

酵母菌小菌落突变株酒精发酵的研究

I. 菌种的选育及其生理特性

楼纯菊 白沂涛 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所)

酵母菌小菌落呼吸缺陷型突变株 (Petite mutant) 的研究国外已有许多报道^[1-3]。Bacila 等^[4]证明 ρ^- 突变株在 5L 发酵罐中酒精发酵产

量比野生型 ρ^+ 约提高 10% 左右。

我们用诱变剂对酒精工业上使用的酵母菌进行处理,得到呼吸缺陷型突变株,这些菌与氯

代新四氮唑 (TTC) 无颜色反应, 氧吸收极微, CO_2 放出量较高, 同时酒精脱氢酶活力比对照高一倍。其中有些突变株酒精发酵产率有较大提高。

材料与方 法

1. 菌种: 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) K 氏菌株 (上海酒精二厂生产菌株), S_5 和 act (为本实验室保存)。

2. 培养基: ①麦芽汁培养基 6—7 度 (Brix), 自然 pH, 用于斜面 and 液体培养。②酵母膏蛋白胨培养基 (%): 酵母膏 0.6, 蛋白胨 0.8, 葡萄糖 2.0, pH6.0, 用于菌体培养及平板。

3. 诱变: 按照 Slonimski 和 Costa 方法, 先用不同浓度的溴化乙锭 (EB) 和盐酸胍进行处理, 然后用 TTC 薄层平板法染色^[5]。

4. 酶液制备: 分别将生长 24, 48, 72 小时的各株酵母菌体用无菌水洗涤两次, 悬浮于 0.1 M pH7.5 的磷酸缓冲液中, 菌液浓度约为 10^8 , 然后在 4℃ 用 MSE 超声波击碎器 [20KC] 处理 15 分钟, $1000 \times g$ 离心 10 分钟, 除去完整菌体及碎片, 即得无细胞抽出液, 做酒精脱氢酶测定。

5. 分析方法: 还原糖测定按 Miller^[6] 改进的 3, 5-二硝基水杨酸方法。酒精的分析用康威氏微量扩散法^[7]和直接蒸馏相结合。 O_2 吸收和 CO_2 放出用华勃氏呼吸器测定和 CO_2 失重相结合。酒精脱氢酶的测定按文献介绍的方法^[8]。蛋白质的重量按 Levin^[9] 改进的双缩脲方法测定。

实 验 结 果

一、EB 浓度和小菌落突变株出现频率关系

结果如图 1 所示。

图 1 证明小菌落突变频率和药物浓度不是呈直线关系, 而是 S 形曲线, 说明每个细胞最少有 2 个或更多位置被 EB 分子击中。

二、EB 作用时间和小菌落突变频率关系

结果见图 1b。

用 4 μM EB 处理 1 小时突变株迅速出现, 它

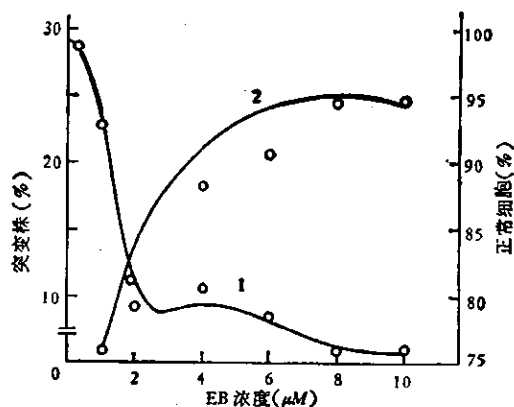


图 1a EB 浓度和小菌落突变株出现频率关系

1. 正常细胞 2. 变异细胞

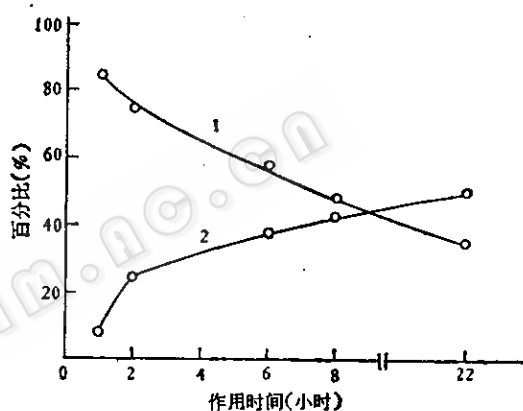


图 1b EB 作用时间和突变频率关系

1. 正常细胞 2. 变异细胞

的斜率=4。在 2 小时后虽然突变株绝对值仍有上升, 但它的速率大大减低, 再延长处理时间作用更不明显。

三、小菌落突变株的稳定性试验

由于 TTC 反应主要和呼吸链系统起氧化还原反应, 小菌落突变株主要是线粒体 DNA 缺陷或缺失, 它是从 ρ^+ \rightarrow ρ^- 或 ρ^0 , 一般不易发生回复突变, 因此当与 TTC 染色时无氧化还原反应为白色小菌落 (图 2), 而对照菌株为鲜红色大菌落。将挑出的突变株经连续传种 30 代, 再重复 TTC 染色, 结果仍为白色小菌落, 说明它的性状是很稳定的。

四、小菌落突变株的生理生化特性

1. 个体和菌落都比正常菌株小得多。见图 3。

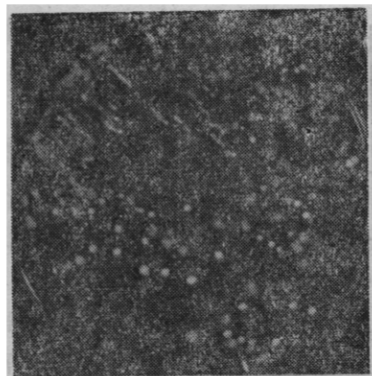


图2 小菌落突变株 TTC 染色稳定性试验

对照菌株K为 $4.4 \times 6.4 - 5.2 \times 6.8 \mu$, 而突变株KEB-4为 $2.8 \times 3.6 - 3.2 \times 5.6 \mu$ 。

2. 生长最高点延迟到达, 对照菌株一般在24小时生长达到最高点。而小菌落突变株一般在30小时左右才到达生长最高点, 其绝对值也

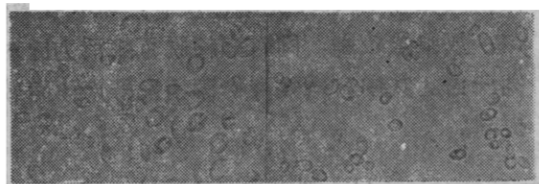


图3 小菌落突变株与对照菌株细胞比较
左: 对照菌株($\times 600$) 右: 小菌落变种($\times 600$)

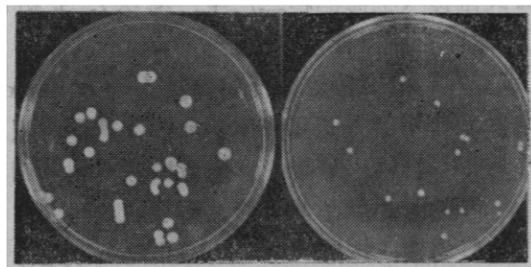


图4 小菌落突变株对非发酵性物质的反应
左: K对照菌落 右: KEB-4 突变株

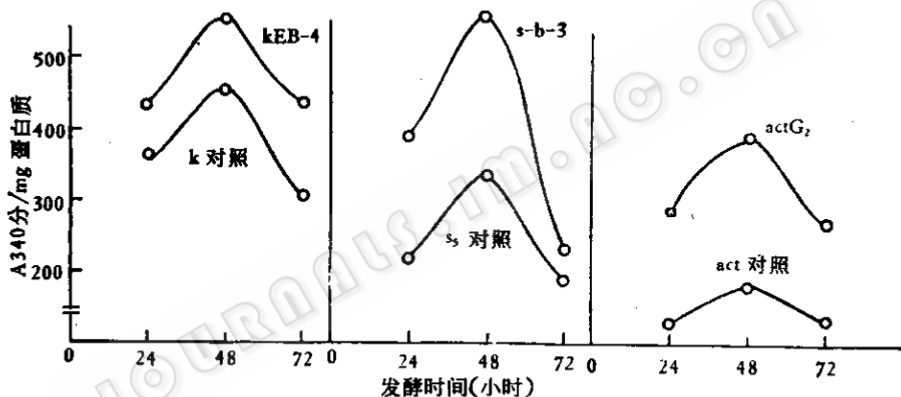


图5 酒精脱氢酶活力比较

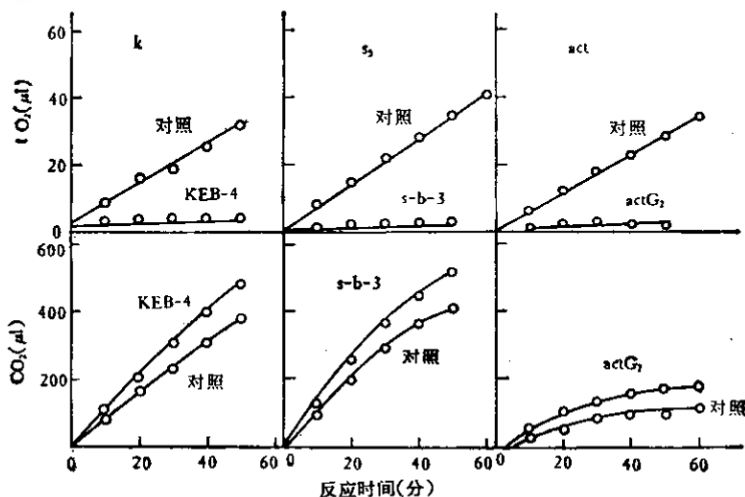


图6 正常菌株和小菌落突变株氧吸收和 CO₂ 放出比较

略低于正常菌株。

3. 不能氧化非发酵性物质, 如甘油、乙醇、醋酸等。

在乙醇培养基中加入 0.5% 葡萄糖培养 72 小时, K 对照菌株在糖利用完后继续氧化乙醇; 而 KEB-4 突变株则不能氧化乙醇继续生长(图 4)。

4. 乙醇脱氢酶活力比对照菌株高约一倍, 发酵 48 小时乙醇脱氢酶活力达最高点, 随着时间延长酶活力又逐步下降, 小菌落突变株乙醇脱氢酶活力都高于对照菌株。如图 5 所示, 反应系统: 焦磷酸钠 0.06M, pH 8.5, 酒精 3 μ M, DPN 0.2 μ M, 酶溶于 0.1M 磷酸缓冲液中, pH7.5

5. 氧吸收和二氧化碳放出高于对照菌株, 如图 6 所示。反应系统: 磷酸缓冲液 0.1M, pH5.6, 温度 37 $^{\circ}$ C, 葡萄糖 5 mM。各株蛋白质含量控制在 3.0 mg/ml。

讨 论

从上述试验结果说明小菌落突变株的突变频率较高, 且性状稳定, 从生理生化特性来看, 都证明有较强的发酵能力。

国外利用呼吸链缺陷型变种在啤酒和酿造方面都已有一些成功的例子^[10], Costa 等^[11]并证明小菌落突变株的线粒体 DNA 有缺失, 细胞色素 C 氧化酶也缺少。我们从电镜所观察到线粒体的变化可能也属于线粒体 DNA 缺失。

参 考 文 献

- [1] Slonimski, P. P. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30: 232—239, 1968.
- [2] Costa, S. O. P. and M. Bacila: *ibid*, 53: 531—538, 1973.
- [3] Juliani, M. H. and S. O. P. Costa: *Mutant. Res.*, 29: 67—75, 1975.
- [4] Horii, J. and M. Bacila: *Proceedings of the International Symposium on Pure and Applied Biochemistry of Yeasts, Universidade de Sao Paulo Brazil* p. 19, 1977.
- [5] Nagai, S.: *Science*, 125: 928—929, 1957.
- [6] Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, 31: 426—428, 1959.
- [7] Conway, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error.*, p. 246—255, 1962.
- [8] Racker, E.: *Alcohol Dehydrogenase from Baker's Yeast, "Methods in Enzymology"* (ed. by Colowick, S. P. and N. O. Kaplan), 1: 500—502, 1955.
- [9] Levin, R. and R. W. U. Brever: *Lab. Clinical Med.*, 38: 474—476, 1951.
- [10] Siinhankova, L.: *J. Inst. Brew.*, 76: 289—295, 1970.
- [11] Costa, S. O. P. and M. Bacila: *An Acad. Bras. Ciens.*, 43: 711—723, 1971.