

# 酿酒酵母呼吸缺陷型和野生型酒精发酵特性的比较分析\*

金建玲\*\* 刘巍峰 高东

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘要:** 比较了酒精发酵生产菌株 IFFI 1300 及其呼吸缺陷型突变株在酒精产量、发酵动力学、耐酒精能力及与酒精发酵相关的乙醇脱氢酶活性等方面的特性。结果表明: 1) 发酵终期的酒精产量, 45 株呼吸缺陷型的平均值与野生型没有显著性差异; 但部分缺陷型的酒精产量高于野生型。2) 酒精发酵动力学结果显示, 呼吸缺陷型酒精产生速度略高于野生型。3) 单位重量干菌体的乙醇脱氢酶活性, 呼吸缺陷型高于野生型。以上结果提示: 呼吸缺陷型用于酒精发酵以提高酒精产量和缩短发酵周期是有潜力的。4) 单位体积发酵液的乙醇脱氢酶活性则野生型高于呼吸缺陷型, 主要原因在于呼吸缺陷型的生物量明显低于野生型。5) 呼吸缺陷型菌株之间的耐酒精能力差别很小, 耐酒精能力的高低与酒精产量的高低没有明显的正相关性。一般的, 酒精产量高的菌株耐酒精能力较强。在实验结果的基础上, 对呼吸缺陷型用于酒精发酵的优越性和可行性进行了讨论。

**关键词:** 呼吸缺陷型, 酒精发酵, 酿酒酵母

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0009-06

\* 山东大学微生物技术国家重点实验室开放基金资助项目  
山东大学优秀青年基金资助项目

\* 联系人 Email: jinjianling@sdu.edu.cn

收稿日期: 2002-10-08, 修回日期: 2002-12-10

## COMPARING CHARACTERISTICS OF ETHANOL PRODUCTION BY RESPIRATORY DEFICIENT MUTANTS AND WILD STRAIN IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

JIN Jian-Ling     LIU Wei-Feng

(State Key Lab. of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract:** In order to compare the characteristics of ethanol production, a series respiratory deficient mutants ( $\rho^-$ ) of *Saccharomyces cerevisiae* and their wild parent strain ( $\rho^+$ ) were assayed for ethanol yield, ethanol fermentation kinetics, ethanol tolerance, and activities of ethanol-dehydrogenase. The data indicated that: Though the average amount of ethanol produced by mutants  $\rho^-$  and by wild  $\rho^+$  strains were similar, some mutants produced a little more amount of ethanol than wild type. The kinetics curve of ethanol fermentation suggested that  $\rho^-$  mutants had a little higher ethanol fermenting speeds than wild type. The activity of ethanol-dehydrogenase per unit weight of protein of  $\rho^-$  mutants cells were higher than that of wild strain  $\rho^+$ ; the activity of ethanol-dehydrogenase per unit volume of fermentation medium of  $\rho^+$  were higher than that  $\rho^-$  mutants, mainly due to the higher biomass of  $\rho^+$  were higher than that of  $\rho^-$  mutants. Some  $\rho^-$  mutants could tolerate higher ethanol concentration than wild  $\rho^+$  strain, but some not. If higher ethanol tolerance and higher ethanol yield  $\rho^-$  mutants were used in fermenting process, higher ethanol yield would be expected, but some problems such as that  $\rho^-$  mutants grew slowly should be considered.

**Key words:** respiratory deficient mutant, ethanol fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

酵母线粒体基因组缺失突变而导致菌体氧化磷酸化功能缺失的一类突变型, 通常称之为呼吸缺陷型 (“pepites” 或  $\rho^-$  突变型)<sup>[1]</sup>。这类突变型不会发生回复突变, 因此是遗传稳定的。它们的生理生化特征包括<sup>[2]</sup>: 不能利用非发酵性碳源 (如甘油, 乙醇等), 只能利用发酵性碳源如葡萄糖, 果糖等, 进行糖酵解产生乙醇来提供生长代谢所需要的能量 (ATP)。而野生型  $\rho^+$  则可以利用发酵性和非发酵性两类碳源产能和生长: 在耗氧条件下可以既利用发酵性碳源进行酵解和三羧酸循环-氧化磷酸化产能, 也可以利用氧化非发酵性碳源产能; 厌氧条件下则只能利用发酵性碳源进行糖酵解和乙醇发酵产能和生长。

自酵母菌呼吸缺陷型 ( $\rho^-$ ) 发现以来, 许多学者对呼吸缺陷型用于酒精发酵的可能性进行了探讨。20多年来, 一直存在正反两种意见。Xavier 和 Bacila 等人报道了呼吸缺陷型具有较高水平的糖酵解酶系, 和较高的乙醇脱氢酶活性<sup>[3]</sup>。于是人们尝试着将呼吸缺陷型应用于酒精发酵。Bacila 等发现呼吸缺陷型比野生型具有更高的产酒精能力<sup>[4]</sup>; Esser 等认为呼吸缺陷型的产酒精能力在耗氧条件下高于野生型, 在厌氧条件下则低于野生型<sup>[5]</sup>; Hutter 等得到呼吸缺陷型产酒精发酵速度低于野生型的结论<sup>[6]</sup>, Poincor 等则报道  $\rho^-$  突变株在厌氧条件下的发酵速度是野生型的 2 倍<sup>[7]</sup>。中国的楼纯菊报道了发酵瓶实验呼吸缺陷型比野生型酒精产量略有提高<sup>[8,9]</sup>。至今, 在呼吸缺陷型应用于酒精发酵方面仍没有定论。本文检测了系列呼吸缺陷型突变株在酒精产量, 发酵动力学, 耐酒精能力及酶学性质方面与野生型的差别, 对呼吸缺陷型应用于酒精发酵的可能性进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

酒精酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) IFFI 1300 ( $\rho^+$ ) 山东酒精总厂提供。酒精酵母 (*S. cerevisiae*) 1300-1 至 1300-50 ( $\rho^-$ ) 系本室从 1300 ( $\rho^+$ ) 经 EB、UV 诱变所得, 不能在甘油为唯一碳源的培养基上生长<sup>[10,11]</sup>。

### 1.2 培养基

1.2.1 YPD 培养基: 葡萄糖 20g, 蛋白胨 20g, 酵母膏 10g, 水 1,000mL pH5.5 ~ 6.0。

1.2.2 天然发酵培养基: 山东酒精总厂提供的糖化醪。

1.2.3 合成发酵培养基: 葡萄糖 160g, 硫酸铵 12g, 磷酸二氢钾 5g, 硫酸镁 0.5g, 氯化钙 0.1g, 水 1,000mL, pH5.5 ~ 6.0。

### 1.3 测定方法

1.3.1 还原糖测定: 采用 Somigy 定糖法<sup>[12]</sup>。

1.3.2 酒精含量测定: 采用常规的气相色谱法进行。

1.3.3 乙醇脱氢酶活性测定: 按文献 [4] 方法进行。

1.3.4 生长曲线测定: 采用比浊法<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 呼吸缺陷型和野生型酒精产量的比较

45 株经不同途径筛选得到的呼吸缺陷型突变株 ( $\rho^-$ ) 和野生型菌株, 经合成发酵培养基预培养后, 调整菌悬液的浓度使之得到  $OD_{600} = 0.8$ , 然后按 10% 的接种量接种到糖化醪发酵培养液 (还原糖含量 165mg/mL) 中, 深层静置发酵。不同时间取样, 检测发酵液中的还原糖含量。当还原糖的残余量仅占起始值的 5% 以下时, 终止发酵。测定各发酵瓶中的酒精含量, 结果见表 1。

从表中可以看出, 野生型菌株的 5 次重复实验的酒精产量非常接近, 没有显著性差异。不同的呼吸缺陷型菌株的酒精产量存在显著性差异, 最高值为每 100mL 发酵液中含酒精 10.16g, 最低值为 9.21g; 45 株呼吸缺陷型菌株酒精产量的平均值与野生型的平均值极为接近, 但呼吸缺陷型的最高酒精产量比其平均值提高 13.1%。因此, 呼吸缺陷型用于酒精发酵具有潜在的可能性。

表 1 野生型和 45 株呼吸缺陷型酒精发酵产量的比较<sup>A</sup>

菌株	1300 ( $\rho^+$ ) <sup>B</sup>	1300-1 ~ 1300-45 ( $\rho^-$ ) <sup>C</sup>								
酒精产量	9.52	9.64	9.49	9.87	9.46	9.67	10.01	9.66	9.39	9.57
(g/100mL)	9.55	8.91	9.55	9.63	9.40	9.41	9.56	9.60	9.59	10.16
	9.56	9.83	9.52	9.39	9.43	9.58	9.81	9.70	9.35	9.51
	9.50	9.62	9.58	9.65	9.55	9.38	9.74	9.32	9.44	9.76
	9.59	9.66	9.73	9.52	9.33	9.43	9.25	9.50	9.31	9.18
平均值	9.544	9.547								
95%可信限	9.50-9.59	9.49-9.60								

注: A 图中酒精产量为发酵终止时 (10%接种量, 糖化醪, 72h), B 野生型酒精产量为 5 次重复实验的平均值,

C 呼吸缺陷型酒精产量为 45 株菌的平均值, 表中每株菌的酒精产量代表 3 次重复实验的平均值

### 2.2 呼吸缺陷型酒精发酵动力学

由于不同呼吸缺陷型酒精产量的平均值与野生型非常接近, 其优越性不明显, 因

此我们对呼吸缺陷型酒精发酵的动力学进行研究,以期探明呼吸缺陷型在酒精发酵方面是否具有优越于野生型的其它特性。实验操作同上,接种量为5%,在发酵的不同时间取样,用于酒精含量、还原糖含量、菌体生长量等指标的测定。结果见图1。不同呼吸缺陷型菌株之间以及呼吸缺陷型与野生型之间的酒精产量和产生速度,在发酵中后期(48~72h)差别较大,而且呼吸缺陷型高于野生型;在接近发酵终期时这种差别逐渐缩小。

图1的结果显示,采用5%接种量时,尽管呼吸缺陷型在最终的酒精产量与野生型比较接近,但缺陷型酒精产生速度比野生型快,发酵中间(48~60h)时缺陷型的酒精产量略高于野生型。而10%接种量(生产上接种量10%以上)时,呼吸缺陷型到达发酵终点约在60~66h,野生型约在72h。因此,有望利用呼吸缺陷型缩短酒精发酵周期。

### 2.3 呼吸缺陷型和野生型的酶学及生长特性的比较

呼吸缺陷型酵母的生长速率和最大生物量都明显低于野生型,但在酒精发酵中其酒精产率却高于野生型酵母,造成这种差别的可能原因是什么?为此,我们比较了呼吸缺陷型和野生型酵母的生长特性、还原糖消耗速度、乙醇脱氢酶活性、酒精耐性等指标,结果见图2、图3和表2。

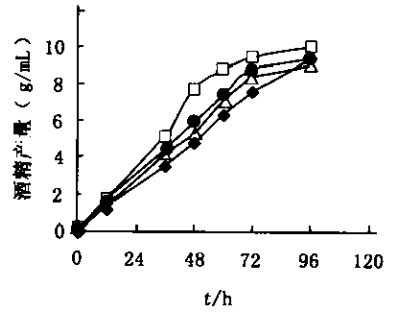


图1 酒精发酵动力学

◆—系列1, ○—系列2,  
—△—系列3, ●—系列4

系列1: 野生型 1300, 系列2: 呼吸缺陷型 1300-5 (酒精终产量高于野生型), 系列3: 呼吸缺陷型 1300-3 (酒精终产量低于野生型), 系列4: 呼吸缺陷型 1300-1 (酒精终产量与野生型接近)

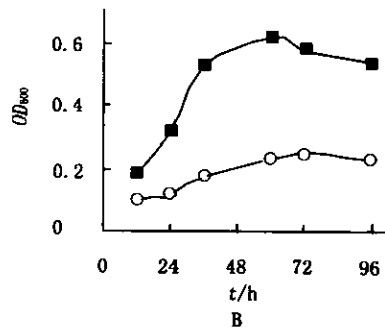
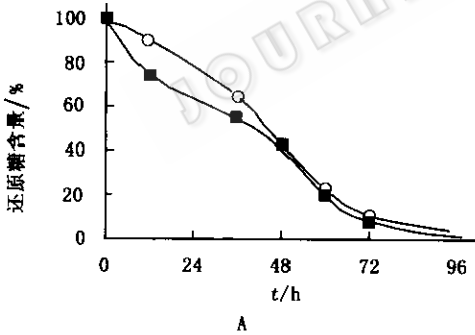


图2 还原糖消耗曲线(A)和生长曲线(B)

○—系列1, ■—系列2

系列1: 5株呼吸缺陷型的平均值, 其中1300-5, 1300-6的酒精产量高于野生型, 1300-1, 1300-7的酒精产量近于野生型, 1300-3的酒精产量低于野生型, 系列2: 野生型1300

从图2中可知,野生型酵母在酒精发酵的早期菌体量有明显增加,而呼吸缺陷型增加幅度远远小于野生型;这个结果说明,尽管发酵早期野生型的还原糖消耗量高于呼吸缺陷型,由于野生型消耗了更多的还原糖来合成菌体组分,因此酒精产量却反而略低于呼吸缺陷型。

图3结果显示,尽管单位菌体干重的乙醇脱氢酶活性呼吸缺陷型(5株呼吸缺陷型的平均值)高于野生型,可是由于单位体积发酵液中野生型的生物量大,因此,最终显示单位体积发酵液中的乙醇脱氢酶活性仍然是野生型高。

表2显示,不同的呼吸缺陷型菌株的耐酒精能力略不同。关于酒精耐性与酒精产量之间的关系,一直存在不同意见。Ezeronye等报道<sup>[14]</sup>,对于不同种的酵母菌,酒精产量低的菌株对外加酒精有更好的耐受性。对于同一种酵母,一般认为酒精耐性好与产量高存在正相关性。我们实验结果表明,来源于同一亲本的突变株的酒精产量与耐酒精能力没有明显的相关性。

2.4 本研究的意义及呼吸缺陷型用于酒精发酵的可能性分析

目前国内外对呼吸缺陷型酒精发酵的报道,一般都局限于几株菌<sup>[4-9]</sup>,因此存在两种不同的观点。我们通过对大量菌株的比较研究,发现某些呼吸缺陷型菌株的最终酒精产量可能略高于野生型,有些会略低于野生型,有些和野生型接近。因此筛选耐酒精能力强和酒精产量高的菌株,有可能用于酒精发酵会提高酒精产量。此外,酒精发酵动力学的结果显示,某些呼吸缺陷型菌株的

酒精产生速度可能较野生型高。这点国内外尚未见报道。因此,呼吸缺陷型用于酒精发酵还有缩短发酵周期的潜能。

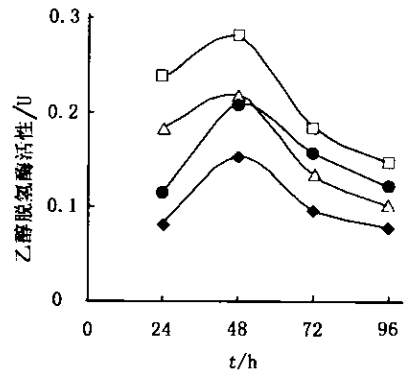


图3 呼吸缺陷型和野生型的乙醇脱氢酶活性

—●— 系列1, —●— 系列2,  
—□— 系列3, —△— 系列4

系列1:呼吸缺陷型乙醇脱氢酶活性(U)/mL发酵液;为5株缺陷型的平均值(菌株编号同图2)。系列2:野生型乙醇脱氢酶活性(U)/mL发酵液;为3次实验的平均值。系列3:呼吸缺陷型乙醇脱氢酶活性(U)/mg干菌体;为5株缺陷型的平均值。系列4:野生型乙醇脱氢酶活性(U)/mg干菌体;为3次实验的平均值。

表2 呼吸缺陷型和野生型耐酒精能力的比较

菌株	1300	1300-1	1300-3	1300-5	1300-6	1300-7
相对耐酒精能力*	+++	++	++	+++	+++	+++
发酵终止时的相对酒精产量	100%	99.4%	87.4%	108.6%	105.4%	98.7%

\*: +++表示在含8%酒精的培养液中第5d仍然有较强的发酵力,产气泡多, ++表示在含8%酒精的培养液中第3d有较强的发酵力,产气泡多,第5d仅有少量气泡产生。

目前中国的酒精发酵一般采用大罐深层发酵。发酵初期培养液中的氧气并没有被去除,属于有氧发酵。随着发酵时间的延长和菌体增长,培养液中的氧气被消耗掉造成厌氧环境,菌体才进入真正的酒精发酵阶段。在生产上,为了减少发酵初期有氧阶段不进行酒精发酵对产量的影响作用,通常采用提高底物浓度的方法来减少酵母菌的有氧呼吸;但是,这种方法不是完全的,总有少部分底物被有氧呼吸所消耗。而且,接近发酵终期,随着底物浓度的急剧下降,产物乙醇的浓度不断上升,加上厌氧条件不严格,此时,酵母菌体开始消耗乙醇进行少量生长。所以,这种发酵方法的能量转化系数不是最高的。

解决上述发酵过程中存在的问题以提高酒精产量和底物转化率,有以下两条途径:

第一,采用严格的厌氧条件。严格厌氧条件下野生型酵母只能通过乙醇发酵途径产能和生长。Esser等已经证明,在严格厌氧条件下,野生型的酒精产量高于呼吸缺陷型<sup>[5]</sup>。但是,严格的厌氧条件要求复杂的和成本较高的工艺条件。

第二,采用呼吸缺陷型突变株。由上所述可知,还原糖的代谢方式和转化为酒精的比例决定了酒精的终产量;在这点上呼吸缺陷型具有优越性。此外,酒精产生速度

跟菌体的乙醇脱氢酶活性与其生物量的乘积相关；尽管单位重量的菌体蛋白呼吸缺陷型比野生型具有更高的乙醇脱氢酶活性，但由于呼吸缺陷型的生物量远远低于野生型，最终导致单位体积发酵液中的乙醇脱氢酶活性仍然是野生型高于呼吸缺陷型。所以，生物量低是限制呼吸缺陷型用于实际生产的最重要因素。

由于呼吸缺陷型在还原糖的代谢方式和单位菌体的乙醇脱氢酶活性都比野生型更具优越性。因此，呼吸缺陷型用于不严格的厌氧条件下的酒精发酵是有潜力的。而要真正用于生产，尚需解决以下问题：（1）筛选耐酒精能力高的呼吸缺陷型突变株。（2）筛选乙醇脱氢酶活性高的呼吸缺陷型突变株。（3）改进生产工艺，增加一级种子罐，以解决呼吸缺陷型生物量低的问题，提高接种量。或在生产过程中使野生型酵母转变为呼吸缺陷型（如阶段性高温处理<sup>[15]</sup>）以解决种子问题。（4）探索呼吸缺陷型酒精发酵的最适发酵工艺。

### 参 考 文 献

- [1] Wilkie D. *Methods in Cell Biology* Vol XII-Yeast cells Academic Press, INC, 1975.
- [2] P A 惠特克, S M 丹克著, 林治焕, 等译. 线粒体—结构、功能和组装 第一版. 北京: 科学出版社, 1982.
- [3] Xavier A W, Costu S O, Bacila M. *An Acad Bras Cienc* 1975, **47**: 557 ~ 560.
- [4] Bacila M, Horii J. *Trends Biochem Sci*, 1979, **9**: 59 ~ 61.
- [5] Esser K, Schmidt U, Stahl U. *App Microbiol Biochem*, 1982, **16**: 161 ~ 164.
- [6] Hutter A, Oliver S G. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**: 511 ~ 516.
- [7] Poinot C, Moulin G, Claisse M. *Galzy P Antonie Van Leeuwenhoek*, 1987, **53**: 65 ~ 75.
- [8] 楼纯菊, 白沂涛, 焦瑞身. *微生物学通报*, 1984, **11** (2): 58 ~ 61.
- [9] 楼纯菊, 白沂涛, 焦瑞身, 等. *微生物学通报*, 1984, **11** (3): 102 ~ 104.
- [10] Slonimski P P, Perrodin G, Croft J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, **30**: 232 ~ 239.
- [10] 高 东, 刘家建, 金建玲. *遗传学报*, 1989, **16** (3): 49 ~ 53.
- [12] 北京大学生物化学教研室. *生物化学实验指导* (第一版). 北京: 高等教育出版社, 1979.
- [13] 白毓谦, 方善康, 高 东, 等. *微生物实验技术* (第一版). 济南: 山东大学出版社, 1987.
- [14] Ezeronye O U, Okerentugba P O. *Mycopathologia*, 2001, **152**: 85 ~ 89.
- [15] Yamamura M, Nagami Y, Vongsavanlert V, *et al.* *Can J Microbiol*, 1988, **34**: 1014 ~ 1017.