

低嘌呤酿酒酵母的 ARTP 法诱变育种

康富帅, 颜兵, 吕南拳, 周世水

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 采用常压室等离子体 (ARTP) 诱变育种系统对酿酒酵母菌株 A、B 分别进行诱变, 选育诱变菌株发酵的啤酒用高效液相色谱 (HPLC) 法测定腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤的含量, 4 种嘌呤在 1~16 mg/L 的测定范围内, 相关系数 $R^2 > 0.999$, 具有良好的线性关系。实验结果表明: 诱变酵母菌株 A-3 发酵啤酒中嘌呤含量为 77.67 mg/L, 比初始菌株 A 的 101.64 mg/L 降低 23.6%; 诱变酵母菌株 B-4 发酵啤酒中嘌呤含量为 76.26 mg/L, 比初始菌株 A 的 96.84 mg/L 降低 21.3%。诱变菌株 A-3、B-4 进行连续传代 10 次并进行发酵啤酒实验, 诱变菌株 A-3、B-4 的发酵性能、发酵啤酒中总嘌呤含量和啤酒品质保持稳定。这表明 ARTP 诱变方法选育低嘌呤酿酒酵母菌种是可行的。

关键词: 酿酒酵母; ARTP 育种; 嘌呤

文章编号: 1673-9078(2014)2-188-191

Mutation Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with Low Purine by Atmospheric and Room Temperature Plasma

KANG Fu-shuai, YAN Bing, LV Nan-quan, ZHOU Shi-shui

(School of Bioscience and Bioengineering, South China university of technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* strain A and B were mutated by using atmospheric and room temperature plasma (ARTP). The contents of adenine, guanine, xanthine and hypoxanthine in beer fermented by the above mutation strains were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Within the range of 1~16 mg/L the above four kinds of purine had good linear relation with a correlation coefficient of $R^2 > 0.999$. The experimental results showed that the purine contents in the beer fermented by mutation strain A-3 and B-4 were 77.67 mg/L and 76.26 mg/L, respectively, being decreased 23.6% and 21.3% compared with the beer fermented by the original strain A (101.64 mg/L) and B (96.84 mg/L). The mutation strain A-3 and B-4 were continuously passed for 10 times and were used for beer fermentation. The fermentation ability, the purine contents in beer and the beer quality were all remained stable. It is showed that ARTP is feasible for mutating and screening low purine strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; atmospheric and room temperature plasma breeding; purine

啤酒是以麦芽为主要原料经酵母发酵生成, 麦芽在糖化过程中将核酸酶解成核苷酸和核苷, 其中生成的少量游离嘌呤经核酸降解的产物统称为嘌呤类物质, 再经人体代谢生成尿酸, 对于尿酸代谢失调就会引起疾病-痛风。虽然啤酒中嘌呤含量只有 20~100 mg/L, 不是很高, 但是啤酒中含有的游离类嘌呤更容易吸收和快速生成尿酸, 以及啤酒中较高含量的鸟苷酸也可代谢成嘌呤, 从而容易引发痛风。已经有报道低嘌呤啤酒研究的文章和专利^[1,2], 但是市面上却见不到低嘌呤啤酒。原因是这些技术酿造的啤酒都是通过添加糖浆、淀粉、大米等辅料的用量来减少含嘌呤

高的麦芽用量, 特别通过人造沸石、壳聚糖、活性炭等吸附剂去除啤酒中嘌呤方法来获得低嘌呤啤酒, 但是无论减少麦芽用量还是吸附法都会导致啤酒中有益成分的减少, 这必然导致啤酒的口感淡薄、口味差, 无法让消费者认可。而本研究创造性的采取在不改变啤酒酿造工艺基础上, 仅从酿酒酵母菌种入手, 即通过诱变选育能够快速代谢利用麦汁中嘌呤和减少酵母自溶出嘌呤的低嘌呤酵母, 直接酿造出低嘌呤啤酒。这样就酿造出保持了啤酒纯正香味、口感的传统啤酒。目前, 我国约有 7500 万人的痛风患者, 这一特殊人群也有不少想饮用啤酒的人, 如果能够开发出痛风患者可适量饮用的低嘌呤纯正口味啤酒, 这将能满足此部分人群的需要, 从而扩大啤酒的消费市场和丰富啤酒品种的种类。

本研究是采用一种高效率的传统育种方式,

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400496)

作者简介: 康富帅(1988-), 男, 硕士生, 研究方向: 酿酒酵母改良

通讯作者: 周世水(1971-), 男, 博士, 副教授, 发酵工程与酿酒

ARTP 法诱变选育啤酒酵母, 以获得与正常发酵啤酒品质相同的低嘌呤啤酒, 即诱变选育的酿酒酵母能够更快地吸收、代谢麦汁中嘌呤类物质, 并能够减少酵母自溶释放到啤酒中嘌呤的诱变菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种

酿酒酵母 A 株和 B 株(华南理工大学酿酒研究室选育保藏)。

1.1.2 培养基

1) YPED 完全培养基: 酵母粉 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L。2) 限量营养培养基: 葡萄糖 20 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、硫酸铵 0.5 g/L、蛋白胨 0.1 g/L、琼脂 20 g/L。3) 麦汁: 广州麦芽有限公司的麦芽水解制成。

1.1.3 嘌呤标准品

腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤(sigma, 纯度>99%)。

1.1.4 仪器

Waters2487 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Agilent TC-C18, 4.6×250 mm, 5 μm, 北京艾德豪克国际技术有限公司 ARTP-2 仪, 752 型紫外可见分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 ARTP 诱变方法

取保藏菌种活化后接种到麦汁中, 25 °C 培养至 OD_{600nm}=1, 取菌液进行 0 s、30 s、60 s、90 s、120 s 的 ARTP 法诱变, 用生理盐水适当稀释后涂布于 YPED 平板, 28 °C 培养 24 h。

1.2.2 诱变选育菌种

培养活化的菌液经 ARTP 诱变 60 s, 培养到 YPED 培养基平板上, 挑取生长良好的菌落到限量营养培养基, 选取能在 YPED 培养基上正常生长而在限量营养培养基上不能生长或缓慢生长的菌株为阳性菌株。该类阳性菌株为嘌呤缺陷型菌株或嘌呤渗漏缺陷型菌株, 即菌株自身无法合成嘌呤或只能微量合成嘌呤导致菌株在嘌呤限量的营养培养基上不能生长或缓慢生长, 利用该阳性菌株发酵会代谢消耗麦汁中嘌呤而得到低嘌呤啤酒。

1.2.3 发酵试验

诱变菌株液体活化后, 接种到 12°P 麦汁, 接种浓度 2×10⁷ 个/mL, 12 °C 发酵 7 d。

1.2.4 样品硫酸处理方法

将发酵啤酒的上清液经 0.22 μm 膜过滤和超声波除气后, 取 2 mL 加入到含 2 mL 3 mol/L 硫酸的 25 mL 具塞试管中, 沸水浴 10 min, 冰浴冷却后, 用 10 mol/L 氢氧化钾调 pH 到 7, 蒸馏水定容至 10 mL, 再用 0.22 μm 膜过滤后待测。

1.2.5 高效液相色谱(HPLC)检测方法^[3-4]

色谱条件: Agilent TC-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 5% vol 甲醇的 0.02 mol/L 磷酸二氢钾(pH4.0), 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

1.2.6 嘌呤标准曲线

分别将腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤的 1g/L 标准品母液配制成 5 组嘌呤混合液, 混合液中 4 种嘌呤的浓度分别为 1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L、16 mg/L, HPLC 测定后, 根据嘌呤测定峰面积与对应嘌呤的浓度, 运用最小二乘法求出 4 种嘌呤的 HPLC 测定标准曲线方程。

2 结果与讨论

2.1 ARTP 诱变时间

按 1.2.1 方法对酿酒酵母进行 ARTP 法诱变, 根据菌种致死率确定最适诱变时间, 结果如图 1。

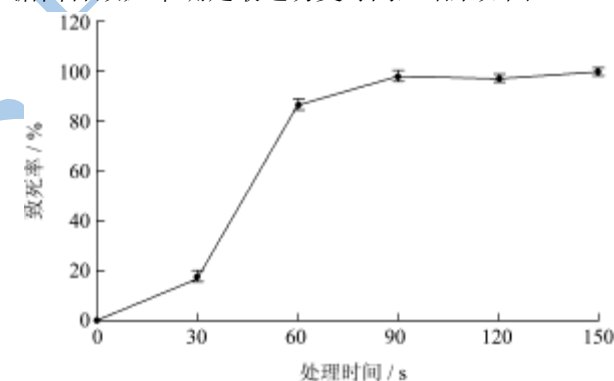


图 1 诱变致死率曲线

Fig.1 The curve of mutation fatality rate

从图 1 可知, ARTP 法诱变酿酒酵母的最适时间是 60 s, 此时酿酒酵母的致死率达到 86% 以上, 即 ARTP 法产生出的高活性离子引起酿酒酵母基因足够的突变, 并有一定数量的存活菌体, 从而实现 ARTP 法高效诱变酿酒酵母。

2.2 4 种嘌呤 HPLC 测定的标准线性方程

混合标样中腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤出峰时间、峰面积与浓度的 HPLC 测定图谱, 如图 2。啤酒样品中腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤的 HPLC 测定结果, 如图 3。

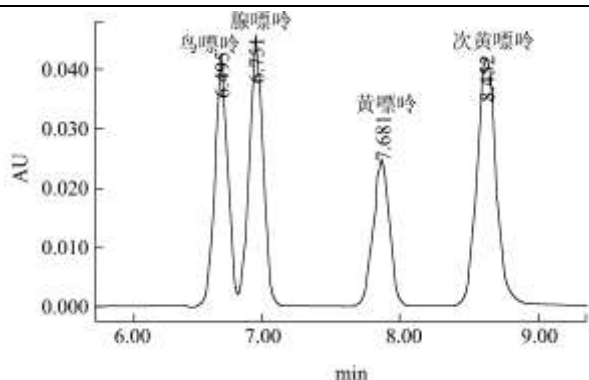


图2 4种嘌呤混合标样 HPLC 测定图谱

Fig.2 HPLC spectra of four kinds of purine mix

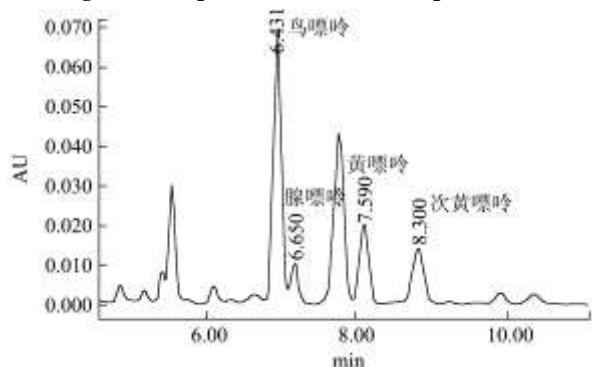


图3 啤酒中4种嘌呤 HPLC 测定图谱

Fig.3 HPLC spectra of four kinds of purine in beer

按照 1.2.5 方法配制成 5 个浓度的 4 种嘌呤混合标样进行 HPLC 测定, 根据测定嘌呤的峰面积与嘌呤浓度对应关系的标准曲线, 采用最小二乘法求出 4 种嘌呤 HPLC 测定的线性方程, 如表 1。同时对样品进行连续 10 次测定, 用相对标准偏差 (RSD) 来确定 HPLC 测定的精密度, 结果如表 1。

表 1 4 种嘌呤 HPLC 测定的标准线性方程及 RSD

Table 1 Standard linear equation and RSD of four kinds of purines by HPLC test

嘌呤种类	标准线性方程	相关系数 R ²	RSD /%
鸟嘌呤	Y=37546X-5140	0.9994	1.28
腺嘌呤	Y=41456X-5288	0.9994	1.38
黄嘌呤	Y=26547X-4630	0.9995	1.17
次黄嘌呤	Y=50537X-13298	0.9992	1.14

从表 1 可知, HPLC 检测 4 种嘌呤标准品的线性范围在 1~16 mg/L 内, 求出检测的线性回归方程, 其相关系数 R²>0.999, 这说明 HPLC 检测嘌呤的峰面积与嘌呤浓度具有良好的线性关系。而 HPLC 检测 4 种嘌呤的相对标准偏差 RSD<1.38%, 这表明该方法检测嘌呤的精度高、测定结果可靠。

2.3 加标回收率的测定

取一个已知 4 种嘌呤含量的啤酒样品, 加入不同浓度的已知 4 种嘌呤混合标样, 制备成 3 个不同 4 种嘌呤浓度的啤酒混合标液进行 HPLC 测定, 求回收率的平均值, 实验结果如表 2。

表 2 加标回收率实验

Table 2 Experiment of the recovery of standard addition

嘌呤种类	本底值 / (mg/L)	加标样 / (mg/L)	测定值 / (mg/L)	回收率 / %	回收率平均值 / %
腺嘌呤		1.0	6.44	106.2	
	5.38	4.0	9.29	97.8	100.8
		8.0	13.25	98.4	
鸟嘌呤		1.0	1.82	103.1	
	0.79	4.0	4.56	94.4	99.4
		8.0	8.80	100.7	
黄嘌呤		1.0	3.70	105.3	
	2.65	4.0	6.61	99.0	101.7
		8.0	10.70	100.7	
次黄嘌呤		1.0	2.21	99.9	
	1.21	4.0	5.14	100.3	99.3
		8.0	9.18	99.7	

从表 2 可知, 4 种嘌呤的加标回收率在 94.4~105.3% 之间, 4 种嘌呤加标回收率均值 99.7%, 这说明啤酒样品中的嘌呤经硫酸水解处理, 嘌呤加标回收率高, 啤酒中总嘌呤的回收检测准确可信。

2.4 低嘌呤酵母诱变菌种的选育

表 3 诱变菌株发酵啤酒中嘌呤含量测定结果

Table 3 Test result of purine in beer fermented by mutation

菌株	黄嘌呤 / (mg/L)	腺嘌呤 / (mg/L)	鸟嘌呤 / (mg/L)	次黄嘌呤 / (mg/L)	总嘌呤 / (mg/L)
初始菌株 A	12.15	42.15	12.54	34.80	101.64
诱变菌株 A-3	8.19	30.48	9.54	29.46	77.67
诱变菌株 A-4	12.18	40.98	10.83	32.91	96.90
诱变菌株 A-6	9.42	35.40	10.98	32.46	88.26
初始菌株 B	12.88	39.30	10.67	33.99	96.84
诱变菌株 B-4	9.60	31.17	9.63	25.86	76.26
诱变菌株 B-6	12.66	38.49	11.16	27.48	89.79
诱变菌株 B-7	12.42	39.03	11.19	30.09	92.73

以酿酒酵母菌株 A、B 为起始菌株, 按 1.2.2 法诱变选育菌种, 再按 1.2.3 法挑选诱变阳性菌落进行发酵, 确定低嘌呤啤酒及其对应的发酵菌株, 即筛选出快速代谢消耗嘌呤且自溶释放出嘌呤少的菌株。从多株阳性菌株发酵结果中各筛选出 3 个典型菌株的发酵低嘌呤啤酒 3 次, 测定啤酒中嘌呤含量的均值, 数据

的相对标准偏差 $RSD \leq 1.1\%$, 结果如表 3。

从表 3 可知, 诱变选育的菌株 A-3 比初始菌株 A 发酵啤酒中总嘌呤含量的 101.64 mg/L 降低到 77.67 mg/L, 降低 23.6%。诱变选育的菌株 B-4 比初始菌株 B 发酵啤酒中总嘌呤含量的 96.84 mg/L 降低到 76.26 mg/L, 降低 21.3%。可见, 采用 ARTP 法能够有效诱变选育出低嘌呤酵母菌种, 其中诱变菌株 B-4 发酵啤酒中总嘌呤的含量最低为 76.26 mg/L。

2.5 低嘌呤诱变菌种的稳定性实验

为确定诱变菌株的遗传稳定性, 对结果最好的诱变菌株 A-3、B-4 进行连续 10 代的传代发酵实验, 实验结果如图 4。

从图 4 可知, 诱变菌株 A-3、B-4 经连续传代后, 各代菌株发酵啤酒中总嘌呤的含量基本稳定, 保持在 80mg/L 左右的水平, 没有菌株恢复突变导致的嘌呤含量提高。可见, ARTP 诱变技术选育低嘌呤酿酒酵母菌种是可行的, 即选育菌株的诱变效果显著且遗传稳

定。

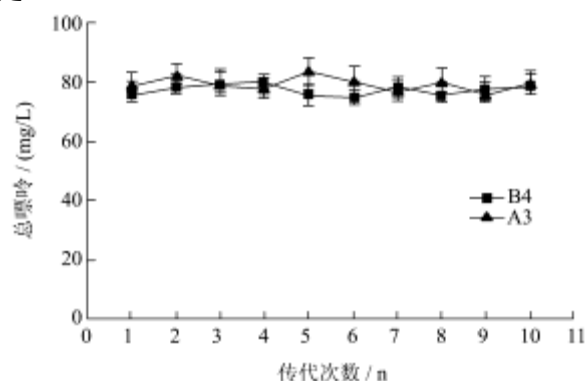


图 4 诱变菌株传代发酵实验

Fig.4 Fermentation experiment of generations of mutation strain

2.6 品鉴诱变菌株 B-4 发酵啤酒

对初始菌株 B、诱变菌株 B-4 进行 11 °P 麦汁的 12 °C 啤酒发酵, 3 组啤酒检测的平均数据 ($RSD \leq 0.9\%$) 和 10 人感官品评描述结果, 如表 4。

表 4 啤酒发酵实验结果

Table 4 Experiment result of beer fermentation

啤酒样品	酒精度 / % vol	pH	总酸 /(g/L)	双乙酰 /(mg/L)	泡持性 /s	色泽 /EBC	香气口感品评
菌株 B 发酵啤酒	4.35	4.18	2.20	0.25	205	5.1	保持并达到了成品啤酒特征香气和纯正口感
菌株 B-4 发酵啤酒	4.33	4.20	2.15	0.25	203	5.1	具有与菌株 B 发酵啤酒一样的特征香气口感

从表 4 可知, 诱变菌株 B-4 与初始菌株 B 的发酵性能、发酵啤酒中各项成分数据、啤酒香气口感等特征基本一致, 这表明 ARTP 诱变技术应用到酿酒酵母菌种的诱变改良是可行的。

3 结论

通过对 2 株酿酒酵母进行 ARTP 法诱变育种, 对诱变菌株发酵啤酒中的腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤、次黄嘌呤进行 HPLC 检测, 确定诱变菌株与初始菌株在发酵性能、发酵啤酒的品质保持不变情况下, 选育出的低嘌呤酿酒酵母菌株 B-4, 其发酵啤酒中的总嘌呤含量最低降到 76.26 mg/L, 诱变菌株 A-3 比初始菌株 A 发酵啤酒中的总嘌呤含量降低幅度达到 23.6%。对诱变菌株 B-4、A-3 进行 10 次传代表明诱变菌株的遗传性能稳定, 这说明 ARTP 诱变选育酵母菌种是可行的、有效的。

参考文献

[1] 吕吉鸿,潘国恒.酿造低嘌呤啤酒的原料选择和处理[J].酿

酒科技,2010,11:16-17

LV Ji-hong, PAN Guo-heng. Brewing Low Purine Beer of Selecting and Handling Material [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2010, 11: 16-17

[2] CHEN Ren-dao, WEN Qiu-yan, XU Fang-hua, et al. Method of Reducing the Purine Content of an Edible Material. United States, US8460724 [P]. 2011/4/21, <http://osweb.firdi.org.tw/tsc/InfoPB.asp?ID=565>

[3] Kaneko K, Yamanobe T, Fujimori S. Determination of Purine Contents of Alcoholic Beverages Using High Performance Liquid Chromatography [J]. Biomedical Chromatography, 2009, 23: 858-86

[4] 夏小乐,夏梅芳,杨海麟,等.LC-MSMS 法分析清爽型黄酒中的嘌呤含量[J].现代食品科技,2010,29(12):1399-1402

XIA Xiao-le, XIA Mei-fang, YANG Hai-lin, et al. LC-MSMS Analysis of Purine Content in Light Chinese Rice Wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(12): 1399-1402