

## 酿酒酵母呼吸突变株的高糖胁迫反应研究\*

# The Response of a *Saccharomyces cerevisiae* Respiratory Mutant to High Sugar Stress

熊雅兰<sup>1</sup>, 晏伟<sup>1</sup>, 张穗生<sup>2</sup>, 陈东<sup>1,2</sup>, 陆琦<sup>2</sup>, 黄日波<sup>1,2\*\*</sup>

XIONG Ya-lan<sup>1</sup>, YAN Wei<sup>1</sup>, ZHANG Sui-sheng<sup>2</sup>, CHEN Dong<sup>1,2</sup>, LU Qi<sup>2</sup>, HUANG Ri-bo<sup>1,2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(1. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】研究野生型甘蔗糖蜜发酵高产乙醇菌株 MF1002 及其糖分利用能力显著提高的呼吸突变菌株 MF15c 在高糖胁迫下的生理特性变化。【方法】测定在高糖胁迫下菌株的生长速率、出芽率、乙醇产量和超氧化物歧化酶(SOD)活力、过氧化氢酶活力、过氧化物酶活力以及细胞质和线粒体的 ATP 酶活力。【结果】在葡萄糖浓度分别为 25%、30% 和 40% 的高糖培养基中, MF15c 菌株生长和乙醇发酵受抑制的程度均明显低于 MF1002。当葡萄糖浓度为 30% 和 40% 时, MF15c 的最大菌体数目、最高出芽率和乙醇发酵浓度等均显著高于 MF1002。当葡萄糖浓度为 30% 时, 两菌株胞内的 SOD 活力、过氧化氢酶活力、过氧化物酶活力以及细胞质和线粒体的 ATP 酶活力均显著上升。其中, MF15c 的胞内 SOD 活力、胞内过氧化物酶活力、细胞质 ATP 酶活力和线粒体 ATP 酶活力在高糖胁迫下的上升幅度显著高于 MF1002。【结论】MF15c 较 MF1002 具有更强的高糖耐受能力。SOD 活力、过氧化氢酶活力、过氧化物酶活力以及细胞质和线粒体的 ATP 酶均参与了高糖胁迫反应, 胞内 SOD 活力、胞内过氧化物酶活力、细胞质 ATP 酶活力和线粒体 ATP 酶活力可能与 MF15c 菌株的高糖耐受能力有关, 可作为进一步改造该菌株的指导指标。

**关键词:** 酿酒酵母 呼吸突变体 高糖胁迫 生理特性

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2014)01-0034-08

收稿日期: 2013-05-21

修回日期: 2013-06-04

作者简介: 熊雅兰(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物化学及分子生物学研究。

\* 国家 973 项目(2010CB736209), 国家 863 项目(2012AA022106, 2013AA050701), 国家国际合作项目(2010DFB63590, 2011DFA61910), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 10100019-21, 桂科攻 1099071, 桂科合 1140010-15), 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053062, 2011GXNSFA018113), 广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW03), 广西八桂学者建设工程专项经费等资助。

\*\* 通讯作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物生物技术及酶工程研究。E-mail: rbhuang@163.com。

**Abstract:** 【Objective】 The wild type *Saccharomyces cerevisiae* strain MF1002 that was a high yield strain of molasses ethanol fermentation, and its respiratory mutant MF15c of which the sugar utilizing capacity was significantly enhanced, were employed to investigate the physiologic response to the high sugar stress. 【Method】 The strains' growth rate, budding ratio, ethanol yield and enzyme activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase, ATPase activity in cytoplasm and the ATPase activity in mitochondria were conducted under high sugar stress. 【Result】 When the strains were cultivated in the medium containing 25%, 30% and 40% glucose, the growth and ethanol

fermentation of MF1002 were repressed significantly stronger than MF15c by high sugar stress. When the glucose concentration in medium was increased to 30% and 40%, the maximum cell number, the maximum cell budding ratio and the ethanol fermentation concentration of MF15c were all significantly higher than that of MF1002. The enzymes activity assay exhibited that the activities of five enzyme afore mentioned were all significantly increased for both strains after they were cultivated in the medium containing 30% glucose for 24h under high sugar stress, of which the activity of 4 enzymes increased significant higher in MF15c than in MF1002, except for the catalase activity in cell extract. **【Conclusion】** MF15c has stronger tolerance than MF1002 to high sugar stress. Thus the activity of these 5 enzymes was involved in the response of both strains to high sugar stress, among which 4 enzyme activities may be correlated with the high sugar tolerance of MF15c and could be used as the indicator for further improvement of the strain.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, respiratory mutant, sugar stress, physiological characters

**【研究意义】**乙醇浓醪发酵能够显著提高设备产能,节省能耗,减少废液排放,这一理念自1983年提出<sup>[1]</sup>以来已成为乙醇发酵产业的追求目标。乙醇浓醪发酵通常指发酵浓度达到15%(V/V)以上的乙醇发酵,要求发酵液的起始糖浓度达到27%以上<sup>[2]</sup>。在发酵初期酵母易受到高糖胁迫,导致酵母的生长和乙醇发酵受到抑制,发酵延后;在发酵后期酵母则受高浓度乙醇浓度的抑制,乙醇发酵浓度降低<sup>[3,4]</sup>。甘蔗糖蜜为蔗糖生产的副产物,一直是我国广西、广东南部、云南等蔗糖产区乙醇发酵生产的主要原料,其中的可发酵糖含量通常只有45%~50%(W/W),而锤度则高达80°Bx<sup>[5]</sup>,因此,高浓度的甘蔗糖蜜发酵乙醇实质上是高糖条件下的乙醇浓醪发酵,实施的关键是获得耐高糖、高产、高效的乙醇发酵生产菌株。研究酿酒酵母工业菌株的高糖耐受机理,对指导菌株改造、耐高糖菌株选育和探讨酵母细胞生命现象具有重要意义。**【前人研究进展】**人们对酿酒酵母高糖耐受性机理尚未全面了解,前人发现酿酒酵母对不同胁迫的反应相互关联<sup>[6]</sup>,与许多代谢途径有关<sup>[7,8]</sup>。**【本研究切入点】**从甘蔗糖厂的废弃物筛选到一系列酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株, MF1002为其中的野生型甘蔗糖蜜发酵高产乙醇菌株,乙醇发酵浓度达到了14.48%<sup>[9]</sup>。对该菌株进行紫外诱变,获得了2株糖分利用能力显著提高的呼吸突变菌株MF11a和MF15c<sup>[10]</sup>。本文以MF1002和MF15c两菌株为研究对象,进一步分析酿酒酵母在高糖胁迫条件下的生理变化。**【拟解决的关键问题】**探讨酿酒酵母糖分利用与高糖耐受之间的关系,为MF15c菌株的进一步改造提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MF1002为野生型酿酒酵母甘蔗糖蜜乙醇发酵  
广西科学 2014年2月 第21卷第1期

高产菌株,从甘蔗糖厂的废弃物中筛选获得<sup>[9]</sup>, MF15c为MF1002经紫外诱变获得的呼吸突变菌株,对糖分的利用能力较MF1002显著提高<sup>[10]</sup>。两菌株均由广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心保藏。

YPD培养基含1%的酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,自然pH值,121℃灭菌20 min,固体培养基添加2.2%的琼脂<sup>[11,12]</sup>。高糖培养基除葡萄糖含量增加至25%、30%和40%外,其余的与YPD液体培养基相同。

试剂盒以外的其它试剂均为生化试剂或分析纯以上级别。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株活化

保藏的菌株接种YPD固体培养基30℃培养,连续转接3次纯化,挑单菌落转接YPD液体培养基,30℃,180r/min下培养过夜活化<sup>[13,14]</sup>2次,再接种同样培养基培养至对数期,菌体数目约 $2 \times 10^8$ 个/mL,立刻用于高糖胁迫实验。

#### 1.2.2 菌株生长测定

活化菌株分别转接YPD液体培养基和高糖培养基,接种量均为2%,接种前先调整接种菌液的菌体数目,确保接种的菌体数目相同,30℃,180r/min培养32 h,定时取样,用血球计数板测定菌体数目和细胞出芽率<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.3 菌株的乙醇发酵能力测定

将菌株活化后转接葡萄糖含量分别为25%、30%和40%的高糖培养基,接种量5%,接种前先调整接种菌液的菌体数目约为 $2 \times 10^8$ 个/mL,然后在30℃,180r/min下发酵32h,再静置发酵至终点。期间于0、8、16、24、32、40、48、56、64h取样,按文献<sup>[16]</sup>的方法测定发酵液的乙醇浓度。所用气相色谱仪为Agilent 6890N型。

#### 1.2.4 菌株的高糖胁迫处理

菌株活化后接种 YPD 培养基和含 30% 葡萄糖的高糖培养基,接种量均 2%,接种前先调整接种菌液的菌体数目,确保不同处理的接种菌体数目相同,30℃,180r/min 培养 24h,取样测定菌株酶活力。

#### 1.2.5 蛋白含量测定

在测定酶活力的同时采用 Bradford 法测定样品的蛋白含量<sup>[17]</sup>,使用的试剂盒为生工生物工程(上海)有限公司的产品,具体操作按说明书进行。

#### 1.2.6 酶活力测定

菌株胞内超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定采用 WST 法进行,测定试剂盒购自上海碧云天公司。样品提取按文献[18]的方法进行,酶活测定操作按试剂盒的说明书进行。测定原理为试剂盒所含的嘌呤氧化酶催化黄嘌呤氧化生成超氧化物阴离子产物,该产物进一步与底物 2-(4-碘苯)-3-(4-硝基苯)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四氮唑 [3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] 反应,生成水溶性甲臍染料。可以通过测定反应体系  $OD_{450}$ ,并以不加 SOD 的样品为对照,测定样品的 SOD 活力。以每分钟抑制 50% 黄嘌呤氧化酶催化偶联反应所需的酶量定义为 1 个 SOD 活力单位(U)。

菌株胞内过氧化氢酶的提取和活力测定按文献[19],采用上海碧云天公司生产的过氧化氢酶检测试剂盒进行,操作按说明书。原理为过氧化氢酶催化底物过氧化氢分解生成水和氧气,残留过氧化氢在过氧化物酶的作用下通过 Trinder 反应生成醌亚胺类色素,可通过测定反应体系的  $OD_{520}$  定量一定时间内的产物形成量,定量测定过氧化氢酶的活力。以 1 min 内催化分解 1  $\mu\text{mol}$  过氧化氢所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

菌株胞内过氧化物酶的提取和活力测定按文献[20]的方法进行。以 ABTS [2,2-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐]为底物,在过氧化物酶的催化下,生成绿色的氧化型 ABTS,通过测定反应体系的  $OD_{405}$  定量产物形成,测定酶活力。1 个过氧化物酶活力单位(U)定义为 1 min 内催化生成 1  $\mu\text{mol}$  ABTS 所需的酶量。

细胞质 ATP 酶的提取按文献[21]的方法进行,线粒体的提取按文献[22]的方法进行。酶活力测定按文献[21]的方法进行,利用 ATP 酶催化 ATP 水解释放出无机磷含量,钼蓝法测定无机磷产物的生成量,定量测定酶的活力。1 个 ATP 酶的活力单位(U)定义为 1 min 内水解 1  $\mu\text{mol}$  ATP 所需的酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株在高糖胁迫下的生长情况

图 1(a1, a2, a3)为两菌株在不同葡萄糖浓度的高糖培养基中的生长曲线。葡萄糖浓度为 25% 时,两菌株均在培养 16h 菌体数目达到最大,分别为  $(3.58 \pm 0.05) \times 10^8$  个/mL(MF1002)和  $(3.41 \pm 0.32) \times 10^8$  个/mL(MF15c),MF1002 略高于 MF15c(图 1, a1)。葡萄糖浓度提高到 30% 后,两菌株的生长均受到一定程度抑制,最大菌体数目均在培养 24h 出现,且略有降低,分别为  $(2.93 \pm 0.07) \times 10^8$  个/mL(MF1002)和  $(3.30 \pm 0.16) \times 10^8$  个/mL(MF15c),MF15c 比 MF1002 高 12.63%(图 1, a2)。葡萄糖浓度进一步提高到 40% 后,菌株生长进一步受抑制,菌体数目均在培养至 32h 才达到最大,分别只有  $(2.23 \pm 0.11) \times 10^8$  个/mL(MF1002)和  $(2.77 \pm 0.13) \times 10^8$  个/mL(MF15c),MF15c 比 MF1002 高 24.22%(图 1, a3)。

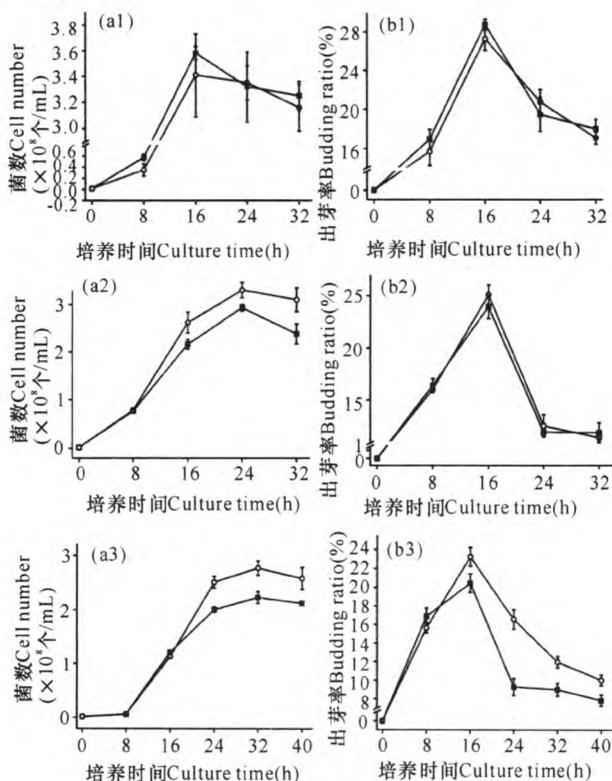


图 1 不同葡萄糖浓度下菌株的生长情况

Fig. 1 Strains growth under different glucose concentration

(a) 菌株生长曲线, (b) 菌体细胞的出芽率; 1: 25% 葡萄糖, 2: 30% 葡萄糖, 3: 40% 葡萄糖; ■: MF1002, ○: MF15c。结果为二次平行试验的平均值加标准差。

(a) Growth curve of strains, (b) Budding ratio change curve of strains cell; 1: 25% glucose, 2: 30% glucose, 3: 40% glucose; ■: MF1002, ○: MF15c. The results were the means value and standard deviation of the duplicate experiments.

图 1(b1,b2,b3)为两菌株在不同葡萄糖浓度的高糖培养基培养的细胞出芽率。3 个葡萄糖浓度下两菌株均在培养 16h 出芽率最高。葡萄糖浓度为 25% 时, MF1002 的出芽率( $28.77 \pm 0.55$ )% 略高于 MF15c 的出芽率( $27.28 \pm 1.20$ )%, 二者无统计学显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 1, b1)。葡萄糖浓度提高到 30% 时, MF15c 出芽率 ( $25.10 \pm 0.96$ )% 反而比 MF1002 的出芽率 ( $23.96 \pm 1.13$ )% 显著高 4.76% (图 1, b2)。葡萄糖浓度为 40% 时, MF15c 的出芽率 ( $23.24 \pm 1.00$ )% 较 MF1002 的出芽率 ( $20.46 \pm 1.00$ )% 显著高 13.59% ( $P < 0.05$ ) (图 1, b3)。

比较图 1 中 a1 和 a3, b1 和 b3 发现, 培养基的葡萄糖浓度由 25% 提高到 40% 时, MF1002 和 MF15c 的最大菌体数目分别下降了 37.71% 和 18.77%, 出芽率分别下降 28.88% 和 14.81%, 两菌株在相同的高糖浓度胁迫下, 其菌体数目增长与出芽率变化趋势完全一致。结果显示 MF15c 生长对高糖的耐受能力明显高于 MF1002。

## 2.2 菌株在高糖胁迫下的乙醇发酵

图 2 为两菌株在不同葡萄糖浓度下的乙醇发酵曲线。葡萄糖为 25%、30% 和 40% 等 3 个浓度下, MF1002 的乙醇发酵浓度在发酵前期均高于 MF15c, 而发酵后期则均低于 MF15c, 最大乙醇发酵浓度分别较 MF15c 低 2.9% (图 2a)、3.5% (图 2b) 和 9.27% (图 2c), 表明随着培养基葡萄糖浓度的提高, MF1002 乙醇发酵受抑制的程度高于 MF15c, 这与两菌株在不同葡萄糖浓度下的生长情况完全一致 (图 1, a1, a2, a3)。

## 2.3 高糖胁迫下菌株胞内 SOD 的活力变化

测定两菌株在 30% 葡萄糖胁迫培养 24h 的胞内 SOD 活力。YPD 培养, 无胁迫条件下, 两菌株的 SOD 活力分别为 ( $1.29 \pm 0.12$ ) U/mg 蛋白 (MF1002) 和 ( $1.23 \pm 0.02$ ) U/mg 蛋白 (MF15c), 相互之间无统计学显著差异 ( $P > 0.05$ )。30% 葡萄糖胁迫培养 24h 后, MF1002 和 MF15c 的 SOD 活力均显著提高, 分别为 ( $5.26 \pm 0.12$ ) U/mg 蛋白和 ( $12.71 \pm 0.05$ ) U/mg 蛋白, 比无胁迫的酶活分别提高 3.08 倍和 9.33 倍, MF15c 的酶活较 MF1002 高 141.63% (图 3)。

## 2.4 高糖胁迫下菌株胞内过氧化氢酶的活力变化

由图 4 可见, 在 YPD 培养、无胁迫条件下, 两菌株胞内过氧化氢酶的活力均很低, 分别只有 ( $0.062 \pm 0.003$ ) U/mg 蛋白 (MF1002) 和 ( $0.074 \pm 0.007$ ) U/mg 蛋白 (MF15c), MF1002 略低于 MF15c。含 30% 葡萄糖的高糖培养基胁迫培养 24h 后, 菌株的过氧化

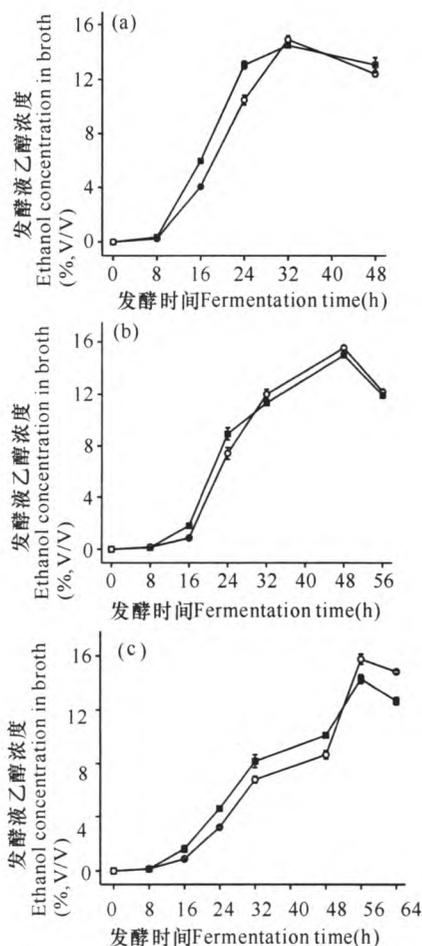


图 2 不同葡萄糖浓度下菌株的乙醇发酵曲线

Fig. 2 Ethanol fermentation curve of two strains under different glucose concentration

(a) 25% 葡萄糖, (b) 30% 葡萄糖, (c) 40% 葡萄糖; ■: MF1002, ○: MF15c。结果为二次平行试验的平均值加标准差。

(a) 25% glucose, (b) 30% glucose, (c) 40% glucose; ■: MF1002, ○: MF15c. The results were the means value and standard deviation of the duplicate experiments.

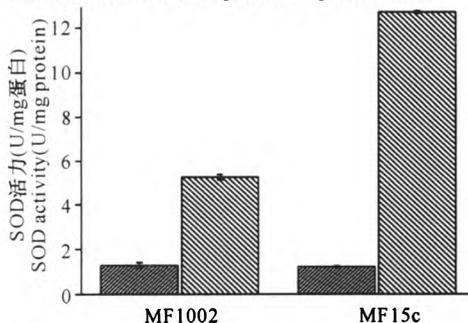


图 3 高糖胁迫下菌株胞内 SOD 的活力变化

Fig. 3 SOD activity change in the cell extract of strains under high glucose stress

菌株在 YPD 培养 8h 至对数期后直接接种含 30% 葡萄糖的高糖培养基进行胁迫处理, 结果为二次平行试验的平均数和标准差。

The strains were cultivated in the medium containing 30% glucose for 24h for stress treatment after cultured in YPD for 8h to exponential phase. The results were the means value and standard deviation of duplicate experiments.

■: YPD 培养基, ▨: 30% 葡萄糖。  
■: YPD medium, ▨: 30% glucose.

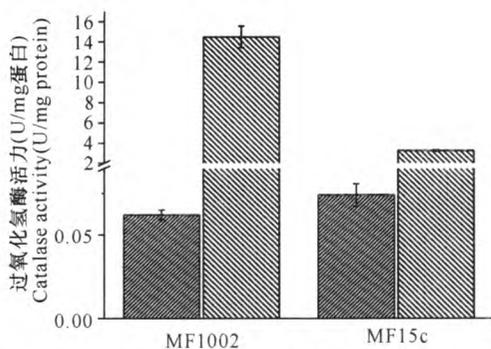


图4 高糖胁迫下菌株胞内过氧化氢酶的活力变化

Fig. 4 Catalase activity change in the cell extract of strains under high glucose stress

菌株在 YPD 培养 8h 至对数期后直接接种含 30% 葡萄糖的高糖培养基进行胁迫处理, 结果为二次平行试验的平均数和标准差。

The strains were cultivated in the medium containing 30% glucose for 24h for stress treatment after cultured in YPD for 8h to exponential phase. The results were the means value and standard deviation of duplicate experiments.

■: YPD培养基, ▨: 30%葡萄糖。  
 ■: YPD medium, ▨: 30% glucose.

氢酶活力均显著增高, 分别达到了  $(14.49 \pm 1.07)$  U/mg 蛋白 (MF1002) 和  $(3.26 \pm 0.07)$  U/mg 蛋白 (MF15c), 较无胁迫的酶活分别提高了 232.71 倍和 43.05 倍, MF1002 较 MF15c 高出 3.44 倍。

## 2.5 高糖胁迫下菌株胞内过氧化物酶的活力变化

图 5 为两菌株分别在 YPD 和含 30% 葡萄糖的高糖培养基培养 24h 的过氧化物酶活力测定结果。用 YPD 培养, 无胁迫条件下, 菌株的胞内过氧化物酶的活力均较低, 分别为  $(0.029 \pm 0.002)$  U/mg 蛋白 (MF1002) 和  $(0.031 \pm 0.001)$  U/mg 蛋白 (MF15c), 二者之间无统计学显著差异 ( $P > 0.05$ )。高糖胁迫培养后, MF1002 和 MF15c 的过氧化物酶活力分别显著增加至  $(0.077 \pm 0.007)$  U/mg 蛋白和  $(0.130 \pm 0.001)$  U/mg 蛋白, 较无胁迫的酶活分别提高了 1.66 倍和 3.23 倍, 此时, MF15c 的酶活较 MF1002 高出 0.69 倍。

## 2.6 高糖胁迫下菌株 ATP 酶的活力变化

YPD 培养, 无胁迫条件下, 两菌株的细胞质 ATP 酶活力均为 0.043 U/mg 蛋白 (图 6a), 线粒体的 ATP 酶活力分别为  $(0.082 \pm 0.002)$  U/mg 蛋白 (MF1002) 和  $(0.110 \pm 0.001)$  U/mg 蛋白 (MF15c) (图 6b), 细胞质的酶活力只有线粒体的约 50%。含 30% 葡萄糖的培养基胁迫培养 24h 后, MF1002 和 MF15c 的细胞质 ATP 酶活力分别增加至  $(0.054 \pm 0.050)$  U/mg 蛋白和  $(0.110 \pm 0.007)$  U/mg 蛋白, 较无胁迫时的酶活力分别增加了 0.26 倍和 1.56 倍 (图 6a), 而菌株线粒体的酶活力则分别增高至  $(0.220 \pm 0.005)$  U/mg 蛋白 (MF1002) 和  $(0.39 \pm 0.01)$  U/mg

蛋白 (MF15c), 较无胁迫时的酶活分别增加了 1.68 倍和 2.55 倍 (图 6b)。受高糖胁迫时, MF15c 的细胞质 ATP 酶活力和线粒体 ATP 酶活力的提高均显著高于 MF1002 菌株。

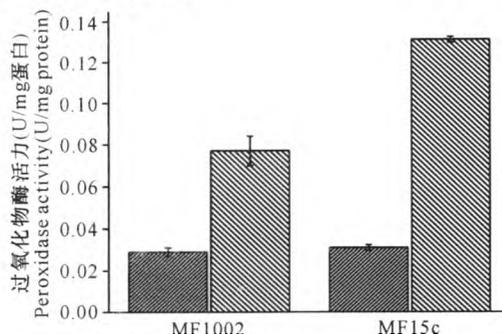


图5 高糖胁迫下菌株胞内过氧化物酶的活力变化

Fig. 5 Peroxidase activity change in the cell extract of strains under high glucose stress

菌株在 YPD 培养 8h 至对数期后直接接种含 30% 葡萄糖的高糖培养基进行胁迫处理, 结果为二次平行试验的平均数和标准差。

The strains were cultivated in the medium containing 30% glucose for 24h for stress treatment after cultured in YPD for 8h to exponential phase. The results were the means value and standard deviation of duplicate experiments.

■: YPD培养基, ▨: 30%葡萄糖。  
 ■: YPD medium, ▨: 30% glucose.

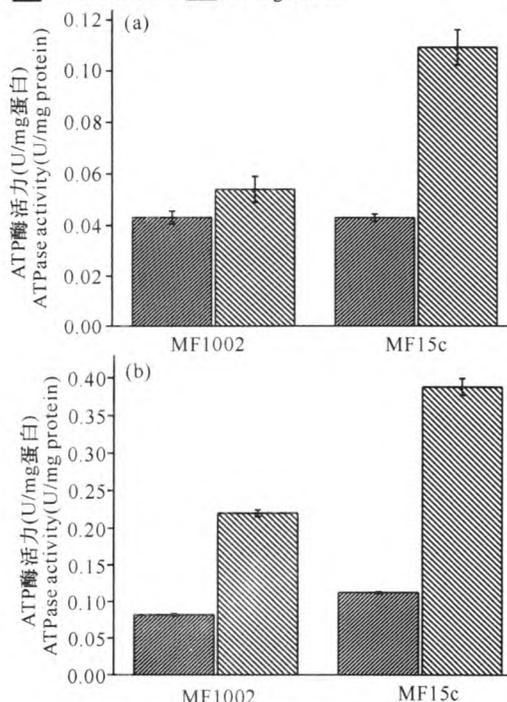


图6 高糖胁迫下菌株细胞质(a)和线粒体(b) ATP 酶的活力变化

Fig. 6 ATPase activity change in cytoplasm(a) and mitochondria(b) of strains under high glucose stress

菌株在 YPD 培养 8h 至对数期后直接接种含 30% 葡萄糖的高糖培养基进行胁迫处理, 结果为二次平行试验的平均数和标准差。

The strains were cultivated in the medium containing 30% glucose for 24h for stress treatment after cultured in YPD for 8h to exponential phase. The results were the means value and standard deviation of duplicate experiments.

■: YPD培养基, ▨: 30%葡萄糖。  
 ■: YPD medium, ▨: 30% glucose.

### 3 讨论

实现甘蔗糖蜜乙醇高浓度发酵的关键之一是获得耐高糖、高产的酿酒酵母生产菌株。本研究以甘蔗糖蜜乙醇发酵野生型酿酒酵母高产菌株 MF1002, 以及对糖分的利用能力显著提高的该菌株的呼吸突变体 MF15c 为实验对象, 探讨酿酒酵母糖分利用及高糖耐受的关系。以往的研究已显示, MF15c 的呼吸强度只有 MF1002 的 57.77%, 发酵醪液的残糖含量较 MF1002 低 34.85%, 发酵效率较 MF1002 高 6.69%<sup>[10]</sup>。本研究进一步观察两菌株在高糖胁迫下的菌株生长和乙醇发酵情况。随着培养基葡萄糖浓度由 25% 逐步提高到 30% 和 40%, 两菌株的生长均受到一定程度的抑制, 菌体数目增长和细胞出芽率成线性下降。其中, MF1002 的最大菌体数目和细胞出芽率分别降低了 37.71% 和 28.88%, 而 MF15c 则分别下降了 28.88% 和 14.81% (图 1), 同时, MF1002 的乙醇发酵受高糖的抑制也显著大于 MF15c (图 2), 说明 MF15c 不仅糖分利用能力明显高于 MF1002, 对高糖的耐受能力也显著优于 MF1002。

对酿酒酵母的抗性胁迫反应已有许多报道, 但对其高糖耐受的研究不多。目前认为, 酿酒酵母对胁迫反应有两个主要机制, 热击应激反应和氧化应激反应, 二者均受到多基因的参与和调控, 与多种代谢途径有关, 不同的抗逆性反应之间还存在相互交叉现象, 即对一种胁迫耐受性高的菌株对另一种胁迫往往也具有较高的耐受能力<sup>[6~8]</sup>。其中, SOD 和过氧化氢酶均参与酿酒酵母的氧化应激机制。酿酒酵母受到各种环境胁迫时, 其细胞内的氧化还原平衡被打破, 内源性活性氧化物, 如活性氧自由基和活性氮自由基大量积累, 对细胞造成伤害。此时, SOD 催化超氧化物自由基生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ , 后者进一步催化  $H_2O_2$  发生分解, 由此消除活性氧自由基对细胞的损伤作用<sup>[23]</sup>。酿酒酵母受高盐<sup>[24]</sup>、高浓度乙醇<sup>[25, 26]</sup>、高温热击和氧化剂<sup>[27]</sup>等胁迫时, 其 SOD 活力显著提高, 受氧化剂胁迫时其过氧化氢酶活力显著增高<sup>[27, 28]</sup>。ATP 酶催化 ATP 分解, 并释放能量, 与酿酒酵母的抗氧化性能和抗热击等多种抗性有关, 尤其在高渗胁迫时, 对维持细胞内的渗透压起到关键作用, 受胁迫时酿酒酵母菌株的 ATP 酶活力增高<sup>[29, 30]</sup>。过氧化物酶催化过氧化氢和有机过氧化物对各种有机物和无机物的氧化作用<sup>[31]</sup>。尽管过氧化物酶与酿酒酵母抗胁迫的相关关系目前尚未见报道, 但有报道表明该酶与植物<sup>[32]</sup>和细菌<sup>[33]</sup>的抗胁迫有

关。何静辉等<sup>[34]</sup>将萝卜的过氧化物酶基因导入毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 表达, 结果显著提高了菌株的抗盐性。说明过氧化物酶也可能与酿酒酵母的高糖耐受有关。本研究分析了糖分利用能力明显不同的 MF1002 和 MF15c 两菌株的胞内 SOD、胞内过氧化氢酶、胞内过氧化物酶、细胞质和线粒体的 ATP 酶等 5 种酶在高糖胁迫下的活力变化, 结果表明, 两菌株这 5 种酶在高糖胁迫下活力均显著上升, 结果与上述文献报道完全一致, 表明这 5 种酶均参与了酿酒酵母的高糖胁迫反应。对于胞内 SOD、胞内过氧化物酶、细胞质 ATP 酶, 以及线粒体 ATP 酶等, 高糖耐受能力较强的 MF15c 菌株受高糖胁迫时活力上升的幅度显著高于高糖耐受能力相对较弱的 MF1002 (图 3、5、6), 说明胞内 SOD、胞内过氧化物酶、细胞质 ATP 酶和线粒体 ATP 酶等的活性可能与 MF15c 菌株的高糖耐受有关, 可作为指导我们进一步改造该菌株的生理指标。尽管两菌株的胞内过氧化氢酶活力在受高糖胁迫时均显著提高, 但 MF1002 提高的幅度 (232.71 倍) 显著大于 MF15c (43.05 倍) (图 4), 说明该酶只是参与了酿酒酵母 MF15c 的高糖胁迫反应, 与 MF15c 菌株的高糖耐受能力可能没有关联性。从目前的研究进展看, 上述这 4 种酶在高糖胁迫下活力显著上升的原因还需从分子水平进一步探讨。

### 4 结论

(1) 糖分利用能力显著提高的酿酒酵母呼吸突变体 MF15c 较始发菌株 MF1002 具有更强的高糖耐受性。

(2) 受高糖胁迫时, 两菌株的胞内 SOD、胞内过氧化氢酶、胞内过氧化物酶、细胞质 ATP 酶和线粒体 ATP 酶等的活力均显著上升, 说明这 4 种酶均参与了酿酒酵母的高糖胁迫反应。

(3) 胞内 SOD、胞内过氧化物酶、细胞质 ATP 酶和线粒体 ATP 酶的活性可能与 MF15c 菌株的高糖耐受能力有关, 可作为指导我们进一步改造该菌株的生理指标。

#### 参考文献:

- [1] Casey G P, Magnus C A, Ingledew W M. High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentration of ethanol by brewing yeast [J]. *Biotechnology Letters*, 1983, 5: 429-434.
- [2] Thomas K C, Hynes S H, Jones A M, et al. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: Effect of sugar concentration and fermentation temperature [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1993, 43 (3):

- 211-226.
- [3] Thomas K C, Hynes S H, Ingledew W M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation[J]. *Process Biochemistry*, 1996, 31(4): 321-331.
- [4] 陈东, 陆琦, 张穗生, 等. 甘蔗糖蜜酒精高产酵母菌株 MF1001 的高浓发酵生产试验[J]. *广西科学*, 2011, 18(4): 385-391.  
Chen D, Lu Q, Zhang S S, et al. High gravity alcoholic fermentation from sugarcane molasses by a high-yield *Saccharomyces cerevisiae* strain MF10001 in industrial scale[J]. *Guangxi Sciences*, 2011, 18(4): 385-391.
- [5] 中国轻工业联合会. QB/T2684-2005 甘蔗糖蜜[S]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.  
China National Light Industry Council. QB/T2684-2005 Sugarcane molasses[S]. Beijing: China Light Industry Press, 2005.
- [6] Perez-Torrado R, Bruno-Barcena J M, Matallanal E. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6831-6837.
- [7] Varela J C S, van Beekvelt C A, Planta R J, et al. Osmo-stress-induced changes in yeast gene expression[J]. *Molecular Microbiology*, 1992, 6(15): 2183-2190.
- [8] Trollmo C L, Andre, Bloomberg A, Adler L. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1988, 56(3): 321-325.
- [9] 陆琦, 张穗生, 吴仁智, 等. 三株甘蔗糖蜜酒精发酵高产酵母菌株的筛选[J]. *广西科学*, 2010, 17(4): 368-372, 376.  
Lu Q, Zhang S S, Wu R Z, et al. Screening three high-yield *Saccharomyces cerevisiae* strains for alcohol fermentation of sugarcane molasses[J]. *Guangxi Sciences*, 2010, 17(4): 368-372, 376.
- [10] 韦缘, 张穗生, 陈东, 等. 两株高糖分利用能力的酿酒酵母呼吸突变体选育[J]. *生物技术通报*, 2012, 7: 158-162.  
Wei Y, Zhang S S, Chen D, et al. Breeding of two respiration-impaired mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced sugar metabolism capacity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, 7: 158-162.
- [11] 张水龙, 陈东, 曹树威, 等. 黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 的克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. *广西科学*, 2013, 20(2): 148-151, 157.  
Zhang S L, Chen D, Cao S W, et al. Cloning of *xynB* gene encoding xylanase B from *Aspergillus niger* and expression in *Sacharomyces cerevisiae* [J]. *Guangxi Sciences*, 2013, 20(2): 148-151, 157.
- [12] 陈英, 陈东, 陆琦, 等. 酿酒酵母  $\alpha$ -半乳糖苷酶基因重组菌株的表达分析[J]. *广西科学*, 2013, 20(2): 143-147.  
Chen Y, Chen D, Lu Q, et al. Recombination and expression analysis of  $\alpha$ -galactosidase gene recombinants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Guangxi Sciences*, 2013, 20(2): 143-147.
- [13] 王青艳, 杨登峰, 孙靓, 等. 酿酒酵母中的嗜热细菌木糖异构酶活性表达及木糖代谢研究[J]. *广西科学*, 2009, 16(4): 446-450.  
Wang Q Y, Yang D F, Sun L, et al. Active expression of xylose isomerase from *Thermobifida fusca* in *Saccharomyces cerevisiae* and its influence on xylose metabolism[J]. *Guangxi Sciences*, 2009, 16(4): 446-450.
- [14] 王利英, 刘一, 杨登峰, 等. 绿色木霉葡聚糖内切酶 cDNA 基因的克隆及其在酿酒酵母中的表达[J]. *广西科学*, 2007, 14(3): 315-319.  
Wang L Y, Liu Y, Yang D F, et al. Cloning of the endoglucanase cDNA genes from *Trichoderma viride* and their expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Guangxi Sciences*, 2007, 14(3): 315-319.
- [15] 关妮, 杨登峰, 米慧芝, 等. 杀菌剂对蔗汁乙醇酵母生长和发酵性能的影响[J]. *广西科学院学报*, 2011, 27(4): 355-357.  
Guan N, Yang D F, Mi H Z, et al. Influence of bactericides for *Saccharomyces cerevisiae* growth and fermentation performance from sugarcane juice[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2011, 27(4): 355-357.
- [16] 张穗生, 陆琦, 陈东, 等. 甘蔗糖蜜酒精高产酵母的发酵特性研究[J]. *广西科学*, 2010, 17(4): 363-367.  
Zhang S S, Lu Q, Chen D, et al. Studies on alcohol fermentation features of a high-yield *Saccharomyces cerevisiae* using sugarcane molasses as feedstock[J]. *Guangxi Sciences*, 2010, 17(4): 363-367.
- [17] 杜丽琴, 杨键, 朱绮霞, 等. 酿酒酵母蔗糖酶基因的克隆、异源表达及重组酶学性质研究[J]. *广西科学*, 2008, 15(2): 184-188.  
Du L Q, Yang J, Zhu Q X, et al. Cloning, expression and characterization of gene encoding invertase from *Sacchromyces cerevisiae* [J]. *Guangxi Sciences*, 2008, 15(2): 184-188.
- [18] Peskin A V, Winterbourn C C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2000, 293(1-2): 157-166.
- [19] O'Brien P, Slaughter M R. Determination of catalase activity. World Intellectual Property Organization; WO2001034831[P]. 2001-05-17.

- [20] 惠永华,王路,牛金涛. 一种检测乳过氧化物酶方法的建立[J]. 南方农业学报,2011,42(1): 105-108.  
Hui Y H, Wang L, Niu J T. Development of a method to detect lactoperoxidase (LP) activity in milk[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(1): 105-108.
- [21] Korshunov S S, Skulachev V P, Starkov A A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria[J]. FEBS Letters,1997,416(1):15-18.
- [22] 张凤莲. 酿酒酵母 PP2C 类蛋白磷酸酯酶对线粒体 ATP 酶活性的调控[D]. 天津:天津大学生命科学学院,2008.  
Zhang F L. Regulation of mitochondrial ATPase activity by type 2C protein phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2008.
- [23] 杜春迎,赵辉,赵志昌,等. 发酵工业中酿酒酵母耐性机制的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(13): 378-382.  
Du C Y, Zhao H, Zhao Z C, et al. Research progress in the tolerance mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(13): 378-382.
- [24] 刘向勇. 酿酒酵母 Bdf1p 转录因子在高盐胁迫反应中调控机制的研究[D]. 济南:山东大学生命科学院,2008.  
Liu X Y. Regulation of the Bdf1p transcription factor in the salt stress response of *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Jinan: Shandong University, 2008.
- [25] Costa V, Reis E, Quintanilha A, et al. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*; the key role of the mitochondrial superoxide dismutase [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 300(2): 608-614.
- [26] Costa V, Amorim M A, Reis E, et al. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase [J]. Microbiology, 1997, 143(pt5): 1649-1656.
- [27] Davidson J F, Whyte B, Bissinger P H, et al. Oxidative stress is involved in heat - induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(10): 5116-5121.
- [28] 马超颖,戚薇,杜连祥. 酿酒酵母氧化应激反应的研究进展[J]. 天津轻工业学院学报, 2002, 43(12): 14-17.  
Ma C Y, Qi W, Du L X. The progress of the oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Tianjin University of Science and Technology, 2002, 43(12): 14-17.
- [29] Anareto B, Piper P. Plasma-membrane ATPase action affects several stress tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as well as the extent and duration of the heat shock response[J]. Journal of General Microbiology, 1990, 136(9): 1763-1770.
- [30] Coote P J, Jones M V, Seymour I J, et al. Activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology, 1994, 140(8): 1881-1890.
- [31] Dunford H B, Stillman J S. On the function and mechanism of peroxidases [J]. Coordination Chemistry Reviews, 1976, 19(2): 187-251.
- [32] 蒋选利,李振岐,康振生. 过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2001, 29(6): 124-129.  
Jiang X L, Li Z Q, Kang Z S. The recent progress of research on peroxidase in plant disease resistance [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2001, 29(6): 124-129.
- [33] Poole L B. Bacterial defenses against oxidants; mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases, review [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 433: 240-254.
- [34] 何静辉,杨静,王丽,等. 转萝卜过氧化物酶基因 *Rsprx1* 提高毕赤酵母抗盐性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(12): 1149-1155.  
He J H, Yang J, Wang L, et al. Enhancement of salt tolerance in *Pichia pastoris* by gene transfer of radish peroxidase [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(12): 1149-1155.

(责任编辑:陈小玲)