

# 一组同源倍体啤酒酵母的亚显微形态和 发酵生理的比较研究\*

徐 浩 江慧修

(中国科学院微生物研究所, 北京)

前文<sup>[1]</sup>曾报导过我们获得并确证的一组同源倍体酵母系列。在本文中我们进一步对这组酵母在电子显微镜(以下简称电镜)下的形态,及发酵生理特性做了比较研究,特别着重于多倍性与半乳糖适应发酵的关系,期能廓清酵母的半乳糖适应发酵是否与核有相关性的这一久已存在的问题<sup>[2]</sup>,并对这组倍体酵母菌株可能的经济价值作一检验。工作分为超薄切片后的电镜形态观察及发酵生理实验两个部分。

## 材 料 和 方 法

所用材料是我们以前获得的同源啤酒酵母倍体系列的菌株:

$n_1$ ——单倍体,图表中以 I 表示;

2.576——二倍体,图表中以 II 表示;

35——三倍体,图表中以 III 表示;

66——四倍体,图表中以 IV 表示。

### (一) 形态观察的方法

取上述四个菌株(在 10 Brix 麦芽汁平板上, 28°C 中培养)的对数期生长物,用凉开水离心洗涤 3 次。用改进的 Yotsuyanagi (四柳)氏双重固定法<sup>[3]</sup>固定;或用 Luft 固定液固定 30 分钟(0°C 冰浴中)。固定后用蒸馏水洗 3 次,然后用 30%、50%、75%、95%、100% 酒精脱水,入 4 份甲基丙烯酸丁酯加 1 份甲基丙烯酸甲酯的混合单体中(换 1 次),再放入预聚成糖浆状(用干燥的过氧化苯甲酰作催化剂,重量比 2%)的上述比例混合物中在 58°C 条件下聚合成硬块。然后用硬质玻璃拉成的玻璃刀在瑞典 LKB 型 (Sjöstrand) 切片机上切片,用 2% 的醋酸铀钍水溶液染色 1.5 小时,除单倍体的一张照片是用日立 11A 电镜摄影外,其他都是用捷克产 Tesla 型电子显微镜进行观察和摄影。为了研究诸倍体菌株核体积间的关系,用 Reiss 牌求积仪测量各菌株电子显微镜照片中的核面积,求出其体积,以比较<sup>1)</sup>核体积间的计量关系,进而与生理实验结果相印证。在切片和包埋中所使用的甲基丙烯酸丁酯是根据文献<sup>[4]</sup>用甲基丙烯酸甲酯转酯制成的。转酯合成时,根据我们所用药品的纯度要求将条件和方法作了适当的简化。兹将改进的双重固定法和简化的转甲酯制备丁酯法扼要叙述如下:

(A) 双重固定法。取对数期(16—18 小时, 28°C 中)的酵母生长物,凉开水洗涤离心 3 次,用 10% 中性福马林液固定 2 小时。蒸馏水洗 3 次。用 pH 5 醋酸缓冲液配成的 RNA 酶 (Light 公司 4× 结晶品)液(15 毫克/45 毫升),在 37°C 中振荡处理 3 小时。所用酶液量为 8—10 毫升,菌种湿重约为 1

\* 本工作承施履吉先生时予指导,参加工作有那淑敏同志。在工作中承区嘉禧先生、薛吉年、关成来、林应锐、傅湘琦、孟景前、杨寿钧等同志先后给予帮助,兄弟单位生物物理研究所、动物研究所大力支援,并此致谢。

本文于 1965 年 1 月 12 日收到。

1) 本文各实验的显著性统计比较的  $t$  值置信界限均为  $t_{0.05}(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$ 。

克左右。处理除去 RNA 后,用 pH 7.4 巴比妥钠-HCl (均为北京试剂厂 II 级) 缓冲液洗涤 3 次,用 Palade 氏固定液在 0℃ 中固定 30 分钟。然后洗涤、脱水,如前所述。

(B) 甲基丙烯酸丁酯的制备。用味氏分馏柱在油浴中加热迴流转酯,分馏柱上端维持 64°—65° 左右,直到转酯完成 (在这一步中我们省去了采用部分冷凝器)。蒸汽带蒸依文献进行。减压分馏时没有通 CO<sub>2</sub> 保护,结果虽然有部分酯类因聚合而损失,但为量不大。减压分馏时用水泵抽气,维持水银柱高 70 毫米,在 58℃ 以上至 87℃ 之间搜集产品。这样产品虽然混杂有一定的低沸点化合物,但从包埋切片的效果上看来,仍然较市售商品更为透明,合用。产品依丁醇计算产量率在 70% 左右。

## (二) 发酵生理实验的方法

所用基质有葡萄糖和半乳糖两种,前者代表酵母利用的最普遍的基质<sup>[5]</sup>,后者则为适应发酵的基质<sup>[6]</sup>,用以下两种方法进行试验。

1. 用 Warburg 测压计法测耗氧率及充氮条件下的发酵。菌种培育用的基础培养基成分如下:

(A) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 克; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 克; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 克; 酵母汁(6%) 10 毫升。

(B) 葡萄糖 50 克。

(A) + (B) 加蒸馏水配成 1000 毫升。

所用菌株在上述培养基内培育 24 或 48 小时后,用 pH 5.6 磷酸缓冲液洗涤菌种 3 次,用缓冲液配成 2% 的菌液,当测定半乳糖的呼吸或发酵时,细胞先在 4% 半乳糖中,于 25℃ 在摇床上振荡 23 小时,或静置 22 小时,以使之对半乳糖适应,并进行细胞计数,然后测定呼吸或发酵。测压所得数据减去内源性部分,被细胞数目除后所得的值,以微升/百万细胞为单位,对着时间,经直线回归的统计处理,画成线性曲线,并用统计方法比较最后 60 分钟时各菌株间的差异的显著性。

2. 用发酵栓法,在有细胞增殖情况下的发酵测定;在 25 毫升含 5% 葡萄糖或半乳糖的基础培养基 (A) 内,接入 500 个细胞,瓶上装置 Alwood 氏发酵栓,在 25℃ 中培养,每 24 小时称重一次。另外在同样条件下培养,每隔一定时间取样用 Conway<sup>[7]</sup> 法测定酒精,用 Fehling<sup>[8]</sup> 法测定残糖。

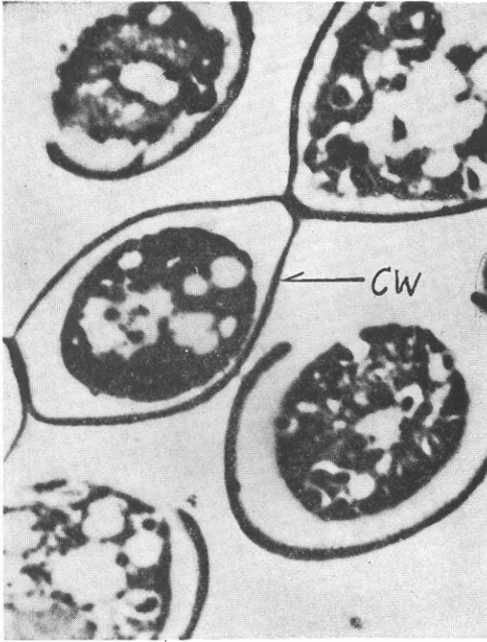
## 实验结果及讨论

### (一) 形态观察

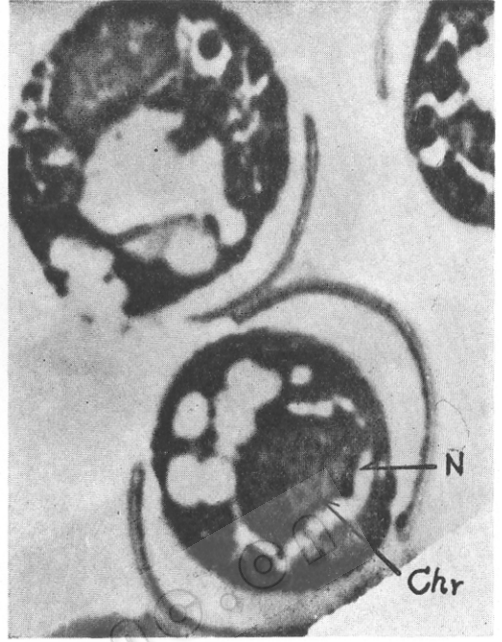
关于酵母的亚显微形态观察一直到最近还有人报导<sup>[9]</sup>。Pease<sup>[10]</sup> 曾经指出,由于酵母细胞内有丰富的 RNA,胞器被 RNA 深深地埋住,因此在制片观察上是一个异常困难的材料。在我们比较多倍体系列细胞的形态时,尝试了中性福马林和 Palade 液的双重固定法和 Luft 固定法。由照片结果看来, Luft 液固定的细胞收缩较少,且方法简单经济,核形态显示清晰,因此我们的大部分照片是用 Luft 液固定切片的。在照片中,由于我们所用的电子显微镜分辨率较低,而且培养时未强烈通气,取材时期又不在稳定期<sup>[11]</sup>,因此线粒体的形态构造未能清晰的显示出来。在比较倍体菌株时,我们测量了在普通光学显微镜下难于测度的核的面积,并折算成核体积,列表如下。

| 菌 株         | 测 量 个 数 | 核 体 积<br>( $\mu^3$ ) | 标 准 误 差<br>( $S_x$ ) | 比 例  |
|-------------|---------|----------------------|----------------------|------|
| 单 倍 体 (I)   | 28      | 1.45                 | $\pm 0.11$           | 1    |
| 二 倍 体 (II)  | 23      | 2.05                 | $\pm 0.25$           | 1.45 |
| 三 倍 体 (III) | 26      | 2.71                 | $\pm 0.44$           | 1.87 |
| 四 倍 体 (IV)  | 40      | 2.81                 | $\pm 0.25$           | 1.94 |

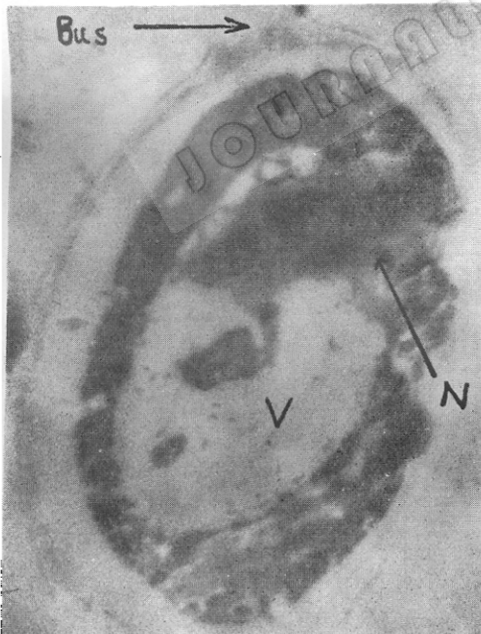
由以上的结果可以算出,多倍体系列间核大小在相邻倍体间 (除一和二倍体间之外)



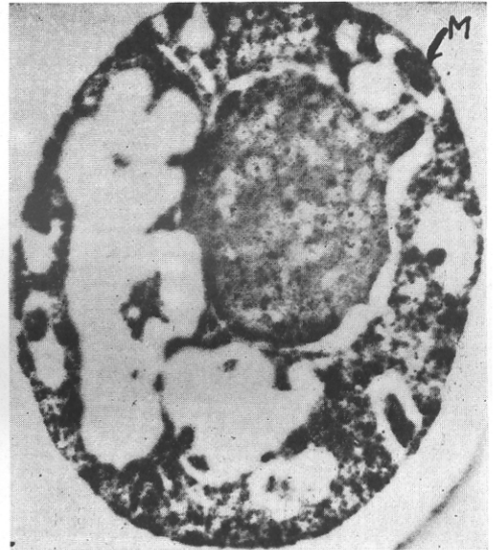
照片 1 Luft 固定的单倍体，示细胞连成短链状，7700 $\times$ 。



照片 2 Luft 固定的单倍体，在核内可以看到染色体，11400 $\times$ 。



照片 3 四柳法双重固定的单倍体，示芽痕、核、液泡，15200 $\times$ 。

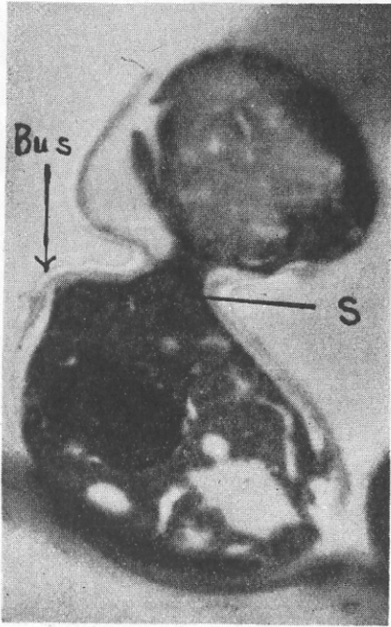


照片 4 Luft 固定的单倍体，21800 $\times$ 。

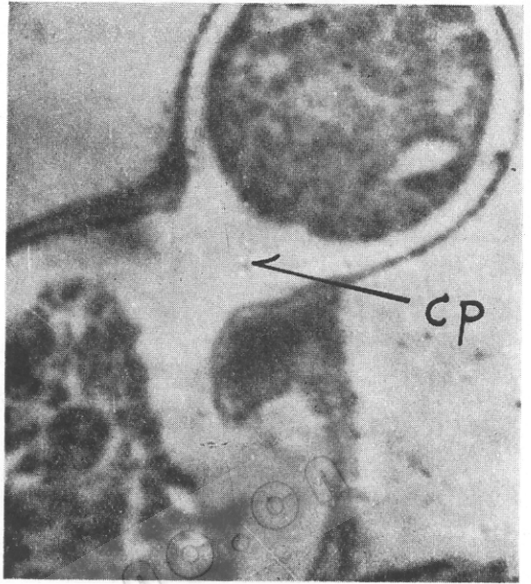
(照片 4 是用日本 Hitachi 11A 电镜摄影的)

照片内缩写说明

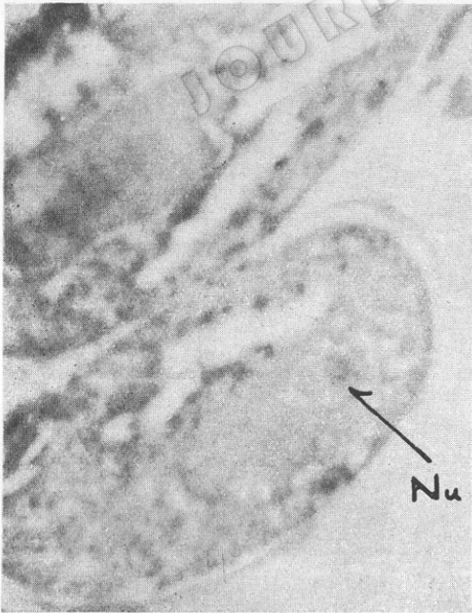
Bud 芽    BS 生殖痕    Bus 芽痕    Chr 染色体    CP 中央孔    CW 细胞壁    Iv 内陷囊  
M 线粒体    N 核    Nu 核仁    S 贮藏物    V 液泡    Vs 液泡内含物



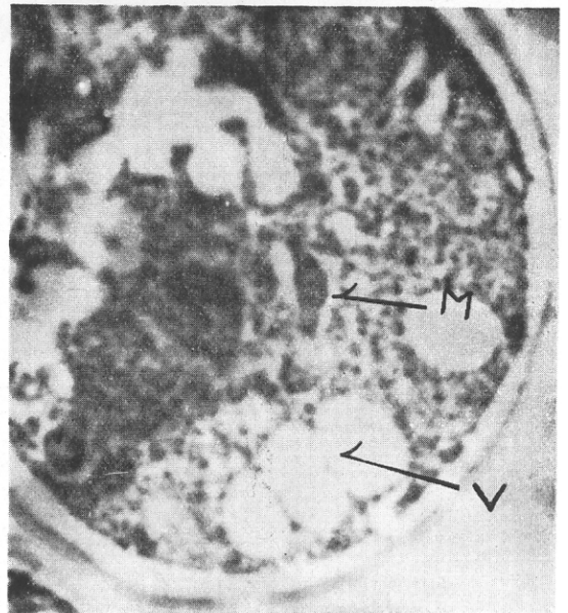
照片5 四柳法双重固定的二倍体,示核、液胞、贮藏物及芽痕, 15200 $\times$ 。



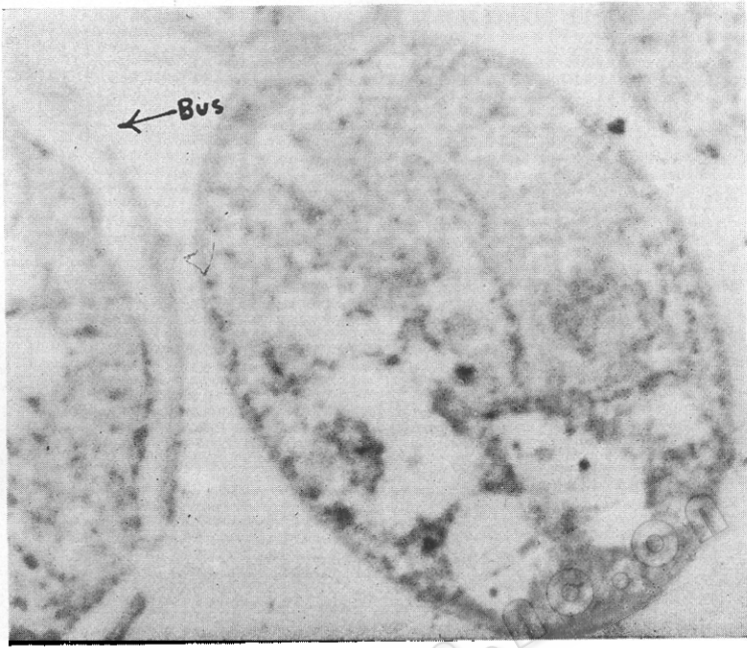
照片6 Luft 固定的二倍体,示中央孔, 15200 $\times$ 。



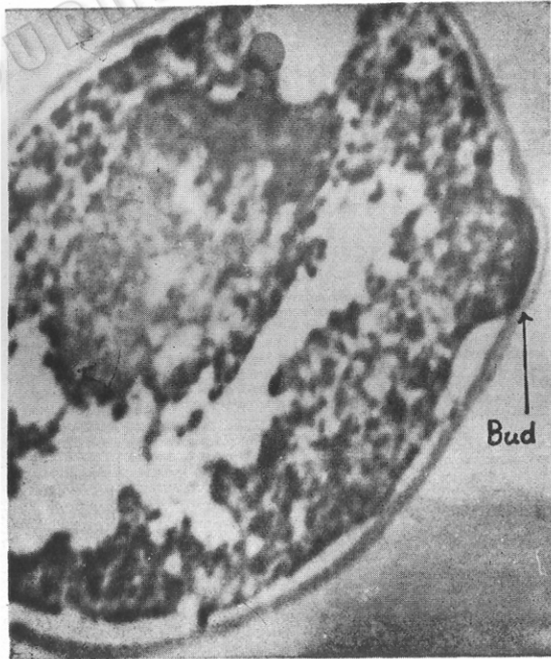
照片7 Luft 固定的二倍体,示核及核仁, 15200 $\times$ 。



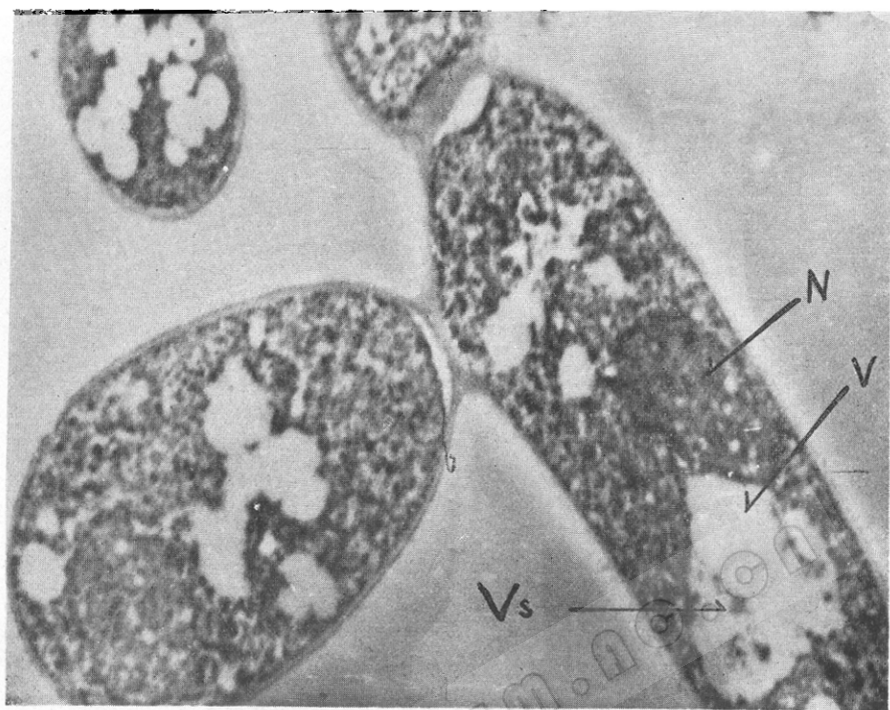
照片8 Luft 固定的二倍体, 15200 $\times$ 。



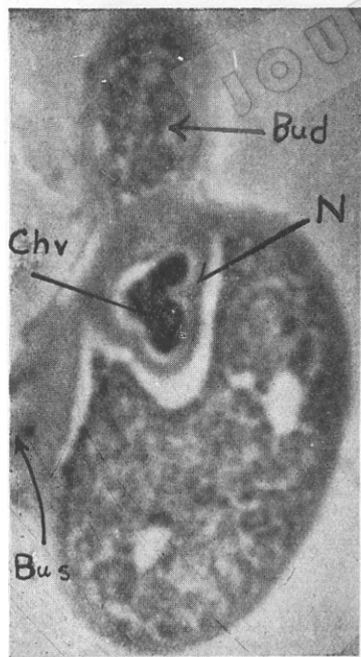
照片 9 Luft 固定的三倍体,成熟的芽尚未由母体脱落,  
25000 $\times$ 。



照片 10 Luft 固定的三倍体,清晰表明出芽是由原生质开  
始的,而壁是被动胀大的,15200 $\times$ 。



照片 11 Luft 固定的三倍体，15200 $\times$ 。

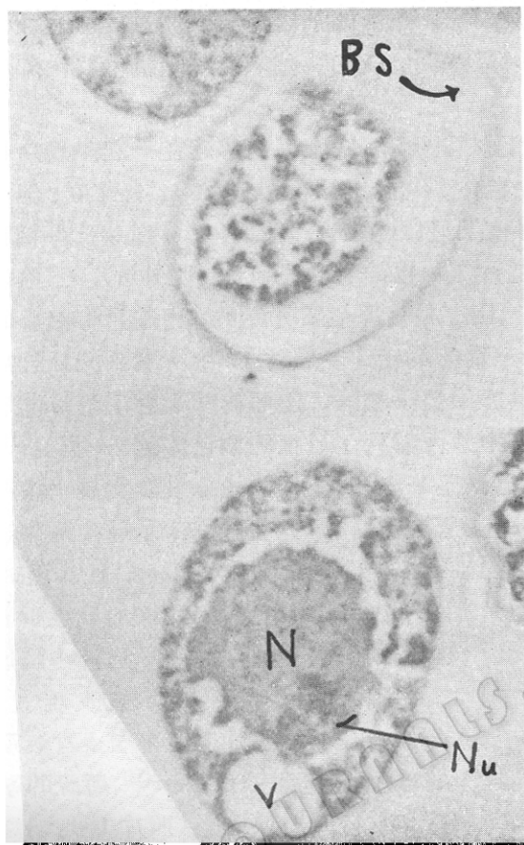


照片 12 Luft 固定的三倍体，在分裂后期，清晰的看到染色体，并表明是核内有丝分裂，15200 $\times$ 。

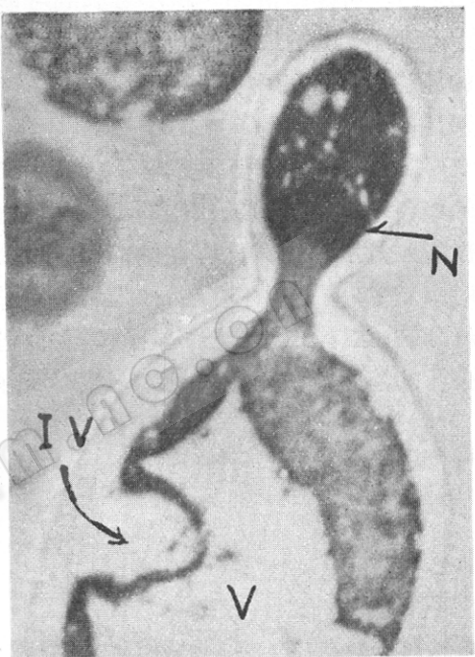


照片 13 四柳法双重固定的三倍体，示子核正通过中央孔，15200 $\times$ 。

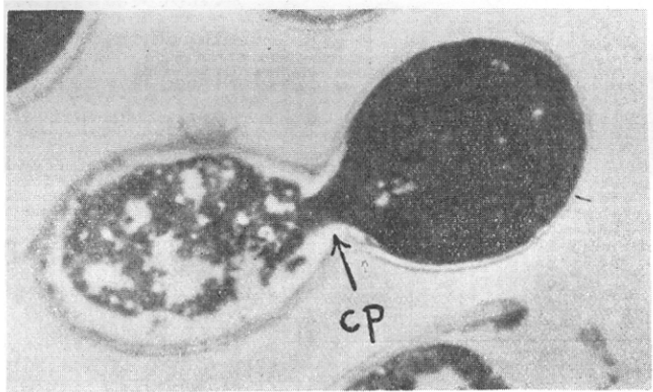




照片 14 Luft 固定的四倍体, 示核, 核仁及生殖痕, 具生殖痕的细胞是刚脱落不久的, 10300 $\times$ 。



照片 15 Luft 固定的四倍体, 示由母细胞正进入芽的核及 Moore 氏小腔, 15200 $\times$ 。



照片 16 四柳法双重固定的四倍体, 10300 $\times$ 。

并无显著差异。但在间隔一或二个菌株的两个倍体间,如一和三,二和四,一和四,倍体间则有显著的差别。它们之间并未成简单的整数比,这可能是因为我們测量的样本数仍嫌少些,仅为 20 至 40 个左右,因此切片时偏离中央造成的误差未能被随机抽样消除所致。

从照片中可以看到单倍体即使出芽后,壁已完全形成,细胞仍能够连在一起呈短链状(照片 1)。有的单倍体的核中看到的可能是染色体,但不易计数(照片 2),有芽痕,但不显著(照片 3),有线粒体(照片 4)。二倍体芽痕明显(照片 5),有时可以看到芽及母细胞间的原生质通道的中央孔(照片 6)及核仁(照片 7),也能看到线粒体(照片 8)。三倍体有明显的芽痕(照片 9),由照片 10 中可以看出出芽是由原生质开始的,当壁只有微小的形变时,原生质的芽便很显著了。照片 11 示三倍体的出芽。照片 12 中所看到的分裂后期的染色体和高等植物细胞的染色体的光学显微图象很相似,因而有助于廓清酵母电子显微镜照片解释中久已存在的即酵母电镜照片中是否看到了真正的染色体这一争论<sup>[11]</sup>。同时由图 12 的染色体存在,核膜依然完整,芽已很显著,表明酵母核的分裂确实属于核内有丝分裂,这个问题在光学显微镜研究中过去一直是有争论的<sup>[11]</sup>。照片 13 示原生质穿过中央孔的情况。在四倍体的细胞中看到了外凸的生殖痕(照片 14),及 Moore 氏<sup>[12]</sup>在冷

冻干燥标本中观察到的增加原生质表面积的內陷腔(照片 15),这种小腔过去在固定的材料中一直未被发现过。此外由我们的照片上看来至少对数期酵母细胞壁并未如 Rose<sup>[13]</sup> 所说的厚达其直径的七分之一(照片 16)。

## (二) 生理实验

### 1. Warburg 测压法的测定结果

(a) 用 Warburg 测压法以葡萄糖为基质时所得的耗氧率,如图 1 所示。从五次实验的结果,经统计处理后,得知在 60 分钟时各个菌株间的耗氧率相差是显著的。

(b) 以半乳糖为基质时,用 Warburg 测压法测定表明未经半乳糖诱导的菌株,利用半乳糖得到的耗氧率极其微小,因而无法比较其差别。经 23 小时适应后,其耗氧率如图 2 所示。在 60 分钟时,除二及四倍体外,其他各菌株间均有显著性差异,次序依次为 IV、II、I、III。

(c) 以葡萄糖为基质时,在充氮条件下,用 Warburg 测压法所得到的

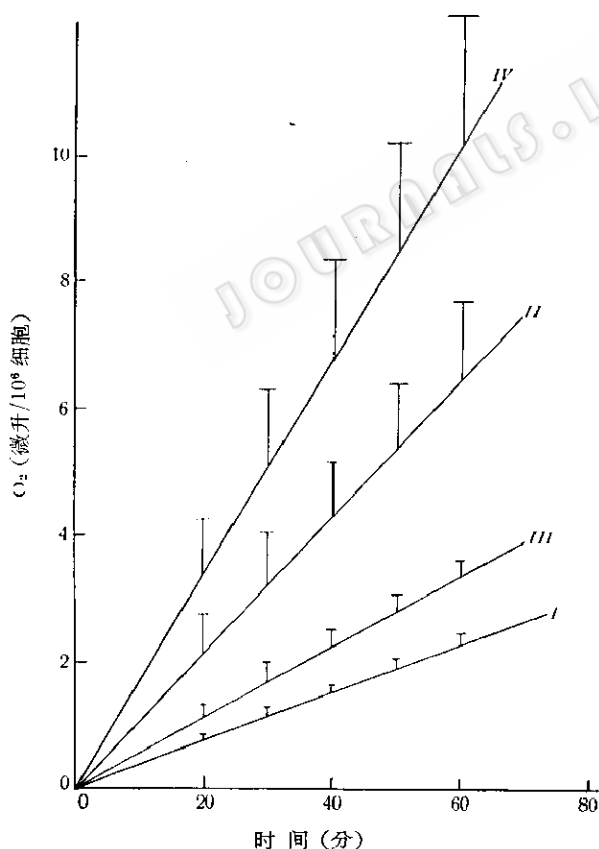


图 1 以葡萄糖为基质时的耗氧率。

气相是空气,侧臂加 1% 葡萄糖(北京化工厂,II 级品)1 毫升,主室加菌液 1 毫升,中央并加 20% KOH 0.1 毫升,总体积是 2.1 毫升。25℃,振速 100 次/分,60 分钟。



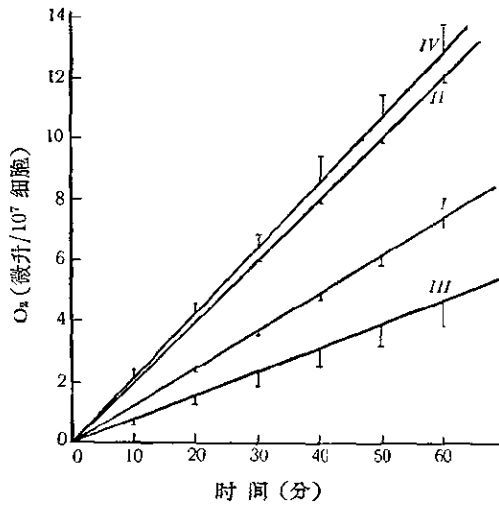


图2 通气诱导 23 小时后以半乳糖为基质时的耗氧率。  
测定条件同图 1, 但以半乳糖代替葡萄糖。  
半乳糖是 E. Merck 出品, Puriss 级。

发酵率的比较如图 3 所示。由五次实验结果可以看出四倍体的发酵率最高, 产  $\text{CO}_2$  最多。依统计分析在 60 分钟时与其他三个菌株相差是显著的。但其他三个菌株的发酵能力, 除二与三倍体之间有显著差别外, 其他并无显著性差异。这一结果和 Scheda 氏<sup>[14]</sup>的报告十分相似。

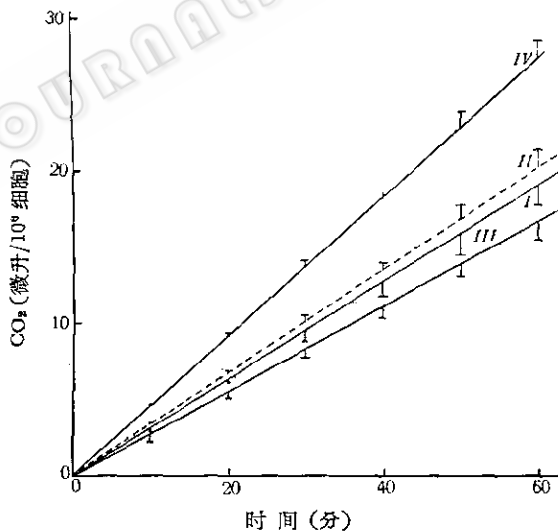


图3 以葡萄糖为基质时的发酵率。  
侧臂葡萄糖液为 0.1 M 的 1 毫升, 中央并不加液体, 主室内多加 0.1 毫升缓冲液。气相是氮气, 每小瓶通气 1000 毫升。

(d) 未经过半乳糖适应阶段的四个菌株均不发酵半乳糖, 无读数。经过 22 小时适应后, 四个菌株的发酵率如图 4 所示。由五次实验所得的结果可以看出, 三倍体的半乳糖适应发酵能力最高, 它在 60 分钟时与其他三个菌株在发酵率方面均有显著差别, 但其他三个菌株间并无显著性差异。

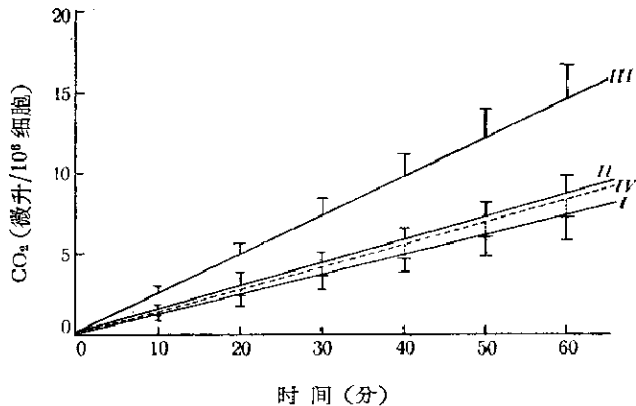


图 4 经适应后以半乳糖为基质时的发酵率。  
测定条件同图 3，但以半乳糖代替葡萄糖。

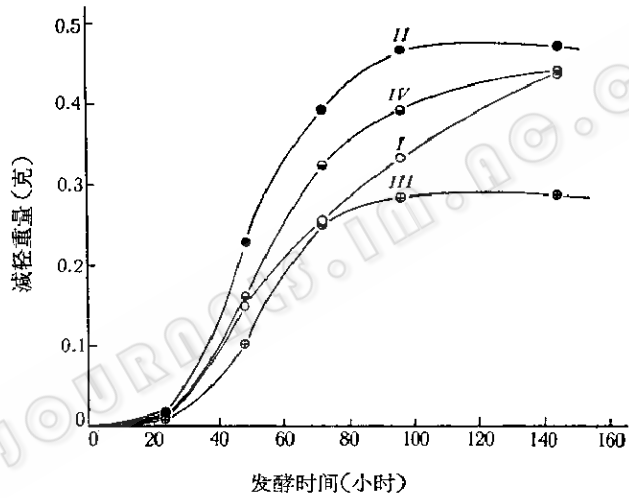


图 5 发酵栓试验时葡萄糖发酵的减重情况。

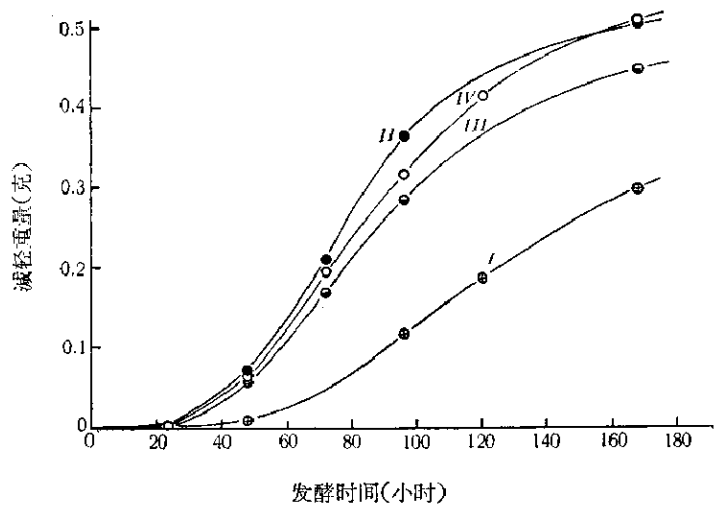


图 6 发酵栓试验时半乳糖发酵减重情况。

2. Alwood 发酵栓法称重, Conway 法定酒精, 及 Fehling 法定残糖所得的结果见图 5—10。

由于上述三种方法所得的结果是受倍体生理差异, 及细胞增殖这双重原因所决定, 而细胞的增殖又受到外界更多因子的影响, 因而所得出的结果只可能是半定量的, 只能代表一般的趋势, 在结果相差的显著性方面不宜进行比较, 或遽下结论。

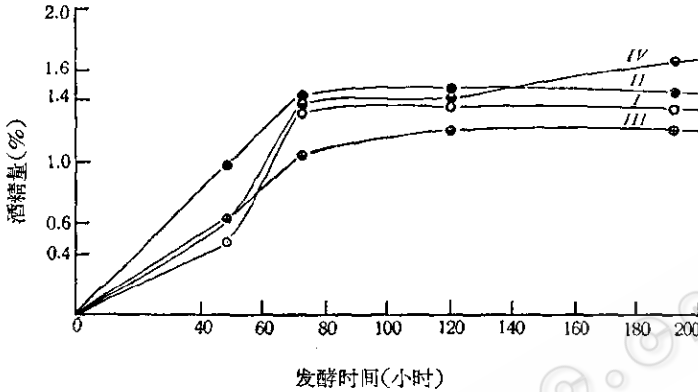


图 7 用 Conway 法定测定葡萄糖酒精发酵。

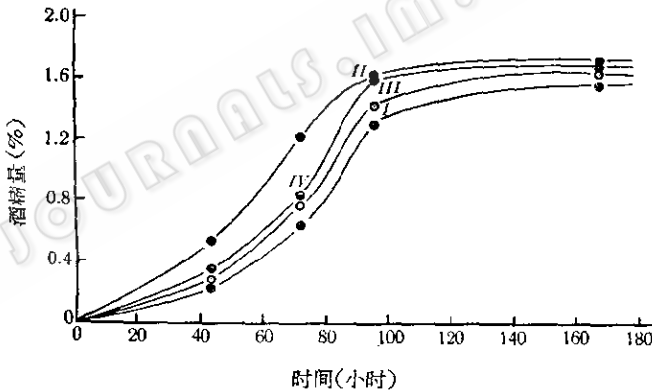


图 8 用 Conway 法定测定牛乳糖酒精发酵。

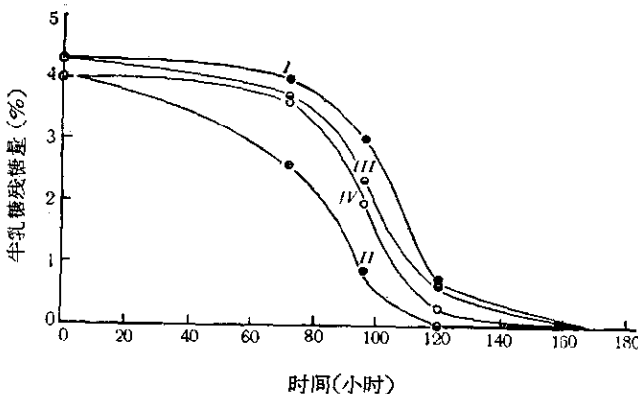


图 9 用 Fehling 法定测定残糖量。

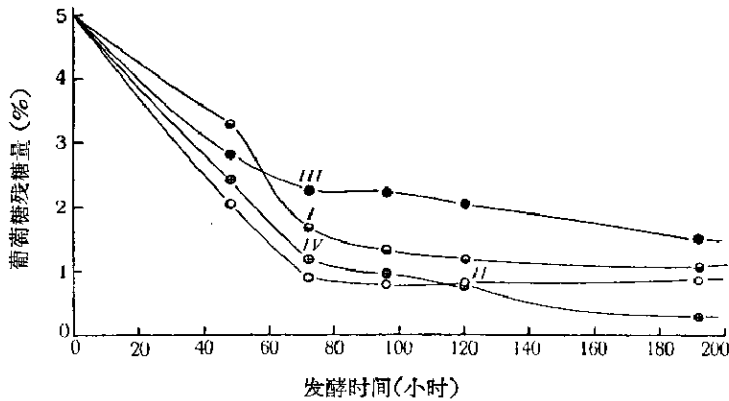


图 10 用 Fehling 法测定残糖量。

## 結 論

(1) 对以酵母为材料的超薄切片而言, Luft 固定液因有简便、经济、不需再用核糖核酸酶处理等优点,在进行較大量的切片时,宜于采用。

(2) 由电鏡照片上可以看出在倍体各菌株間并无显著的形态学的差异。但核的大小則有区别,依倍体递增,其体积亦渐趋变大。但由于測量的切片并不总是取在核的真正的最大切面处,同时电鏡照片样本数又不可能很大,因此在倍体間并不能看出核体积互成整数比,从这一点也可以說明酵母多倍性的确定仍以我們过去所用的定核酸法为佳<sup>[1]</sup>。本实验的核体积不成比例,可能是电鏡取样观察和切片时方法学上的缺点,还不能就这一点断言倍体系列各菌株的核間沒有成比例的关系。

(3) 用三四倍体易于清晰地看到芽痕,生殖痕。在三倍体中看到了染色体,在四倍体中观察到了 Moore 氏用冷冻干燥法在电子显微鏡下所观察到的,而迄未在固定材料中见到的內陷囊。

(4) 照片中清晰的表明酵母的核分裂属于核內有絲分裂。

(5) 以葡萄糖作基質时,以細胞为单位,四倍体的耗氧率和发酵率都較高,說明这株高倍体菌株可能具有一定的经济价值。

(6) 半乳糖的适应发酵能力和适应后的耗氧率与倍体性的关系尚不明确,有待进一步研究,特别是发酵率与耗氧率之間次序上的不同的原因,更有待进一步探討。

## 参 考 文 献

- [1] 徐浩等:微生物学报, 10 (2): 204—211, 1963.
- [2] Catcheside, D. G.: *The Genetics of Microorganisms*, Sir Isaac Pitman & Sons, Ltd., pp. 110—126, 1951.
- [3] Yotsuyanagi, Y.: *Compt. rend. Acad. Sci (Paris)*. 248, 274—277, 1959.
- [4] 岡嗣桂、郑发菊:中国科学院第一次高分子化学会议会刊, 44—48 页, 1957 年。
- [5] Cook, A. H.: *The Chemistry and Biology of yeasts*, Acad. press, pp. 123—156, 1958.
- [6] Cook, A. H.: *The chemistry and Biology of yeasts*, Acad. press, pp. 323—368, 1958.
- [7] Conway, E. J.: *Micro-diffusion analysis and volumetric error*, Crosby Lockwood and Son, Ltd., pp. 248—255, 1957.
- [8] Brown, C. A. & Zerban, F. W.: *Physical and chemical methods of sugar analysis*, John Wiley & Sons, Inc. pp. 744—749, 1948.

- [9] Hagedorn, H.: *Protoplasma*, 58:250—285, 1963.
- [10] Pease, D. C.: *Histological Techniques for Electron Microscopy*, Acad. press, p. 46, 1960.
- [11] McClary, D. O.: *Bot. Rev.*, 30:168—214, 1964.
- [12] Moor, H. & Mühlethaler, K.: *J. Cell. Biol.*, 17:609—628, 1963.
- [13] Rose, A. H.: *Wallerstein Lab. Comm.* 26:21—37, 1963.
- [14] Scheda, R.: *Arch. Mikrobiol.*, 45:65—100, 1963.
- [15] Monod, J.: *Biochem. J.*, 79:3, 18p, 1961.

## COMPARATIVE STUDIES ON THE SUBMICROSCOPICAL MORPHOLOGY AND THE FERMENTATION CHARACTERISTICS OF AN AUTOPOLYPLOID SERIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

HSU HAO AND JIANG HUEY-SHIOW

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking)

Comparative studies on the submicroscopical and the physiological characteristics of the autopolyploid strains obtained by the authors have been made, and the following results have been obtained:

(1) For mass preparation of ultrathin sections of the yeasts, Lufts solution as a fixative has the advantage of being convenient and non-expensive.

(2) There is no detectable difference in the submicroscopical morphology among the four yeast strains, but the volumes of the nuclei of the mono- and diplonts, mono- and triplonts, mono- and tetraplonts, as well as of the di- and tetraplonts, have significant differences between each other, although the volumes obtained are not in integral multiple proportions.

(3) In electron microphotographs conspicuous bud scars have been observed in di- tri- and tetra- ploid yeasts; birth scar has been observed in tetraploid yeast; chromosome set and Moor's involution vesical have been observed in tetraploid yeast.

(4) Using glucose as the substrate, the tetraplont has the highest oxygen consumption and CO<sub>2</sub> discharge rate based on cell number among the four strains, and these facts implied that this strain might be of economic importance.

(5) The contradiction between the intensity sequences of the adaptive fermentation and O<sub>2</sub> consumption on galactose of the four strains yet remains to be clarified.