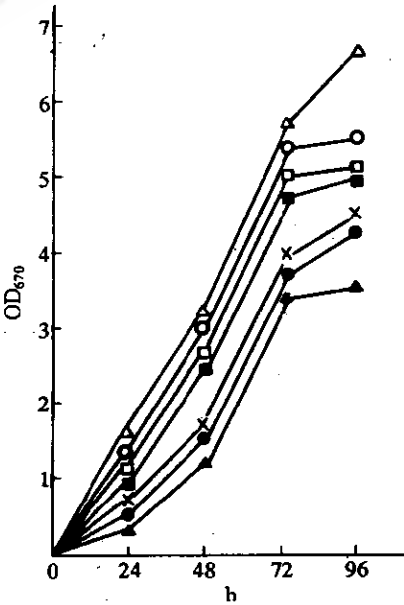


图 1 亲株和融合株的生长速率

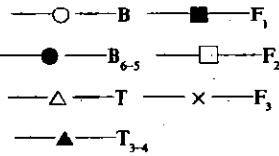


表3 亲株和融合子巨大菌落形态比较

项 目	T	B	T ₃₋₄	B ₆₋₅	F ₁	F ₂	F ₃
形状	圆形, 周边呈波状	圆形, 周边规则	圆形, 周边不规则	圆形, 周边规则	圆形, 周边不规则	圆形, 周边规则	圆形, 周边较规则
同心圈	明显	明显	明显	不明显	明显	不明显	明显
中央形状	中央较薄, 凹面大	中央厚, 凹面小	中央较厚, 凹面较大	中央厚, 隆起	中央较厚, 凹面较大	中央厚, 凹面小	中央厚, 隆起
辐射线	从中部至边缘	从中部至边缘	从中部至边缘	从中央至边缘	从中部至边缘	从中央至边缘	从中央至边缘
表面状态	有皱折, 有光泽	有皱折, 有光泽	有皱折, 有光泽	有皱折, 有光泽	有皱折, 有光泽	有皱折, 有光泽	有皱折, 有光泽
颜色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色

30d, 形成巨大菌落。菌落形态见表 3。

2.4.5 融合株稳定性的鉴定: 将两亲株的原生质体分别进行与融合过程相同的融合剂处理, 在 HMM 平板上培养未见原养型菌落出现, 表明未发生自发回复突变。两融合亲株的接合型相同, 所以排除了自然杂交的可能。融合株细胞进行十代连续培养和自然分离, 未见核基因标记的分离, 确认融合子的稳定性。

2.5 融合株生产性能的测定

测定亲株和融合株的生长速率, 水解淀粉

表4 融合株与亲株的啤酒发酵试验

菌株	酒精份 (W/W %)	原麦汁浓度 (W/W %)	实际发酵度 (%)	还原糖量 (g/100ml)
T	4.150	11.73	70.19	0.786
B	3.965	11.60	66.37	0.931
F ₁	4.090	11.69	68.44	0.814
F ₂	4.030	11.53	67.52	0.918

能力和啤酒发酵试验。试验结果表明: 融合株 F₂ 具有水解淀粉能力, 其酒精份和真正发酵度

都略高于生产用啤酒酵母 B, 而絮凝性与 B 菌株相接近。1L 啤酒发酵试验结果: 酒精度 (%): T、B、F₁、F₂ 分别为 4.15、3.96、4.09 和 4.03。实际发酵度分别为 (%): 70.19、66.37、68.44 和 67.52。F₂ 为适宜生产低糖啤酒菌株。结果见表 4 和图 1。

参 考 文 献

- [1] 陈海昌, 唐屹, 张苓花等. 微生物学通报. 1994, 21 (4): 213-217.
- [2] 夏淑兰. 现代应用微生物学实验技术, 北京: 轻工业出版社, 1988.
- [3] Yamashita, I. et al.: Agri. Biol. Chem., 1984, 48(1): 137-141.
- [4] 杜绿君. 啤酒酵母和微生物管理. 北京: 轻工业出版社, 1990.
- [5] Farahnak F. Applied and Environmental Microbiology. 1986, 9: 362-367.
- [6] 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1987.
- [7] 天津轻工业学院. 工业发酵分析. 北京: 轻工业出版社, 1979.