

# 酵母菌杂交育种

## V. 药用酵母的杂交育种

蔡金科 刘玉方 张博润

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用显微操作技术对啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)不同品系间进行杂交,从不同杂交组合中选出五株杂种菌株,在甜菜糖蜜培养基中所有杂种的生物量比工业生产菌 Y26 提高 20% 以上,其中杂种 HX895 可提高生物量达 30%。细胞的生物量和残糖测定表明: HX895 在生长速度、糖的利用率皆优于 Y26; 总蛋白质量和维生素 B<sub>1</sub> 含量测定证明 HX895 也优于 Y26。遗传分析和细胞 DNA 含量测定证实 HX895 为四倍体。

**关键词** 啤酒酵母; 杂交; 杂种特性

药用酵母是指利用酵母菌本身或从酵母细胞中制备各种生物制剂,用以预防和治疗人类疾病的一类酵母。酵母厂生产的面包酵母有相当大的一部分供医药工业提取核酸类物质、维生素、凝血质、卵磷脂、谷胱甘肽和多种氨基酸等生物化学和生理活性物质,特别是提取核酸及其降解产物——核苷酸、核苷、碱基及其衍生物作为抗病毒、抗代谢药物,并用于治疗肝脏、心脏、血液及肿瘤等疾病都有一定疗效。因此开展药用酵母的研究,选育较好的药用酵母菌株成为一项重要的工作。

本文报道通过啤酒酵母不同品系间杂交,获得酵母细胞在生物量、细胞蛋白质含量及维生素 B<sub>1</sub> 含量等主要指标优于现生产菌株的杂种菌株,为酵母工业提供了新的酵母品种。

## 材料和方法

### (一) 实验菌株

啤酒酵母的不同品系: YG007、YG008、YG009 和 E4 系本组收藏菌株; Y26 系我国生产用的面包酵母菌株; A364A 为美国加州大学 R. W. Mortimer 教授赠送。

### (二) 实验菌株生物量测定

1. 培养基和培养条件: 培养基组分为 (%): 甜菜糖蜜 10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025, pH5.4。从斜面取培养物一环接种于种子瓶中(500ml 三角瓶装 50ml 培养基), 30℃ 静置培养 24 小时,按 10% 接种量接种于发酵培养瓶中(500ml 三角瓶装 90ml 培养基), 旋转摇床, 210 次/分, 28℃ 培养 18 小时。

2. 生物量测定方法: 上述培养液经 5000 转/分离心 5 分钟收集细胞,并用蒸馏水洗二次,将细胞压干、称重,称为湿重,将压榨细胞放入称量瓶中于 110±1℃ 烘干 3 小时,称重,为干重。

### (三) 酵母菌杂交育种

按前文报道<sup>[1-3]</sup>利用显微操作技术,从不同啤酒酵母品系中选出发酵力强、生物量接近 Y26 的 YG007、YG008 和 YG009 菌株进行纯化、单孢分离得到单孢菌系,再采用细胞×细胞交配方法进行杂交并获得杂种。在某些品系间的杂交后代表现出杂种优势,供进一步选用。

### (四) 残糖测定

采用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法<sup>[4]</sup>。

本文于 1984 年 5 月 4 日收到。

本所程光胜同志协助测定总氮量。

卫生部药品生物制品检定所协助测定 V<sub>B</sub> 含量,一并致谢。

### (五) 总蛋白质和维生素 B<sub>1</sub> 含量的测定

按测定细胞生物量方法取得细胞, 冷冻干燥后用凯氏定氮法测定总氮量, 同时用冷干样品测定维生素 B<sub>1</sub> 含量。

### (六) 细胞 DNA 含量测定

1. 细胞 DNA 的提取: 按 Sherman 等人<sup>[1]</sup>改进的酵母 DNA 提取方法进行。

2. 细胞计数: 精确称取冷干酵母, 溶于定量无菌水中适当稀释, 用血球计数器在显微镜下直接计数, 计算出每克干酵母的细胞数目。

3. 酵母细胞 DNA 含量测定: 定量称取冷干酵母并按上述方法提取 DNA。在 260nm 处测紫外吸收值, 按小牛胸腺 DNA (Sigma) 制作的标准曲线, 计算出 DNA 含量, 并计算出细胞 DNA 的总量, 再由 DNA 的总量和总的细胞数计算出每个细胞 DNA 的近似含量。

## 结果和讨论

### (一) 啤酒酵母不同品系间杂交和生物量测定

由本组保藏的啤酒酵母中经初筛选得 YG007、YG008、YG009 三株菌作为实验菌株, 再经单孢分离, 从中选出发酵力强、生长速度快的单孢菌株 YG009-1, 分别与 YG008 单孢菌株 YG008-1 和 YG007 单孢菌株 YG007-8 进行细胞与细胞交配, 分别获得 6 株和 10 株杂种, 以 Y26 为对照, 测

定其生物量, 选出 HX895 生物量高的菌株 (图 1、表 1)。

由 YG008-1 × YG009-1 所获得 6 株杂种细胞的生物量比对照菌明显提高, 以 HX895 为最好。而 YG009-1 × YG007-8 所获得 10 株杂种仅有 3 株细胞生物量比对照菌高。由此可见杂交育种是育种工作的有效手段之一。

### (二) HX895 培养过程中细胞生物量的积累、pH 值和残糖测定

以 Y26 为对照菌测定 HX895 不同培养时间的生物量、pH 值和残糖 (图 2)。HX895 生长速度快、细胞生物量高于 Y26, 残糖比 Y26 略低, 培养时间约可缩短 4 小时, 所以可提高设备的利用率, 细胞生物量也相应得到提高。以 18 小时计算 HX895 对糖的利用率为 93.4%, 每克糖产生细胞生物量为 0.94 克 (湿重)。

### (三) 糖浓度和通气量对 HX895 生物量的影响

不同糖浓度和装液量对 HX895 细胞生物量的影响是明显的 (图 3、4)。

由图 3、4 可见 HX895 在含糖为 1% 时, 酵母得率最高, 因此, HX895 杂种适用于工业生产中流加糖蜜的工序, 对生产有利。同时也表明 HX895 需较大通气量。

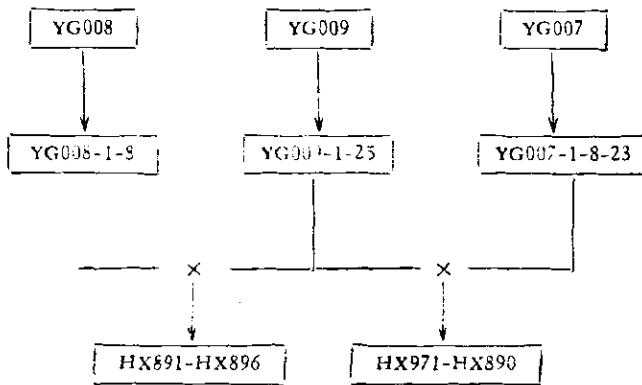


图 1 药用酵母杂交育种谱系图

Fig. 1 Pedigree showing the cross breeding of medicinal yeast

表 1 不同杂种生物量比较  
Table 1 Comparison of biomass of hybrids

菌株 Strain	杂交组合 Cross combination	生物量(干重) Biomass (Dry weight) (g/500ml)	实验次数 Number tested	提高生物量 Increase of biomass production (%)
Y26		4.44	9	
HX891	YG008-1×YG009-1	5.63	3	26.8
HX892	YG008-1×YG009-1	5.63	3	26.8
HX893	YG008-1×YG009-1	5.25	3	18.2
HX894	YG008-1×YG009-1	5.34	3	20.2
HX895	YG008-1×YG009-1	5.75	9	29.5
HX896	YG008-1×YG009-1	5.48	3	23.4
HX971	YG007-8×YG009-1	4.58	3	10.3
HX972	YG007-8×YG009-1	4.95	3	11.5
HX975	YG007-8×YG009-1	5.09	3	14.6

(四) HX895 总蛋白质质量和维生素 B<sub>1</sub> 含量的测定  
以 Y26 菌株为对照,测定杂种 HX895

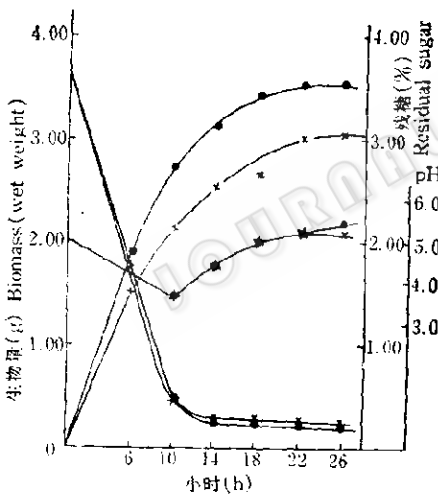


图 2 细胞生物量、pH 和残糖与培养时间的关系  
Fig. 2 Time course of biomass, pH and residual sugar of strains HX895 and Y26

(HX895 和 Y26 菌株在加甜菜糖蜜的培养基中, 28°C 摇床培养)

(Strains HX895 and Y26 were cultured in beet molasses medium, on a shaker, 28°C)

- 1. HX895 生物量      2. Y26 生物量
- HX895 biomass    Y26 biomass
- 3. HX 895 残糖      4. Y26 残糖
- HX895 residual sugar    Y26 residual sugar
- 5. HX895 pH        6. Y26 pH
- HX895 pH        Y26 pH

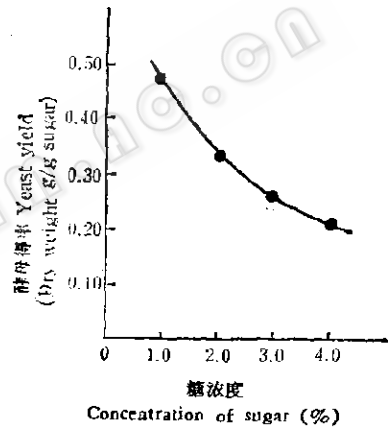


图 3 糖浓度对酵母得率的影响  
Fig. 3 Effect of sugar concentration on yeast yield

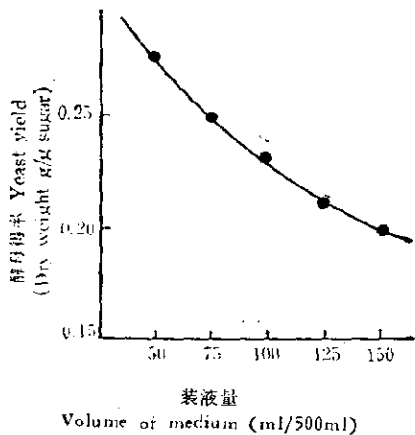


图 4 通气量对酵母得率的影响  
Fig. 4 Effect of aeration on yeast yield

表 2 HX895 蛋白质和  $V_{B_1}$  含量

Table 2 Contents of protein and thiamine in HX895

菌株 Strain	蛋白质 Protein (%)	$V_{B_1}$ Thiamine ( $\mu\text{g/g}$ dry weight)
Y26	53.5—56.0	30.9
HX895	55.0—60.1	44.3

表 3 HX895 与 Y26 菌株的细胞大小

Table 3 Cell size of HX 895 and Y26 strains

菌株 Strain	细胞长度 Length of vegetative cell ( $\mu\text{m}$ )	细胞宽度 Width of vegetative cell ( $\mu\text{m}$ )	细胞体积 Volume of cell ( $\mu\text{m}^3$ )
Y26	6.88	5.38	834.66
HX895	10.63	7.50	2504.76

表 4 不同倍体酵母细胞 DNA 含量

Table 4 Content of DNA in cell of different ploidy

菌株 Strain	A364A	E4	HX975	HX895
DNA ( $\mu\text{g}$ )/细胞 $\times 10^{-7}$ DNA( $\mu\text{g}$ )/cell $\times 10^{-9}$	6.42	11.72	17.81	23.00

总蛋白质和维生素  $B_1$  含量, 结果都高于 Y26。因此, HX895 的营养价值高于 Y26 菌株。

#### (五) HX895 与 Y26 菌株细胞大小

镜检上述二株菌细胞, 发现其细胞大小有明显差异, HX895 的细胞显然比 Y26 大得多(表 3)。

按椭圆形体积计算公式  $V = \frac{4}{3} \pi ab^2$

求出了 HX895 细胞体积为  $2504.76 \mu\text{m}^3$ , 这样大的细胞对酵母生产中的细胞收集、过滤以及压榨等工艺都会带来很大方便。

#### (六) 细胞 DNA 含量的测定

提取酵母细胞 DNA 并测定所提取酵母菌的细胞数, 计算出每个细胞 DNA 含量的近似值, 测定结果(三次测定平均值)列于表 4。

测定结果表明四株菌株每个细胞的 DNA 含量近似 A364A:E4:HX975:HX895

= 1:2:3:4。这与遗传分析所测得的结果 A364A、E4、HX975 和 HX895 分别为单倍体、二倍体、三倍体和四倍体相一致。酵母倍体数愈高, 细胞内含核酸类物质的量愈多。这对核酸工业具有重要意义。

药用酵母育种的目的是要培育出生长速度快、细胞生物量高, 药用物质含量也高的新菌株, 这样不但可以使药用酵母产量提高, 而且也可同时提高作为药物提取物的产量。我们从这两方面有目的地进行药用酵母的杂交育种工作, 选用了各具特点的 YG007、YG008 和 YG009 三株啤酒酵母进行杂交, 从而选出了 HX895 杂种菌株, 其生长速度、细胞生物量、蛋白质和维生素  $B_1$  的含量都优于现生产菌株 Y26, 且性能稳定, 将保存二年多的菌株再进行试验, 各方面的性能没有退化的表现, 因此 HX895 是一株较好药用酵母杂种菌株, 为我国酵母工业提供了一个有生产意义的新

品系。

### 参 考 文 献

- [1] 蔡金科等: 遗传学报, 5(1): 9-17, 1978。  
[2] 蔡金科等: 遗传学报, 5(2): 89-107, 1978。

- [3] 蔡金科等: 微生物学报, 22(1): 48-54, 1982。  
[4] 北京大学生物系生物化学教研室编: 《生物化学实验指导》, 人民教育出版社, 北京, 22-24, 1980。  
[5] Sherman, F. et al.: Methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1979。

## HYBRIDIZATION AND SELECTION OF YEAST

### V. BREEDING OF MEDICAL YEAST

Cai Jinke Liu Yufang Zhang Borun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Crosses were carried out between *Saccharomyces cerevisiae* YG009×YG007 and YG009×YG008 by means of micromanipulation technique. Five hybrids were obtained from different cross combinations of experimental strains.

All the hybrids produced more biomass, about 20% higher than industrial strain Y26 in beet molasses medium. The biomass produced by hybrid HX895 was about 30% higher than strain Y26. Biomass and residual sugar determination

showed that hybrid HX895 growth rate and sugar utilization ratio were higher than that of strain Y26. The contents of total protein and thiamine (B<sub>1</sub>) were also higher than that of strain Y26. The content of DNA and genetic analysis showed that hybrid HX895 was a tetraploid.

#### Key words

*Saccharomyces cerevisiae*; Hybridization; Hybrid character