

酵母菌耐酒精机制的研究进展

池振明 高 峻

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

关键词: 酵母菌, 乙醇

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(1999)-05 0373 05

乙醇是酵母菌发酵糖的重要产物之一。但是当乙醇在培养基中累积到一定浓度时, 对酵母菌细胞产生有毒效应。然而, 不同的酵母菌菌株对一定浓度的乙醇有不同的抗性, 而且在不同培养条件下和生长在不同的培养基中同一株酵母菌对一定浓度的乙醇也有不同的抗性。最近几年来, 有的学者从自然界中分离到了或通过遗传工程手段构建了一些能在短时间内产生高浓度酒精(发酵液中的乙醇浓度达到 17.5%v/v 以上, 而普通酵母菌只能产生 9%~11%v/v 乙醇)的酵母菌^[1]。因此酵母菌耐酒精的生化机制引起了许多研究者的浓厚兴趣, 因为研究酵母菌耐酒精的生化机理对于提高发酵工业的酒精产量和弄清微生物抵抗不良环境的生命机制有重要的实际和理论意义。

现在发现酵母菌耐酒精的生化机理是十分复杂的, 细胞中的许多组份与酵母菌耐酒精能力有密切的关系, 所以细胞的许多基因控制着酵母菌耐酒精的特性, 而且这些具体生化机理远还未弄清。酵母菌细胞的线粒体、冲击蛋白、质膜 ATP 酶和海藻糖也与耐酒精能力有一定的关系。本文就近年来在这方面的研究进展做一些简要的介绍。

1 脂肪酸与酵母菌耐酒精能力的关系

随着发酵培养基中的乙醇浓度增加, 乙醇可以插入膜的疏水区, 结果减弱了水格子结构, 降低疏水性相互作用力(这种作用力对于维持膜完整性是非常重要的)。乙醇在疏水区的存在还会降低范德华相互作用力, 增加膜的运动性和疏水区的极性, 使膜减弱了对极性分子自由交换的疏水性障碍作用。

所有这些乙醇效应都会降低细胞膜的完整性, 导致膜渗透性功能下降, 引起细胞内物质泄漏。那么细胞

膜含有更多的长链脂肪酸可以增加疏水区的表面积和范德华相互作用力, 降低膜疏水区的极性, 从而恢复细胞膜的渗透性功能。据报道长链脂肪酸还可以增加疏水区的厚度, 阻止乙醇进入疏水区。所以细胞膜的脂肪酸与酵母菌耐酒精有密切的关系。

Beaven 等人^[2]把乙醇加入到 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞悬液中, 浓度从 0.5~1.5mol/L, 结果导致细胞膜中 $C_{18:1}$ 脂肪酸不断增加, 而 $C_{16:0}$ 脂肪酸不断下降, 这依次导致膜流动性增加。

还有一些耐酒精酵母菌细胞本身在生长过程中就可以合成较多的长链不饱和脂肪酸, 从而这些酵母菌细胞能抗较高浓度的酒精。最近, 我们研究了产高浓度酒精酵母菌和酒精敏感酵母菌的细胞膜组成, 发现前者在分批培养过程中能合成较多的 $C_{18:1}$ 脂肪酸, 而且在高浓度乙醇冲击(乙醇浓度达到 18%v/v)过程中, 死亡的速率明显比后者慢, 这说明长链不饱和脂肪酸与酵母菌耐高浓度酒精有密切的关系^[5]。Odumeru 等人^[4]利用 37℃ 热冲击处理或 10%(v/v)乙醇冲击处理酿造酵母菌, 发现细胞的 $C_{18:1}$ 和 $C_{16:1}$ 脂肪酸增加, 而 $C_{16:0}$ 脂肪酸在下降, 同时这些酵母菌可产生 11%(v/v)的乙醇。

在培养基中加入合适量的脂肪酸, 特别是不饱和脂肪酸, 这些脂肪酸很容易被酵母细胞吸收并被组入细胞质膜和线粒体膜中, 结果这些酵母细胞在酒精发酵过程中耐酒精能力有很大提高。在厌氧发酵过程中,

国家自然科学基金资助项目。(No.39370022)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39370022)

收稿日期: 1998-07-05, 修回日期: 1998-09-16

酵母菌不饱和脂肪酸和固醇合成受到抑制,这些酵母菌对乙醇的抑制效应特别敏感。如果给这些酵母菌补充含单一不饱和键的脂肪酸,那么它们对乙醇的抗性便增加,并且能产更高浓度的乙醇^[4]。

然而,酵母菌在酒精发酵过程中,由于缺氧,不饱和脂肪酸含量是在不断的下降,而饱和脂肪酸含量在连续上升。例如,我们发现产高浓度酒精酵母菌在高浓度酒精发酵过程中 $C_{18:0}$ 和 $C_{16:0}$ 脂肪酸量迅速上升,而 $C_{16:1}$ 和 $C_{18:1}$ 脂肪酸量却快速下降。但是有趣的是这些酵母菌可以合成大量的 $C_{10:0}$ 脂肪酸^[3]。Del Castillo Agudo^[6] 也报道耐酒精酵母菌株 LA1 细胞可以合成 $C_{12:0}$ 脂肪酸。所以我们认为当细胞中不饱和脂肪酸合成受到抑制,膜流动性下降时,产高浓度酒精酵母细胞中的短链脂肪酸量的增加一样可以提高膜的流动性。这也许是酵母菌耐高浓度酒精的机制之一。大家都知道当把酵母细胞固定在某些不溶性载体上时可以提高酵母菌的耐酒精能力。有趣的是与游离细胞相比,固定化细胞可以合成更多的饱和脂肪酸。Hilge-Rotmann 等人^[7]猜想细胞含有较多饱和脂肪酸,尤其是长链饱和脂肪酸有利于酵母菌更快地从细胞中除去乙醇。

上述结果表明,在不同条件下,酵母菌耐酒精的机制是很不相同的。

然而,最近 Swan 等人^[8]在研究酵母菌膜脂肪酸组成和膜流动性后,发现膜脂肪酸、膜流动性和酵母菌耐酒精之间并没有明显的相互关系。Aguilera 等人^[9]也认为酵母菌的乙醇敏感突变株和野生型菌株在膜脂肪酸组成方面并无差别。这些结果说明酵母菌耐酒精的机制是很复杂的,不同的菌株其耐酒精的生化机制是不一样的。

2 磷脂与酵母耐酒精能力的关系

磷脂是细胞膜的最重要成分,所以人们自然会想到它们在酵母耐酒精方面可能起着重要的作用。例如,人工加入 PC(phosphatidylcholine)可以提高清酒酵母细胞生长速率、酒精发酵活力和乙醇耐受力^[2,10]。然而,Mishra 等人^[2]发现富含 PS(phosphatidylserine)的酿酒酵母细胞对乙醇具有抗性,而富含 PE(phosphatidylethanolamine)和 PC 的酵母细胞对乙醇的抗性却较差。但是,我们最近的研究结果^[3]表明产高浓度酒精酵母菌在酒精发酵过程中其细胞中的 PC 和 PE 含量在不断的下降,而 PI(phosphatidylinositol)含量在整个发酵期内

基本保持不变。根据这种现象,我们推测 PI 可能对酵母菌高产酒精和耐高浓度酒精起一定的作用。

Arneborg 等人^[11]根据他们的研究结果也建议 PI 可能在酵母细胞适应乙醇过程中起主要的作用。

为了证实 PI 确实在酵母菌耐高浓度酒精和产高浓度酒精过程中起着重要的作用,我们研究了产高浓度酒精酵母菌细胞 PI 含量对高产酒精和耐高浓度酒精的影响。在酒精发酵过程中,当细胞 PI 含量较高时,酵母菌产酒精的速率和培养基中累积的最终乙醇产量都较高,这表明 PI 对于酵母细胞产酒精速度和高产酒精起着重要的作用。在高浓度乙醇冲击处理(乙醇浓度为 18%v/v)过程中,低 PI 含量的细胞死亡的速度明显快于高 PI 含量的细胞。这些结果明显地说明 PI 在酵母菌耐高浓度酒精过程中起着非常重要的作用^[3]。但是,在分子生物学和生物化学方面,PI 是如何发挥高产酒精和耐高浓度酒精的作用还不清楚。我们认为高浓度的 PI 可能对质膜蛋白质特别是 ATP 酶和质膜完整性起保护作用,以免受高浓度酒精的有害影响,但这种假设需要用实验来证实。

3 麦角固醇与酵母耐酒精能力的关系

酵母细胞中的麦角固醇被认为与耐酒精能力有关系,因为麦角固醇是酵母细胞固醇类中最主要的一种化合物,由于它的特殊化学结构,能增加细胞膜的坚固性,从而在有乙醇存在的情况下膜具有更好的稳定性,并且麦角固醇在细胞膜上能形成障碍物从而阻止乙醇进入细胞^[2]。当细胞合成更多的麦角固醇时,能促进酵母细胞生长。给培养基添加麦角固醇也可以明显地促进清酒酵母对酒精的耐受性^[2]。最近,我们发现与酒精敏感工业酵母菌 001 菌株相比,产高浓度酒精酵母菌 1200 菌株在有氧分批培养过程中能合成较多的麦角固醇,而且这些产高浓度酒精酵母菌在高浓度乙醇冲击过程中,死亡的速率明显比酒精敏感酵母菌慢,这说明麦角固醇与酵母菌耐高浓度酒精有密切的关系^[5]。

然而,酒精酵母菌的酒精敏感突变株与它们的野生型相比,在麦角固醇含量方面并无差别。Novotny 等人^[12]发现他们所用的酵母菌株 FL100 菌株麦角固醇占所有固醇含量的 90%,而其它菌株麦角固醇含量较低,但是它们在乙醇致死过程中,对乙醇的耐受力并无区别,所以他们认为不同麦角固醇含量的酒精酵母菌与

耐酒精能力并无直接的联系。

4 线粒体与酵母菌耐酒精的关系

线粒体在酵母菌耐酒精能力方面起着重要的作用,而且被认为线粒体膜或细胞膜的脂类不同是与酵母菌耐酒精和线粒体的其它生物学功能密切相关。Aguilera 等人^[13]在研究线粒体活力和耐酒精后,认为酒精酵母菌存在有高活力的线粒体和氧化代谢反应对于减少乙醇对生长速率、发酵速率或呼吸速率的抑制是必不可少的,有氧培养的野生型酵母菌其 K1 值(乙醇抑制常数)比小菌落突变型或厌氧培养的酵母菌的高得多。最后,他们得出结论野生型耐酒精能力比小菌落突变型大是由于细胞组分和细胞生理的不同,而不是呼吸代谢本身的不同。

乙醇能强有力地诱变酒精酵母菌掉失线粒体 DNA 而成为呼吸缺陷型,即所谓的小菌落突变型。与野生型酵母菌相比,小菌落突变型在含有不同乙醇浓度的培养基中生长时,其耐受的乙醇浓度较低。在乙醇冲击过程中,死亡的速率明显加快。如果把耐酒精酵母菌细胞的线粒体转移到呼吸缺陷型细胞中,后者的耐酒精能力和产酒精能力明显加大,这再度说明线粒体在酵母菌耐酒精过程中起着非常重要的作用^[14]。我们发现与产高浓度酒精酵母菌相比,在高浓度乙醇冲击过程中,酒精敏感酵母菌很容易失去线粒体 DNA 而成为呼吸缺陷型^[5]。

那么,现有结果表明乙醇并不能破坏分离纯化的 DNA 或野生型酵母菌细胞的染色体 DNA,但对线粒体膜和细菌细胞膜有强烈的损伤作用。很可能与细菌 DNA 一样,线粒体 DNA 是附着在线粒体内膜上,所以线粒体膜受到乙醇破坏以后,酵母菌细胞便掉失线粒体 DNA。Jimenes 等人^[14]发现,与野生型酵母菌相比,麦角固醇合成突变型酵母菌很容易自发地失去线粒体 DNA 而成为呼吸缺陷型,这可能表明线粒体 DNA 的掉失与细胞膜或线粒体膜组份有一定的关系。现在还有证据表明在乙醇作用下线粒体 DNA 的掉失还与线粒体 DNA 本身的性质有关。如果这些假设是真的话,那么耐酒精酵母菌线粒体膜脂类和线粒体 DNA 一定不同于酒精敏感酵母菌线粒体膜脂类和线粒体 DNA,所以分离并测定耐酒精酵母菌和酒精敏感酵母菌线粒体膜脂类和线粒体 DNA,然后比较它们的不同,对于进一步弄清酵母菌耐高浓度酒精的机制有重要的意义。

5 冲击蛋白与酵母菌耐酒精能力的关系

酵母菌细胞受到特殊环境突然冲击后,在细胞中能合成一套蛋白质,把这些蛋白质叫做冲击蛋白。这些特殊环境包括高温(亚致死温度)、高浓度酒精、高浓度重金属离子、高浓度 NaCl 等等。一旦细胞合成了这些蛋白质,这些细胞便得到了保护,并可以适应这些特殊环境和在这些环境中生存下去。据认为这些蛋白质可以导致细胞累积异常或未折叠的蛋白质^[2]。

酵母通过热冲击产生的蛋白质和通过乙醇冲击产生的蛋白质是一样的。所以通过热冲击产生的蛋白除了能使酵母菌细胞获得热抗性外,也能使它们提高耐酒精的能力。这样一旦酵母细胞获得热冲击蛋白,它们在有乙醇存在的环境中存活能力便得到提高。可以通过热冲击获得耐酒精的酵母菌,例如利用热冲击和乙醇冲击处理技术获得一株抗高浓度酒精的酵母菌 37(5),该株酵母菌能在含有 15%、16% 和 17%(v/v)乙醇的培养基中生长。与亲本菌株比较,它具有较高的乙醇生产能力。

有人^[2]通过热冲击在酒精酵母菌中分离到热冲击抗性突变株,与野生型菌株相比,这些突变株除了能抗热外,还能抗 UV 光辐射和抗 15% 的乙醇。

6 海藻糖与酵母菌耐酒精能力的关系

海藻糖是酵母菌合成的由两分子葡萄糖通过 α -1,1-糖苷键连接而成的一种非还原性二糖。当酵母菌细胞生长在高温,含有乙醇或重金属环境中时,在酵母生长处在稳定期期间,便累积海藻糖。除了作为碳水化合物储存物外,海藻糖还有稳定细胞膜和蛋白质,保护细胞的功能,在各种不利的条件下,海藻糖可以维持酵母菌细胞的各种结构。Odumeru 等人^[4]发现用热和乙醇冲击处理酒精酵母菌过程中,酿造酵母菌除了可以增加不饱和脂肪酸外,酵母细胞内的海藻糖含量明显增加,这可能可以保护细胞以免受到乙醇冲击的不利影响,而且在发酵过程中,发酵液中乙醇浓度明显增加。Mansure 等人^[15]发现当酵母细胞含有高浓度海藻糖时,可以抑制由乙醇引起的细胞内含物的泄漏和提高酵母菌细胞在 10%(v/v)乙醇培养基中的存活率。据报道海藻糖可以与膜磷脂极性磷酸基团结合,从而稳定了细胞膜。

7 质膜 ATP 酶与酵母菌耐酒精能力的关系

质膜 ATP 酶在消耗 ATP 能量后能把细胞内的质子

抽到细胞外,从而在质膜上建立起质子推动力,当这种质子推动力消失时,便可以给酵母细胞的物质主动运输提供能量。据报道这种跨膜质子推动力的形成和维持对乙醇非常敏感,而且质膜ATP酶也是乙醇作用的主要目标。乙醇可以通过抑制质膜ATP酶活力,从而使细胞内的质子无法被抽出,或通过增加质膜对质子或其它阳离子的渗透性,从而加快胞外的质子被动地流入胞内,或者同时利用这两种方式,来影响膜电位和质子梯度。

Alexandre等人^[16]通过比较生长在不含有乙醇的酵母细胞质膜ATP酶活力和生长在含有10%(v/v)乙醇的酵母细胞质膜ATP酶活力后,发现质膜ATP酶本身的物理和化学特性没有改变,但是在含有10%(v/v)乙醇中生长的酵母菌质膜ATP酶得到活化,并且对乙醇的敏感性降低。这说明酵母菌细胞适应了乙醇之后,质膜ATP酶活力发生了变化。Posa等人^[17]发现对乙醇抗性较差的*Kluyveromyces marxianus*质膜ATP酶对乙醇的敏感性要比耐酒精的*S.cerevisiae*相应质膜ATP酶大的多,这说明质膜ATP酶与酵母菌耐酒精有一定的关系。Panaretou等人^[2]发现*S.cerevisiae*突变株其质膜ATP酶发生了变化,结果与野生型菌株相比,这些突变株能抗较高浓度的乙醇和高浓度的盐。

这些酵母菌质膜ATP酶活力的变化与质膜的脂类环境有很大的关系。例如长链脂肪酸可以增加ATP酶活力。另外一些人发现质膜的固醇与磷脂的比例是决定质膜ATP酶最大活力的关键因素。

8 酵母菌耐酒精能力的遗传基础

尽管最近几年在酵母菌耐酒精机理研究方面取得了一些进展,但是酵母菌耐酒精能力的遗传基础至今还十分不清楚。现在普遍认为酵母菌耐酒精的机制是受到多基因系统调节的。例如从二倍体酒精酵母菌中分离得到的分离子在耐酒精能力方面是不同的,每一单倍体菌株的耐酒精能力都不会超过亲本的耐酒精能力,利用这些单倍体进行杂交所获得的某些二倍体在耐酒精能力方面超过了亲本菌株,这些结果说明酵母菌耐酒精不是受单一基因的控制。所以要想通过基因工程的方法提高酵母菌耐酒精的能力是非常困难的,比较理想的方法是单倍体杂交和原生质体融合技术,利用这些方法提高酵母菌耐酒精能力已有了许多成功

的例子^[1]。

综上所述,我们可以看出尽管最近几年在酵母菌耐酒精机制研究方面取得了许多进展,但是酵母菌耐酒精的生化机制是十分复杂的,并且受多基因控制,通过进一步对酵母菌耐酒精机制的了解,可以利用最新的基因工程技术把有关的基因克隆到工业酵母细胞中,以便改良这些酵母菌。

参 考 文 献

- [1] Chi Z M, Xu P, Liu J G *et al.* Chinese Journal of Biotechnology, 1995,11(3):171~176.
- [2] Mishra P. Tolerance of Fungi to Ethanol, In: Jennings D H ed. Stress Tolerance of Fungi. Marcel Dekker, Inc, 1993,189~208.
- [3] Chi Z M, Kohlwein S P, Paltauf F *et al.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1998(in Press).
- [4] Odumeru J A, D'Amore T, Russel I *et al.* J Industrial Microbiol, 1993,11(1):13~19.
- [5] Chi Z M, Arneborg N. Journal of Industrial Microbiology, 1998, (in Press).
- [6] Del Castillo Agudo L. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37(4): 647~651.
- [7] Hilge-Rotmann B, Rehm H J *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 34(4):502~508.
- [8] Swan T, Watson K *et al.* Can J Microbiol, 1997, 43(1):70~77.
- [9] Aguilera A, Benitez T *et al.* Arch Microbiol. 1986, 143:337~344.
- [10] Shin C S, Song J Y, Ryu O H *et al.* Biotechnol Bioeng, 1995, 45(3):450~453.
- [11] Arneborg N, Hoy C E, Jorgensen O B *et al.* Yeast, 1995, 11(4):953~959.
- [12] Novotny C, Flieger M, Panos J *et al.* Biotechnology and Applied Biochemistry, 1992,15(2):314~320.
- [13] Aguilera A, Benitez T. Arch Microbiol, 1985, 142(2):389~392.
- [14] Jimenez J, Benitez T. Curr Genet, 1988, 13(3): 461~469.
- [15] Mansure J J C, Panek A D, Crowe L M *et al.* Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1191(2):309~316.
- [16] Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C *et al.* FEMS Microbiology Letters, 1994, 124(1): 17~22.
- [17] Rosa M F, Sa-Correia I *et al.* Enzyme Microb Technol, 1992, 14(1):23~27.