

抗酸酵母遗传特性的初步研究

王昌禄 杜连祥 顾晓波 路福平

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

山田修 五味胜也 饭村穰

(大藏省国税厅酿造研究所 日本国东广岛市 739)

摘要 研究了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)单倍体突变株 YNN-27-24(α trp⁻ ura⁻)对乳酸抗性产生原因及其遗传特性。结果表明,该突变株对乳酸的抗性不是由于对环境条件的适应,而是由基因突变所致。通过对 A13-18(als⁻)和 YNN-27-24进行杂交得到的 30 株杂交子代的遗传特性进行分析可以看出,YNN-27-24突变株对乳酸和潮霉素 B(Hygromycin B)的抗性,均由单基因控制,并且,该突变株抗 L-乳酸与抗潮霉素 B 基因之间存在着非常紧密的连锁关系。

关键词 酿酒酵母, 乳酸抗性, 潮霉素 B

分类号 Q93-933

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为遗传工程的受体菌,已日益受到生物学家的重视。众所周知,条件突变株在研究细胞结构与功能的关系方面已经显示了其优越性。除温度、溶解氧、渗透压外,pH也是一个与微生物生长、代谢有关的重要环境参数。目前,有关 pH 对细菌、霉菌生长、基因表达的影响,已经进行了报道^[1-3],但 pH 对酵母菌生长的影响,特别是有关抗酸酵母的遗传分析却未见报道。

在利用酵母菌的发酵工业中,大多数都采用纯种发酵进行。作为抑制杂菌生长的方法,一方面可以利用嗜杀酵母分泌的嗜杀毒素来抑制野生酵母的生长^[4],另一方面还可以在发酵过程中添加乳酸等有机酸的方法,通过降低发酵环境的 pH 来抑制杂菌的生长;或者是通过酸洗的方法,除去回收酵母泥中的细菌,以保证啤酒纯种发酵的进行。此外,将抗酸酵母用于成熟度较低,有机酸含量较高的葡萄酒酿造中,以提高葡萄酒的质量,更有其实际意义。

本文以酿酒酵母单倍体抗乳酸突变株 YNN-27-24为研究对象,通过对其抗酸基因的遗传分析,为从理论上解释抗酸酵母突变株的

生长机制。为今后分离、克隆抗酸酵母基因,构建发酵工业中可实际应用的双倍体或多倍体抗酸酵母奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: YNN-27(α trp⁻ ura⁻), A13-18(a lys⁻) (由日本国税厅酿造研究所提供)。

YNN-27-24(α trp⁻ ura⁻), (由 YNN-27 诱变得到的抗酸酵母突变株)。

1.1.2 培养基: YPD 培养基(%): 酵母膏 1, 蛋白胨 2, 葡萄糖 2, pH6.0. YPDH、YPDL 和 YPDLM 培养基; 分别在无菌的 YPD 和 YPDL 培养基中,加入不同浓度,经无菌过滤的潮霉素 B (mygromycin B, $\mu\text{g} / \text{ml}$) 和纯 L-乳酸(%),分别配制不同 pH 和不同潮霉素 B 浓度的 YPDH、YPDL 和 YPDLH 培养基。生孢子培养基(%): 醋酸钾 1, 酵母膏 0.2, 葡萄糖 0.2, pH

本课题为日本科学技术国际交流中心(JISTEC)基金资助项目
1997-11-27收稿

自然; YNB 培养基(%): YNB0.67, 葡萄糖 2, pH 自然。培养基灭菌条件均为 121℃, 15min。

1.2 实验方法

1.2.1 突变株单倍体及接合型的确认^[6]。

1.2.2 抗酸酵母突变株遗传标记的确认^[6]。

1.2.3 酵母菌杂交, 单倍体分离方法^[6]。

1.2.4 遗传分析: 将 A13-18 和 YNN-27-24 菌株进行杂交, 对所分离的子代单倍体细胞分别接种至 YPD(pH6.15)、YDDL(pH2.8)、YDPH (含潮霉素 B 50μg / ml, pH6.15)、YDDLH (含潮霉素 B 200μg / ml, pH2.8) 固体培养基平板上, 按 10⁶ 个细胞 / ml 接种于 5ml 液体培养基中, 测定供试菌株在不同培养基中的生长情况, 进行遗传分析。

2 结果与讨论

2.1 抗酸酵母突变株单倍体细胞及接合型的确认

将供试菌株接种于生孢子培养基平板上培养 14d 后, 镜检没有子囊孢子生成, 可确认 YNN-27、YNN-27-24 及 A13-18 菌均为单倍体细胞。

将已知接合型的标准菌株 A13-18 分别与 YNN-27、YNN-27-24 菌株进行杂交, 在显微镜下观察形成哑铃型细胞的情况, 确认 YNN-27、YNN-27-24 菌株的接合型均为 α 型。

2.2 抗酸酵母突变株的遗传标记

在含有 YNN-27、YNN-27-24、A13-18 菌悬液的 YNB 固体培养基平板上放入含有不同氨基酸的滤纸片, 培养 48h 后, 观察滤纸片周围菌落生长情况, 其结果如下: YNN-27 和 YNN-27-24 菌株在 YNB 培养基平板上, 只在含有 *trp* 和 *ura* 混合液的滤纸片周围有菌落出现; A13-18 菌株在 YNB 培养基平板上只在含有 *lys* 的滤纸片周围有菌落出现。由此证明三株供试酵母菌的遗传标记分别如 1.1.1 所示。

2.3 抗酸酵母突变株产生原因的分析

将在 YPD 斜面培养基连续转接 15 代得到的 YNN-27-24'、YNN-27 和 YNN-27-24 菌株, 分别接种在含有 4% 乳酸的 YDDL 固体和液体

培养基 (pH2.80) 中进行培养, 由其生长特性可知, 在 YDDL 固体培养基平板上, YNN-27、YNN-27-24 和 YNN-27-24' 菌株分别在 34h、24h 和 24h 开始有明显生长现象。在 YDDL 液体培养基中, YNN-27-24 与 YNN-27-24' 菌株在 YDDL 培养基中生长速率相同, 延迟期明显短于 YNN-27 菌株, 显示了对 L-乳酸的抗性。由此可知, 抗酸酵母突变株 YNN-27-24 抗乳酸生长这一性状, 可以稳定遗传, 并不是由于对环境条件的适应而出现, 而是因为基因突变所引起, 有关这一推论, 可参照 2.5 的实验结果。

2.4 供试菌株在不同培养基中的生长特性

实验结果表明, L-乳酸对供试菌株生长速率的影响不同: 当培养基的 pH 大于 3.0 时, 亲株 YNN-27 的生长速率与抗酸酵母 YNN-27-24 相同; 当培养基 pH 低于 3.0 时, L-乳酸才对 YNN-27 和 A13-18 的生长有明显抑制作用, 而对 YNN-27-24 菌株的生长却未表现出明显的抑制作用。在不同 pH 条件下, 不同浓度的潮霉素 B 对 YNN-27、A13-18 和 YNN-27-24 菌株的生长都有不同程度的抑制作用。突变株 YNN-27-24 在 YDPH 培养基中的生长速率略低于在 YPD 培养基中的生长速率, 而 YNN-27、A13-18 菌株在 YDPH 培养基中则分别表现为 60h 内不生长。由此可见, 突变株 YNN-27-24 同时具有抗 L-乳酸和抗潮霉素 B 的特性。同时发现, 当 YPD 培养基中同时添加 L-乳酸和潮霉素 B 时, 由于培养基中 pH 不同, 供试菌株生长所受抑制作用明显小于培养基中只添加潮霉素 B 时的情况。YNN-27、A13-18 和 YNN-27-24 菌株在含有不同浓度乳酸和潮霉素 B 培养基中的生长特性不同, 为对抗酸酵母突变株进行遗传分析提供了依据。

据报道^[7], 酿酒酵母原生质膜 ATPase (PMAI) 结构基因突变株 (简称 PMAI 突变株) 在保持菌体内部 pH 方面有缺陷。PMAI 突变株是根据对潮霉素 B 的抗性选择出来的, 该菌株对潮霉素 B 的抗性与菌株保持细胞内 pH 有关。潮霉素 B 是含有氨基和多醇的氨基糖苷类抗生素, 其作用机制是抑制在核糖体上多肽的转移,

从而抑制原核和真核生物蛋白质的合成^[8]。

从以上结果可以看出,抗酸酵母 YNN-27-24 中抗潮霉素 B 基因与抗 L-乳酸基因之间有一定关系,可能是两个连锁的基因,或者就是一个基因。以下将通过杂交的方法对抗酸酵母突变株 YNN-27-24 进行遗传分析,以确定该突变株抗 L-乳酸这一性状是由多个基因还是由单基因控制,以及抗 L-乳酸基因与抗潮霉素 B 基因之间的关系。

2.5 抗酸酵母突变株 YNN-27-24 的遗传分析

2.5.1 抗酸酵母杂交子代的获得:

采用群体杂交法,将 A13-18 和 YNN-27-24 菌株在 YPD 培养基斜面上进行混合,30℃ 培养 24h,制成菌悬液,饥饿培养 4~6h,稀释后用涂布法在 YNB 平板上进行分离,30℃ 培养 2~3d,共挑选出 34 株单个菌落,编号为 AY1~AY34。任意选择 AY1、AY7 和 AY15 菌株,接种在生孢子培养基上培养 7d,镜检,都有四个子囊孢子生成,证明 AY1、AY7 和 AY15 都为杂合二倍体。

2.5.2 抗酸酵母杂交子代单倍体的分离:

采用常规方法^[6],分别对 AY1、AY7 和 AY15 二倍体细胞进行单倍体分离和单倍体确认,随机选择单倍体共 30 株,接入不同培养基中测定其生长特性。由二倍体 AY1 菌株分离得单倍体:AY1-1~AY1-10;由二倍体 AY7 菌株分离得单倍体:AY7-1~AY7-10;由二倍体 AY15 菌株分离得单倍体:AY15-1~AY15-10。

2.5.3 单倍体分离株在不同固体培养基平板上的生长特性:

将由二倍体 AY1 菌株分离所得单倍体 AY1-1~AY1-10 菌株分别接种在 YPD (pH6.15)、YPDL (pH2.80)、YPDH (含潮霉素 B 50μg/ml, pH6.15) 和 YPDLH (含潮霉素 B 200μg/ml, pH2.8) 不同固体培养基平板上进行培养,其生长情况如表 1 所示。

从表 1 可以看出,单倍体 AY1-1、AY1-4、AY1-5、AY1-7、AY1-9、AY1-10 菌株在不同固体培养基平板上的生长情况与亲本抗酸酵母 YNN-27-24 菌株相似,同时表现了对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性;单倍体 AY1-2、AY1-3、AY1-6、AY1-8 菌株在不同固体培养基平板上

表1 单倍体AY1-1~AY1-10菌株在不同固体培养基平板上的生长情况

菌株	YPDL	YPDH	YPDLH
A13-18	-	-	-
YNN-27-24	+	+	+
AY1-1	+	+	+
AY1-2	-	-	-
AY1-3	-	-	-
AY1-4	+	+	+
AY1-5	+	+	+
AY1-6	-	-	-
AY1-7	+	+	+
AY1-8	-	-	-
AY1-9	+	+	+
AY1-10	+	+	+

注: - 表示在 YPDL、YPDH 和 YPDLH 固体培养基平板上 28~30h、60h 和 30~32h 不能生长; + 表示在上述固体培养基平板上 22~24h、14~16h 和 14~16h 能生长。

的生长情况与亲本 A13-18 菌株相似,对 L-乳酸和潮霉素 B 都没有抗性。由此可见,在由二倍体 AY1 分离所得单倍体 AY1-1~AY1-10 菌株中,对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性呈现抗性:非抗性 = 6:4 的规律。

由二倍体 AY7 分离所得单倍体 AY7-1~AY7-10 以及由二倍体 AY15 分离所得单倍体 AY15-1~AY15-10 在 YPDL、YPDH 和 YPDLH 固体培养基平板上的生长情况,与由二倍体 AY1 分离所得单倍体 AY1-1~AY1-10 菌株在上述固体培养基平板上的生长情况相似。即:单倍体 AY7-5、AY7-6、AY7-3、AY7-9 菌株在上述培养基中的生长情况与亲本抗性酵母 YNN-27-24 菌株相似,同时表现了对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性;而单倍体 AY7-1、AY7-2、AY7-4、AY7-8、AY7-10、AY7-7 菌株在上述培养基中的生长情况与亲本 A13-18 菌株相似,对 L-乳酸和潮霉素 B 都没有抗性。单倍体 AY15-1、AY15-5、AY15-6、AY15-8、AY15-9、AY15-10 菌株在 YPDL、YPDH 和 YPDLH 培养基中的生长情况与亲本抗酸酵母 YNN-27-24 菌株相似,同时表现了对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性;而单倍体 AY15-2、AY15-3、AY15-4、菌株 AY15-7 菌株在上述培养基中的生长情况与亲本 A13-18 相似,对 L-乳酸和潮霉素 B 都没

有抗性。由此可见,在由二倍体 AY7 分离所得单倍体 AY7-1~AY7-10 菌株中,对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性呈现抗性:非抗性 = 4:6 的规律。由二倍体 AY15 分离所得单倍体 AY15-1~AY15-10 菌株中,对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性呈现抗性:非抗性 = 6:4 的规律。

2.5.4 单倍体分离株在不同液体培养基中的生长特性:将由二倍体 AY1 分离所得单倍体 AY1-1~AY1-10 菌株分别接种在 YPDL (pH 2.80)、YPDH(含潮霉素 B 50μg/ml, pH6.15)、YPDLH(含潮霉素 B 200μg/ml, pH2.8) 液体培养基中进行培养,其生长情况如表 2 所示。

表2 单倍体AY1-1~AY1-10菌株在不同液体培养基平板上的生长情况

菌株	YPDL	YPDH	YPDLH
A13-18	-	-	-
YNN-27-24	+	+	+
AY1-1	+	+	+
AY1-2	-	-	-
AY1-3	-	-	-
AY1-4	+	+	+
AY1-5	+	+	+
AY1-6	-	-	-
AY1-7	+	+	+
AY1-8	-	-	-
AY1-9	+	+	+
AY1-10	+	+	+

注: - 表示在 YPDL、YPDH 和 YPDLH 液体培养基中,在 660nm 下,吸光度达到 0.4、0.4 和 0.3 时所需时间分别为 44~45h、60h 和 50~52h; + 表示在上述液体培养基中,在 660nm 下,吸光度达到 0.4、0.4 和 0.3 时所需时间分别为 34~36h、60h 和 50~52h。

从表 2 可以看出,单倍体 AY1-1、AY1-4、AY1-5、AY1-7、AY1-9、AY1-10 菌株在液体 YPDL、YPDH 和 YPDLH 培养基中的生长情况与亲本抗酸酵母 YNN-27-24 菌株相似。同时表现出对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性;而单倍体 AY1-2、AY1-3、AY1-6、AY1-8 菌株在上述液体培养基中的生长情况与亲本 A13-18 菌株相似,对 L-乳酸和潮霉素 B 都没有抗性。由此可见,在由二倍体 AY1 分离所得单倍体 AY1-1~AY1-10 菌株中,对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性呈现抗性:非抗性 = 6:4 的规律。

用同样方法,研究由二倍体 AY7 分离所得单倍体 AY7-1~AY7-10 菌株以及由二倍体 AY15 分离所得单倍体 AY15-1~AY15-10 菌株在 YPDL、YPDH 和 YPDLH 液体培养基中的生长情况,其结果与由二倍体 AY1 分离所得单倍体 AY1-1~AY1-10 菌株在上述液体培养基中的生长情况相似。即:单倍体 AY7-5、AY7-6、AY7-3、AY7-9 菌株在上述液体培养基中的生长情况与亲本抗酸酵母 YNN-27-24 菌株相似,同时表现了对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性;单倍体 AY7-1、AY7-2、AY7-4、AY7-8、AY7-10、AY7-7 菌株在上述培养基中的生长情况与亲本 A13-18 菌株相似,对 L-乳酸和潮霉素 B 都没有抗性。单倍体 AY15-1、AY15-5、AY15-6、AY15-8、AY15-9、AY15-10 菌株在上述培养基中的生长情况与亲本抗酸酵母 YNN-27-24 菌株相似,同时表现了对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性;而单倍体 AY15-2、AY15-3、AY15-4、AY15-7 菌株在上述培养基中的生长情况与亲本 A13-18 菌株相似,对 L-乳酸和潮霉素 B 都没有抗性。由此可见,在由二倍体 AY7 分离所得单倍体 AY7-1~AY7-10 菌株中,对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性呈现抗性:非抗性 = 4:6 的规律。在由二倍体 AY15 分离所得单倍体 AY15-1~AY15-10 菌株中,对 L-乳酸和潮霉素 B 的抗性呈现抗性:非抗性 = 6:4 的规律。

综合以上结果可以看出:通过对 A13-18 和 YNN-27-24 菌株进行杂交,挑选出 34 株单个菌落,编号为 AY1~AY34,任意选择 AY1、AY7 和 AY15 菌株,在生孢子培养基平板上生成子囊孢子后,分别进行酶解破壁并在 YPD 平板上进行单倍体分离,随机选择 30 株单倍体,接入含有不同浓度 L-乳酸和潮霉素 B 的固体和液体培养基中进行生长特性测定。分别以杂交亲本 YNN-27-24 和 A13-18 菌株作为对照,对杂交子代在含有不同浓度 L-乳酸和潮霉素 B 的固体和液体培养基中的生长特性进行比较,都呈现抗性:非抗性 = 16:14 的规律。通过统计分析,A13-18 和 YNN-27-24 菌株杂交得到的

30株单倍体子代的生长特性符合单基因控制的比例(1:1)。由此可见,抗酸酵母突变株YNN-27-24对L-乳酸和潮霉素B的抗性性状都由单基因控制。另外,抗酸酵母突变株YNN-27-24抗L-乳酸与抗潮霉素B性状,无论是在上述固体还是液体培养基中,其生长特性都相伴出现,虽然仅根据此项分析还不能确定该突变株抗L-乳酸与抗潮霉素B性状是否由同一个基因控制,或确定它们基因之间的距离,但至少可以认为,抗酸酵母突变株YNN-27-24抗L-乳酸与抗潮霉素B基因之间存在着非常紧密的连锁关系。

参 考 文 献

- [1] Hamamoto, T., Hashimoto, M., Hino, M., et al. Mol. Microbiol., 1994, 14: 939~946.
- [2] Kobayashi, H., Suzuki, T., Unemoto, T., J. Biol. Chem., 1986, 261: 627~630.
- [3] Olson, E. R., Mol. Microbiol., 1993, 8: 5~14.
- [4] 杜连祥, 王昌禄编著. 嗜杀酵母在酒类酿造中的应用, 北京: 中国食品出版社, 1989.
- [5] 杜连祥编著. 工业微生物学实验技术, 天津: 天津市科学技术出版社, 1992.
- [6] Davids P. J Biol Chem, 1988, 263: 18118~18122.
- [7] Yadau J C. J Bacteriol, 1984, 160: 884.

THE PRIMARY STUDIES ON THE GENETIC CHARACTERS OF ACID TOLERANCE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*^{*}

Wang Changlu Du Lianxiang Gu Xiaobo Lu Fuping

(Tianjin University of Light Industry, Tianjin 300222)

Osamu Yamada Katsuya Gomi Yuzuru Iimura

(National Research Institute of Brewing, Japan 739)

Abstract This paper mainly deals with the reason of a haploid mutant YNN-27-24(α trp^- ura^-) of *Saccharomyces cerevisiae* to lactic acid tolerance as well as genetic analysis of the mutant. It was observed that the reason of mutant against lactic acid does not adapt to environmental condition, but lies in the gene mutation. From the analysis of 30 crossers crossed by A13-18 (a lys^-) and YNN-27-24, the results show that the growth characters of YNN-27-24 of L-lactic acid and hygromycin B tolerance are controlled by single gene and the genes have close relationship between them.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Acid tolerance, Hygromycin B

* Part of this study was supported by JISTEC, Japan