

# 通过灭活原生质体融合选育啤酒酵母新菌株

周东坡 平文祥 孙剑秋

(齐齐哈尔大学师范学院生物系 齐齐哈尔 161006)

张宝国 王 超 国晓秋

(齐齐哈尔啤酒厂 齐齐哈尔 161000)

**摘 要** 将生产用啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) LQ<sub>16</sub>和 QSB<sub>7</sub> 分别进行单倍体化,并筛选 LQ<sub>16</sub>(Ile<sup>-</sup>, Dat<sup>+</sup>)和 QSB<sub>7</sub>(Ala<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S<sup>-</sup>)的遗传标记。经摇瓶培养后,酶解制备原生质体,对前者进行紫外灭活,而后者进行热灭活,再利用 PEG 进行融合,在 MMR 和 SMMR 培养基上再生,挑选融合子。连续传代稳定后鉴定融合子 QSB-XI<sub>6</sub>。通过细胞体积和生物量的测定,以及遗传型的分析和细胞 DNA 含量测定等均证实了获得的是融合子。经对啤酒感官评价,双乙酰含量测定与多种成分的气相色谱分析以及啤酒的发酵度、絮凝性、稳定性测定,并经连续多次生产试验证实 QSB-XI<sub>6</sub> 是一株口味独特、发酵度高、絮凝性强、遗传性能稳定兼具有多种优良性状的啤酒酵母生产新菌株。

**关键词** 啤酒酵母,灭活原生质体,原生质体融合,融合子 QSB-XI<sub>6</sub>

**分类号** Q933 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)05-0454-60

自 1977 年 Sipiczki 与 Ferenczy<sup>[1]</sup>首次实现酵母菌的原生质体融合以来,相继有人做了啤酒酵母的原生质体融合研究<sup>[2-9]</sup>,但多仅限于实验室的方法学研究,或限于将亲株的某一、两种优良性状转入融合子中,未见选育出集中双亲的多种优良性状并有明显提高,再应用于生产者。本文旨在探讨酵母菌双亲灭活原生质体融合的新方法,将生产菌株进行融合,改良其多种遗传性状,达到工业菌株的育种目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 出发菌株** 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) LQ<sub>16</sub>是由齐齐哈尔啤酒厂提供的生产菌株, QSB<sub>7</sub> 来自齐齐哈尔大学师范学院微生物实验室。

**1.1.2 蜗牛酶** 购自中国科学院东方仪器设备公司。

**1.1.3 培养基** 产孢培养基:葡萄糖 1.0g,酵母膏 2.5g, NaAC 8.2g, KCl 5mmol/L, Mg-SO<sub>4</sub> 0.29mmol/L 定容至 1L,完全培养基(YEPD)液体、固体,按文献[10]配制;再生培养基(MMR)液体、半固体、固体,均按周东坡、平文祥的方法配制<sup>[10]</sup>, pH5.2(在灭菌后加入适量 2% 无菌的人血清白蛋白),选择再生培养基(SMMR):在 MMR 中去除人血清白蛋白,而加入 0.07% 的醋酸铅和 500μg/mL 的双乙酰;基础培养基(MM):在 MMR 中去除山梨醇和人血清白蛋白;SM 系列培养基:在 MM 中分别加入 40μg/mL 的 L-氨基酸(1 种或几种),在 YEPD 中分别加入 0.07% 的醋酸铅和 500μg/mL 的双乙酰。

**1.1.4 有关溶液** 原生质体制备液 0.1mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH7.5 含 0.8mol/L 的山梨醇和 0.01mol/L 的 EDTA ) 0.2% $\beta$ -巯基乙醇 (V/V) 和 0.06mol/L 的 EDTA 溶液 聚合剂 含有 0.8mol/L 的山梨醇和含 10mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  的 40%PEG (MW6000) 溶液。

## 1.2 方法

**1.2.1 诱导单倍体与遗传标记** 将活化的双亲出发株分别转接于产孢培养基上, 28℃ 培养 5~7d, 离心收集菌体, 洗涤悬浮后加 2% 蜗牛酶, 37℃ 酶解 4h, 经 5 倍稀释后再置于 58℃ 保温 8min, 离心再悬浮后, 以玻璃珠用力摇振 10min。将已基本分散的孢子悬液适当稀释, 涂于 YEPD 平皿上, 28℃ 培养 7d, 从平皿上挑取小菌落, 移至 YEPD 斜面上。将该培养好的菌株再转接至产孢培养基上, 培养 3~7d, 染色镜检证明不产生子囊孢子, 即为单倍体细胞株; 将此二单倍体细胞株分别稀释成约  $10^7$  CFU/mL, 并用 UV 灯诱变 (30W, 距离 20cm, 照射 15min) 处理, 经暗培养后, 再挑取单菌落分别培养于 MM、各种 SM 和 YEPD 固体培养基上, 标记结果证明, QSB<sub>7</sub> 为  $\text{Ala}^-$ ,  $\text{H}_2\text{S}^-$  (低  $\text{H}_2\text{S}$  合成能力); LQ<sub>16</sub> 为  $\text{Ile}^-$ , Dat<sup>-</sup> (抗双乙酰)。

**1.2.2 原生质体制备** 参照周东坡、平文祥<sup>[10]</sup>的方法进行。将上述两个单倍体细胞亲株分别经 YEPD 斜面和液体培养基两次活化后, 再按 2% 的接种量转接于上述液体三角瓶中, 28℃ 振荡培养约 13h,  $\text{OD}_{570}$  达 0.43 时, 离心收集菌体, 并以无菌水洗两次, 5 倍浓缩于 0.2% $\beta$ -巯基乙醇和 0.06mol/L 的 EDTA 中, 30℃ 保温 30min; 振荡后各取 10mL, 用原生质体制备液洗涤 3 次, 以等量的原生质体制备液悬浮, 加蜗牛酶 0.08g, 30℃ 水浴 60min, 离心收集原生质体, 并洗涤再悬浮于等体积的原生质体制备液中。

取悬浮液 1mL 加入无菌水 10mL, 20min 后再用无菌水稀释成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  浓度, 涂布于 YEPD 平皿培养, 做裂解计数。

取悬浮液 0.5mL 用原生质体制备液稀释成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ , 分别倾注 MMR 双层平板培养, 以计算原生质体制备率。

**1.2.3 原生质体灭活** 各取悬浮液 5mL, QSB<sub>7</sub> 置于 52℃ 超级恒温水浴中 30min 灭活; LQ<sub>16</sub> 用 UV 灯 (30w, 距离 20cm) 灭活 20min。再用原生质体制备液稀释成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ , 倾注于 MMR 双层平皿培养, 计算灭活率。

**1.2.4 原生质体融合** 分别取上述灭活的原生质体悬液各 1mL, 等量混合并离心, 弃上清, 加入 4mL 40% 的 PEG, 摇匀后置 30℃ 水浴中处理 45min, 稀释后离心弃上清, 再用 MMR 液或 SMMR 液做 10 倍系列稀释, 并分别倾注 MMR 双层平皿和 SMMR 双层平皿, 置 28℃ (SMMR 双层平皿置 18℃) 温箱中培养 5~7d, 计数再生菌落。

**1.2.5 融合子的传代与鉴定** 挑取 MMR 和 SMMR 双层平皿上长出的菌落于 MM、SM 系列平皿上做鉴定, 再将融合子转接于 YEPD 斜面, 转接传代 10 次以上, 经 MM 和 SM 系列培养基上检验无分离者, 与双亲株 (CK) 一起用麦汁做啤酒发酵筛选试验, 并做融合子鉴定。经与双亲株 ( $2n$ ) 细胞一起做啤酒发酵试验, 筛选到双乙酰较低, 口味好, 发酵度较高, 凝絮性较好的融合子 QSB-XI<sub>6</sub>。

**细胞体积的测定** 用显微测微尺测量细胞的长轴 (a)、短轴 (b), 按 Anne 等<sup>[11]</sup>的公式:

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

生物量测定:参照蔡金科等<sup>[12]</sup>的方法,将经两次活化的菌悬液转接于 YEPD 液中, 28℃ 摇振培养 18h,再经 3000r/min 离心 8min,收集细胞,并以无菌水洗涤 3 次,放入称量瓶中,105℃ 烘干至恒重。

遗传型测定:将已活化的双亲株和融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 细胞分别接种到 1mL 无菌生理盐水的小试管中饥饿 3h 以上,再用接种环取样点在 MM<sub>9</sub> 系列 SM(各种 L-氨基酸)和 YEPD 加醋酸铅或双乙酰的培养基平皿上,28℃ 培养 48h(后者置 18℃ 培养 3~5d)观察结果。在含双乙酰皿中长出的菌落即为抗双乙酰,在含醋酸铅的皿中长出的白色菌落即为低 H<sub>2</sub>S 合成能力的菌株。

细胞 DNA 含量的测定:采用文献<sup>[13]</sup>的方法,用 0.5mol/L 的高氯酸分别提取双亲株与融合子的 DNA。再用二苯胺法<sup>[13]</sup>将 1mL 的核酸抽提液中加入 2.5mL 的新鲜二苯胺试剂,30℃ 下密闭放置 18h,然后用 75-2 分光光度计在 600nm 的波长下测其 OD 值,并用小牛胸腺 DNA 测得的标准曲线,计算其 DNA 含量,同时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。求出三次测定结果的平均值。

死灭温度的测定:按管敦仪<sup>[14]</sup>的方法测定。

1.2.6 融合子与亲株发酵效果比较:将融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 和齐齐哈尔啤酒厂目前生产中使用的亲株 LQ<sub>16</sub> 分别做装瓶和 160t 露天锥形大罐的发酵试验。按照管敦仪等的方法<sup>[14]</sup>测定其发酵度、双乙酰含量,按照 Burns 试验法<sup>[14]</sup>和悬液透光率的方法<sup>[3]</sup>测定其酵母菌的絮凝性,并品尝成品啤酒的口味,用气相色谱仪(GC5A 型)测定其成品啤酒中数种重要成份的含量。

2 结果

2.1 原生质体的制备率、再生率、灭活率和融合率

原生质体的制备率、再生率、灭活率和融合率的结果见表 1。

表 1 双亲株的原生质体制备、再生、灭活与二者的融合结果

Table 1 Results of fusion between the inactivated protoplasts of *S. cerevisiae* LQ<sub>16</sub> and *S. cerevisiae* QSB<sub>7</sub>

| 出发株              | 原生质体制备率/%                 | 再生率/%             | 灭活率/%                                | 融合率                   |
|------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Strain           | Protoplast formation rate | Regeneration rate | Inactivated protoplast rate          | Fusion rate           |
| QSB <sub>7</sub> | 99.28                     | 71.5              | (热灭活)<br>(heat-inactivated)<br>99.99 | 1.85×10 <sup>-6</sup> |
| LQ <sub>16</sub> | 99.49                     | 70.6              | (UV 灭活)<br>(UV-inactivated)<br>99.99 |                       |

2.2 细胞体积、生物量、遗传型、DNA 含量与死灭温度的测定

融合子与双亲株的形态学、遗传学与某些生理生化特性的测定结果见表 2。

2.3 融合子与双亲株的发酵效果

2.3.1 发酵度:用瓶装小试并按齐齐哈尔啤酒厂现行生产工艺用 160t 露天锥形大罐发酵,测定其真正发酵度结果见表 3。

表 2 融合 QSB-XI<sub>6</sub> 和双亲株的某些特征  
Several characteristics of fusant QSB-XI<sub>6</sub> and parents

| 项 目<br>Items                                   | LQ <sub>16</sub>                               | QSB <sub>7</sub>                  | QSB-XI <sub>6</sub>   |
|--|--|-----------------------------------|---|
| 平均细胞体积<br>Mean volume of cell                  |  |                                   |   |
| a/ $\mu\text{m}$                               | 5.888 $\pm$ 0.587                              | 6.08 $\pm$ 0.65                   | 7.136 $\pm$ 0.748   |
| b/ $\mu\text{m}$                               | 4.504 $\pm$ 0.511                              | 4.702 $\pm$ 0.451                 | 5.312 $\pm$ 0.690   |
| V/ $\mu\text{m}^3$                             | 62.922 $\pm$ 13.817                            | 70.413 $\pm$ 12.846               | 108.05 $\pm$ 19.754   |
| 生物量(干重)<br>Biomass( dry weight )               | 1220   | 1202.5                            | 1823.6  |
| /mg/500mL                                      |  |                                   |   |
| 遗传型<br>Genotype                                | Ala <sup>+</sup> H <sub>2</sub> S <sup>+</sup> | Ile <sup>-</sup> Dar <sup>r</sup> | Ala <sup>+</sup> Ile <sup>+</sup><br>H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> Dar <sup>r</sup> |
| DNA 含量<br>Content of DNA                       | 2.415  | 2.21                              | 3.88  |
| / $\mu\text{g}/\text{cell}\times 10^{-9}$      |  |                                   |   |
| 死灭温度/ $^{\circ}\text{C}$<br>Lethal temperature | 52   | 54                                | 54  |

\* a :Mean major axis( 长轴平均值 ) b :Mean mior axis( 短轴平均值 ) V :Mean volume( 体积平均值 )

表 3 融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 与亲株的发酵度比较  
Table 3 Fermentation degree of QSB-XI<sub>6</sub> and parents

| 菌株                  | 小试真正发酵度                            | 大罐真正发酵度                              |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Strain              | True fermentation degree in bottle | Ture fermentation degree in big tank |
| QSB-XI <sub>6</sub> | 71.07 $\pm$ 0.51                   | 71.858 $\pm$ 0.694                   |
| LQ <sub>16</sub>    | 62.05 $\pm$ 0.46                   | 65.60 $\pm$ 0.922                    |
| QSB <sub>7</sub>    | 56.03 $\pm$ 0.67                   |                                      |

乙酰还原酶产量高或释放的快。大罐发酵的成品啤酒中 LQ<sub>16</sub> 平均含双乙酰 0.071mg/L , QSB-XI<sub>6</sub> 平均含双乙酰为 0.055mg/L( 见表 4 )

表 4 融合子与亲株的发酵液与成品酒中双乙酰变化

| 菌株                  | 双乙酰含量 Diacetyl content/mg/L |       |       |       |       |       |                    |
|---------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------|
|                     | 瓶装小试 Test in bottle         |       |       |       |       |       |                    |
|                     | 天数/d                        | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6 7                |
| QSB-XI <sub>6</sub> |                             | 0.072 | 0.214 | 0.33  | 0.21  | 0.139 | 0.096 0.072        |
| LQ <sub>16</sub>    |                             | 0.110 | 0.139 | 0.173 | 0.511 | 0.246 | 0.097 0.077        |
|                     |                             |       |       |       |       |       | 0.0554 $\pm$ 0.007 |
|                     |                             |       |       |       |       |       | 0.071 $\pm$ 0.001  |

表 5 融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 与亲株的絮凝性  
Table 5 Flocculence comparison of fusant QSB-XI<sub>6</sub> and LQ<sub>16</sub>

| 菌株<br>Strain        | 本斯值<br>Burns value /mL | 悬液透光率<br>Transmittancy of supernatant |
|---------------------|------------------------|---------------------------------------|
| QSB-XI <sub>6</sub> | 3.13                   | 32.47 $\pm$ 4.3                       |
| LQ <sub>16</sub>    | 2.78                   | 29.22 $\pm$ 5.8                       |

2.3.2 啤酒口味 对瓶装发酵和大罐发酵生产的啤酒 ,由国家和省级评酒员进行品尝品评 ,认为 QSB-XI<sub>6</sub> 融合子发酵 啤酒具有清淡爽口 ,饮后干净利落 ,色淡口味独特的特点。

2.3.3 双乙酰含量 通过瓶装发酵试验和大罐发酵试验的定期抽样检测 ,证明 QSB-XI<sub>6</sub> 株比 LQ<sub>16</sub> 菌株发酵样品中双乙酰生成量少 ,峰值低 ,且早期下降的速度快 ,说明其酵母双

2.3.4 絮凝性 通过对 160t 大罐发酵后分别测定其酵母絮凝性 ,说明融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 的絮凝力有所提高( 如表 5 )。

2.3.5 降糖速度、 $\alpha$ -氨基氮的降低速度 通过瓶装小试 ,其结果是融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 均明显高于双亲株( 见表 6、表 7 )。

**2.3.6 酵母细胞数的变化和乙醇含量比较** :小试结果证明融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 的细胞数比双亲株明显增殖较快( 3d 即至高峰 ,而双亲株 5d 才至高峰 ),后期絮凝沉降的也快( 见表 8 );小试结果表明融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 的发酵液中乙醇含量高于双亲株( 见表 9 )。

**2.3.7 成品啤酒中化学成分比较** :大罐发酵后的成品酒经 GC5A 型气相色谱测定 ,融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 的酒中 ,丁酸乙酯少乳酸乙酯等酯类含量明显较高 ,异戊醇等杂醇含量较少。结果见表 10。

表 6 融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 与双亲株发酵液降糖速度

Table 6 Change of sugar degree in the fermented liquid of QSB-XI<sub>6</sub> and of parents

| 菌株<br>Strain        | 糖度 Sugar degree /°Bx |       |       |       |      |      |      |      |
|---------------------|----------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
|                     | 天数/d                 | 0     | 1     | 3     | 5    | 7    | 9    | 13   |
| QSB-XI <sub>6</sub> |                      | 11.22 | 9.63  | 6.97  | 3.98 | 2.03 | 1.46 | 1.15 |
| LQ <sub>16</sub>    |                      |       | 11.22 | 10.10 | 9.17 | 6.70 | 3.80 | 2.20 |
| QSB <sub>7</sub>    |                      | 11.22 | 10.37 | 9.90  | 8.90 | 6.25 | 2.03 | 1.43 |

表 7 融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 与双亲株发酵液中 α-氨基氮的变化

Table 7 Change of α-aminonitrogen in the fermented liquid of QSB-XI<sub>6</sub> and of the parents

| 菌株<br>Strain        | α-氨基氮 α-Amino nitrogen/mg/L |       |     |     |     |     |
|---------------------|-----------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|
|                     | 天数/d                        | 0     | 1   | 3   | 5   | 7   |
| QSB-XI <sub>6</sub> |                             | 165.8 | 144 | 94  | 63  | 56  |
| LQ <sub>16</sub>    |                             | 165.8 | 156 | 148 | 104 | 92  |
| QSB <sub>7</sub>    |                             | 165.8 | 160 | 158 | 140 | 111 |

表 9 不同菌株发酵液中乙醇含量的变化

Table 9 Change of alcohol content in the fermented liquid of QSB-XI<sub>6</sub> and of parents

| 菌株<br>Strain        | 乙醇含量 Alcohol content/% |       |       |       |       |       |
|---------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                     | 天数/d                   | 1     | 3     | 5     | 7     | 9     |
| QSB-XI <sub>6</sub> |                        | 0.590 | 1.73  | 3.15  | 3.875 | 4.048 |
| LQ <sub>16</sub>    |                        | 0.485 | 0.855 | 1.84  | 3.144 | 3.587 |
| QSB <sub>7</sub>    |                        | 0.325 | 0.485 | 0.965 | 2.12  | 3.10  |

3 结论和讨论

本试验由于是对双亲株分别做了不同方式的物理灭活原生质体进行融合 ,故原生质体及其融合子的再生受到很大影响 ,而由于在预试验中设计了多种不同条件 ,最后选出了最佳试验条件进行原生质体的制备、再生与融合 ,故使双亲灭活的原生质体融合率已达到了  $1.85 \times 10^{-6}$  ,还是很理想的。另外 ,双亲株均是单一的营养缺陷型标记 ,在

表 8 不同菌株发酵液中细胞数的变化

Table 8 Change of cell number in the fermented liquid of QSB-XI<sub>6</sub> and of the parents

| 菌株<br>Strain        | 酵母细胞数 Cell number / (万个/mL) |      |      |      |      |      |      |  |
|---------------------|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|--|
|                     | 天数/d                        | 1    | 3    | 5    | 7    | 9    | 11   |  |
| QSB-XI <sub>6</sub> |                             | 1800 | 5960 | 4500 | 2000 | 1000 | 600  |  |
| LQ <sub>16</sub>    |                             | 1600 | 4600 | 5300 | 2700 | 1600 | 1000 |  |
| QSB <sub>7</sub>    |                             | 1400 | 3000 | 4000 | 3000 | 1500 | 900  |  |

表 10 融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 与亲株 LQ<sub>16</sub>

成品酒中某些成分的气相色谱分析

Table 10 Gas chromatography analysis to some components in the beer products of QSB-XI<sub>6</sub> and of LQ<sub>16</sub>

| 化学成分<br>Composition     | 含量 Content/(μg/L)   |                  |
|-------------------------|---------------------|------------------|
|                         | QSB-XI <sub>6</sub> | LQ <sub>16</sub> |
| 正丙醇<br>n-Propylalcohol  | 16.3                | 18.3             |
| 异丁醇<br>Isobutanol       | 7.3                 | 7.05             |
| 正丁醇<br>n-Butanol        | —                   | 5.5              |
| 异戊醇<br>Isoamylalcohol   | 52.7                | 56.4             |
| 丁酸乙酯<br>butyryl acetate | 11.7                | 9.9              |
| 乳酸乙酯<br>Lactic acetate  | 25.2                | 10.0             |

预试验中将双亲的细胞浓度调整到  $10^7 \sim 10^8/\text{mL}$  时,分别涂 MM 平皿,均不长菌落;原生质体灭活后分别倾注 MMR(不加血清白蛋白)平皿,也无菌落再生。加之,原生质体不能百分之百的再生,因此,灭活融合后,在 SMMR 上长出的原类型菌落不可能是自发回复突变的结果,也不可能是 UV 灭活时,诱发回复突变的结果,而是双亲融合的产物,故所挑取的菌落是可信的,所计算出的融合率也是可信的。

双亲原生质体灭活后的融合有利地排除双方亲本类型的再生株,所以对选择融合子是十分有利与方便的。MMR 双层平皿可用于间接选择各类遗传型的融合子,并准确的计算融合率,如不考虑计算融合率,在 SMMR 双层平皿中同时加入双乙酰和醋酸铅进行直接选择融合子,则直接选择出来的融合子虽然遗传型不全,但的确增大了具有几种遗传标记的真正融合子的选择力度,增加了选择融合子的准确性与可靠性,也会减少日后融合子鉴定的工作量。特别是上述直接选择法有利于大量选择出较理想的正突变菌株(尤其是啤酒口味等性状),可明显减少初筛与复筛的工作量,缩短育种进程。

根据菌体生理代谢的途径,对 LQ<sub>16</sub> 亲株做了高抗双乙酰的遗传标记,而该种变异株又缺乏乙酰羟酸合成酶<sup>[15]</sup>,使  $\alpha$ -乙酰乳酸合成的量与双乙酰生成的量减少,2,3-戊二酮生成的量也减少,故发酵过程中双乙酰的峰值较低,抗双乙酰的变异株也可产生较多的双乙酰还原酶,可将双乙酰还原成 2,3-丁二醇,使啤酒中双乙酰还原快且含量低;对 QSB<sub>7</sub> 亲株又做了低 H<sub>2</sub>S 合成能力的遗传标记,可使发酵的酒中含硫化合物减少。二者的融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 集中了双亲的上述特性,故使成品酒中的双乙酰和 H<sub>2</sub>S 的含量均低;利用该菌株发酵制成的成品酒经气相色谱分析证实其正丁醇、异戊醇等杂醇含量少,乙酸乙酯、乳酸乙酯等酯类含量较高,且远低于阈值,故口味独特。

测定 QSB-XI<sub>6</sub> 株的细胞体积接近于二亲株细胞之和,生物量和 DNA 含量也明显高于双亲株,兼具双亲株的低 H<sub>2</sub>S 合成能力和高抗双乙酰的特性,而且发酵度、口味、絮凝性等均有一定提高或改善。说明它确实是融合子。而经传代十几代后仍稳定,故应视为稳定的融合子。

融合子 QSB-XI<sub>6</sub> 的细胞增殖速度和在发酵中降糖速度、 $\alpha$ -氨基氮的降低速度、双乙酰的降低速度和乙醇含量及发酵度均明显高于双亲株(可缩短发酵周期 3~5d),絮凝性也高于双亲株,且口味有明显改善,已投入生产。说明原生质体融合确实是一种有效的重要育种手段,并可创造出不同于双亲的新性状<sup>[10]</sup>。该方法在工业微生物育种中的确具有广泛的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Spiczki M, Ferenczy L. *Molecular & General Genetics*, 1977, **151**: 77~81.
- [2] 朱智男, 杨东林, 陈艺虹. 微生物学杂志, 1990, **10**(3): 38~42.
- [3] 江慧修, 张金玲, 周 坚等. 微生物学报, 1993, **33**(1): 22~31.
- [4] Halfmann H J, Emeis C C, Zimmermann V. *Arch Microbiol*, 1993, **134**: 1~4.
- [5] Benítez T, Gasent-Ramírez J M, Castrejón F *et al.* *Biotechnol Prog*, 1996, **12**: 149~163.
- [6] Lima N, Moreira-C, Teixeira J A. *Microbios*, 1995, **81**: 187~197.
- [7] Urano N, Sahara H, Koshino S *et al.* *J biotechnol*, 1993, **28**(2/3): 237~247.
- [8] Urano N, Sato M, Sahara H *et al.* *J Biotechnol*, 1993, **28**(2/3): 249~261.

- [ 9 ] Urano N , Kamimura M , Nanba T *et al.* *J Biotechnol* , 1991 , **20**( 1 ) : 109 ~ 116 .
- [ 10 ] 周东坡 , 平文祥著 . 微生物原生质体融合 . 哈尔滨 : 黑龙江科学技术出版社 , 1991 , 59 ~ 64 , 317 ~ 335 .
- [ 11 ] Anne J , Eysson H , Somer P D E . *Arch Microbiol* , 1974 , **98**( 2 ) : 159 ~ 166 .
- [ 12 ] 蔡金科 , 刘玉芳 , 张博润 . 微生物学报 , 1985 , **25**( 2 ) : 124 ~ 128 .
- [ 13 ] Farahnak F , Seki T , Ryll D D Y *et al.* *Appl Environ Microbiol* , 1986 , **51**( 2 ) : 362 ~ 367 .
- [ 14 ] 管敦仪主编 . 啤酒工业手册 . 北京 : 轻工业出版社 , 1982 ( 上 ) 439 ~ 442 ( 中 ) 211 ~ 256 .
- [ 15 ] 王治权 , 陈远河 , 尚水英 . 啤酒酵母实用技术 . 上海 : 上海科学普及出版社 , 1990 , 113 .

## BREEDING OF YEAST FOR BEER MANUFACTURING BY INACTIVATED PROTOPLAST FUSION

Zhou Dongpo   Ping Wenxiang   Sun Jianqiu

( *Biology Department of Teacher 's College of Qiqihar University , Qiqihar 161006* )

Zhang Baoguo   Wang Chao   Guo Xiaoqiu

( *Qiqihar Brewery , Qiqihar 161000* )

**Abstract** QSB-XI<sub>6</sub> , one of fusants , was obtained by PEG-induced fusion between UV-inactivated protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* LQ<sub>16</sub>( Ile<sup>-</sup> , Dat<sup>r</sup> ) and heat-inactivated protoplasts of *S. cerevisiae* QSB( Ala<sup>-</sup> , H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> ). The cell volume , biomass , genotype and DNA content of the fusant were measured in comparison with of its parents and the results showed that QSB-XI<sub>6</sub> was a fusant . The fermentation ability and the flocculent capacity of this fusant were higher than those of its parents . The diacetyl content of the beer produced by the fusant was measured and some other compositions of the beer was also analysed by gas chromatography . The sensory evaluation of the beer was much better and the flavour was distinctive . the results of many production trials in succession showed that all good characteristics of QSB-XI<sub>6</sub> were stable .

**Key words** Beer yeast , Inactivated protoplast , Protoplast fusion , Fusant QSB-XI<sub>6</sub>