

# 酵母菌絮凝的分型及其生理生化特性的研究

张博润 陈蔚 铁翠娟 何秀萍 谭华荣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 通过对 410 余株酵母菌进行絮凝测定,从中筛选到 5 株强絮凝菌。依据不同糖对其絮凝水平的抑制,将 5 株强絮凝菌分为 Flo 1 型和 NewFlo 型。对这两种絮凝型菌株的相关生理生化特性进行了研究。结果表明, Flo 1 型菌絮凝只受甘露糖抑制,它对高温(70℃)、蛋白酶 E、胰蛋白酶敏感,而对蛋白酶 K、糜蛋白酶、Ca<sup>2+</sup>、pH 有一定耐受性。NewFlo 型菌絮凝受甘露糖等多种糖抑制,它对高温(70℃)、各种蛋白酶、Ca<sup>2+</sup>、pH 均较敏感。这两种类型菌株絮凝的最适 Ca<sup>2+</sup> 浓度为 10mmol/L~1mol/L,最适 pH 为 3.0~4.5。

**关键词** 酵母菌 絮凝 分型 生理生化特性

分类号 Q939.5 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)06-0527-32

酵母菌絮凝通常指酵母菌在生长期间发生的细胞间的无性凝集。在发酵工业中,酵母菌细胞的絮凝能力是评价菌种优劣的一个重要指标。若细胞絮凝性强,在发酵后期,分散于发酵液中的细胞相互聚集形成絮凝颗粒并沉降,从而有利于细胞同发酵液的有效分离,可大大简化后处理工艺,降低成本。然而絮凝是一个极复杂的现象,不仅受遗传因子的控制,而且受环境、生理等多方面的影响。目前,对酵母菌絮凝机理还不太清楚,主要有两种假说<sup>[1]</sup>:一种假说认为酵母菌细胞絮凝是由细胞壁上类外源凝集素的糖蛋白和甘露聚糖相互作用形成,而另一种假说认为酵母菌细胞絮凝是细胞壁上蛋白和甘露聚糖间以钙离子桥连接而成。近年来,国外有关学者对酵母菌絮凝机理及其分子遗传学进行了较广泛的研究<sup>[2-4]</sup>,而国内未见类似报道。本文报道了强絮凝酵母菌的筛选、分型及其生理生化特性的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 从本组保藏的酵母菌中挑选出不同种属的 410 余株菌作为筛选强絮凝菌的出发菌株,编号为 FL-1~FL-410。标准 Flo 1 型絮凝菌株 ABXL-1D(MAT<sub>a</sub>, FLO1), BX24-2B(MAT<sub>α</sub>, FLO1), ABXR-11A(MAT<sub>α</sub>, FLO5), STX347-2C(MAT<sub>a</sub>, FLO5)由美国的 Rebecca Contopoulou 教授赠送。标准 NewFlo 型絮凝菌株 NCYC1190, NCYC1195 由英国的 J. R. Johnston 教授赠送。

**1.1.2 培养基**: YEPD 培养基, YNB 培养基, 麦芽汁培养基<sup>[5]</sup>。

**1.1.3 酶、试剂及溶液**: 各种蛋白酶均为国产。所用化学试剂为分析纯。絮凝缓冲液为 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH4.0, 含 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>)。蛋白酶的缓冲液为 0.1mol/L

磷酸钠缓冲液(pH7.5)。

## 1.2 培养条件和测定方法

1.2.1 培养条件:实验菌株于 25℃ 活化后接一环于液体 YEPD 中,25℃,200r/min 培养 48h。

1.2.2 絮凝水平测定:按文献[6]的方法略有改进。目测法:将待测菌接种于装有 3mL YEPD 液体培养基的试管中,28℃ 静置培养 48h 后,剧烈振荡 1min,室温静置,观察絮凝形成速度及絮凝物大小,确定菌株的絮凝水平。分光光度法:取 48h 培养物离心收集菌体,用 250mmol/L EDTA 溶液及无菌水各洗两次,离心收集菌体并悬于絮凝缓冲液中,立刻在 600nm 处测 OD 值,然后细胞悬液移至三角瓶中,25℃,120r/min 振荡 2h 至絮凝完成,室温静置 30min,取上清在 600nm 处测 OD 值。以振荡处理后测定的 OD 值除以振荡处理前测定的 OD 值,再乘以 100%(即自由细胞浓度)表示絮凝水平。

## 1.3 不同因素对菌株絮凝水平的影响

1.3.1 不同糖对絮凝水平的影响<sup>[6]</sup>:将不同浓度的各种糖溶于絮凝缓冲液中,测定絮凝水平,为避免代谢旺盛的酵母细胞消耗糖而降低其浓度,可于 250mmol/L EDTA 洗细胞时,在 60℃ 处理 5min 以杀死细胞(该处理不影响细胞的絮凝),然后测定絮凝水平。

1.3.2 Ca<sup>2+</sup> 浓度对絮凝水平的影响<sup>[7]</sup>:改变絮凝缓冲液中 Ca<sup>2+</sup> 的浓度,测定絮凝水平。

1.3.3 pH 值对絮凝水平的影响:改变絮凝缓冲液的 pH 值,测定絮凝水平。

1.3.4 高温对絮凝水平的影响:将用 EDTA 及蒸馏水洗过的酵母细胞重新悬于絮凝缓冲液中,70℃ 保温,在不同时间取样,测定絮凝水平。

1.3.5 蛋白酶对絮凝水平的影响:将用 EDTA 及蒸馏水洗过的酵母细胞重新悬于加有各种蛋白酶的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.5)中,30℃ 保温,在不同时间取样,测定絮凝水平。蛋白酶浓度分别为:蛋白酶 E 0.1mg/mL,蛋白酶 K 1mg/mL,胰蛋白酶 1mg/mL,糜蛋白酶 0.5mg/mL。

1.3.6 培养基对絮凝水平的影响:将酵母菌分别接种于 YEPD 培养基、YNB 培养基、麦芽汁培养基中,25℃,200r/min 培养 48h,测定絮凝水平。

1.3.7 培养时间对絮凝水平的影响:将酵母菌接种于 YEPD 培养基后,每隔 8h 取样测定絮凝水平。

## 2 结果和分析

### 2.1 强絮凝菌株的筛选

通过目测法从酵母菌 FL1~FL410 中筛选到 5 株强絮凝菌株,即 FL-186、FL-187、FL-189、FL-190、FL-191 均为啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。用这 5 株菌进行后续实验。

### 2.2 絮凝菌株的分型

Stratford 等人将酵母菌絮凝表型分为两型:Flo1 型和 NewFlo 型,Flo1 型菌絮凝只受甘露糖抑制,而 NewFlo 型菌絮凝受甘露糖等多种糖抑制。本文检测了 1mol/L 不同糖(甘露糖、麦芽糖、葡萄糖)对 5 株强絮凝菌的絮凝水平抑制情况,并以标准絮凝菌株作对照。结果表明 FL-189、FL-190、FL-191 的絮凝仅受甘露糖抑制,而不受其它糖的影响,与

标准 Flo 1 型菌株的表型一致,该特性表明这 3 株菌属于 Flo 1 型。而 FL-186、FL-187 的絮凝则受以上 3 种糖不同程度的抑制,与标准 NewFlo 型菌株的表型一致,证明这两株菌属于 NewFlo 型。据文献<sup>[7]</sup>报道, Flo 1 型菌可能同基因 FLO1、FLO5、FLO8、Cyc8、Tup1 有关。分型结果见表 1。

表 1 絮凝菌株的分型

Table 1 Distinction of yeast flocculent phenotypes

菌株	对照絮凝水平	甘露糖	葡萄糖	麦芽糖	分型
Strains	Control	Mannose	Glucose	Maltose	Phenotypes
ABXL-1D	++	+	++	++	FLO1
BX24-2B	++	+	++	++	FLO1
FL-189	+++	+++	+++	+++	FLO1
FL-190	+++	++	+++	+++	FLO1
FL-191	+++	++	+++	+++	FLO1
NCYC1190	++	-	+	-	NewFlo
FL-186	+++	-	-	-	NewFlo
FL-187	+++	-	-	-	NewFlo

注:“-”不絮凝;“+”弱絮凝;“++”中度絮凝;“+++”强絮凝

“-”No flocculation;“+”Poor flocculation;“++”medial flocculation;“+++”Strong flocculation.

## 2.3 不同因素对菌株絮凝水平的影响

### 2.3.1 糖浓度对絮凝水平的影响

结果如图 1 所示。不同浓度的糖对 NewFlo 型菌的絮凝均有抑制作用,且随糖浓度增高,抑制作用加强。其中麦芽糖的抑制作用最强,浓度仅为 100mmol/L 时就几乎完全抑制絮凝,葡萄糖的抑制作用最弱,当浓度升高至 1mol/L 时才能完全抑制絮凝。Flo 1 型菌的絮凝则只受甘露糖抑制,抑制作用随糖浓度增加而缓慢增强。

### 2.3.2 $Ca^{2+}$ 对絮凝水平的影响

结果如图 2 所示,可以看出, Flo 1 型和 NewFlo 型菌株的絮凝都依赖  $Ca^{2+}$ 。最适  $Ca^{2+}$  浓度为 10mmol/L ~ 1.0mol/L,且 NewFlo 型菌对  $Ca^{2+}$  浓度变化较 Flo1 型菌敏感,当  $Ca^{2+}$  浓度低于 10mmol/L 或高于 2.0mol/L 时即表现出较明显的絮凝抑制。

### 2.3.3 pH 对絮凝水平的影响

实验结果表明 Flo 1 型和 NewFlo 型菌株的絮凝都依赖 pH(图 3)。最适 pH 为 3.0~4.5。同  $Ca^{2+}$  对絮凝的影响相似, NewFlo 型菌对不同 pH 值都较 Flo 1 型菌敏感。

### 2.3.4 高温对絮凝水平的影响

实验结果表明 Flo 1 型和 NewFlo 型菌株的絮凝均受高温(70℃)抑制(图 4),且温育时间越长,对细胞絮凝抑制越明显。这可能是由于参与絮凝形成的细胞壁表面蛋白在高温时失活,空间结构发生改变,从而使絮凝受抑制。

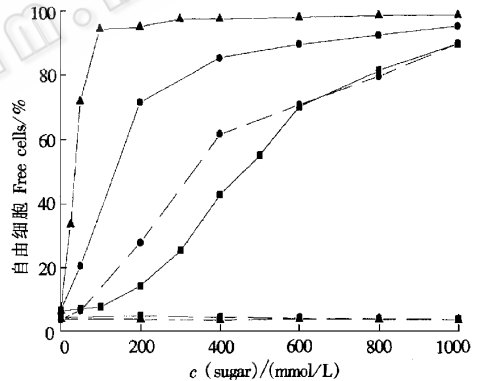


图 1 糖浓度对絮凝的影响

Fig. 1 Effect of sugar concentration on the flocculation of yeast cells

● : Mannose ; ▲ : Maltose ; ■ : Glucose ;  
— : FL-186 ; - - : FL-191.

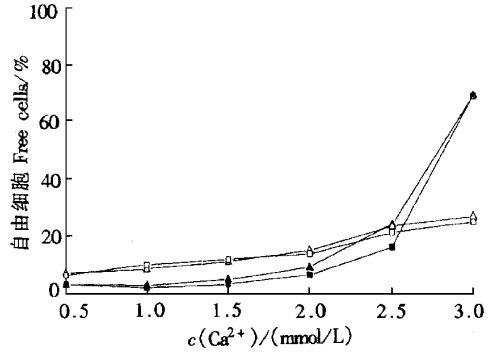
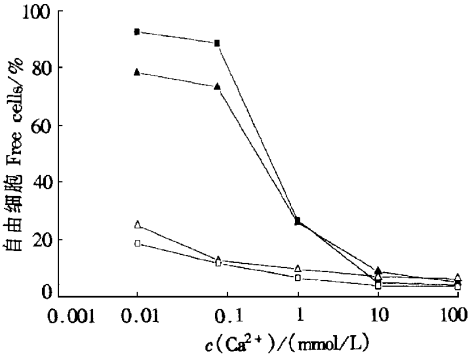


图2 Ca<sup>2+</sup>对絮凝的影响

Fig. 2 Effect of calcium chloride concentration on the flocculation of yeast cells

■ FL-186 ; ▲ FL-187 ; □ FL-191 ; △ FL-189.

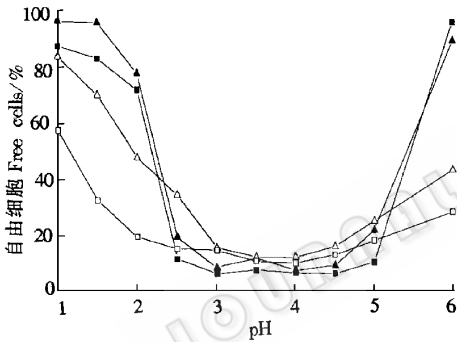


图3 pH对絮凝的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the flocculation of yeast cells

■ FL-186 ; ▲ FL-187 ; □ FL-190 ; △ FL-189.

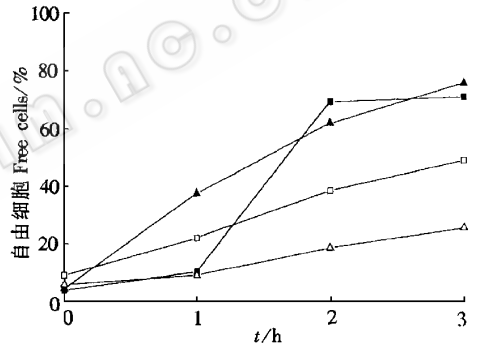


图4 高温(70°C)对絮凝的影响

Fig. 4 Effect of high temperature on the flocculation of yeast cells

■ FL-186 ; ▲ FL-187 ; □ FL-190 ; △ FL-189.

2.3.5 不同蛋白酶对絮凝水平的影响:如图5所示,NewFlo型菌对蛋白酶E、蛋白酶K、胰蛋白酶相当敏感,仅作用10min就几乎完全丧失絮凝性。对糜蛋白酶则有一定耐受性,随温育时间延长絮凝逐渐减弱,至60min时才几乎不絮凝。Flo1型菌对蛋白酶E、胰蛋白酶也较敏感,温育10min后即丧失絮凝性,但对蛋白酶K及糜蛋白酶均有一定耐受性,随温育时间延长絮凝只缓慢减弱。蛋白酶对絮凝有抑制作用表明细胞壁蛋白参与絮凝形成。由于Flo1型和NewFlo型菌株对四种蛋白酶的敏感性不同,表明这两种絮凝型菌株的细胞壁表面参与絮凝形成的蛋白组成可能不同。

2.3.6 培养基对絮凝水平的影响:我们测定了Flo1型和NewFlo型菌株在不同培养基中培养后细胞的絮凝水平,结果表明Flo1型菌株在YNB、YEPD中培养较在麦芽汁中培养絮凝水平高,而NewFlo型菌株在麦芽汁、YNB中培养较在YEPD中絮凝水平高。

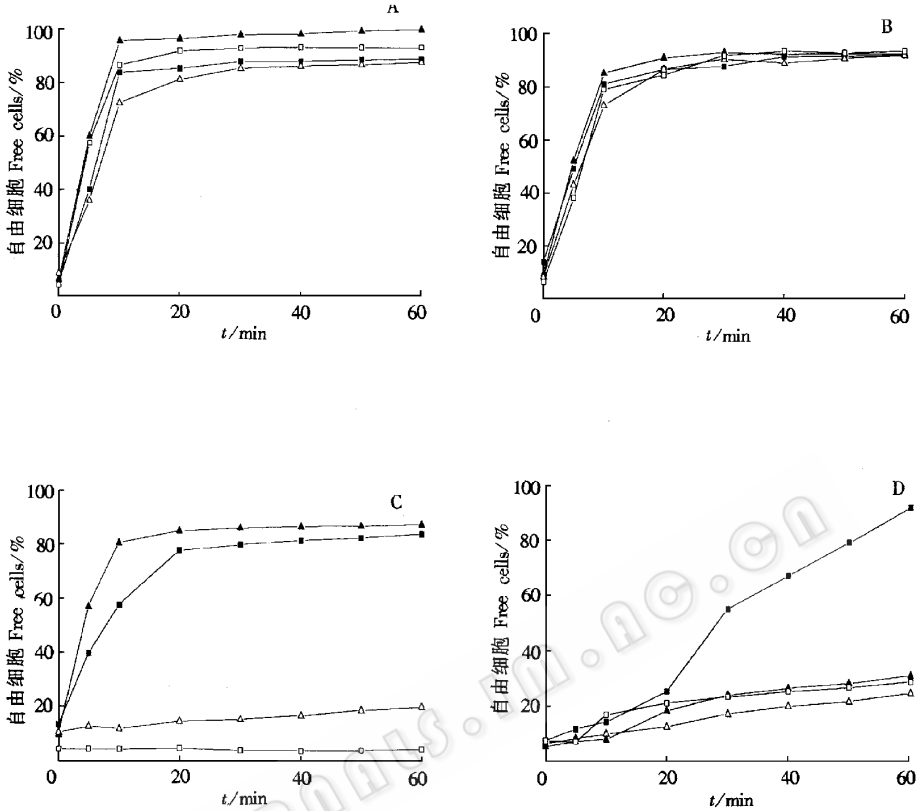


图5 蛋白酶对絮凝的影响(A 蛋白酶 E, B 胰蛋白酶, C 蛋白酶 K, D 糜蛋白酶)

Fig. 5 Effect of proteinases on the flocculation of yeast cells  
(A Protease E, B Trypsin, C Protease K, D Chymotrypsin)

■ :FL-186 ; ▲ :FL-187 ; □ :FL-191 ; △ :FL-189.

2.3.7 培养时间对絮凝水平的影响:实验结果表明 Flo 1 型菌株在整个培养期间都具絮凝性,即所谓结构性絮凝。而 NewFlo 型菌只是到稳定期才开始出现絮凝。

### 3 讨论

本文通过对 410 余株酵母菌进行絮凝水平能力测定,从中筛选到 5 株强絮凝菌株。依据不同糖对其絮凝的抑制作用不同,将 5 株强絮凝菌株分为 Flo 1 型和 NewFlo 型。实验了不同物理、化学因子对这两种絮凝型菌株的絮凝表型的影响,对酵母菌的絮凝机理作了初步探索。结果表明,酵母细胞絮凝是  $Ca^{2+}$  依赖的,且有细胞壁蛋白和甘露聚糖的参与。然而,对于不同絮凝型菌株,可能这三种因子所起的作用不同,有可能这两种絮凝型菌株的絮凝机理分别属上述两种絮凝假说之一,还需进一步深入研究。

据文献<sup>[8]</sup>报道,可根据菌株絮凝性对高温和糜蛋白酶的敏感性不同将 Flo 1 型菌株分为两大类:对高温(70℃)敏感而对糜蛋白酶不敏感的 Flo 1 型菌株可能带有 FLO5 基

因对高温(70℃)不敏感而对糜蛋白酶敏感的 Flo 1 型菌株可能带有 FLO1 基因。本实验结果表明我们筛选到的 Flo 1 型菌株对高温(70℃)和糜蛋白酶都有不同程度的敏感性,仅对高温和糜蛋白酶的敏感性难以确定 Flo 1 型菌株带有何种絮凝基因,故还需进一步对这些 Flo 1 型菌株进行分子生物学方面的深入研究,才能确定絮凝基因和絮凝表型的相关性。

### 参 考 文 献

- [1] 张博润,任 健,刘玉方.微生物学通报,1996,23(5):307~311.
- [2] Watari J, Takata Y, Ogawa M *et al.* *Yeast* 1994,10:211~225.
- [3] Dengis P B. *J Inst Brew*, 1997,103(4):257~262.
- [4] Bony M, Thines-empoux d, Barre P *et al.* *J Bacteriol*, 1997,179(15):4929~4936.
- [5] 贾盘兴,蔡金科,马德钦等.微生物遗传学实验技术.科学出版社,1992:407~408.
- [6] Stratford M, Assinder S. *Yeast*, 1991,7:559~574.
- [7] Dengis P b, Nelissen L R, Rouxhet P G. *Appl Environ Microbiol*, 1995,61(2):718~728.
- [8] Bidard B. *Curr Genet*, 1994,25:196~201.

## DISTINCTION OF YEAST FLOCCULENT PHENOTYPES AND STUDIES OF THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF YEAST FLOCCULATION

Zhang Borun Chen Wei Tie Cuijuan He Xiuping Tan Huarong  
(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

**Abstract** More than 400 yeast strains were examined for their flocculation, and five of them displayed strong flocculation. The 5 strains were divided into two groups which are Flo 1 and NewFlo phenotypes on the basis of their response to sugar inhibitor. Related physiological and biochemical characteristics of the two phenotypes' strains were studied. The results showed that the flocculation of Flo 1 phenotype was only inhibited by mannose; it was sensitive to high temperature (70℃), pronase E, trypsin, whereas tolerant to pronase K, chymotrypsin,  $Ca^{2+}$ , pH; the flocculation of NewFlo was inhibited by many sugars, such as glucose, maltose, sucrose, mannose; it was sensitive to high temperature (70℃), pronase,  $Ca^{2+}$ , pH. The Calcium concentration and pH value of the optimum flocculation of the Flo1 and NewFlo phenotypes strains were respectively 10mmol/L ~ 1mol/L; 3.0~4.5.

**Key words** Yeasts, Flocculation, Distinction of yeast flocculent phenotype, Physiological and biochemical characteristics