

嗜杀酵母 在酒类酿造中的应用

杜连祥 王昌禄 编著
中国食品出版社



嗜杀酵母在酒类酿造中的应用

杜连祥 王昌禄 编著

中国食品出版社

内 容 简 介

本书主要介绍能杀死野生酵母、防止污染、净化发酵体系的嗜杀酵母的基础知识及应用技术。包括嗜杀酵母及其分泌的嗜杀毒素；酵母菌线状双链RNA嗜杀质粒和线状双链DNA质粒及其嗜杀性状遗传；嗜杀酵母的育种及其在葡萄酒、啤酒、清酒和黄酒等酒类的酿造以及酒精发酵等工业生产中的应用。

本书内容丰富，材料新颖。适合于广大从事微生物育种及从事啤酒、葡萄酒等酒类酿造的科技人员阅读，也可供高等院校微生物、发酵专业师生参考。

嗜杀酵母在酒类酿造中的应用

杜连祥 王昌禄 编著

彭倍勤 责任编辑

*

中国食品出版社出版

(北京广安门外湾子)

新华书店北京发行所发行

河北省新城县印刷厂印刷

*

787×1092 32开本 7.375印张155千字

1989年10月第1版 1989年10月第1次印刷

印数：1—5000册

ISBN 7-80044-240-3/T S · 241

定价：2.80元

前 言

在利用酵母菌进行啤酒、葡萄酒、清酒、黄酒等酒类酿造及酒精发酵生产中，都要采用各种手段抑制或灭杀杂菌，使有用的或人工添加的酵母菌生长繁殖，形成优势或纯种定向发酵。但是，目前我国各厂所采用的发酵方式（自然发酵或人工发酵）还不同程度地受到各种野生酵母或其它微生物的侵染，因而不能达到纯粹发酵的程度。

近年来，酿造工业上的研究课题大都围绕如何高效而经济地酿制出优质产品来进行的。其中利用凝集性酵母的连续发酵和固定化增殖酵母细胞连续发酵最引人注目。但是，在发酵过程中，酵母菌性状稳定性差和发酵系统被污染，常常是影响发酵的主要因素。因此必需选育发酵性能稳定的和具有抗污染能力的酵母菌用于生产。近些年来，人们将具有嗜杀活性的优良酵母应用于间歇或连续发酵，对于防止污染及净化发酵体系收到了明显效果。

所谓嗜杀酵母是指某些酵母菌在其生长繁殖过程中，能向菌体外分泌一种毒蛋白的菌株，这种毒蛋白被称作嗜杀毒素，又称为致死蛋白。嗜杀酵母能杀死同族及亲缘酵母，这种杀死“朋友”的特性为一般抗生物物质所没有，因此成为酵母菌株间相互淘汰的有力武器。不同类型的嗜杀酵母其嗜杀活性亦不同。嗜杀酵母对嗜杀毒素具有免疫力，不同类型的嗜杀酵母对不同类型毒素的免疫力亦不尽相同。为此，嗜杀酵

母可分为11种类型（详见后述）。

根据酵母菌株间相互杀死的现象，酵母菌可分为嗜杀酵母、中性酵母和敏感酵母。自然界中存在的酵母菌绝大部分是敏感酵母，酿造工业上使用的酵母几乎都是敏感酵母。由于酿造工业使用的酵母几乎都是酵母属的酵母菌，因此对酵母属的 K_1 型嗜杀酵母研究得最深入，应用也最广泛。该嗜杀酵母分泌的毒素是分子量约为11500道尔顿的小的单纯蛋白，当用嗜杀毒素处理敏感酵母细胞时，发现敏感细胞内的 K^+ 、ATP等物质向细胞外漏出，细胞内蛋白质等大分子物质的合成停止，于是细胞死亡。由北京市卫生防疫站对 K_1 型嗜杀酵母（TQ嗜杀酵母）的全面毒理学实验证明，该毒素对人畜无害。

在自然界中，野生嗜杀酵母菌株存在很少。尽管如此，在一定条件下，其增殖速度较其它酵母快得多。通常，象葡萄酒、啤酒、清酒、黄酒等酒类的酿造及酒精的生产，多属于开放式发酵，原料不管灭菌或不灭菌，在发酵过程中，被来自环境（如原料、容器、空气等）的各种微生物污染的机会很多。发酵液一旦被野生嗜杀酵母污染，就会在很短时间内，杀死人工添加的或有用的酵母，使酿造失败。因此，野生嗜杀酵母是酿造工业中的有害菌之一。但如果通过育种，诸如多次回交、细胞质导入、核融合缺陷细胞融合、微型原生质体细胞融合、紫外线致死细胞融合等方法，将野生嗜杀酵母决定嗜杀表征的基因转移到优良生产用酵母菌中去，使其获得嗜杀活性，这样的菌株就能象野生嗜杀酵母一样，杀死侵染的野生酵母，从而净化发酵体系，确保发酵正常进行，实现纯种定向发酵。这种优良嗜杀酿酒酵母已广泛用于啤酒

(苏联)、葡萄酒(法国)、清酒(日本)等酒类的酿造中。此外,由于发酵液中含有嗜杀毒素,因此使酿制的成品酒中也含有这种物质,这对防止污染,增加成品酒质量的稳定性具有良好的功能。

嗜杀酵母分泌嗜杀毒素和对毒素免疫的这些表征,是由存在于嗜杀酵母细胞质中的双链 RNA (dsRNA) 质粒支配的,而维持质粒在细胞内的存在、复制、性状表达及调节,又与许多核染色体基因有关。因此,以嗜杀酵母为遗传学研究的材料,对于阐明细胞质遗传规律及细胞质基因和核基因间相互关系,将起着十分重要的作用。

为了使更多从事酿造及工业微生物育种的工作者了解关于嗜杀酵母方面的知识、育种方法及国内外研究现状,我们在整理研究实验资料及收集国外研究成果资料的基础上,编写了本书。

全书分嗜杀酵母、嗜杀毒素、嗜杀质粒、嗜杀性状遗传和嗜杀酵母育种与应用等五部分。较全面地介绍了嗜杀酵母的基本知识、嗜杀酵母的分离鉴定、毒素的定量分析,嗜杀表征与核的关系等,并着重介绍嗜杀酵母育种的原理与方法以及在葡萄酒、啤酒、清酒、酒精等工业生产上的应用实例。

由于编者水平有限,书中一定存在许多缺点和错误,敬请读者给予批评指正。

编 者

目 录

第一章 嗜杀酵母	(1)
一、嗜杀现象	(2)
二、嗜杀酵母的分布	(3)
三、嗜杀酵母的分类	(7)
四、嗜杀酵母对敏感酵母的抑制作用	(11)
五、嗜杀酵母的分离鉴定	(13)
第二章 嗜杀酵母的嗜杀毒素	(16)
一、嗜杀毒素活性的定量分析	(17)
二、嗜杀毒素对各增殖期敏感酵母的致死作用	(19)
三、嗜杀毒素的性质	(20)
1. 热稳定性	(20)
2. pH对嗜杀毒素活性的影响	(20)
3. 搅拌对嗜杀活性的影响	(20)
4. 蛋白酶对嗜杀毒素活性的影响	(22)
四、嗜杀毒素的生成条件	(24)
1. pH的影响	(24)
2. 温度的影响	(24)
3. 培养基中氮素的影响	(26)
第三章 嗜杀质粒	(31)
一、双链 RNA 和病毒粒子	(32)
1. L-dsRNA	(33)

2. M-dsRNA	(35)
3. 类病毒粒子	(36)
二、嗜杀毒素前体物质在酵母菌细胞内的生成与分泌	(40)
三、嗜杀毒素的作用	(48)
四、汉逊氏酵母属的嗜杀酵母	(51)
五、酵母菌线状DNA嗜杀质粒	(54)
1. pGKL 质粒的检出与结构分析	(55)
2. pGKL 质粒与嗜杀现象	(59)
3. pGKL 质粒导入 <i>S. cerevisiae</i> 细胞中	(63)
4. pGKL 质粒在细胞内的分布	(65)
5. pGKL 质粒的机能分析	(66)
第四章 嗜杀酵母嗜杀性状的遗传	(69)
一、细胞质遗传现象	(69)
1. 母体遗传	(70)
2. 接合不分离现象和持续分离	(71)
3. 细胞质基因的特点	(75)
4. 细胞质基因与核基因的关系	(76)
二、嗜杀性状的遗传	(78)
1. 发生在嗜杀质粒上的基因突变	(88)
2. 发生在核染色体上的基因突变	(89)
3. 嗜杀质粒复制模型	(92)
4. 异常 L-dsRNA	(93)
5. 附着在 VLP 粒子上的 RNA 聚合酶	(94)
6. L-dsRNA 质粒是否为嗜杀基因组成员	(94)
第五章 嗜杀酵母的育种	(97)

一、酵母菌育种的一般知识	(97)
1. 酵母菌的生活史	(97)
2. 酵母菌有性杂交	(107)
3. 微生物细胞融合技术	(122)
二、嗜杀酵母育种	(130)
1. 回交法	(132)
2. 细胞质导入法	(134)
3. 微型原生质体细胞融合与核融合缺陷原生质体 细胞融合	(150)
三、嗜杀酵母育种实例	(151)
1. 应用多次回交法选育嗜杀清酒酵母	(151)
2. 嗜杀酵母在葡萄酒酿造上的应用	(162)
3. 嗜杀啤酒酵母的选育与应用	(179)
4. 具有 K_2 型嗜杀质粒的酒精酵母的育种及在酒精 连续发酵中的应用	(189)
5. 利用微型原生质体融合法选育嗜杀中性清酒酵母	(202)
6. 利用紫外线致死原生质体融合法选育嗜杀酵母	(214)

第一章 嗜杀酵母

酵母菌株间有相互杀死的现象。根据这种现象，可将酵母分为嗜杀酵母、中性酵母和敏感酵母三种类型。嗜杀酵母能杀死同族及亲缘酵母，而不被同族酵母杀死；中性酵母既不能杀死其它酵母，也不会被嗜杀酵母杀死；敏感酵母只能被嗜杀酵母杀死。自然界中存在的酵母绝大部分是敏感酵母。酿造工业上使用的酵母几乎全都是敏感酵母（人工选育的除外）。

嗜杀酵母在其生长繁殖过程中，向菌体外分泌嗜杀毒素（亦称致死蛋白）。这种毒素对不同类型的酵母具有不同的嗜杀能力；不同类型的嗜杀酵母所分泌的嗜杀毒素，其嗜杀活性不同。嗜杀酵母对嗜杀毒素具有免疫力。但是，不同类型的嗜杀酵母对不同类型嗜杀酵母所分泌的嗜杀毒素的免疫力亦不尽相同。为此将嗜杀酵母分为11种（ $K_1 \sim K_{11}$ ）类型。

由于酿造工业中使用的酵母，绝大部分是酵母属酵母。因此，到目前为止，人们对酵母属的嗜杀酵母（如 K_1 型嗜杀酵母）研究最深入，应用也最广泛。为此，我们将在下面着重介绍 K_1 型嗜杀酵母的特性、遗传学知识以及它在酿造工业上的应用等方面。

一、嗜杀现象

自然界中，不同生物间的相互杀死现象是经常发生的，通过这种生存的竞争借以维持生物种属的特征。即使在同种生物间也是如此。因此说自然界中生物现象是复杂的。同种生物间相互杀死现象，在微生物中最典型的例子，就是人们早已知道的大肠杆菌素生成菌和产生细菌素的细菌。在高等植物玉米黑粉病菌 (*Ustilago maydis*) 中也存在着这种作用。总之，不论是在低等生物，还是在高等生物间都广泛存在着嗜杀现象。

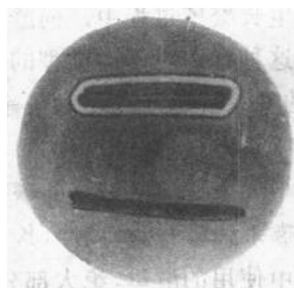


图 1-1 嗜杀现象

在含有美兰的pH4.7的营养培养基平板上，涂布 $10^5 \sim 10^6$ 个敏感株细胞，在其上接入嗜杀酵母，于25℃培养2天后，观察到在嗜杀株菌落周围形成抑菌带（对敏感株）。

酵母菌株间的相互杀死现象，是1963年Bevan和Makower等人^[1]在混合培养研究室保存啤酒酵母菌(*Saccharom-*

yces cerevisiae)时发现的。他们将产生毒素并能杀死同族及亲缘酵母的菌株命名为嗜杀酵母(图1-1), 将被嗜杀酵母杀死的菌株称作敏感酵母, 同时将既不能杀死别的酵母, 也不能被嗜杀酵母杀死的菌株称为中性酵母。

这种酵母相继在清酒、葡萄酒、啤酒等酿造酵母中及其相应的发酵醪中发现, 并分离得到。最近, 在酵母属之外的许多酵母中也发现了嗜杀酵母。

二、嗜杀酵母的分布

1963年Bevan、Makower等人在啤酒酵母中发现了嗜杀酵母之后, 相继报道了在啤酒^[2]、葡萄酒^[3]、清酒^[4]的酿造中也存在嗜杀酵母。

今村武司^[5]调查了数年间从清酒酿造用曲、发酵醪中分离的野生酵母和日本全国保藏的清酒酵母中嗜杀酵母的比例, 在1964~1972年间分离得到的112株野生酵母中, 发现嗜杀酵母7株(来源于曲子中1株、原料米的蒸煮醪中3株、发酵醪中3株), 占总菌株数的6%。据日本国税厅酿造试验所大内弘造博士^[6]报道, 到1965年度分离保存的410株清酒酵母菌株中, 嗜杀酵母为72株, 占总菌株数的17.6%(表1-1)。此外, 因地域不同, 嗜杀酵母的分布比率也不同, 有的地区高达35%。

最近, Philliskirk^[7,8]调查了国家酵母菌种收藏中心(National Collection of Yeast Cultures, 以下简称NCYC)保藏的28属148种964株酵母中嗜杀酵母的分布。发现除酵母属外, 在汉逊氏酵母属(*Hansenula*)、克鲁维酵

表 1-1 保存的清酒酵母菌株中嗜杀酵母、
中性酵母、敏感酵母的分布

分离者及保藏地点	菌 株 数			供试菌 株总数
	嗜 杀 株	中 性 株	敏 感 株	
日本酿造协会 (全国)	11 (7.0%)	5 (3.2%)	141 (89.8%)	157
斋藤富男 (东北地区)	A 群 24 (38.1%)	0	39 (61.9%)	63
	B 群 22 (21.7%)	2 (2.2%)	65 (73.0%)	89
	C 群 0	0	19 (100%)	19
	D 群 0	0	2 (100%)	2
国税厅酿造试验所 (全国)	4 (14.3%)	1 (3.6%)	23 (82.1%)	28
菅野信男 (四国)	7 (35.0%)	0	13 (65.0%)	20
小玉健吉 (从秋田、 千叶的米曲中分离)	4 (14.8%)	0	23 (85.2%)	27
其 它	0	0	5 (100%)	5
合 计	72 (17.6%)	8 (2.0%)	330 (80.5%)	410

母属 (*Kluyveromyces*)、假丝酵母属 (*Candida*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 等属酵母菌株中也存在着一定比例的嗜杀酵母。特别是汉逊氏酵母属中, 嗜杀酵母检出频度高达 41.3% (表 1-2)。

表 1-2 NCYC 保藏的酵母菌株中
嗜杀酵母的分布

分 类	属数	属 名	种数	菌株数	嗜杀株数
黑粉菌目 (<i>Ustilaginales</i>)	1	白冬孢酵母属 (<i>Leucosporidium</i>)	1	1	0
掷孢酵母科 (<i>Sporobolomyceta-</i> <i>ceae</i>)	2	布勒酵母属 (<i>Bullera</i>)	1	1	0
		掷孢酵母属 (<i>Sporobolomyces</i>)	5	6	0
子囊菌纲酵母 (<i>Ascomycetous</i> <i>Yeasts</i>)	17	固囊酵母属 (<i>Citeromyces</i>)	1	1	0
	✓	德巴利酵母属 (<i>Debaryomyces</i>)	5	11	1
		拟内孢霉属 (<i>Endomycopsis</i>)	6	8	0
		有孢汉逊酵母属 (<i>Hanseniaspora</i>)	1	1	0
	✓	汉逊酵母属 (<i>Hansenula</i>)	11	29	12
	✓	克鲁维酵母属 (<i>Kluyveromyces</i>)	9	20	3
		油脂酵母属 (<i>Lipomyces</i>)	2	3	0
		梅奇酵母属 (<i>Metschnikowia</i>)	1	3	0

续表

分 类	属数	属 名	种数	菌株数	嗜杀株数
		拿逊酵母属 (<i>Nadsonia</i>)	2	2	0
		针孢酵母属 (<i>Nematospora</i>)	1	1	0
		管囊酵母属 (<i>Pachysolen</i>)	1	1	0
		毕赤酵母属 ✓ (<i>Pichia</i>)	14	34	1
		酵母属 ✓ (<i>Saccharomyces</i>)	21	678	38
		类酵母属 (<i>Saccharomycodes</i>)	1	7	0
		裂殖酵母属 (<i>Schizosaccharomyces</i>)	4	7	0
		许旺酵母属 (<i>Schwanniomyces</i>)	1	1	0
		温酵母属 (<i>Wingea</i>)	1	1	0
无孢酵母 (<i>Asporogenous</i> Yeasts)	8	酒香酵母属 (<i>Brettanomyces</i>)	4	7	0
		✓ 假丝酵母属 (<i>Candida</i>)	17	51	2
		隐球酵母属 (<i>Cryptococcus</i>)	8	13	0
		克勒克酵母属 (<i>Kloeckera</i>)	3	11	0
		红酵母属 (<i>Rhodotorula</i>)	7	29	0
		✓ 球拟酵母属 (<i>Torulopsis</i>)	16	32	2
		丝孢酵母属 (<i>Trichosporon</i>)	3	4	0
		三角酵母属 (<i>Trigonopsis</i>)	1	1	0
合 计	28		148	964	59

此外, Philliskirk 还认为, 具有嗜杀活性的酵母广泛存在于实验室保存的啤酒酵母、葡萄酒酵母以及用于其它酿造上的酵母菌株之中, 在面包、糕点的污染菌中也发现了嗜杀酵母。

笔者所在的研究组在几十种样品中, 仅从自然发酵的葡萄酒醪及水果表面分离到嗜杀酵母, 而在人工发酵如啤酒发酵醪等样品中, 未分离到嗜杀酵母。在实验室保存的各类酵母中, 仅从酵母属菌株中, 分离到 3 株嗜杀酵母, 占检测的总菌株数的 5.8%。

三、嗜杀酵母的分类

嗜杀酵母在其生长繁殖过程中, 向菌体外分泌嗜杀毒素(致死蛋白)。这种致死蛋白是由存在于嗜杀酵母细胞质中的线状双链 RNA (dsRNA) 的遗传信息决定的。嗜杀毒素对不同类型的酵母具有不同的嗜杀能力; 不同类型的嗜杀酵母所分泌的嗜杀毒素, 其嗜杀活性也不同。嗜杀酵母对嗜杀毒素具有免疫力。但是, 不同类型的嗜杀酵母对不同类型嗜杀酵母所分泌的毒素免疫力也不尽相同。为此, Roger^[9]、Young^[10]、Wickner^[11]等人根据酵母菌间相互杀死作用及免疫力, 将嗜杀酵母分为 11 种 ($K_1 \sim K_{11}$) 类型 (表 1-3)。从表中可知, 嗜杀酵母对不同类型的嗜杀酵母的嗜杀活性非常狭窄, 即使对敏感酵母的嗜杀作用也是如此, 这是嗜杀酵母致死作用的特性之一。

原昌道博士^[12]调查了各种不同类型嗜杀酵母对各种敏感性酵母的嗜杀作用, 其结果如表 1-4 所示。表中的数值表示

表 1-3 嗜杀酵母的分类

嗜杀酵母类型	菌 株	被杀死的嗜杀酵母类型
K ₁	葡萄汁酵母 (<i>S. uvarum</i> NCYC 190) 酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> A 8209 13) 酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> NCYC 232) 酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> NCYC 236, 啤酒) 酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> KL 88, 清酒) 某种酵母 (<i>S. hybrids</i> NCYC 631) 某种酵母 (<i>S. hybrids</i> NCYC 663)	K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₁₁
K ₂	酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738) 酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1001, 啤酒) 糖化酵母 (<i>S. diastolicus</i> NCYC 713, 啤酒) 酿酒酵母 (<i>S. cerevisiae</i> M 437, 葡萄酒)	K ₁ , K ₄
K ₃	好望角酵母 (<i>S. capensis</i> NCYC 761)	K ₁ , K ₄ , K ₁₁
K ₄	光滑球拟酵母 (<i>T. glabrata</i> NCYC 388)	K ₁
K ₅	某种酵母 (<i>D. vanriji</i> NCYC 577) 异常汉逊酵母 (<i>H. anomala</i> NCYC 434) 亚膜汉逊酵母 (<i>H. subpelliculosa</i> NCYC 16)	K ₁ , K ₃ , K ₄ , K ₁₁
K ₆	脆壁克鲁维酵母 (<i>K. fragilis</i> NCYC 587)	K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₁₁
K ₇	粗状假丝酵母 (<i>C. valida</i> NCYC 327) 膜膜半赤酵母 (<i>P. membranaefaciens</i> 333)	K ₁ , K ₃ , K ₄ , K ₆ , K ₁₁
K ₈	异常汉逊酵母 (<i>H. anomala</i> NCYC 435)	K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₆ , K ₁₁
K ₉	姆拉克汉逊酵母 (<i>H. mrakii</i> NCYC 500)	K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₅ , K ₆ , K ₁₁
K ₁₀	果蝇克鲁维酵母 (<i>K. drosophilae</i> NCYC 575)	K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₅ , K ₆ , K ₇ , K ₈ , K ₁₁
K ₁₁	光滑球拟酵母 (<i>T. glabrata</i> ATCC 15126)	K ₁ , K ₂ , K ₁₀