

定向选育氨基酸营养缺陷型苹果 酒酵母突变株的研究

彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以苹果酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 1750 为材料, 利用甲基磺酸乙酯(EMS)对其进行诱变, 定向筛选出 2 株氨基酸营养缺陷型突变株, 利用生长谱法对缺陷型进行了鉴定、分析。结果表明, 诱变菌液在基本培养基中饥饿培养 3 h 后, 菌体浓度趋于稳定; 在高氮源培养基中培养 4 h 后加入制霉菌素, 于 10 h 时结束其抑制作用, 能取得较好的诱变效果。该定量化的参数确定方法为营养缺陷型突变株的筛选奠定了基础。

[关键词] 营养缺陷型; 苹果酒酵母; 甲基磺酸乙酯; 诱变; 筛选

[中图分类号] TS201.3; TQ926.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2007)04-0096-03

Study on directional breeding of aminophenol auxotroph cider yeast mutant

PENG Bang-zhu, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this paper, cider yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) 1750 had been treated by ethyl methyl sulfonate(EMS), and two aminophenol auxotrophic strains were directionally obtained during the experiment, then the auxotrophies were identified and analysed by growth chart of nutritional need. The result showed that the cell concentration was of stabilization when induced strains were incubated for 3 hours in the minimum medium, and mycostatin should be added after 4 hours and the inhibition finished after 10 hours in the MM with high nitrogen, in this way could good effect be achieved. This quantitative method paved the way for the breeding of aminophend auxotroph matant.

Key words: auxotrophy; *saccharomyces cerevisiae*; EMS; mutagenesis; breeding

营养缺陷型菌株在工业微生物育种学、遗传学、医学和食品生物技术等领域都有非常重要的作用, 科研工作者常常需要各种营养缺陷型突变株, 以便用于科学研究和实际生产。营养缺陷型微生物细胞在发酵工程上也有很重要的意义, 其在生产上可作为氨基酸、核苷酸、抗生素和蛋白质等的生产菌株^[1-3], 理论上可进行基质代谢途径分析, 并可作为遗传标记应用于遗传工程和菌种改良的研究中^[4]。

营养缺陷型为初级代谢途径阻断变异型, 因此其也经常作为初级代谢途径研究的可靠遗传标记^[5-6]。1953 年, Adelberg^[7]首次利用青霉素固体平板法, 筛选出了氨基酸缺陷型菌株; 随后 Luigi^[8]又对这种方法进行了改进, 使其应用性得到了增强。目前, 在营养缺陷型突变株的筛选过程中, 一般都是凭借经验确定一些关键参数, 尚无确定的量化方法。本研究利用甲基磺酸乙酯(EMS)对苹果酒酵母菌

[收稿日期] 2006-09-19

[基金项目] 霍英东教育基金项目(200281065); 农业部科技跨越计划项目(2005-4)

[作者简介] 彭帮柱(1978-), 男, 河南信阳人, 在读博士, 主要从事食品生物技术与发酵工程研究。

[通讯作者] 岳田利(1965-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术和食品工程高新技术研究。

株(*Saccharomyces cerevisiae*) 1750 进行了诱变,经过分离、筛选,得到了2株氨基酸缺陷型突变株,在对其缺陷型进行鉴定、分析的基础上,系统地提出了筛选突变株时一些过程参数的定量化确定方法,现予以报道,以期营养缺陷型菌株的选育提供参考。

1 材料与方方法

1.1 菌种

苹果酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 1750,来自轻工部发酵研究所。

1.2 培养基

产孢培养基(SPM)、完全培养基(CM)、产孢前培养基和基本培养基(MM)按文献[9]介绍的方法配制。高氮源培养基由基本培养基加入10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 得到。

1.3 试验方法

1.3.1 单倍体的制备 参照文献[10],将苹果酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 1750 活化后接至产孢前培养基,28℃培养2 d,再转接于产孢培养基,28℃培养2 d后涂片染色,观察孢子形成与否。待孢子大量生成时,用无菌生理盐水制成孢子悬液,取无菌的1.5 mL离心管1只,加入1 mL孢子悬液,离心5 min(转速5 000 r/min)收集菌体,加入20 mg/mL的蜗牛酶液1 mL,33℃水浴酶解4 h,58℃水浴处理8 min,迅速冷却菌液,倒入装有玻璃珠的无菌离心管中,加适量无菌生理盐水和无菌液体石蜡,振荡20 min,稀释至 10^{-5} 倍,取菌液涂在完全培养基平板上,28℃培养至长出明显菌落。将平板上各个菌落按上述方法在产孢前培养基和产孢培养基中再培养,涂片染色镜检,凡不形成子囊孢子的为单倍体细胞。

1.3.2 单倍体生长曲线绘制 参照文献[11]进行。

1.3.3 单倍体诱变 参照文献[12],将单倍体细胞接种到液体完全培养基中,28℃培养24 h后,转移1 mL到无菌离心管,离心5 min(转速5 000 r/min)

收集细胞,用无菌水离心洗涤2次。将细胞悬浮于1 mL无菌磷酸钠缓冲溶液(pH 7),加30 μL 甲基磺酸乙酯(EMS)到离心管中,振荡分散细胞,然后28℃摇床培养1 h,离心分离得到菌体,用50 g/L 硫代硫酸钠洗2次终止诱变作用。

1.3.4 突变株的浓缩 将诱变菌液接种于完全培养基中培养24 h后,转入基本培养基中进行饥饿培养至菌体浓度不再增加^[13],然后转入高氮源培养基中培养至对数生长期,然后加入终质量浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的制霉菌素和终质量浓度为170 g/L的蔗糖溶液,继续培养至稳定期,达到抑制野生型细胞浓缩缺陷型细胞的目的。

1.3.5 氨基酸营养缺陷型突变株的检出 利用点植对照法^[14],将经过上述处理后的菌落用无菌牙签对应转接1个MM平板和1个CM平板(先点接MM平板,后点接CM平板),记录被转移菌落的编号;在28℃下培养CM和MM平板1~2 d,然后对每套CM平板与MM平板进行两两比较;用无菌牙签将MM平皿上不能生长的菌落接到完全培养基斜面上,28℃培养24 h,然后再转接到加入2 g/L 蛋白胨的MM平板上;用无菌牙签将MM平皿上能生长的菌落转接到完全培养基斜面上保存,作为氨基酸营养缺陷型鉴定用菌株。

1.3.6 营养缺陷型菌株的鉴定 参照文献[11],取1 mL待鉴定营养缺陷型菌液,将其均匀涂布于基本培养基(MM)平板表面上,用蘸有不同氨基酸混合液(表1,各氨基酸质量浓度均为10 mg/mL)的9片圆形无菌滤纸(直径约1 cm)覆盖其上,28℃培养2~3 d后,观察滤纸表面有无菌落长出,然后根据长有菌落的滤纸的不同组号,结合表1鉴定出突变株的缺陷型。

2 结果与分析

2.1 饥饿培养时间的确定

饥饿培养时间与菌体浓度变化的关系见表2。

表1 不同氨基酸混合液的组成

Table 1 Compositions of different amino acid mixed solutions

组号 No	1	2	3	4	5
6	鸟氨酸 Ornithine	甘氨酸 Glycine	半胱氨酸 Cysteine	蛋氨酸 Methionine	胱氨酸 Cystine
7	组氨酸 Histidine	亮氨酸 leucine	异亮氨酸 Isoleucine	缬氨酸 Valine	赖氨酸 lysine
8	苯丙氨酸 Phenylalanine	酪氨酸 Tyrosine	色氨酸 Tryptophan	苏氨酸 Threonine	脯氨酸 proline
9	谷氨酸 Glutamine	丝氨酸 Serine	丙氨酸 Alanine	天冬氨酸 Asparagine	精氨酸 Arginine

由表2可以看出,诱变后的菌体在基本培养基

上饥饿培养3 h后,菌体浓度变化不大,说明缺陷型

突变株的生长受到抑制而进入休眠状态,防止了加入制霉菌素时,氨基酸缺陷型突变株也可以生长而被误杀。因此,确定本试验的饥饿培养时间为 3 h。

表 2 饥饿培养时间与菌体浓度变化的关系

Table 2 Relation between time of incubation and cell concentration

培养时间/h Culture time	吸光度 Absorbance	培养时间/h Culture time	吸光度 Absorbance
1	0.124	4	0.280
2	0.256	5	0.281
3	0.278		

2.2 加入制霉菌素前培养时间的确定

由图 1 可以看出,酵母菌 1750 的对数生长期为 2~10 h,在 4 h 后进入对数生长中期。由于对数生长中期酵母细胞体内的物质代谢活动较为旺盛,对营养需求量增加,且细胞体积增长较快,此时加入制霉菌素抑制野生型酵母细胞壁的生长,容易达到抑制野生型细胞的目的。因此,确定将诱变后的菌液先在高氮源培养基中培养 4 h,待进入对数生长中期后,再加入制霉菌素抑制野生型细胞。

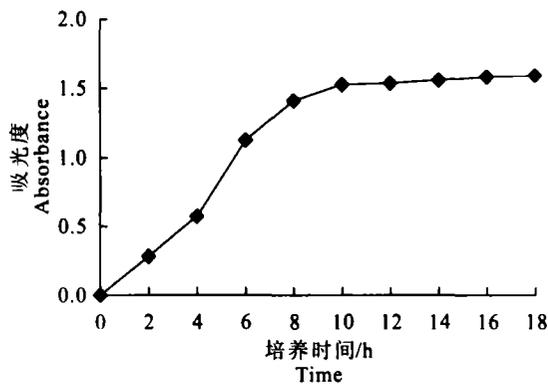


图 1 苹果酒酵母 1750 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of cider yeast 1750

2.3 制霉菌素作用时间的确定

由图 1 可以看出,酵母菌 1750 在培养 10 h 后进入生长稳定期,此时细胞生长代谢缓慢,制霉菌素对残存野生型细胞的抑制作用不明显。由于制霉菌素本身具有一定的毒性,为防止作用时间过长而对突变株有负作用,此时应该结束制霉菌素的作用。本试验中,在对数生长中期即培养 4 h 加入制霉菌素,至培养 10 h 时结束制霉菌素的作用,因此制霉菌素的作用时间为 6 h。

2.4 氨基酸营养缺陷型突变株的检出和鉴定

对诱变菌液进行筛选,最后得到 E_2 和 E_1 2 株氨基酸突变株,进一步利用单一氨基酸生长谱鉴定分析发现,突变株 E_2 在组号 5、7 的滤纸片上可以长

出菌落,结合表 1 可知其为赖氨酸缺陷型(Lys^-)突变株;突变株 E_1 在组号 4、8 的滤纸片上可以长出菌落,结合表 1 可知其为苏氨酸缺陷型(Thr^-)突变株;将 E_2 和 E_1 各传代 10 次以上,在基本培养基和添加相应缺陷型氨基酸的基本培养基上复检验证,发现其只在添加相应缺陷型氨基酸的培养基上生长,说明其遗传标记稳定。

3 讨论

确定营养缺陷型突变菌株的有效筛选方法,是获得营养缺陷型菌株的关键。在诱变后的细胞群体中,营养缺陷型菌株所占比例相当小,大量的野生型细胞,不易分离出营养缺陷型菌株,故常采用抗生素法、菌丝过滤法等来淘汰野生型菌株^[5]。本试验采用加入终质量浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的制霉菌素杀死野生型细胞,由于野生型细胞能够在基本培养基中生长繁殖,某些抗生素能抑制细胞壁的生物合成^[15],在含有抗生素的基本培养基中,野生型细胞内的物质虽仍在继续合成,但因细胞生长受到抑制,其细胞壁不再增大而导致细胞死亡^[9];由于营养缺陷型菌株不能在基本培养基上生长而处于休止状态,故抗生素对其不起作用,从而达到了浓缩营养缺陷型菌株的目的。为防止野生型细胞破裂自溶而给营养缺陷型菌株提供所需营养物质,使营养缺陷型菌株生长而被误杀,在添加抗生素的同时应提高环境渗透压以防止细胞破裂,故本试验加入 $170 \text{ g}/\text{L}$ 的蔗糖溶液以提高环境渗透压。突变基因的出现并不意味着突变表型的出现,表型的改变落后于基因型的改变^[16],为此在分离突变体前必须对诱变菌液进行中间培养,以提高筛选效率,减少回复突变现象的出现。利用点植对照法分离缺陷型突变体时,应该注意先点接基本培养基,后点接完全培养基,以防止将完全培养基带入基本培养基中,造成缺陷型突变体在基本培养基上也可以生长的现象,从而给分离工作带来误差。另外,在基本培养基上的点接量一定要少,以防止细胞过多及细胞老化而导致自溶现象的发生,从而引起缺陷型突变体也可以在基本培养基上生长的现象。

4 结论

1) 利用甲基磺酸乙酯(EMS)对苹果酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)1750 进行诱变,然后定

(下转第 104 页)

部取食。但在不缺水、沙蒿长势良好的情况下,沙蒿金叶甲在沙蒿上的空间位置还有待进一步研究。

用 Iwao 的 $m^* - m$ 回归分析法分析表明,沙蒿金叶甲个体间相互吸引,分布的个体成分是个体群。Toylar 冪法则检验表明,沙蒿金叶甲在田间沙蒿上呈聚集分布,且与密度有关,有密度依赖性,聚集强度随种群密度的升高而增加。这些结果都与田间沙蒿的分布、生长情况以及沙蒿金叶甲的产卵等生活习性密切相关,这为进一步研究沙蒿金叶甲抽样调查、预测预报和控制该虫提供了科学依据。

沙蒿金叶甲最适抽样数 N 与样本均数 m 及允许误差 D 的关系式表达为: $N = [3.93779/m + 2.88030]/D^2$ 。因此,在确定允许误差和样本均数后,即可利用此公式求得最适抽样数,避免抽样过少影响统计数据的准确性或抽样过多增加无效劳动量。

本研究建立的序贯抽样方程式为: $T_n = 3.93779/[D^2 - 2.88030/n]$ 。防治及测报调查时,可采用理

论抽样数或序贯抽样法调查该虫密度,以确定是否需要防治。

[参考文献]

- [1] 黄兆花. 我国沙区重要属植物的特性及应用[J]. 干旱区资源与环境, 1991, 5(1): 12-21.
- [2] 崔乃然. 新疆主要饲用植物志(第 2 册)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994: 261-262.
- [3] 田 畴, 贺答汉, 李进跃. 荒漠草原害虫沙蒿金叶甲的发生与防治[J]. 植物保护, 1987, 13(5): 25-26.
- [4] 张治科, 杨彩霞, 高立原. 甘草萤叶甲空间分布型初步研究[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 74-77.
- [5] 徐汝梅. 昆虫种群生态学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1985.
- [6] 张孝羲. 昆虫生态及预测预报[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [7] 丁岩钦. 昆虫种群生态学生态原理与应用[M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [8] 余 昊, 王登元. 春尺蠖种群空间分布型及抽样技术研究[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(5): 296-298.

(上接第 98 页)

向筛选出 2 株氨基酸营养缺陷型突变株 E_2 和 E_4 , 利用生长谱法对缺陷型进行了鉴定、分析, 结果表明突变株 E_2 为赖氨酸缺陷型(Lys^-), 突变株 E_4 为苏氨酸缺陷型(Thr^-)。

2) 本研究获得了缺陷型菌株筛选过程中一些关键参数的定量化确定方法, 即诱变菌液的饥饿培养应在菌体浓度不再增加时结束; 加入制霉菌素前, 应将菌液培养至对数生长中期; 制霉菌素的处理作用应在高渗透压条件下进行, 当菌体细胞进入稳定期时应当结束其抑制作用。

[参考文献]

- [1] Hensing M C, Rouwenhorst R J, Heijnen J J, et al. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts[J]. Antonie Leeuwenhoek, 1995, 67: 261-279.
- [2] Tung B S, Unger E R, Levin B, et al. Use of an unsaturated fatty acid auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae* to modify the lipid composition and function of mitochondrial membranes[J]. Journal of Lipid Research, 1991, 32: 1025-1038.
- [3] 彭志英. 食品生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 97-122.
- [4] Johannes P, Dijken V, Jack T P. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied Research[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2095-2100.
- [5] 张克旭, 陈 宁, 张 蓓, 等. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 89-95.
- [6] Cakar Z P, Sauer U, Bailey J E. Metabolic engineering of yeast: the perils of auxotrophic hosts[J]. Biotechnol Lett, 1999, 21: 611-616.
- [7] Adelberg E A, Myers J W. A modification of the penicillin technique for the selection of auxotrophic bacteria[J]. J Bacteriol, 1953, 65: 348-352.
- [8] Luigi G, Kaufman H. Selecting bacterial mutants by the penicillin[J]. Method Science, 1960, 131: 604-605.
- [9] 陈思斌, 肖照佩. 酵母生物化学[M]. 济南: 山东科学出版社, 1990: 75-79.
- [10] 彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏, 等. 优良苹果酒酵母的选育[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(5): 81-84.
- [11] 郝 林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 56-89.
- [12] 亚当斯 A, 戈特施林 D E, 凯泽 C A. 遗传学实验方法指南[M]. 刘子铎, 译. 北京: 科学出版社, 2000: 8-14.
- [13] 潘军华, 张 星. 定向筛选组氨酸营养缺陷型突变菌株的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2002(2): 8-15.
- [14] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1991: 117-118.
- [15] 沈 同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1991: 105-178.
- [16] Chen C, Kolodner R D. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants[J]. Nat Genet, 1999, 23: 81-85.