

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C12N 1/18

A21D 8/04 C12P 7/06



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95191170.8

[43]公开日 1997年1月15日

[11] 公开号 CN 1140469A

[22]申请日 95.11.7

[30]优先权

[32]94.11.8 [33]US[31]08/335,685

[32]95.5.8 [33]US[31]08/436,979

[86]国际申请 PCT/US95/14471 95.11.7

[87]国际公布 WO96/15221 英 96.5.23

[85]进入国家阶段日期 96.7.8

[71]申请人 皮尔斯博瑞公司

地址 美国明尼苏达州

[72]发明人 戴维·J·多明哥斯

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公  
司

代理人 王达佐

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 降解代谢产物无阻遏底物限制性酵母菌株

[57]摘要

本发明包括一种在有葡萄糖时只利用半乳糖作为唯一糖源的酵母细胞。

# 权 利 要 求 书

1. 一种为酵母菌属啤酒酵母种的酵母细胞，在有葡萄糖存在时只能利用半乳糖作为一种糖源。
- 5      2. 如权利要求 1 的酵母细胞，其中酵母细胞是二倍体。
3. 如权利要求 1 的酵母细胞，能在含有至少约 6 % 重量比的乙醇浓度的混合物中生长。
4. 如权利要求 1 的酵母细胞和还包括具有该酵母细胞所需营养的基质，该酵母细胞散布在此基质中。
- 10      5. 如权利要求 4 的酵母细胞，其中基质是面包生面团，且该酵母发酵并醒发该面包生面团。
6. 如权利要求 5 的酵母细胞，其中该酵母醒发此生面团的时间大约是由常规的半乳糖底物限制性酵母制作的面包生面团的时间的一半。
7. 如权利要求 4 的酵母细胞，其中基质是乳清。
- 15      8. 如权利要求 7 的酵母细胞，其中基质还包括能利用葡萄糖作为糖源的酵母细胞。
9. 如权利要求 1 的酵母细胞，其中该酵母细胞基本上丧失了蛋白酶 A，B 和羧肽酶 Y 的酶活性。
10. 如权利要求 1 的酵母细胞，而且还能利用水解的乳糖作为一种唯一的碳源。
- 20      11. 如权利要求 1 的酵母细胞，且具有当温度低于约摄氏 10 度时就停止生长的生长能力。
12. 一种啤酒酵母属的酵母细胞，能在含至少 6 % 重量比的乙醇浓度的混合物中生长。
- 25      13. 一种啤酒酵母属的酵母细胞，基本上不具有蛋白酶 A、蛋白酶 B 和羧肽酶 Y 的活性。
14. 如权利要求 12 的酵母细胞，其中混合物是面包生面团。
15. 如权利要求 11 的酵母细胞，而且包括面包生面团，其中酵母细胞是散布的。
- 30      16. 一种将乳清转化为葡萄糖和乙醇的方法，包括：  
        提供一种啤酒酵母属的酵母细胞，在有葡萄糖时只能利用半乳糖作为糖源；  
        将该酵母细胞散布于乳清中；  
        提取出由该酵母细胞在乳清中作用所产生的葡萄糖和乙醇。
17. 一种将乳清转化为乙醇的方法，包括：  
35      提供一种只能利用半乳糖作为糖源的啤酒酵母属的酵母细胞，和一种常规面包

酵母细胞;

将酵母细胞散布于乳清中; 和

提取出由酵母细胞在乳清中作用所产生的乙醇。

1 8. 一种减少面包生面团的醒发时间的方法, 包括:

- 5 提供一种啤酒酵母属, 在有葡萄糖时能利用半乳糖作为唯一糖源, 而且能在含有至少约 6%重量比的乙醇浓度的混合物中生长的酵母细胞;

将这种酵母散布于生面团基质中; 和

将有该酵母的生面团转移到生面团在其中醒发的容器中。

# 说明书

## 降解代谢产物无阻遏底物限制性酵母菌株

5 本申请是1993年10月27日申请而未审查的美国申请号08/144, 236的部分续申请, 而08/144, 236申请又是07/829, 453提出待审的美国申请号07/829, 453申请的部分续申请。本申请也是1993年7月2日申请而未审查的美国申请号08/087, 616的部分续申请, 此08/087, 616申请又是未审查的美国申请号08/026, 927的部分  
10 续申请。07/829, 453和08/026, 977两个申请均是美国申请号07/732, 081的部分续申请, 现已被放弃。

### 本发明的背景技术

本发明涉及一种酵母细胞, 它在葡萄糖存在的情况下只利用半乳糖作为糖源。

15 常规的酵母细胞具有能使所述酵母细胞代谢各种糖类的活性酶类。这些糖类包括葡萄糖, 麦芽糖和半乳糖。对酶活性的调节建立在酶活性的选择性激活和抑制基础上进行。当酵母细胞在一种以葡萄糖为其糖源的培养基中生长时, 那些辅助代谢除了葡萄糖外的其它糖类的酶的活性都受到抑制。

酶活性的抑制是通过两种机制中的一种而发生的。第一种机制是, 葡萄糖灭活  
20 作用经修饰和/或降解蛋白质很快地抑制了某些酶类和另一些蛋白质的功能。第二种机制是, 葡萄糖阻遏作用, 在转录水平上减少了许多产生酶和调节酶活性的基因的表达。

酵母细胞中的葡萄糖阻遏作用与大肠杆菌中称为“降解代谢产物阻遏作用”的  
25 代谢过程很相似。“降解代谢产物阻遏作用”这个术语反映了一种信念, 即对基因转录的阻遏不是由葡萄糖本身所引起的, 而是由葡萄糖的降解代谢产物引起的, 就象由B. Magasianic在“降解代谢产物阻遏” in Cold Spring Harbor Symp, Quant. Biol. 26: 249 (1962)中所描述的那样。在本申请中, “葡萄糖阻遏”一词与“降解代谢产物阻遏”一词是交替使用的。

30 大量的酵母细胞基因的表达是受葡萄糖阻遏作用支配的。但葡萄糖阻遏作用的程度在基因与基因之间变化很大。例如, 有关半乳糖利用的基因, 即半乳糖基因(GAL基因), 它的表达所受的阻遏至少1000倍于葡萄糖的。有关麦芽糖代谢的基因, 麦芽糖基因, 它的表达所受到的阻遏15倍于葡萄糖, 就如M. Johnston等人描述的The Molecular and Cellular  
35 Biology of the yeast Saccharomyces(1

992) at 226.

葡萄糖在GAL基因的表达上表现出两种影响。第一种影响是，将葡萄糖加入以半乳糖为基本底物的培养基，会导致在这种富集半乳糖的培养基上长出的酵母培养物表现出对GAL基因表达的几乎是完全但又是暂时性的阻遏。第二方面影响是，GAL酶的合成在此之后又以一种减低了的速率重新开始，就如Adams在一篇文章中所讲的那样。“Identification of glucokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics of induction and glucose effects,” *J. Bacteriol* III: 308 (1972)

由于葡萄糖的阻遏作用，在同一批培养中常规酵母培养物在葡萄糖中的生长分三个时期，正如E. Jones等人所描述于 *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (1992)。在第一生长期或快速生长期内，葡萄糖在发酵的同时还抑制基因表达。仅在葡萄糖在快耗尽之前，培养又进入第二个生长期，受葡萄糖抑制的基因去抑制，使培养物适应随后的对在利用葡萄糖期间积累的乙醇代谢产物的氧化作用。某些酶的合成的去抑制作用远在葡萄糖耗尽之前便已开始，并在乙醇生长中达到最高水平。生长的第三阶段或称最后时期是缓慢生长的时期，它止于有效乙醇被用尽之时。

通常由于酵母菌株都有很强的适应性和多面性，要预测某一特殊酵母菌株暴露在一种完全营养基质中时的行为是很困难的。一方面，某酵母株可能偏好一种如半乳糖的糖类，但当这种酵母菌株置于含有高浓度的葡萄糖的基质中时，其对半乳糖的偏爱会逐渐被削弱。培养基中只含有葡萄糖将倾向于抑制半乳糖的代谢。这种酵母菌株有可能拒绝利用任何糖类。另一方面，此酵母菌株也可能转向葡萄糖代谢。

### 本发明概要

本发明涉及酵母菌属啤酒酵母种的酵母细胞，这种啤酒酵母菌能在有葡萄糖存在时只利用半乳糖作为它的糖源。本发明也涉及能耐受浓度至少在营养基质中为6%重量比的乙醇的酵母细胞。本发明还涉及一种实质上不具备蛋白酶A、蛋白酶B和羧肽酶Y的酶活性的酵母细胞。

### 附图的描述

图1图示了候选的降解代谢产物不阻遏、CAT<sup>-</sup>，单倍体酵母菌株对面包生面团的耐受时间。

图2图示出CAT<sup>-</sup>，葡萄糖底物限制性(GSL)菌株1、2、3、4号，以及非CAT<sup>-</sup>对照菌株，通过测它们每种酵母菌株培养物在600纳米(nm)处的吸收率而测得的生长速率。

图3图示出CAT<sup>-</sup>GSL菌株6、7、8和9号，及对照菌株，测每个酵母菌株的培养物在600nm处的吸收率，而测得的它们的生长速率。

图4图示出CAT<sup>-</sup>GSL菌株10、12、15和16号，及对照菌株的生长速率，是通过测每种酵母菌株培养物在600nm处的吸收率而得。

5 图5图示出CAT<sup>-</sup>GSL菌株第17、18、19和20号，及对照菌株的生长速率，是通过测每种酵母菌株培养物在600nm处的吸收率而得的。

图6图示出CAT<sup>-</sup>GSL菌株第24、23、27和35号，及对照组菌株的生长速率，是通过测每种酵母菌株培养物在600nm处的吸收率而得出的。

10 图7图示出CAT<sup>-</sup>GSL菌株第36、37、40和41号，及对照组菌株的生长速率，是通过测每种酵母菌株的培养物在600nm处的吸收率而得的。

图8图示出一种二倍体10×54酵母在三种类型培养基中，通过测每种酵母菌株的培养物的600nm吸收率而测得的生长速率。

#### 本发明的详细描述

15 本发明包括二倍体啤酒酵母细胞，它在有葡萄糖存在时只利用半乳糖作为其糖源。本发明的酵母菌株产生的营养基质，如面包生面团，其有控制地醒发所花时间只有用常规的以半乳糖作其唯一糖源的一种GAL<sup>-</sup>酵母菌所需时间的一半。这种针对面团的可控制的醒发能力很重要，特别是当面团是装在一个封闭的容器中，如一个纸板箱中时。在一个具体实施方案中，本发明的半乳糖的酵母菌株同时还有对乙醇的耐受力，而这种耐受力比任何一种常规的面包酵母菌或GAL<sup>-</sup>酵母菌的乙醇耐受力都要强。

能利用半乳糖的酵母细胞被用于发酵和醒发面包生面团，特别是可冷冻的面包生面团。酵母菌对乙醇耐受的特征也减少了酵母菌产生面包生面团所需的醒发时间。

25 这种利用半乳糖的酵母细胞也用于食物废品的加工。干酪产物产生大量乳清，实质上就是乳糖和水。传统的加工过程是用酵母将乳糖水解为葡萄糖和半乳糖，而后者再进一步水解为乙醇。常规的酵母细胞优先发酵葡萄糖，而不是半乳糖。结果，半乳糖是该过程的二级终产物。本发明的酵母细胞可用于选择性地半乳糖转为乙醇，而不触动葡萄糖，或用于与常规的细菌菌株组合在一起，同时转化葡萄糖和半乳糖为乙醇。

30 在另一个具体实施方案中，本发明的酵母细胞还包括与常规酵母细胞相比减小了的蛋白酶活性。蛋白酶活性被减小是因为这种酵母细胞实质上缺少蛋白酶A、蛋白酶B和羧肽酶Y的活性。与常规的酵母细胞相比缺少这些酶活性的结果是其溶解后的蛋白水解活性减少了90%。酵母细胞的这个特点使这种酵母细胞更适合于象发酵和醒发可冷冻的生面团这样的应用。

蛋白酶降解面包团结构中的谷胶基质，导致生面团彻底裂解成液态，糖浆状物



是为了举例说明本发明的各种具体实施方案，并不是想限制本发明。

如本文所用，菌株 D 3 0 8.3 指一种单倍体的半乳糖底物限制性 (G S L) 啤酒酵母菌株，因有一个腺嘌呤突变菌落为粉红色。菌株 M S L.1 是 D 3 0 8.3 的一个腺嘌呤非必需的回复突变体。这种菌株的菌落都不是粉红色。 a /  $\alpha$  G S L # 33 菌株，是二倍体 G S L 菌株。菌株 G S L # 33 是 G S L 的单倍体菌株。 G A T - 15 菌株，是单倍体 G S L 菌株，是降解代谢产物不阻遏的，而且是能发酵水解了的乳糖糖浆的菌株。 1 0  $\times$  5 4 菌株是二倍体 G S L 菌株，是降解代谢产物不阻遏的。 C A T - 1 5 菌株和 1 0  $\times$  5 4 菌株具有醒发含有水解过的乳糖底物的生面团的能力。 M S L.1 株和 a /  $\alpha$  G S L # 3 3 株都不能在水解了的乳糖糖浆中有效地发酵和生长。

D 3 0 8.3 菌株于 1 9 9 3 年 3 月 5 日保藏于位于 R o c k v i l l e , M D 的美国培养物保藏中心 ( t h e A m e r i e a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ) ( A T C C ) ，登记号为 7 4 2 1 1 。该保藏是根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约》而进行的。

15

### 实施例 I

单倍体酵母菌株 M S L.1 和 G S L # 3 3 均在含葡萄糖和半乳糖的培养基中培养。如上所述，野生型的 M S L.1 酵母菌株和 a G S L # 3 3 酵母菌株不能代谢乳糖。降解代谢产物非阻遏的单倍体酵母菌株是从上述菌株中培养出的。

20 所需的材料包括具有下列相应的基因型的酵母菌株：

<u>酵 母 菌 株</u>	<u>基 因 型</u>					
MSL.1	h $\times$ k1	h $\times$ k2	glk1	trp1	his2	met14
aGSL#33	h $\times$ k1	h $\times$ k2	glk1	met14	lys2 *	

25 \* 基因型是以在各种不同缺陷培养基平板上的生长行为以及亲代菌株的基因型为基础确立的。

5 0 m l 的酵母浸出蛋白胨培养基 ( Y E P ) 和半乳糖被倾注入两个经高压蒸汽灭菌的培养瓶中。一个瓶接种 M S L.1 酵母株的分离菌落，而另一个瓶接种 “ a ” G S L # 3 3 酵母株的分离菌落，

30 被接种的培养物置于 3 0  $^{\circ}$  C 振荡培养箱中振荡培养。 M S L.1 培养物温育 4 8 小时，而不太活泼的 “ a ” G S L # 3 3 样本则温育 7 2 小时。

温育后紧接着，每份量为 1 0 0 微升 (  $\mu$  l ) 的  $1 0^{-1}$  ,  $1 0^{-2}$  ,  $1 0^{-3}$  和  $1 0^{-4}$  稀释的前面提到的母培养物被涂布在含以下琼脂配方的 6 0 % 葡萄糖 / 4 0 % 半乳糖的 Y E P 平板上：

60%葡萄糖 / 40%半乳糖 YEP 琼脂

5	细菌酵母浸出物 (1%)	10克
	细菌蛋白胨 (2%)	20克
	葡萄糖 (1.2%)	12克
	半乳糖 (0.8%)	8克
	细菌琼脂 (2%)	20克
	蒸馏水	1000 ml

另外, 每种培养物的  $10^{-5}$  至  $10^{-8}$  稀释分别涂布在 YEP 培养基和含半乳糖的培养基上。所有的平板均置  $30^{\circ}\text{C}$  温育。计数酵母菌落。滴度结果表明, MSL.1 培养物细胞密度约  $1.3 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ , 而“a”GSL#33 的密度约等于  $6 \times 10^7 \text{ CFU/ml}$ 。

10 候选的降解代谢产物不阻遏 ( $\text{CAT}^-$ ) 的回复突变的菌落在 60% 葡萄糖 / 40% 半乳糖平板上长势很好, 而代谢受损“野生型”对照菌落表现为难以区分的薄膜。

15  $30^{\circ}\text{C}$  温育了约 5 天后, 60% 葡萄糖 / 40% 半乳糖 YEP 选择平板上分离出了 82 个的可能的 MSL.1 菌落和 68 个“a”GSL#33  $\text{CAT}^-$  菌落。为了从半乳糖底物限制性但非分解产物抑制性的菌落群中分离不再有半乳糖底物限制性的回复变异菌落, 所有待选的  $\text{CAT}^-$  GSL 菌株的分格涂布在含酵母浸出物蛋白胨和葡聚糖的平板 (YEPD 培养基) 以及含 60% 葡萄糖 / 40% 半乳糖的 YEP 培养基的平板上。平板均于  $30^{\circ}\text{C}$  贮存约一周。

20 68 个“a”GSL#33  $\text{CAT}^-$  候选菌株中, 有 43 个在 60% 葡萄糖 / 40% 半乳糖 YEP 平板上生长, 但不能在 YEPD 平板上生长。这些酵母菌落看起来是  $\text{CAT}^-$  GSL 酵母株。剩下的 24 个菌落很容易就在 YEPD 上生长起来, 而且看上去也不再是半乳糖底物限制性的。

25 没有一个 MSL.1  $\text{CAT}^-$  菌落被证明是  $\text{CAT}^-$ 。所有被测试的候选菌在 60% 葡萄糖 / 40% 半乳糖和在 YEPD 培养基上长得同样的好。

30 那 43 个  $\text{CAT}^-$  GSL 候选菌落被测试了液体培养基的糖类利用能力, 分离出的推定为  $\text{CAT}^-$  GSL 的菌落非抑制作用程度, 及这些菌落在不含糖类的液体 YEP, YEPD 培养基, YEPD 和半乳糖培养基, 及 YEP 和 50% 葡萄糖 / 50% 半乳糖的液体培养基中的生长能力, 都可以评估。

包含有 10 ml YEP 和半乳糖的试管样品, 接种了分离出的候选  $\text{CAT}^-$  GSL 酵母糊的菌落。此样品于振荡培养箱中  $30^{\circ}\text{C}$  振荡温育约 24 小时。对照的“GSL#33 和 GSL#33”  $\alpha/A$  样品也在 YEP 和半乳糖培养增基中准备好。

35 紧接着温育阶段之后, 含 10 ml YEP 培养基 (不含糖), YEPD 培养基, YEP 和半乳糖培养基, 及 YEP 和 50% 葡萄糖 / 50% 半乳糖培养基的各试管样本中均接种评价过的每种菌株的对数期起始培养物 100 微升。接种之后, 每份

样品先在一个光学分光光度计上 600 纳米 (nm) 处测吸光率, 然后再置样本于 30 °C 培养箱。在 9 天之内连续记录吸光率的测量值以定量酵母的生长。

4 3 个评估了的 CAT<sup>-</sup> GSL 候选菌落中有约 24 个看来在 50 % 葡萄糖 / 50 % 半乳糖液体培养基中比二倍体对照 a GSL # 33 菌株和单倍体 MSL. 1 亲代 GSL 菌株都要长得快且长得好。这 24 个候选菌株鉴定如下:

10 CAT<sup>-</sup> GSL # 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 26, 27, 35, 36, 37, 40 和 41。另有两个候选株, 23 和 25 也显示了优势生长行为。这些菌株的生长率均示于图 2——7。其生长率非常接近于每分钟 0.025 ml 的放气量。图示于图 2——7。

15 以其在面包生面团中的表现筛选这些候选菌落。筛选测验包括评估每种酵母菌株发酵和醒发面包生面团的能力的 Risograph 排气量试验。从被候选酵母菌株发酵和醒发面包生面团得到的 Risograph 排气量, 以及生面团产物醒发时间实验, 均显示多数 CAT<sup>-</sup> GSL 酵母菌株以较快的速度放出二氧化碳, 且其产生的总二氧化碳比二倍体对照酵母和亲代单倍体 GSL 酵母菌株明显的多。CAT<sup>-</sup> GSL 酵母菌株在有葡萄糖存在时能有效地代谢半乳糖, 这一点在用一种食物分级水解的乳糖糖浆来醒发 GSL 酵母发酵的生面团产物时很重要。

20 上面鉴定的 26 个酵母菌落以其在发酵和醒发生面团中的表现筛选之。下列表 1 概括了醒发鉴定时间的数据, 放气速率, 总排气量和候选酵母菌株的生面团的细胞产量。表 1 显示了 5—7 菌株每一栏中, 比其它候选株在筛选试验中表现出色, 也比对照 a / α GSL # 33 表现出色。

表 1

优选菌株 (按下行顺序)	醒发时间 (小时)	排气速率 (毫升/分)	总排气量 (毫升)	细胞产量 (克/升)
# 1	Cat10 3.1	Cat 15 1.150	Cat 37 90	a/α GSL#33 24.0
# 2	Cat15 3.5	Cat 37 0.150	Cat 20 85	Cat 37 19.9
# 3	Cat1 4.2	Cat 25 0.125	Cat 2 77	Cat 20 19.2
# 4	Cat37 4.3	Cat 24 0.125	Cat 16 72	Cat 25 19.0
# 5	Cat40 4.4	Cat 23 0.125	Cat 15 72	Cat 4 19.0
# 6		Cat 2 0.125	Cat 36 72	Cat 18 19.0
# 7		Cat 12 0.125		
a/α GSL#33	6.6	0.050	50	24
优选范围	3.1-6.6	0.150-0.050	90-50	24-19
平均	3.9	0.132	78	19.2

表 2 显示了每种在表 1 的描述中最优选表现者的候选菌株的在表 1 中出现的频率。字母分别代表验收时间 ( P ), 排气速度 ( R ), 总排气量 ( T ), 和产量 ( Y )。

表 2

菌株	P	R	T	Y
1	P			
2		R	T	Y
4				Y
10	P			
12		R		Y
15	P	R	T	
16			T	
18				Y
20			T	Y
23		R		
24		R		
25		R		Y
36			T	
37	P	R	T	Y
40	P			
a/α GSL33				Y

5

如表 1 和表 2 所证实的, 好几种菌株在不止一种评判标准下是优越的。CAT<sup>-</sup>37 在四种标准下较优, 而 CAT<sup>-</sup>2 和 CAT<sup>-</sup>15 在三种标准下较优。在这些评判标准中, 醒发时间在测定在面包生面团的表现中是最重要的。CAT<sup>-</sup>10 只在醒发时间方面较优。此表的几种菌株后来均用于交配实验过程, 以产生分解代谢物不阻遏的, G S L, 二倍体酵母菌株。

10

图 1 是一个条形图, 显示了所有被测试的菌株的生面团验收时间。对照菌 a / α G S L # 33 的醒发时间最长, 有 6.6 小时。所有候选株都比对照菌株表现出色, 显示这些候选株确实是降解代谢产物不阻遏的。醒发时间最短的候选株是 CAT<sup>-</sup>10, CAT<sup>-</sup>15, CAT<sup>-</sup>1, CAT<sup>-</sup>37, 和 CAT<sup>-</sup>40。CAT<sup>-</sup>10 和 CAT<sup>-</sup>15 的醒发时间约只有对照酵母的一半。

15

还测试了的候选株的二氧化碳的产生。将候选株和水混合来制面包生面团。所有考虑到的菌株中, CAT<sup>-</sup>15 和 CAT<sup>-</sup>37 的二氧化碳产生率最高。CAT<sup>-</sup>25, CAT<sup>-</sup>24, CAT<sup>-</sup>23, CAT<sup>-</sup>2 和 CAT<sup>-</sup>12 的二氧化碳产生率只稍

稍低于菌株 C A T<sup>-</sup>1 5 和 C A T<sup>-</sup>3 7 的速率。

生面团中总排气量最大的候选株并不总是对应那些二氧化碳产生率最高的候选株。在 6 株总 C O<sub>2</sub> 产量最高的候选株中，只有 C A T<sup>-</sup>3 7， C A T<sup>-</sup>2， 和 C A T<sup>-</sup>1 5 同时有较高的 C O<sub>2</sub> 产生率。

5 C A T<sup>-</sup>株在面包生面团中的排气比常规的面包酵母产生的总排气量和排气速率低得多。这正是对用于制造可冷冻的面包生面团的酵母菌株所期望的特征。它允许这种酵母菌株不必打破贮存生面的容器就能在容器中被用于发酵和醒发生面。

10 关于细胞产量，所有 C A T<sup>-</sup>候选株均比 a / α G S L # 3 3 对照株要低。相信这是因为 a / α G S L # 3 3 是二倍体菌株，而所有其它受试菌株是单倍体菌株所致。因为二倍体株有两套而不是一套遗传信息，所以 a / α G S L # 3 3 酵母细胞能生长得更快。互补作用和营养型标记的存在使二倍体对照株相对于单倍体株，生长受到促进。单倍体菌株中，有几个菌株的细胞产量均非常接近每升 2 0 克。这是较高的产量。

15

### 实施例 II

将蛋白酶缺陷突变引入半乳糖底物限制性 ( G S L ) 酵母菌株中。蛋白酶缺陷的酵母菌株， α p e p # 4 - 3， 与如实施例 1 中所描述的单倍体 G S L 酵母菌株， a G S L # 3 3 C A T<sup>-</sup>1 0， ， 成功地进行了交配。从这种交配中获得的杂合体菌落在一个孢子形成培养基的平皿上铺板。分离出产生单倍体孢子的菌落。筛

20 选这些单倍体菌落的半乳糖底物限制型，即，只能在半乳糖中生长不能在葡萄糖中生长，和降解代谢产物不阻遏型，即，在有葡萄糖时也能生长的能力。

共分离 7 3 株单倍体 G S L 降解代谢产物不阻遏 ( C A T<sup>-</sup> ) 的候选菌株。从中筛选 P E P # 4 - 3 突变。用蛋白酶 A 活性试验和另一个蛋白酶 B 活性试验来筛选单倍体候选菌株。

25 单倍体菌株于 1 9 9 4 年 1 1 月 7 日保藏在位于 R o c k v i l l e， M D 的美国典型培养物保藏中心 ( A T C C )， 该保藏是依照《国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约》进行的，登记号为 7 4 3 0 6， 7 4 3 0 7 和 7 4 3 0 9。

30

### 实施例 III

在分离 G S L / C A T<sup>-</sup>单倍体酵母候选株以产生二倍体 G S L / C A T<sup>-</sup>酵母菌株时，使用了有低温敏感突变的酵母菌株 1 t s # 8， 来导入 α 交配基因到 G S L 单倍体候选菌库中。共分离到 3 6 株单倍体 G S L / C A T<sup>-</sup>候选菌。其中 1 0

35 株似乎还是低温敏感的。这些菌株已保存在位于 R o c k v i l l e， M D 的美国典型培养物保藏中心 ( A T C C )， 是依据《国际承认的用于专利程序的微生物

保藏布达佩斯条约》进行的保藏。这些菌株有如下ATCC登记号和圆括号里的鉴定号：74123 (cdc 19)，74124 (XA6—9C—1ts1)，74125 (AXC—94B—1ts2)，74126 (XA98—34B—1ts3)，74127 (XA99—13C—1ts4)，74128 (XA77—3D—1ts5)，74129 (XA88—3A—1ts6)，74130 (XA89—2A—1ts7)，和74131 (XA33—5A—1ts8)，保藏日为1992年1月31日。

#### 实施例IV

10

常规的面包酵母培养物产生的面包生面团很典型地需在生面团里加入了至少2%的乙醇，以抑制乳酸细菌的生长，稳定面团容器压力，并减小生面团的流动贮藏期限变化。不幸的是，乙醇还抑制酵母的生长和气体的产生。一种显示对乙醇有耐受性适用于可冷冻生面团的GSL菌株已被分离得到。

15 这种分离是将在有6%乙醇存在的情况下和长至稳定期的培养物中获得的活酵母菌落经连续的分离和再接种步骤而得到的。此分离基于这样一个前提：分离到的菌落对乙醇耐受力越强，它在乙醇存在时的生长将更快。

20 已分离到两株有希望的乙醇耐受候选株，并对其在可冷冻的生面团系统中进行了测试。结果显示：乙醇耐受菌落比亲代 $10 \times 54$ 酵母菌能更快地醒发面团样品，如实施例5所述。醒发时间减少了一半，为1小时。其中一株乙醇耐受株，E35#1，已被保藏在位于Rockville, MD的美国典型培养物保藏中心，保藏依据国际承认的用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约，是1994年11月7日保藏的，登记号为74310。

25

#### 实施例V

为产生有最强代谢能力的GSL/CAT二倍体酵母菌株，将分离出的推定的单倍体GSL/CAT酵母菌株置于YEP（不含糖）培养基，YEPD培养基，YEP加半乳糖培养基，和一种50/50克分子百分比半乳糖/葡萄糖的YEP液体培养基上生长，以进行筛选。将发现的最易在50/50半乳糖/葡萄糖培养基上生长的单倍体酵母菌株进行交配，以产生二倍体GSL/CAT酵母菌株。评估这候选的二倍体GSL/CAT菌株释放二氧化碳和醒发可冷冻生面团的能力。对其中最有效的菌株作进一步分析。

有效的单倍体菌株包括以下几种：

35 a GSL33 CAT-(a.k.a.33) #: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 1-6, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 27,

29, 31, 32, 33, 35, 36, 39, 40, 41

a GSL33 CAT-15×alts 8 (a.k.a 15×8) #: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23  
5 a GSL33 CAT-10×pep4-3 (a.k.a.10×4-3) #: 1-74

10 在所评估的酵母菌株中,发现只有13株保持了GSL/CAT表型并有适合于经互补作用配对的营养缺陷型标记。筛选表型包括这些特征: i.该酵母菌易于在YEP加半乳糖的培养基上生长; ii.易于在YEP加50%半乳糖/50%葡萄糖的培养基上生长; iii.不易于在YEP加葡聚糖的培养基上生长。以上结果均是与在不含糖的YEP对照培养基上观察到的生长速率相比较而得的。

15 根据相容的交配类型和互补的营养缺陷型标记的组合,鉴别了列于表3的下列酵母菌交配对。同时还列出了基于酵母菌的营养缺陷型标记的一种最低限度选择培养基。

表 3

α 配对株	a 配对株	人工合成的半乳糖 最低限度选择培养基 *
1 5 × 8 # 1 0	1 0 × 4-3 # 5 4	无增补
1 5 × 8 # 1 0	1 0 × 4-3 # 5 8	无增补
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 1 5	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 2 0	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 2 5	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 2 7	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 5 2	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 5 4	无增补
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 5 8	无增补
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 7 1	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5 7	1 0 × 4-3 # 5 1	无增补
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 1 5	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 2 0	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 2 5	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 2 7	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 5 2	增补赖氨酸
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 5 4	无增补
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 5 8	无增补
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 7 1	增补赖氨酸

\* 所用的选择培养基是人工合成的半乳糖最低限度的培养基，当两种亲代菌株生长均需要赖氨酸时，加入赖氨酸。

- 5 列于表 3 的单倍体交配酵母菌株对用平板划线法接种在 Y E P 加半乳糖的培养基上，于 3 0 °C 温育 2 4 小时。划线的平板再以垂直方向交叉复制到另一个 Y E P 加半乳糖的平板上 3 0 °C 温育 2 4 小时。该交叉复制平板再用复制平板培养法传到人工合成的半乳糖最低限度培养基中，此培养基可增补赖氨酸，也可不增补赖氨酸。这些平板均于 3 0 °C 培育 1 - 4 天。属于杂交配对组合成的二倍体酵母株的生长是明显的，表中记为“+”。
- 10

表 4

$\alpha$ 交配株	a 交配株	二倍体酵母菌落生长状况 *
1 5 × 8 # 1 0	1 0 × 4-3 # 5 4	+
1 5 × 8 # 1 0	1 0 × 4-3 # 5 8	+
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 1 5	-
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 2 0	-
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 2 5	-
1 0 × 4-3 # 5	C A T 3 3 # 2 7	-
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 5 2	+
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 5 4	+
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 5 8	+
1 0 × 4-3 # 5	1 0 × 4-3 # 7 1	+
1 0 × 4-3 # 5 7	1 0 × 4-3 # 5 1	+
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 1 5	-
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 2 0	-
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 2 5	-
1 0 × 4-3 # 5 9	C A T 3 3 # 2 7	-
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 5 2	+
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 5 4	+
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 5 8	+
1 0 × 4-3 # 5 9	1 0 × 4-3 # 7 1	+

\* 在合成的半乳糖最低限度培养基（有或无赖氨酸）平板上，观察到那些两种单倍体菌落重叠生长之处就是二倍体菌落的生长。）

5 表 4 中列出的推定的二倍体 G S L / C A T 菌株在新鲜的含或不含赖氨酸的合成半乳糖最低限度培养基上进行平板培养进行进一步分离，再在新鲜的 Y E P 加半乳糖平板上对前面分离到的菌落再培养。

10 对推定的二倍体 G S L / C A T 酵母菌株利用半乳糖和 / 或葡萄糖的能力的评估，可通过将 1 0 0 微升的一接种环酵母糊在 3 毫升 ( m l ) 稀释缓冲液中稀释后得到的大量的接种物以平板涂布方式涂在 Y E P 加半乳糖培养基平板 Y E P D 培养基的平板上，来进行评估。单倍体 G S L / C A T 酵母菌株标本，C A T 1 5，被用作一种对照。平板 3 0 ° C 保存约 4 天。所有评估的候选二倍体酵母菌株很易在 Y E P 加半乳糖的培养基上生长，而在 Y E P D 培养基平板上，未显示出生长的迹象，

或是几乎没有回复突变菌落。

根据上述观察结果，我们可以得出结论，即分离到的二倍体 G S L / C A T<sup>-</sup> 酵母菌株是半乳糖底物限制性的。这些菌株还被置于液态 Y E P 培养基，Y E P D 培养基，Y E P 加半乳糖培养基，和 Y E P 加 5 0 % 葡萄糖 / 5 0 % 半乳糖培养基中进行生长，以它们代谢其它糖类的能力，还筛选了它们在 8 小时内发酵和醒发生面团样本的能力。三种推定的二倍体菌株，5 × 5 4，5 9 × 5 8，和 1 0 × 5 4，在所有筛选测试中表现合格。1 0 × 5 4 菌株的生长用图示表示在图 8 中。

1 0 × 5 4 菌株已于 1 9 9 4 年 1 1 月 7 日保藏在位于 R o c k i l l e, M D A T C C，依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约进行保藏，登记号为 7 4 3 0 8。

通过将酵母菌株接种到 Y E P 加半乳糖培养基上，而测试了这三种菌株葡萄糖利用能力的回复情况。结果显示见表 5。

表 5

菌株	回复突变频率	
CAT-1 5	$10/5.2 \times 10^7 = 1.92 \times 10^{-7}$	$10^7$ 个细胞中回复突变体数为 1.92
5 × 5 4	$30/2.04 \times 10^8 = 1.47 \times 10^{-7}$	$10^7$ 个细胞中回复突变体数为 1.47
10 × 5 4	$45/1.65 \times 10^8 = 2.73 \times 10^{-7}$	$10^7$ 个细胞中回复突变体数为 2.73
59 × 5 8	$470/6.2 \times 10^7 = 7.58 \times 10^{-6}$	$10^6$ 个细胞中回复突变体数为 7.58

(上文表中所计算出的观察到的回复突变频率代表的是观察到的点突变回复突变频率。)

这三种二倍体菌株还被检查了营养缺陷型的营养要求。菌株在人工合成的半乳糖最低限度培养基上平板培养。所有菌株都能在最低限度培养基上生长。

我们发现，本发明的酵母菌株，当掺入一面包生面团中时，产生出酵母发酵的和酵母醒发的可冷冻生面团。用本发明的生面团烤出的面包比用常规的面包酵母制作的面包更受欢迎。

尽管对本发明的较优选实施方案已作描述，但本领域的普通技术人员仍认识到，在形式和细节上所做的一些改进不会脱离本发明的精神和范围。

无分解代谢物阻遏酵母  
醒发时间

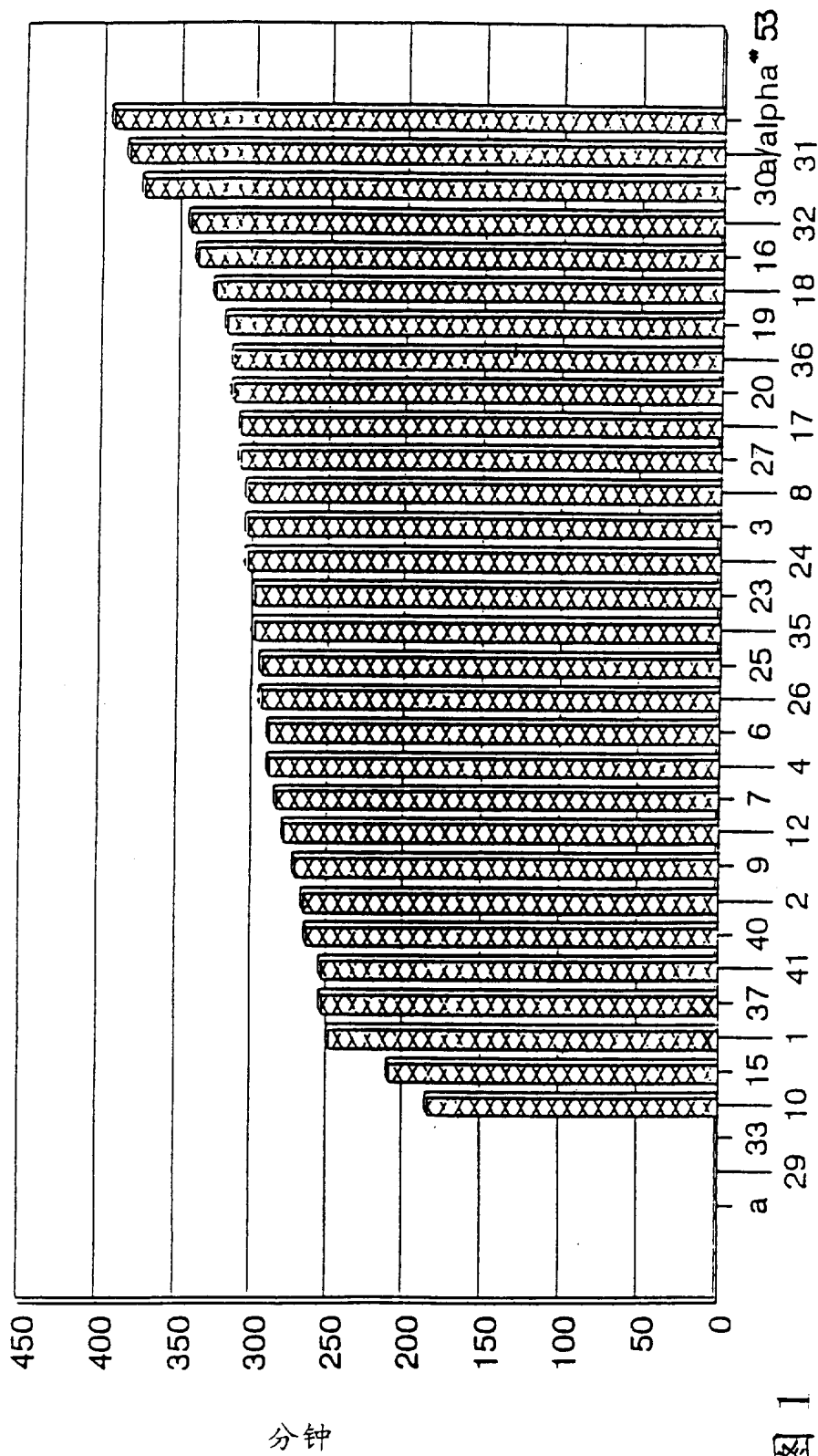
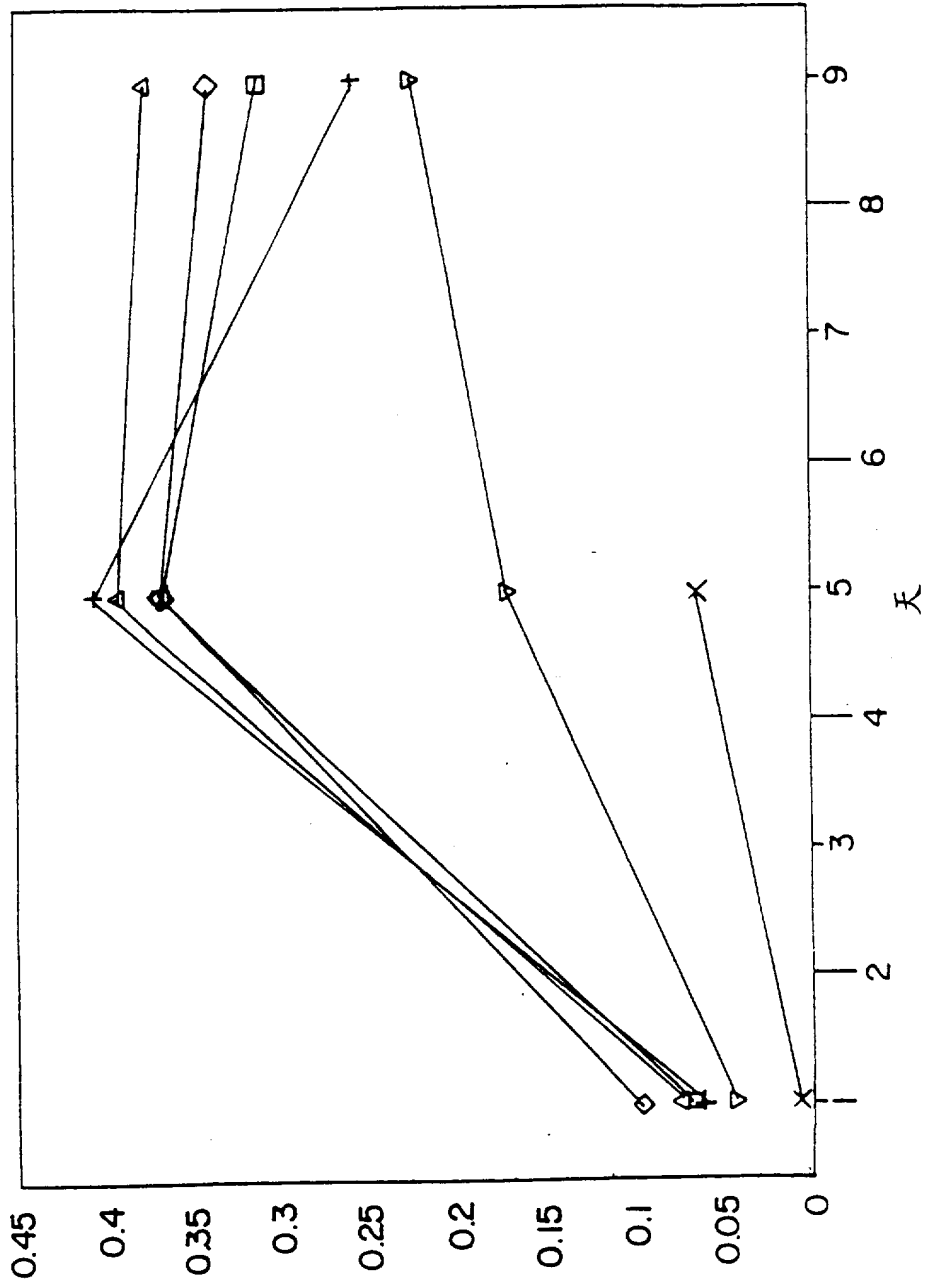


图 I

对应于时间@300的酵母样本吸光率(600nm)  
(YEP+50%葡萄糖/50%半乳糖培养基)



CAT. GSL □ +2 ◇ 3 ▽ α/GSL 33

图 2

对应于时间@300的酵母样本吸光率(600nm)  
(YEP+50%葡萄糖/50%半乳糖培养基)

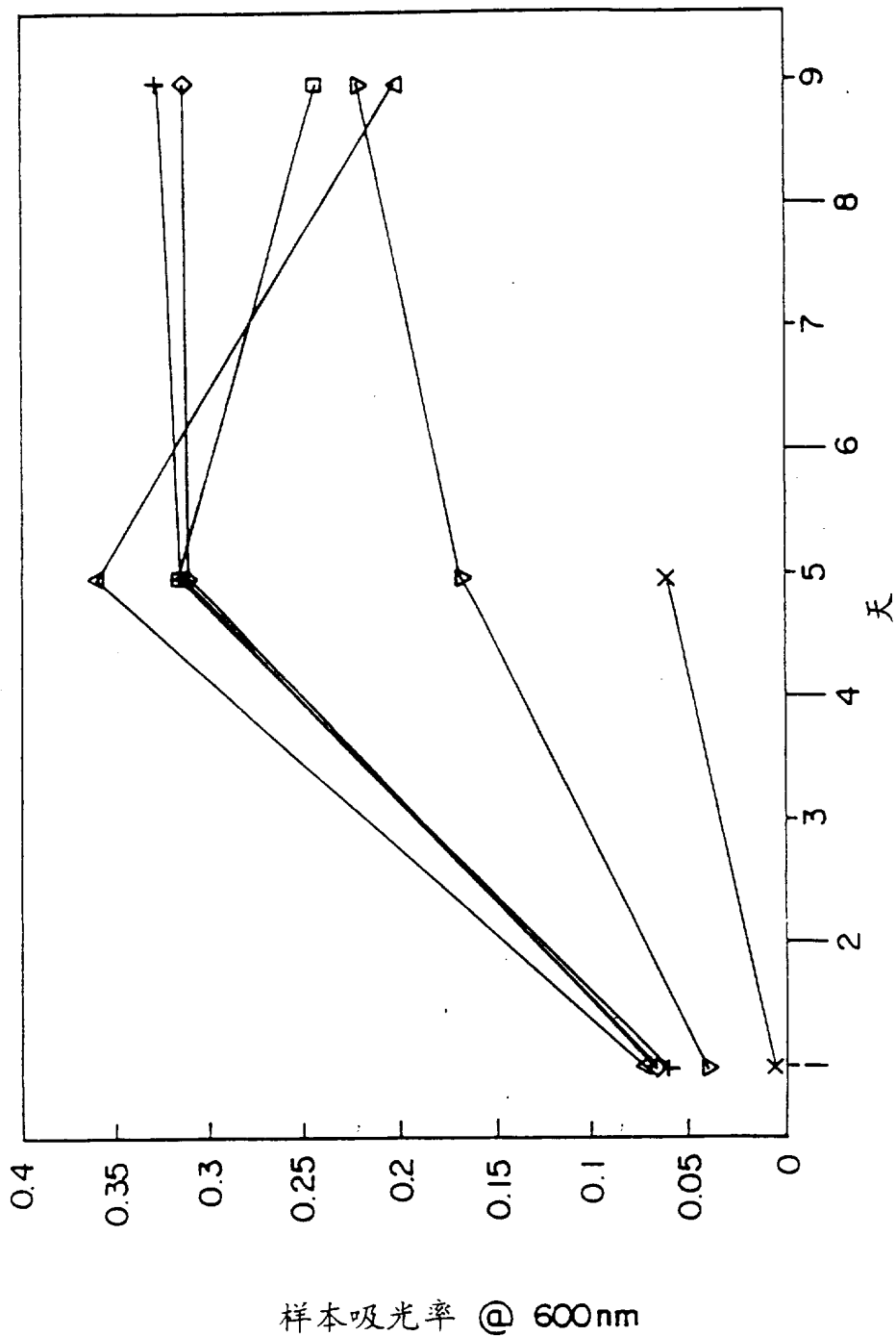
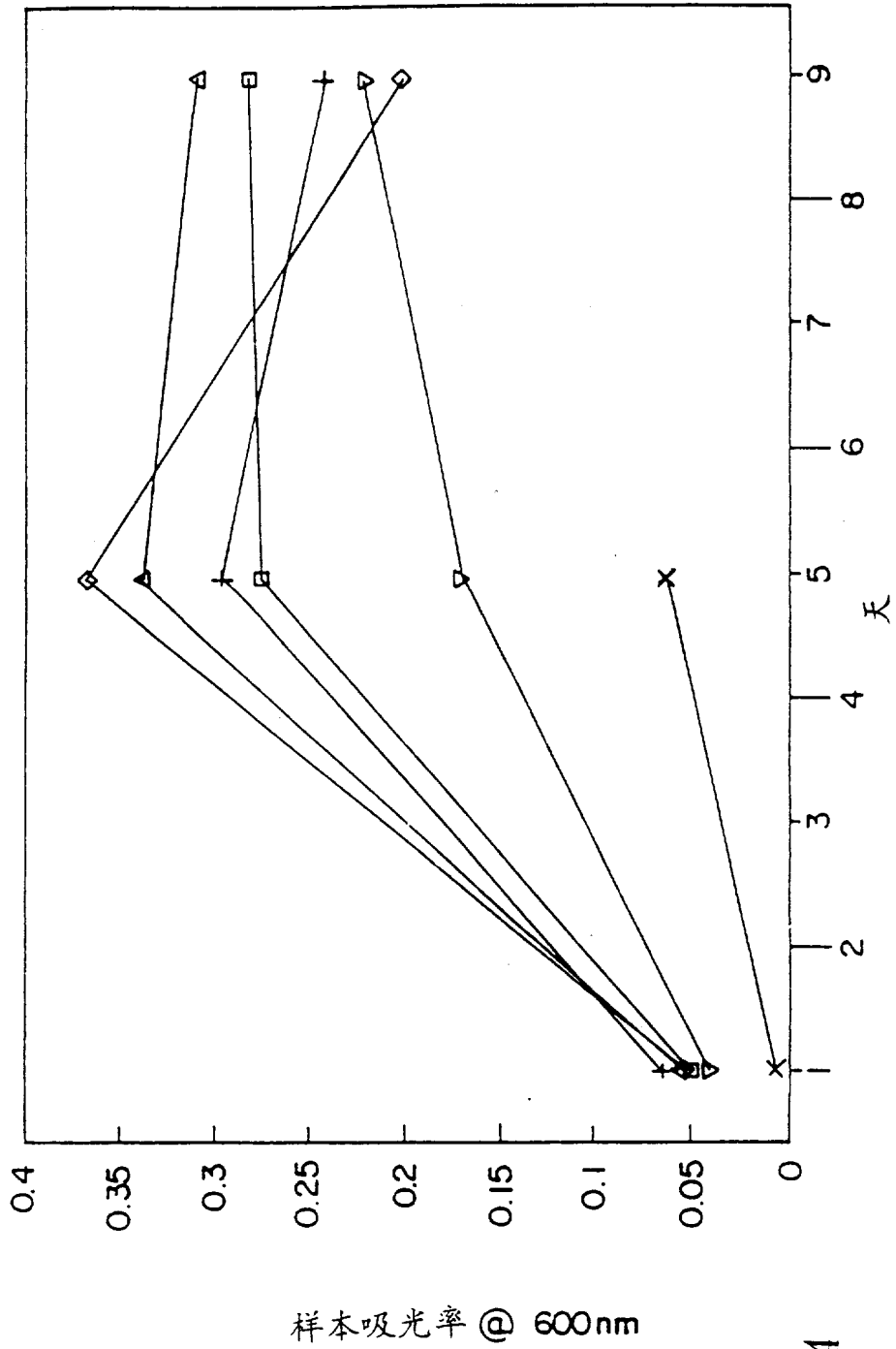


图 3

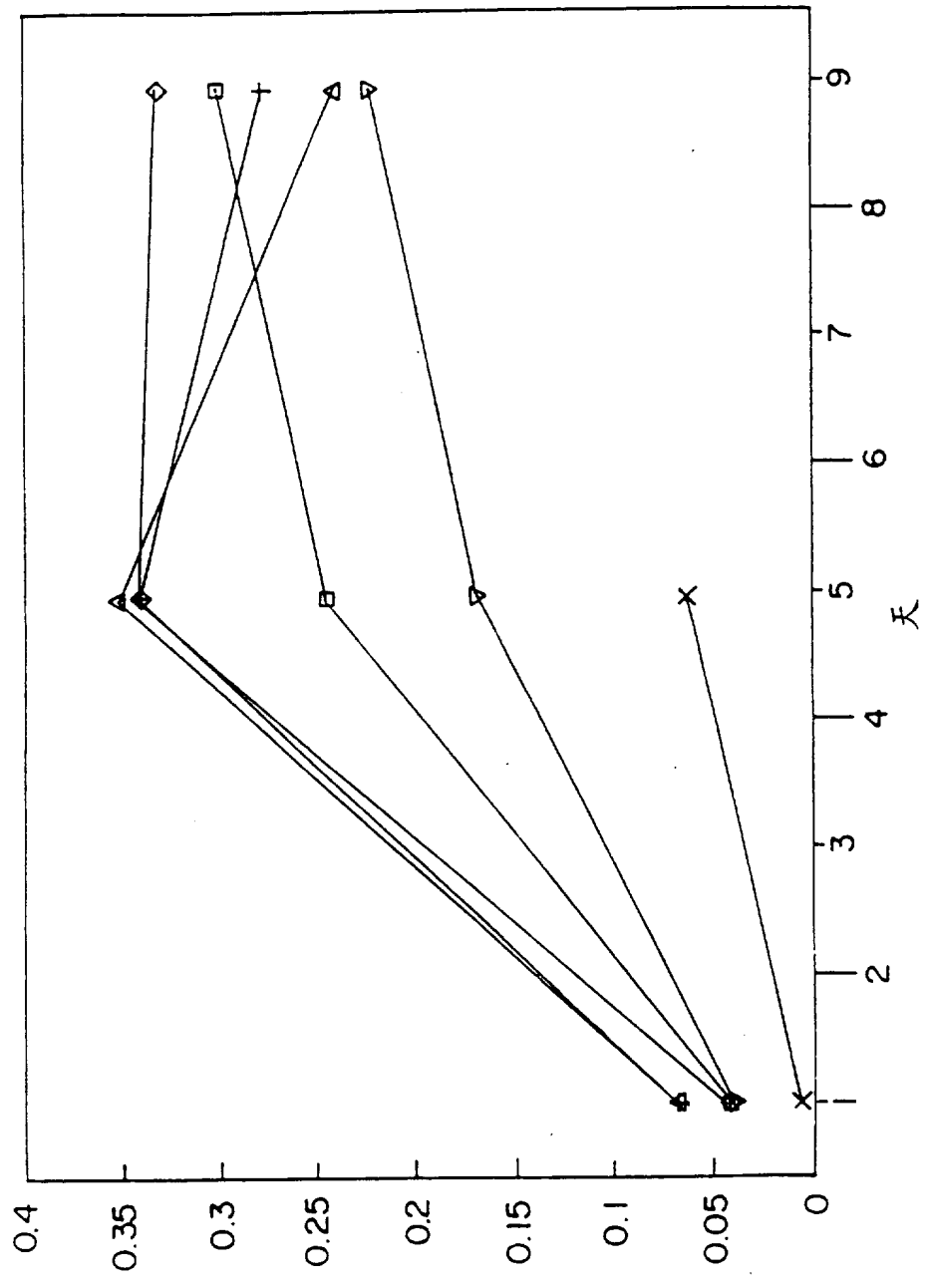
对应于时间@300的酵母样本吸光率(600nm)  
(YEP+50%葡萄糖/50%半乳糖培养基)



CAT. GSL<sup>™</sup> □ 10    △ 12    ◇ 15    + 16    x 33    ▽ 33 @ GSL<sup>™</sup> 33

图 4

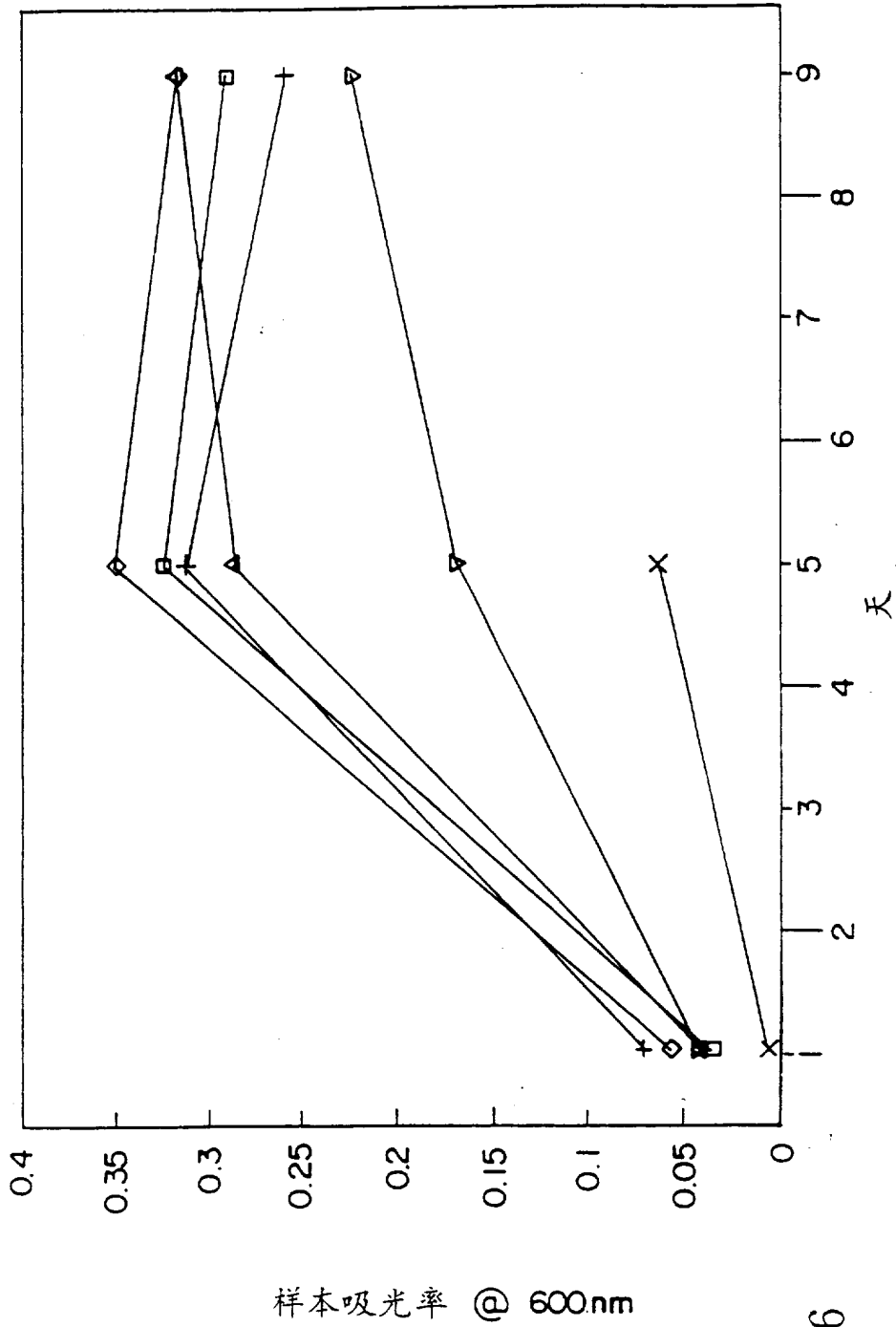
对应于时间@300 的酵母样本吸光率(600nm)  
(YEP+50%葡萄糖/50%半乳糖培养基)



CAT. GSL\* o 17 + 18 ◇ 19 △ 20 x o GSL\* 33 ▽ o/@ GSL\* 33

图 5

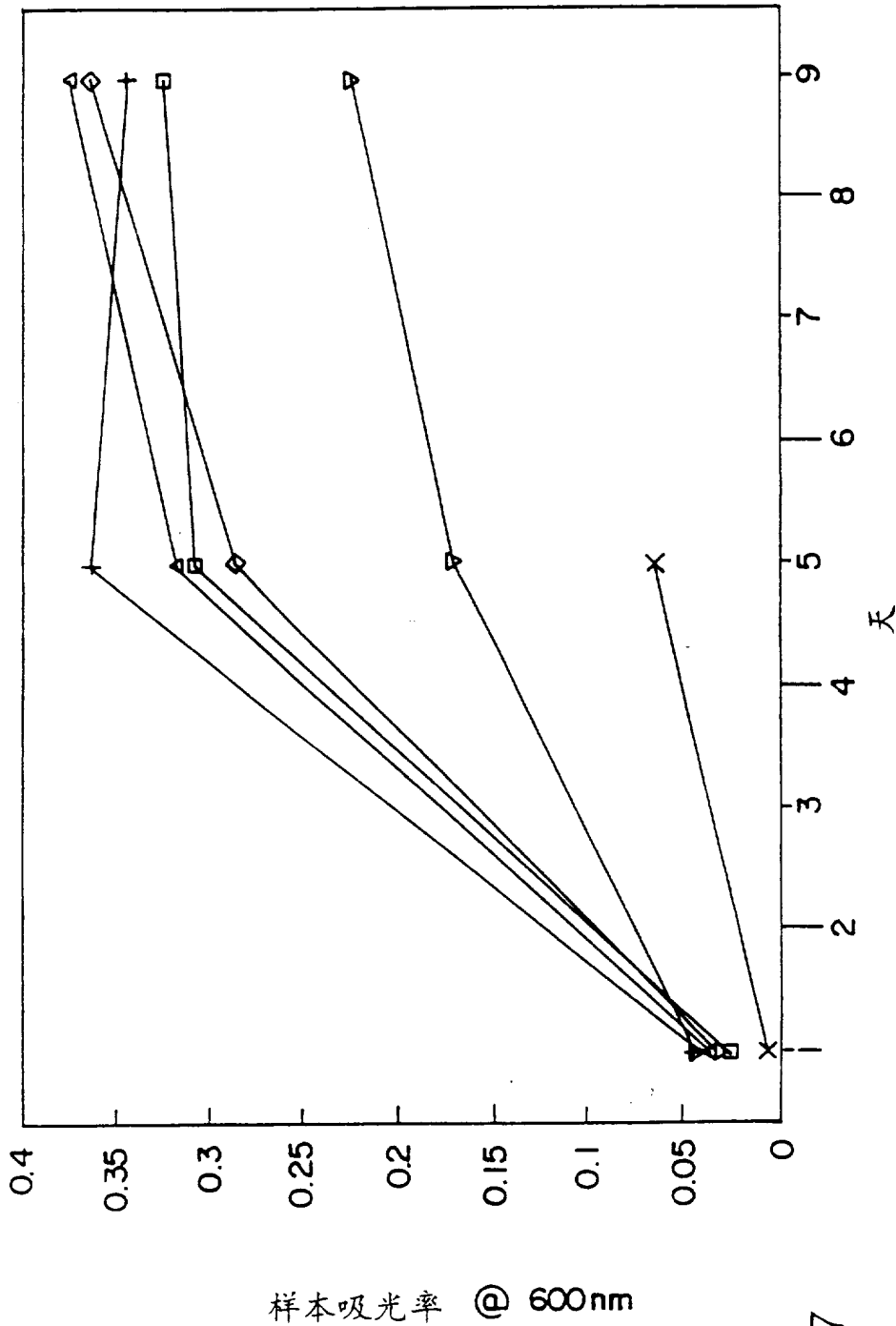
对应于时间@300 的酵母样本吸光率(600nm)  
(YEP+50%葡萄糖/50%半乳糖培养基)



CAT. GSL™ □24 +26 ◇27 △35 × αGSL™ 33 ▽ α/@ GSL™ 33

图 6

对应于时间@300的酵母样本吸光率(600nm)  
(YEP+50%葡萄糖/50%半乳糖培养基)



CAT. GSL<sup>™</sup> □ 36 + 37 ◇ 40 △ 41 × a GSL<sup>™</sup> 33 ▽ a/@ GSL<sup>™</sup> 33

图 7

培养于 YEP+50%半乳糖/50%葡萄糖中的  $10 \times 54$   
 酵母样本对应于时间@300 的吸光率

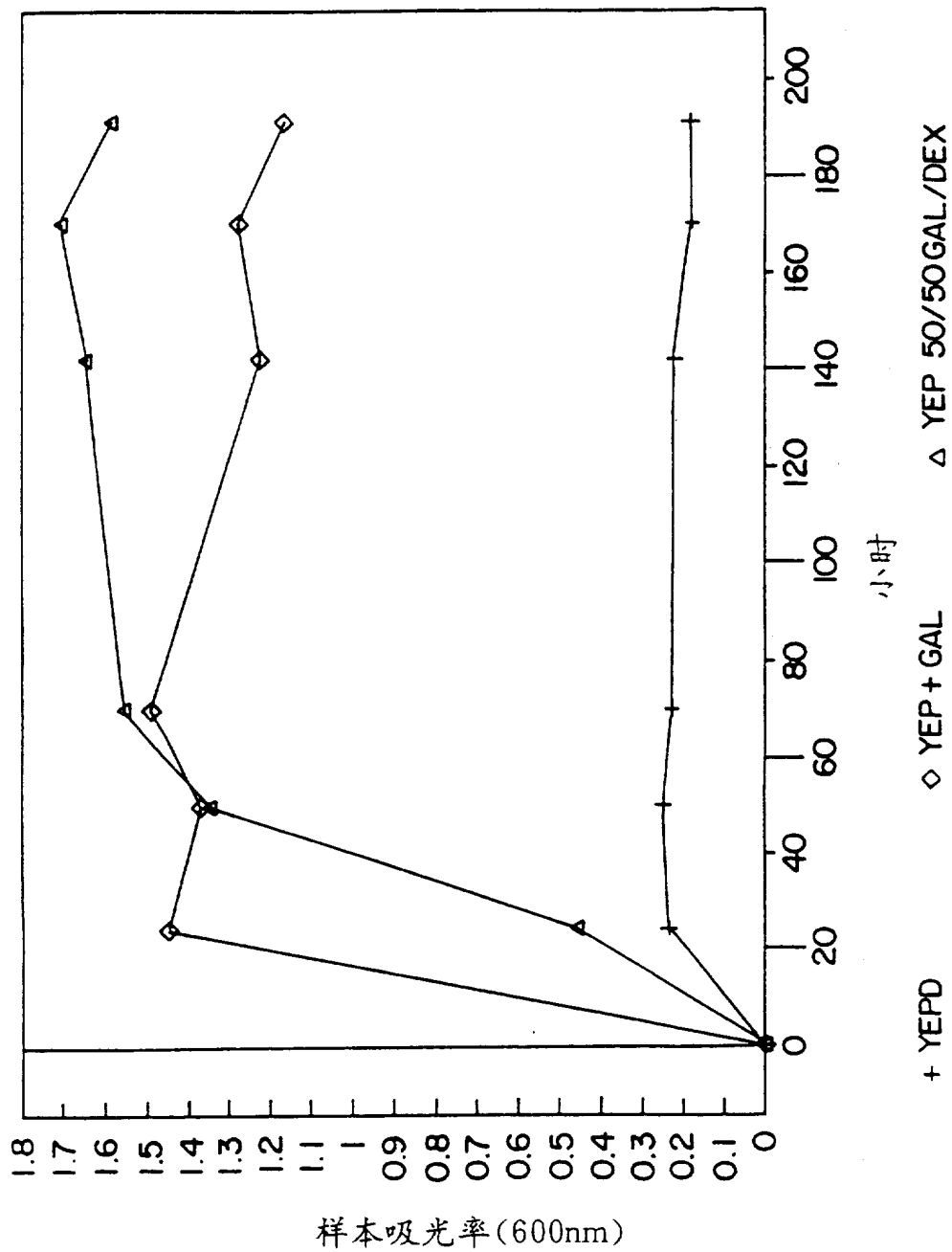


图 8