

# 酵母菌絮凝机理研究进展及应用前景

张博润 任 健\* 刘玉方

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

近十年来,酵母絮凝机理的研究日益受到重视,这主要是由于絮凝是发酵工业,如啤酒酿造、酒精发酵和单细胞蛋白生产中使用的酵母菌的一个重要特性。酵母的絮凝对产品的质量和产物与培养基的分离具有重要意义。目前对酵母菌絮凝机理的研究已取得重要进展,并开展了絮凝机理的遗传学及分子生物学研究。本文对该领域的研究进展和应用前景作一简要综述。

## 1 酵母细胞絮凝的分类及絮凝的分型

酵母细胞产生凝聚现象的原因主要有三种:a.链形成凝聚:在酵母细胞繁殖过程中,芽细胞未能从母细胞脱落,不断地进行细胞繁殖之后形成细胞链;b.交配凝聚:由不同交配型细胞交换交配信息之后,通过细胞表面特殊的蛋白与蛋白连接引起细胞凝聚;c.无性絮凝:由细胞表面蛋白和酵母细胞外壁的甘露聚糖结合所引起的细胞凝聚,即真正的絮凝。根据生理生化实验及糖抑制作用类型,将酵母絮凝分为FLO1型和New Flo1型。Calleja将啤酒酵母凝聚现象归纳成图1所示<sup>[1]</sup>。

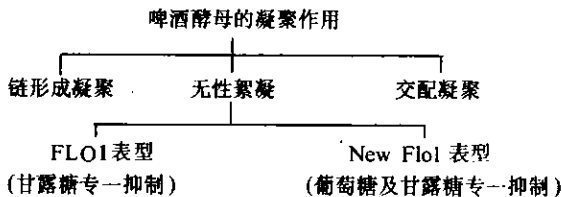


图1 啤酒酵母絮凝的分类

除啤酒酵母外,相继在其它酵母(如异常汉逊酵母,巴斯德毕赤酵母,路德酵母及粟酒裂殖酵母等)中也发现了絮凝现象,并做了一些研究,但大部分工作仍集中于啤酒酵母。

## 2 酵母絮凝的生理生化特性

**2.1 无机离子效应:**絮凝形成受培养基中无机盐的影响。钙盐是最有效且必不可少的促进剂,但可能受其同系物的竞争性抑制。其它离子则是通过诱发  $Ca^{2+}$  泄漏或释放而促进絮凝<sup>[2]</sup>。另外,还存在着无机离子的非专一性多效作用,即低浓度促进絮凝高浓度抑制絮凝<sup>[3]</sup>。

**2.2 糖抑制现象:**早期的研究指出,酵母絮凝受一些单糖和二糖(如葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘露糖等)抑制。最近发现低温减缓酵母的代谢后,其絮凝仍可受糖抑制。在此温度下,甘露糖大大降低了絮凝键的强度<sup>[4]</sup>。

**2.3 蛋白质变性剂作用:**Eddy等人用木瓜蛋白酶处理絮凝酵母细胞,证明絮凝被破坏,第一次发现了细胞表面蛋白在絮凝中起作用<sup>[5]</sup>。以后的研究相继发现蛋白质变性剂和蛋白酶对酵母细胞絮凝的不可逆抑制。利用蛋白酶作用可将FLO1和New Flo1表型区分开。蛋白酶E能够快速裂解FLO1和New Flo1菌株的表面蛋白并破坏其絮凝作用。New Flo1表型菌株对胰蛋白酶或蛋白酶K的消化作用极为敏感,而FLO1表型菌株仅缓慢地受这些酶的作用。推测New Flo1表型菌株的细胞表面蛋白含有更多的易被蛋白酶裂解的键<sup>[6]</sup>。

**2.4 pH的变化对絮凝的影响:**pH值对絮凝的影响也很明显。FLO1型菌株能在较低的pH下絮凝,而New Flo1型则要求较高的pH值。较低的pH可能会损害其细胞表面蛋白,从而影响New Flo1型菌株的絮凝能力<sup>[7]</sup>。

\* 辽宁师范大学代培硕士生

1995-04-20 收稿

**2.5 温度对絮凝的影响:**培养温度的变化对某些菌株的絮凝特性也有一定影响,研究发现某些酵母菌株的絮凝为温度敏感型。最近 Fernandes 首次报道了一株非絮凝酵母(马克斯克鲁维酵母)因温度改变而形成絮凝,暗示了生长温度的改变对细胞表面蛋白的影响,从而导致絮凝<sup>[8]</sup>。

另外,还发现将某些弱(非)絮凝酵母混合时,呈现强絮凝,即所谓“共絮凝现象”。这表明絮凝的供体与受体是不同的<sup>[9]</sup>。

### 3 絮凝机制的假说

**3.1 早期解释絮凝现象的几个假说:**早期的有关研究者根据各自对酵母絮凝现象的观察与研究,相继提出了试图阐明絮凝机制的一些假说,较有影响的有“絮凝共生假说”、“蛋白质沉淀假说”、“絮凝胶体假说”、“钙桥假说”等。他们试图从酵母污染、培养基内蛋白依附酵母细胞壁、胶体颗粒、钙离子作用等方面解释酵母细胞的絮凝机理。但这些假说各有缺陷,目前已被普遍接受的类外源絮凝素假说代替。

**3.2 类外源絮凝素假说:**这个假说指出是酵母细胞壁上的特定表面蛋白与其他酵母细胞的甘露糖残基之间的专一性结合引起絮凝。絮凝的供体仅在絮凝细胞上发现,对蛋白酶敏感,曾纯化和鉴定了与絮凝有关的蛋白。但供体蛋白的分子鉴定尚未见报道;受体存在于絮凝和非絮凝细胞上,对蛋白酶不敏感,受 ConA 和高碘酸作用而冻结,受甘露糖专一性抑制,这意味受体是甘露聚糖残基<sup>[10]</sup>。而细胞壁缺失甘露聚糖的酵母,如粟酒裂殖酵母缺乏絮凝受体。至于 New Flo1 型絮凝,可能存在不同的外源絮凝素机制,但 FLO1 与 New Flo1 的受体相似。即为  $\alpha$ -(1-3)-连接的甘露糖侧链的非还原末端,长度为 2~3 个甘露吡喃糖残基<sup>[4]</sup>。通过对共絮凝现象的研究,发现甘露聚糖侧链序列的精细结构对受体是必不可少的<sup>[11,12]</sup>。

**3.3 病毒假说:**Stratford 最近提出了有关酵母絮凝机理的病毒假说,外源絮凝素可能从酵母的一种感染剂(病毒)产生,而非酵母本身产生。这一假说得到新近研究结果的支持,如酵

母絮凝可能受病毒转移激活蛋白表达的诱导<sup>[13]</sup>。还发现 Kill-L 病毒与 FLO 表型伴随并且 Lds RNA 与假定的絮凝结构基因相一致,这提示了酵母絮凝是 Kill-L 病毒外壳蛋白表达的结果。但是,病毒假说是基于间接证据的推理,需要进一步的实验证明。

### 4 絮凝的遗传学研究

**4.1 早期的遗传学研究:**酵母絮凝遗传学基础是由几位早期的研究者提出的。但他们并未指出酵母细胞凝集起因于链形成、交配还是絮凝。1951 年在 Brighton 举行的欧洲酿造会议提出酵母细胞絮凝是一种可遗传的特性,成为应用现代科学研究絮凝的转折点。

**4.2 FLO 基因的发现与研究:**利用啤酒酵母菌株为实验材料,人们发现了三个决定絮凝特性的显性基因(FLO1、FLO2 和 FLO4)及一个半显性基因(flo3)。Russell 研究证明 FLO1、FLO2 和随后发现的 FLO4、FLO8 是等位基因<sup>[14]</sup>,后来统称作 FLO1 基因,其位置在染色体 I 上 3' 端离染色体 I 右端 24kb。最近, Watari 等<sup>[15]</sup>对 FLO1 基因进行了克隆和序列分析,完整的 FLO1 基因的开读框架由编码 1537 个氨基酸蛋白的 4611bp 所组成。FLO1 蛋白的显著特征是含有四种重复序列和大量的丝氨酸和苏氨酸。FLO1 蛋白的 N-和-C-末端区域呈疏水性,含有膜结合区域,表明 FLO1 蛋白是一种整合膜蛋白。Bidard 等<sup>[16]</sup>进行了 FLO5 基因的克隆和分析,在不同酵母菌株中表达研究证明 FLO5 基因是显性基因,它的表达受某些遗传因素控制。可以根据生理生化实验分析区别 FLO5 和 FLO1 基因控制的絮凝表型,但其遗传基础的差别还未建立。通过不同絮凝基因的克隆和表达,将为研究絮凝机理提供新的手段和方法。FLO5 是与 FLO1 不等位的显性基因,定位于染色体 VIII 上。FLO5 与 FLO1 表型可通过热处理或蛋白酶处理来区分。FLO5 和 FLO1 结构相似,转录产物相同,推测亦为结构基因。此外,还发现了隐性基因 flo6、flo7,可能是 FLO1 的等位基因<sup>[17]</sup>。显性基因 FLO9 位于染色体 I 上,与 arg4 呈松散连

表 1 至今发现的与絮凝有关的基因

基因	等位基因	附注
FLO1	FLO2 FLO4 FLO8	Flocculin, Chr.I
flo3		Semi-dominant
FLO5		Flocculin, Chr.VII
flo6		Recessive
flo7		Recessive
FLO9		Flocculin, Chr.I
FLO10		Flocculin, Chr.Xf
sfl1		Suppressor
fsul		Suppressor
fsu2		Suppressor
fsu3		Suppressor
tup1	aar1 aer2 amml cyc9 flk1 sfl1 umr7	Repressor of trans- cription
ssn6	cyc8	Repressor of trans- cription
ssn2-8		Repressors of snf1 mutation
FH4C		
pho2		Activator of trans- cription
LSR1		Transcription factor
cka1 / cka2		Casein kinase II
kre6		(1-6) $\beta$ -glucan synthase
skn1		(1-6) $\beta$ -glucan synthase
abs		
wal		
fsp	DDR48	Floc.spec.protein DNA-damage- response
CHS2		Chitin synthase II
oxi2		Subunit 3 cyt-c- oxidase
olil		Subunit 9 ATPase
Ha-ras		Human Ha-ras
tax		HTLV-1 tax transactiv.

接,受交配型影响,在 a/a 和  $\alpha/\alpha$  中表达极弱。显性基因 FLO10 位于染色体 XI 上<sup>[18]</sup>。表 1 列出了至今发现的与絮凝有关的基因<sup>[19]</sup>。

4.3 絮凝遗传学的单基因模型和 FLO 正调节模型: FLO1、FLO5、FLO8 等是显性基因,通过杂交、原生质体融合实验及对这些基因分子克隆和分析,推测 FLO 基因编码絮凝作用所需的蛋白,可能是外源凝聚素本身,由此提出“单基因模型”<sup>[17]</sup>。

FLO  $\longrightarrow$  表面蛋白  $\longrightarrow$  絮凝现象  
flo (凝聚素)

但是,这种简单的模型显然不完善,因为像 *tup1* 或 *cyc8* 突变引起的絮凝表型和 FLO 菌株表型相同,这些突变显然不会凭空产生外源凝聚素基因。外源凝聚素基因必定在突变以前已存在于菌株之中,这意味着编码甘露糖专一性外源凝聚素的结构基因可能普遍存在于啤酒酵母中, FLO1、FLO5、FLO8 可能是调节基因,作用于未知的结构基因,于是,提出 FLO 正调节模型<sup>[20]</sup>(图 2)。其结构基因编码表面蛋白,在非絮凝菌株中不表达,但在 FLO 调节基因形成的激活因子存在的情况下,结构基因表达;激活因子由 TUP1 / CYC8 阻遏或由 *tup1* / *cyc8* 去阻遏。

TUP1  $\longrightarrow$  激活因子  
或  $\longrightarrow$  调节基因  $\longrightarrow$  结构基因  $\longrightarrow$  表面蛋白  
CYC8 FLO 和絮凝  
flo

图 2 FLO 正调节模型

由于 FLO 是显性基因,其产物作为外源凝聚素基因的激活子,而 TUP1 和 CYC8 基因产物可能为多效应调节因子<sup>[21]</sup>,与絮凝激活子和结构基因相互作用。这个模型得到 Williams 等人支持,他们提出 TUP1 和 CYC8 在分解代谢产物阻遏的调节中抑制某种转录激活因子<sup>[22]</sup>。另外, Kramer 等指出酵母絮凝可被病毒调节激活因子 (HTLV-1 Tax transactivator) 的表达所诱导<sup>[18]</sup>。这一发现也有力的支持了 FLO 是调节基因。但也有人持

反对意见,认为 FLO1 编码膜蛋白,因而是结构基因;目前,尚无直接证据说明 FLO 是调节基因,问题的关键在于找到凝聚素。Straver 等首次从酿酒酵母(絮凝性和非絮凝性)细胞壁分离到具有酵母细胞凝集活性的凝聚素。将分离纯化的凝聚素加入絮凝细胞后明显增强细胞的絮凝能力,加入非絮凝细胞而能使细胞呈弱絮凝能力。他们的研究指出絮凝细胞能释放凝聚素,非絮凝细胞不能释放凝聚素,当有甘露糖存在时抑制释放。絮凝酵母细胞在其生长过程中连续合成并释放凝聚素,而非絮凝酵母尽管也合成凝聚素,但不释放,因而无法与其他细胞表面的受体结合产生絮凝。所以酵母细胞絮凝能力取决于细胞是否释放凝聚素<sup>[23,24]</sup>。

**4.4 线粒体 DNA 的影响:**有人指出小菌落突变型丧失了絮凝能力。一些抗药性突变株也如此,这说明线粒体对絮凝有影响。Esser 等研究了其遗传机制,发现线粒体基因组的 *olie* 和 *oxi2* 两个位点如果同时缺失,则菌株会失去絮凝能力<sup>[25]</sup>。但利用这些基因构建絮凝酵母菌株却没有成功,这意味着非絮凝酵母不一定要缺失这些基因<sup>[26]</sup>。

**4.5 突变引起的絮凝:**除了 FLO 基因引起的絮凝之外,还发现一些突变也会引起絮凝,其表型与 FLO1 型的絮凝相似。如 *CYC8* 和 *TUP1*,它们具有相同的多效效应,而絮凝与这类突变引起的多效效应密不可分。对 *TUP1* 和 *CYC8* 的克隆和测序结果表明,除 *TUP1* 与编码 G 蛋白  $\beta$ -亚基同源外,未发现与其他蛋白同源,这意味着 *CYC8* 和 *TUP1* 具调节特性,其基因产物可能是多效调节因子<sup>[22]</sup>。此外,还发现 *abs*、*wal*、*PD7*、*SFL1*、*ckaZ* 突变也会引起絮凝。

## 5 絮凝的应用前景

酵母絮凝是受遗传因子控制、受环境因素影响的复杂现象。尽管对絮凝的遗传控制机理还不十分清楚,由于它在工业上有极大的应用前景,日益受到各国学者的重视。已有报道通过诱变、杂交、原生质体融合及基因克隆技术<sup>[27~30]</sup>构建絮凝酵母菌株。Watari 等人的研

究指出 FLO1、FLO8 在异源二倍体中表达受到很强的抑制,而 FLO5 则不受交配型基因的影响,他们将 FLO5 菌株与工业菌株杂交或原生质体融合,得到絮凝力强的酵母。这说明了 FLO5 对于提高工业菌株絮凝性的潜在价值<sup>[31]</sup>。Vezinhet 等通过 Cytoduction 技术构建了絮凝性强的葡萄酒酵母<sup>[28]</sup>。江慧修等<sup>[29]</sup>将一株发酵力强、啤酒风味好的非絮凝性酵母(卡尔斯伯酵母 B8)与强凝集性酵母 A43 融合,得到了几株具有强凝集性,并保留了 B8 的发酵力强、啤酒风味好的融合株。我们实验室从 1994 年起开展了酵母絮凝机理的研究,根据 FLO1 型和 New Flo1 型的不同生理生化特性,进行了分型研究,确定了一批 FLO 型和 New Flo1 型菌株。目前正在进行 FLO1 型基因的克隆和表达研究,并取得了一些结果。

随着对絮凝机制和絮凝遗传控制的深入研究,絮凝这一生产菌株的关键特性必将显示出其巨大的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Calleja G B. Cell aggregation. In Rose A H and Harrison J S(eds). *The Yeasts*, Vol.2, 2nd ed. Academic Press Ltd., London, 1987. 165~238.
- [2] Stratford M. *Yeast*, 1989C, 5: 487.
- [3] Calibo R L, Matsumura M, Kataoka H. *J Ferment Bioe*, 1989, 67: 40.
- [4] Stratford M, Assinder S. *Yeast*, 1991, 7: 559~574.
- [5] Eddy A A, Rudin A D. *J Inst Brew*, 1958, 64: 19.
- [6] Stratford M, Carter A T. *Yeast*, 1993, 9: 371~378.
- [7] Stratford M, Keenan M H J. *Yeast*, 1987, 3: 201.
- [8] Fernandes J. *Yeast*, 1993, 9: 859~866.
- [9] Eddy A A. *Chemistry and Industry*, 1957, 99.
- [10] Miki B L A, Poon N H, Janes A P, et al. *J Bacteriol*, 1982a, 150: 878~889.
- [11] Nishihara H, Toraya T. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 2721~2726.
- [12] Einspahr H, Parks E H, Phillips S R, et al., In "Lectins, Boilogy Biochemsitry, Clinical Biochemsitry", 1988, Vol.6, 245~263.
- [13] Kramer R A, Tomchak L, Ruben S M, et al. *Aids Res Hum Retroviruses*, 1990, 6: 1305~1309.
- [14] Russeu I, Stewart G G, Reader H P. *J Inst Brew*, 1980, 86: 120~121.
- [15] Watari J. *Yeast*, 1994, 10: 211~225.

- [16] Bidard B. *Curr Genet*, 1994, **25**: 196~201.
- [17] Johnston J R, Reader H P. *Proc 11th Int Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology*, 1982, 124.
- [18] Teunissen A W R H. PhD thesis. Leiden University, The Netherkands, 1995.
- [19] Teunissen A W R H, Steensma H Y. *Yeast*, 1995, **11**: 1001~1013.
- [20] Williams F E, Trumbly R T. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**: 6500~6511.
- [21] Stratford M. *Yeast*, 1992, **8**: 25~38.
- [22] Trumbly R J. *Gene*, 1988, **73**: 97~111.
- [23] Straver M H, Troas V M, Smit G, *et al.* *Yeast*, 1994, **10**(9): 1183~1194.
- [24] Straver M H, Smit G, Kijne J W. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(8): 2754.
- [25] Esser K, Henrichs J, Kues U. In Attia Y A. (ed.), *Flocculation in Biotechnology and Seperation Systems* Elsevier Science Publishers. B V, Amsterdam, 1987, 383~398.
- [26] Hinrichs J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**: 48.
- [27] Urane N. *J Biotechnol*, 1993, **28**: 237~247.
- [28] Vezinhet F, Barre P. *J Inst Brew*, 1992, **98**: 315~319.
- [29] 江慧修, 张金玲, 周坚, 等. *微生物学报*, 1993, **33**(1): 22~31.
- [30] Wateri J. *J Inst Brew*, 1994, **100**: 73~77.
- [31] Wateri J, Kudo M, Nishikawa N, *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990, **54**: 1677~1681.