

酵母菌杂交育种

IV. 高产酒精酵母杂交育种

蔡金科 张博润 刘玉芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用显微操作技术进行 *Saccharomyces cerevisiae* α 系 2.576 (mel^-) 与 *S. carlsbergensis* 2.500 (MEL^+) 以及 *S. cerevisiae* Stole 系 (mel^-) 与 *S. microellipsoides* 2.699-2-3 (MEL^+) 种间杂交。获得的杂种能全发酵棉子糖, 而亲株 α 系与 Stole 系仅能发酵此糖 1/3。两个不同杂交系的杂种 H808 与 H824-14 用孢子 \times 孢子交配法进行杂交, 所有的杂种酵母 H868、H869、H875 和 H876 发酵糖蜜比生产菌株 α 系及 Stole 系快。H875 菌株生成酒精量比其亲株高 3—10%。将 H875 菌株与生产菌株 *S. cerevisiae* DT 菌系杂交, 获得 H946 和 H948 两株杂种, 其中 H948 酒精发酵力比 DT 系高 3%, 比 H875 高 2%, 是一株酒精生产优良新品系。

酵母菌蔗糖与棉子糖发酵的遗传调控是十分复杂的。酵母菌有 6 个蔗糖基因和 6 个以上的蜜二糖基因^[6,7], 其中 5 个蔗糖基因 (SUC 1—5) 是蔗糖酶 (β -D-fructofuranoside fructohydrolase E. C. 3. 2. 1. 26) 的结构基因。遗传学实验证明棉子糖全发酵是受蔗糖基因与蜜二糖基因协同控制的^[5,8]。我国工业用酒精酵母 α 系和 Stole 系都不形成蜜二糖酶, 糖蜜中的蜜二糖当作非发酵性糖而被丢弃。几年前, 国外用杂交法培育出发酵力强、并且能利用 70—75% 棉子糖的新品系, 在生产上已取代了 α 系酵母^[9]。本文报道高产酒精酵母杂交育种的研究和描述培育酒精酵母新品系的特性。

材料和方法

(一) 实验菌株

从保藏的国内外生产用的糖蜜酒精酵母菌中选出不同种的有代表性的 19 株酵母进行初筛, 从中选出发酵力强的菌株: 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AS 2.576 (α 系酵母), *S. cerevi-*

siae DT 菌系以及 AS 2.552 (Stole 系酵母) 作为亲株。同时找出完全发酵棉子糖的菌株卡氏酵母 (*S. carlsbergensis*) AS2.500 和小椭圆酵母 (*S. microellipsoides*) 2.699-2-3 为蜜二糖基因的给体菌。

(二) 遗传分析方法

α 系和卡氏酵母是异宗配合菌株, 从单孢菌株中选出发酵力强的, 用细胞 \times 细胞交配法进行杂交。另一杂交系中小椭圆酵母和 Stole 系是同宗配合菌株, 因而采用孢子 \times 孢子交配法进行杂交。其它方法见前文^[1,2]。

(三) 酵母菌酒精发酵力的测定

如无特别注明, 一般所用的甜菜糖蜜是吉林省范家屯糖厂赠送的。发酵培养基的糖蜜浓度为 25% (W/V)。根据正交试验测定最适发酵条件的结果, 指出不需要添加硫酸铵、硫酸镁, 以 pH 5 左右最好。在 30 $^{\circ}$ C 下静止培养。酒精发酵力测定方法因实验目的不同而分为两种方法进行。

1. CO_2 减轻法: 由于糖类发酵产生 CO_2 , 根据 CO_2 产量多少即可换算出酒精的产量^[1]。

2. 发酵液中酒精含量测定法: 取 100 ml 发酵液, 调至 pH 7.0 左右, 加水至 200 ml。加热蒸

本文于 1980 年 3 月 12 日收到。

方心芳、相望年教授对本文提出宝贵意见, 特此致谢。

馏,收集 100ml 蒸馏液。在 15℃条件下,用标准比重计测量酒精比重,根据比重值换算出酒精含量。

(四) 发酵液中糖分的纸层析测定

发酵終了后,取离心后的上清液点样,同时用原发酵液及蔗糖、棉子糖、蜜二糖三种糖的混合液为对照。滤纸为 Whatman 1 号。扩散剂为正丁醇:吡啶:水 (6:4:3)。显色剂为: A + B + 5ml 85% 的磷酸,其中 A 液为 1g 二苯胺溶于 25ml 丙酮; B 液为 1ml 苯胺溶于 25ml 丙酮。在 20℃ 连续展层二次,第一次 30 小时,第二次 24 小时,展层后取出晾干。显色后于 80℃ 烘干 10 分钟。根据对照样品即可查出发酵液中糖的组分。

结 果

(一) 酵母菌种间杂交与杂种形成

甜菜糖蜜中有大量蔗糖和少量棉子糖,要获得优良的酒精酵母,必须考虑到水解蔗糖的蔗糖基因和水解棉子糖的蜜二糖基因间的互补作用等因素^[5,8],所以我们分两个系统来进行酵母菌交配。

1. 啤酒酵母 2.576 (Я系) 与卡氏酵母 2.500 杂交: 这两种酵母都是异宗配合菌。2.576 的单孢菌株间发酵力有明显差异 (2.9—5.4 gCO₂/100 ml 培养基), 最优者接近于亲株。取最优单孢菌株 2.576-11 和 2.576-14 分别与 2.500 的单孢菌株 2.500-1 和 2.500-4 交配,共得到 10 个杂种,结果列于表 1。为了获得纯合的蜜二糖基因菌株,挑出发酵力较强的杂种 H 513 和 H 516 进行单孢分离,选出带有蜜二糖基因、发酵力又强的单孢分离菌系 H 513-2 与 H516-15,把它们再进行交配,得到 16 株蜜二糖基因纯合杂种 (H 805—H 820),其中 H 808 和 H 819 菌株的发酵力超过了亲株 (表 2)。

2. 啤酒酵母 2.552 (Stole 系) 与小椭圆酵母杂交: 将啤酒酵母 2.552 与小椭圆酵母 2.699-2-3 以孢子 × 孢子交配法进行杂交,获得三个杂合二倍体 (H823、H824、

表 1 不同种间的杂种发酵力

Table 1 Fermentative ability of interspecific hybrids *S. cerevisiae* strain Я × *S. carlsbergensis*

菌株 Strain		杂交组合 Cross combination	发酵力(CO ₂ g/100ml) Fermentative ability
亲株 Parent	2.576-11	a mel ⁻ (1)	5.40
	2.576-14	a mel ⁻	5.20
	2.500-1	α MEL ⁺	1.56
	2.500-4	α MEL ⁺	1.88
杂种 Hybrid	H505	2.576-11 × 2.500-1	4.71(5) ²⁾
	H506	2.576-11 × 2.500-1	1.66(5)
	H507	2.576-14 × 2.500-4	4.98(5)
	H508	2.576-14 × 2.500-4	4.96(5)
	H509	2.576-14 × 2.500-4	5.04(5)
	H510	2.576-14 × 2.500-4	5.03(5)
	H513	2.576-14 × 2.500-1	5.41(7)
	H514	2.576-14 × 2.500-1	5.30(7)
	H515	2.576-14 × 2.500-1	5.45(7)
	H516	2.576-14 × 2.500-1	5.54(7)

1) mel⁻ 表示不发酵蜜二糖; MEL⁺ 表示能发酵蜜二糖。

mel⁻ = non-fermenter of melibiose MEL⁺ = fermenter of melibiose.

2) (): 括号内数字表示实验重复次数,以下皆同。

Number in parenthesis represents total number of repeats.

表 2 H513-2 × H516-15 杂种的发酵力比较

Table 2 Comparison of fermentative ability of hybridized strains H516-15 × H513-2

菌株 Strain		杂交组合 Cross combination	发酵力(CO ₂ g/100ml) Fermentative ability
亲株 Parent	H513-2	MEL ⁺	4.91
	H516-15	MEL ⁺	5.54
杂种 Hybrid	H805	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.42(2)
	H806	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.38(2)
	H807	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.51(2)
	H808	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.58(2)
	H809	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.38(2)
	H810	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.54(2)
	H811	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.27(2)
	H812	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.55(2)
	H813	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.42(2)
	H814	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.50(2)
	H815	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.43(2)
	H816	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.51(2)
	H817	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.30(2)
	H818	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.26(2)
H819	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.60(2)	
H820	H513-2(MEL ⁺) × H516-15(MEL ⁺)	5.49(2)	

表 3 2.552 × 2.699-2-3 的杂种发酵力比较

Table 3 Fermentative ability of interspecific hybrids *S. cerevisiae* strain Stole × *S. microellipsoides*

菌株 Strain		杂交组合 Cross combination	发酵力 (CO ₂ g/100ml) Fermentative ability	
			范家屯糖蜜 Molasses (Fanjiatun)	包头糖蜜 Molasses (Baotou)
亲株 Parent	2.552	<i>mel</i> ⁻	4.92(2)	5.37(2)
	2.699-2-3	MEL ⁺	4.72(2)	4.89(2)
杂种 Hybrid	H823	2.552 × 2.699-2-3 (<i>mel</i> ⁻) (MEL ⁺)	5.31(2)	5.83(2)
	H824	(<i>mel</i> ⁻) (MEL ⁺)	5.42(2)	5.56(2)
	H825	(<i>mel</i> ⁻) (MEL ⁺)	5.36(2)	5.83(2)

H825)。这些杂种都发酵蜜二糖，其中 H825 发酵力最高，H824 次之(表 3)。将此二菌株进行单孢分离，从中选出发酵糖蜜强，又能完全利用棉子糖的纯合二倍体菌株 H825-14 与 H824-2 进行交配，共获得 5 个蜜二糖基因的纯合杂种 (H870—H874)，糖蜜发酵力均超过亲株(表 4)。

3. 不同杂交系间的杂交：从上述两个不同杂交系中分别选出优良的杂种 H 808 和 H825-14。H808 含有纯合的卡氏酵母的蜜二糖基因与蔗糖基因系，以及来自 J 系的蔗糖基因系；H825-14 含有纯合的小椭圆酵母的蜜二糖基因系和蔗糖基因系，以及得自 Stole 系的蔗糖基因系。为了获

得优良的杂种, 将两个不同遗传系的杂种再进行复合杂交。两次交配共得到 4 个杂种(H868、H869、H875、H876)。与原亲株 9 系及 Stole 系进行对比发酵试验, 结果列于表 5。从表 5 中可看出两个不同遗传系统杂种的复合交配, 所得到的杂种, 酒精发酵力比 9 系和 Stole 系酵母都强。其中

H 875 发酵不同来源的糖蜜所生成的酒精都较高。进一步将 H875 的单孢菌株 H875-7B 和 H875-10B 分别与 DT 系单孢菌株交配, 获得的杂种中, H946、H948 发酵糖蜜比亲株快, 酒精产量又高。经过连续杂交选育的这些株系, 经过酒精发酵对比试验, 表现其为高产酒精酵母新品系(图 1)。

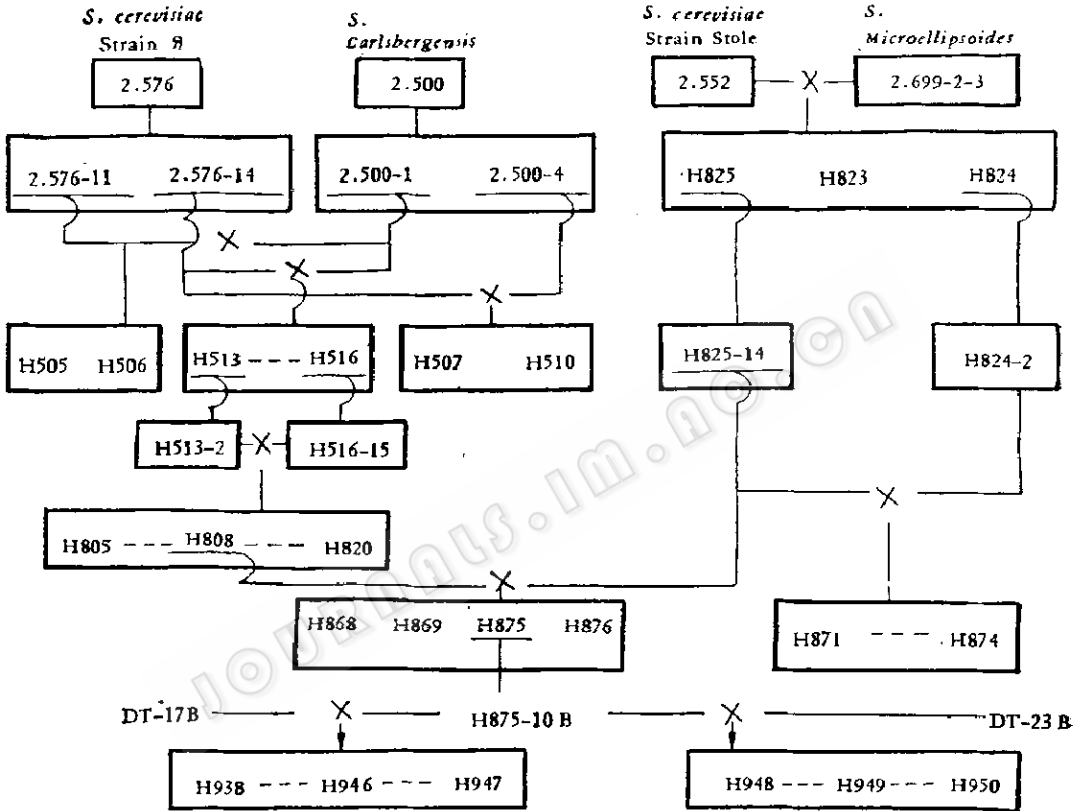


图 1 高产酒精酵母杂交育种谱系图

Fig. 1 Pedigree showing the cross breeding of yeasts for high ethanol production

表 4 不同杂种发酵力比较

Table 4 Comparison of fermentative ability of hybridized strains H825-14 × H824-2

菌株 Strain		杂交组合 Cross combination	发酵力 (CO ₂ g/100ml) Fermentative ability
亲株 Parent	H825-14	MEL ⁺	5.25(2)
	H824-2	MEL ⁺	4.72(2)
杂种 Hybrid	H870	H825-14(MEL ⁺) × H824-2(MEL ⁺)	5.42(3)
	H871	H825-14(MEL ⁺) × H824-2(MEL ⁺)	5.29(4)
	H872	H825-14(MEL ⁺) × H824-2(MEL ⁺)	5.38(4)
	H873	H825-14(MEL ⁺) × H824-2(MEL ⁺)	5.42(3)
	H874	H825-14(MEL ⁺) × H824-2(MEL ⁺)	5.49(4)

表5 H808 与 H825-14 的杂种发酵力比较
Table 5 Fermentative ability of hybrid strains H808 × H825-14

菌株 Strain		杂交组合 Cross combination	表型 Pheno type	发酵力 (CO ₂ g/100ml) Fermentative ability	
				范家屯糖蜜 Molasses (Fanjiatun)	包头糖蜜 Molasses (Baotou)
亲株 Parent	Я系		—	5.01	5.46
	Stole 系		—	5.14	5.42
杂种 Hybrid	H868	H808 × H825-14	+++	5.20	5.55
	H869	H808 × H825-14	+++	5.24	5.55
	H875	H808 × H825-14	+++	5.30	5.49
	H876	H808 × H825-14	+++	5.24	5.61

(二) 杂种发酵甜菜糖蜜及产物分析

1. 杂种 H875 与生产菌株 Я系及 Stole 系酵母发酵力比较:按上述最适发酵条件,用 CO₂ 减轻重量法测定杂种 H 875 和 2.552(Stole 系)及 2.576(Я系)发酵糖蜜产生酒精的能力。发酵瓶在 30℃、静止条件下培养,定时测量 CO₂ 减轻的重量,直到恒重为止。试验结果表明,杂种 H875 发酵糖蜜产生酒精量及发酵速度比两亲株既多又快(图 2)。H 875 所具有的优良经济性状可能和它具备蜜二糖基因与蔗糖基因形成一个很好的互补系有关。

2. 酒精产量的比较分析:由表 5 看出

两个不同杂交系的杂种发酵力比生产菌株 Я系及 Stole 系都好。选出 H870 和 H875 两株杂交种与其亲株一起分别进行发酵试验。在 31 三角瓶装 800ml 培养液,在 30℃ 下静止培养,发酵 2 天后取样蒸馏酒精。在 15℃ 条件下,测酒精比重值,换算出酒精含量,结果列于表 6。

从表 6 可看出,以范家屯甜菜糖蜜为原料,H875 和 H870 产生酒精量显著高于两亲株,而 H875 更优于 H870。H875 分别比亲株 2.576 和 2.552 酒精产量提高 10.9% 和 21.3%,以包头糖厂的糖蜜为原料,酒精产量也分别提高 3.2% 和 6.6%。

表 6 杂种 H870、H875 与亲株的酒精产量比较
Table 6 Ethanol production by H875 and H870 and parent strains

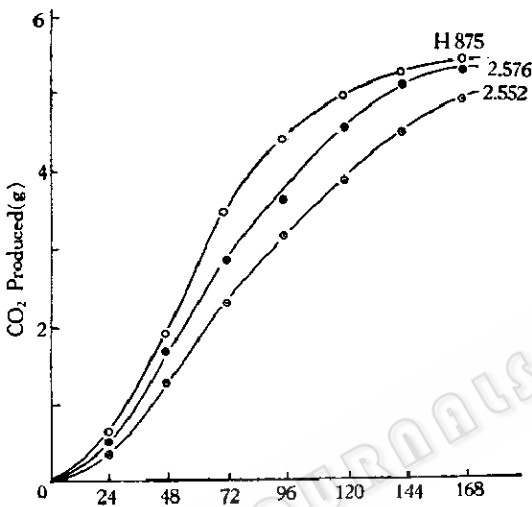
糖蜜来源 Source of molasses	菌株 Strain	酒精含量(V/V) Ethanol %(V/V)				酒精增产率(%) Increase of ethanol production (%)	
		实验次数 No. of experiments			平均值 Average value	杂种: 2.552 Hybrid: 2.552	杂种: 2.576 Hybrid: 2.576
		1	2	3			
范家屯糖厂 Fanjiatun sugar factory	2.552	6.86	7.50	7.02	7.13	100	—
	2.576	7.99	7.99	7.42	7.80	—	100
	H870	8.40	8.40	—	8.40	117.8	107.7
	H875	8.48	8.90	8.58	8.65	121.3	110.9
包头糖厂 Baotou sugar factory	2.552	7.99	8.64	8.48	8.37	100	—
	2.576	8.31	8.81	8.81	8.64	—	100
	H875	8.73	9.06	8.98	8.92	106.6	103.2

Fermentation was carried out in 3L flasks each containing 800ml medium comprising of 25% beet molasses, pH5, at 30°C.

表 7 不同杂种的酒精产量

Table 7 Ethanol production of hybrid strains

菌株 Strain	酒精含量 (V/V) Ethanol % (V/V)		平均值 Average value	酒精增产率 (%) Increase of ethanol production (%)	
	实验次数 No. of experiments			杂种:DT Hybrid: DT	杂种:H875 Hybrid: H875
	1	2			
DT	8.31	8.56	8.44	—	—
H875	8.48	8.64	8.56	1	—
H946	8.64	8.64	8.64	2	1
H948	8.64	8.81	8.73	3	2



发酵时间(小时)Period of fermentation (h)

图 2 亲株 2.576 和 2.552 与杂种 H 875 酒精发酵的时间变化

Fig. 2 Time course of alcohol fermentation by H875 and parent strains 2.552 and 2.576. Fermentation was carried out in 250ml Erlenmeyer flasks, each containing 100ml of fermentation medium, comprising of 25% beer molasses, pH 5, at 30°C

为改善 H 875 的蔗糖发酵力, 将其与 DT 系交配, 产生的 H946 和 H948 两杂种, 发酵糖蜜既快, 酒精产量又有提高 (表 7)。

3. 发酵醪中糖类的分析: 发酵醪中残糖成份纸层析测定表明, A 系和 Stole 系酵母在发酵条件下尚未利用棉子糖; 杂种 H875 能完全利用棉子糖; 三株菌都能利用蔗糖 (图 3)。这表明所获得的杂种具备两株给体菌的蜜二糖基因。杂种获得的蜜二糖基

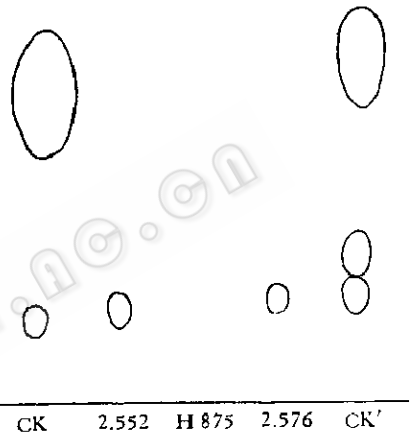


图 3 杂种 H875 与亲株 2.552、2.576 发酵液中糖分分析

Fig. 3 Paper chromatogram of sugars in the culture broth of H875 and parent strains 2.552 and 2.576

CK: 糖蜜培养基(上至下: 蔗糖、棉子糖)
CK': 1%蔗糖+1%蜜二糖+1%棉子糖的混合液 (从上至下: 蔗糖、蜜二糖、棉子糖)
CK: Molasses broth
CK': The mixture of 1% sucrose 1% raffinose and 1% melibiose

因所编码的蜜二糖酶与蔗糖酶协同作用, 很快将培养基中的蔗糖与棉子糖分解并发酵生成酒精。

讨 论

酵母菌在糖蜜发酵过程中, 首先利用其中的蔗糖生产酒精, 而后蔗糖酶水解棉子糖, 利用分解的果糖, 将蜜二糖作为非发酵性糖而被弃去。酒精酵母育种的目, 首

先是培育出发酵蔗糖快,能利用全部棉子糖,以增加酒精产量。

1974年,国外报道培育出能利用棉子糖的酒精酵母,是将 *Saccharomyces cerevisiae* Я系和 *S. carlsbergensis* 杂交后,获得的杂种 67号、73号、112号发酵力比亲株提高 1%^[9]。我们从蔗糖基因系、蜜二糖基因系,以及这两个基因系的协同作用出发,有目的的进行甜菜糖蜜发酵优良菌株的杂交与选育工作,选出了生产上不同品系(苏联的 Я系和德国的 Stole 系)和全发酵棉子糖的两个酵母种(小椭圆酵母与卡氏酵母)之间进行交配。从复合杂交中得到的 H 875 杂种,在发酵力方面比两亲株提高酒精产量 3—10%,且能完全利用棉子糖。将 H875 与啤酒酵母生产菌株 DT 品系杂交,从 20 个杂种中,选出 H946 和 H948 两株,酒精产量又比 H875 提高 2%。所获得的杂种在发酵力方面,均超过 Я系及 Stole

系,也优于 Косиков^[9]培育的杂种。这可能与选用的亲株不同有关,例如,作为蔗糖基因的亲株,我们选用了三个不同品系,蜜二糖基因来源于二个酵母种。有关杂种的遗传分析将另文报道。

参 考 文 献

- [1] 方心芳:《应用微生物实验法》,中国财政经济出版社,北京,1962,第72—74页。
- [2] 蔡金科等:遗传学报,5(1):9—17,1978。
- [3] 蔡金科等:遗传学报,5(2):89—107,1978。
- [4] 大内弘造:日本酿造协会杂志,74:642—647,1979。
- [5] Losada, M: *Compt. Rend. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.*, 25(18—19):460—482,1957。
- [6] Mortimer, R. K. and D. C. Hawthorne: *Genetics*, 53:165—173,1966。
- [7] Roberts, C. et al.: *Heredity*, 13:499—517,1959。
- [8] Winge, Ø. and C. Roberts: *Compt. Rend. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.*, 25:419—459,1957。
- [9] Косиков, К. В.: *Успехи Современной Генетики*. N.5. стр. 74—90. 1974。

HYBRIDIZATION AND SELECTION OF YEASTS

IV. BREEDING OF YEASTS FOR HIGH ETHANOL PRODUCTION

Cai Jinke Zhang Borun Liu Yufang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Interspecific crosses between *Saccharomyces cerevisiae* strain Я 2.576(*mel*⁻) × *Saccharomyces carlsbergensis* 2.500 (*MEL*⁺) and *S. cerevisiae* strain Stole 2.552(*mel*⁻) × *S. microellipsoides* 2.699-2-3(*MEL*⁺) were carried out by means of micromanipulation technique (Fig. 1). Hybrids fermented raffinose completely in contrast to parent strains. Strains Я and Stole which fermented this sugar only 1/3.

Crosses between hybrids H808 and H825-14, belonging to the two different crosses lines were performed by spore-

spore mating method. It is evident that in most cases the hybrids H868, H869, H875 and H876 could attenuate molasses broth more rapidly than industrial strains Я and Stole. Hybrid H875 produced more ethanol, about 3—10% higher than that of the parent strains.

Further, hybrid H875 was crossed with *S. cerevisiae* strain DT. It was found that one hybrid H948 was able to produce up to 3% higher level of ethanol than strain DT, and 2% higher than H875. Hybrid H948 seems to be an excellent ethanol producer.