

文章编号: 1001-7453(1999)03-0042-05

产多元醇酵母的耐高渗生长特征

袁 野,王正祥,诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘要: 应用低水活度选择性增殖的方法从花卉、果园土壤、水果和蜂产品等样品中分离得到 267株耐高渗酵母,其中 206株生产阿拉伯醇、赤藓糖醇和甘油等各种多元醇。对随机挑选的 6株产多元醇的耐高渗酵母在不同质量浓度葡萄糖培养基中的生长特征进行了研究,结果显示酵母的耐高渗生长能力与其产多元醇的类别之间存在关联。在所调查的酵母中,产赤藓糖醇的酵母耐高渗生长能力最强,产阿拉伯醇的酵母耐高渗生长能力次之,产甘油的酵母耐高渗生长能力较弱。

关键词: 耐高渗酵母;多元醇;葡萄糖;生长特征

中图分类号: Q935 文献标识码: A

耐高渗酵母是一类能够生长在高渗透压(低水活度)环境下的微生物,根据生活环境性质的不同,可称为耐糖酵母(sugar-tolerant yeasts)和耐盐酵母(salt-tolerant yeasts)。Van der Walt^[1]建议用含葡萄糖质量分数分别为 50%和 60%的琼脂培养基来划分耐高渗酵母和嗜高渗酵母。耐高渗酵母最初被作为食物腐败菌来加以研究,直至 Spencer^[2]等人通过实验发现耐高渗酵母在好氧发酵条件下可以生产多种多元醇。各国研究者在对耐高渗酵母好氧发酵生产多元醇进行研究的同时,也对酵母的耐高渗机理进行了较广泛和深入的研究。Brown首次提出了相容性溶质这一概念^[3],认为耐高渗酵母通过胞内积累多元醇等相容性溶质来适应高渗环境生长。与不耐高渗的酵母相比,耐高渗酵母有活跃的 HMP途径,该途径的活化程度随糖质量浓度的增加而增加^[4],这是耐高渗酵母产多元醇和适应高渗环境生长的基础。Tilbury^[5]调查了 26株耐高渗酵母在蔗糖和甘油糖浆中的生长情况,发现 *Saccharomyces rouxii*最能适应高渗环境生长, *Hansenula anomala*不是特别适应高渗环境, *Torulopsis etchellsii*和 *Torulopsis versatilis*等能适应高渗环境,但它们生长得比酿酒酵母属的酵母慢。Anand等人^[6]调查了耐高渗酵母和不耐高渗酵母在不同水活度条件下的生长特征,发现耐高渗酵母有一个较宽的最适生长水活度范围,而不耐高渗酵母的此范围很窄。Onishi^[7]通过实验指出耐高渗酵母的耐糖和耐盐性质存在差异。Tokuoka等人^[8]考察了 1株耐高渗酵母分别在高质量浓度的葡萄糖、蔗糖和氯化钠条件下的生长和多元醇积累特征,进一步证实酵母在耐盐和耐糖,以及耐不同种类的糖上存在差别。作者用高浓度葡萄糖培养基选择性增殖的方法^[9]从 88个样品中分离得到 206株产多元醇酵母,并对随机选出的 6株产多

收稿日期: 1999-01-09;修订日期: 1999-05-17

作者简介: 袁野(1969年 1月生),男,四川乐山人,硕士研究生。

元醇酵母在不同质量浓度和质量分数的葡萄糖培养基中的生长特征进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

所有菌株均为作者实验分离所得。

1.2 培养基 (g/L)

增殖培养基 (g/L): 葡萄糖 400, 酵母膏 10, 尿素 1;

分离培养基 (g/L): 葡萄糖 200, 酵母膏 10, 尿素 1, 琼脂 20;

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 200, 酵母膏 5, 尿素 1;

斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 200, 酵母膏 5, 尿素 1, 琼脂 20;

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 100, 玉米浆 10 (ml/L), 尿素 2;

YEPD培养基 (M1) (g/L): 蛋白胨 20, 酵母膏 10, 葡萄糖 20;

质量浓度 20 g/dL 的葡萄糖培养基 (M2): 葡萄糖 200 (g/L), 其余配方同 YEPD;

质量分数 50% 的葡萄糖培养基 (M3): 葡萄糖质量分数为 50%, 其余配方同 YEPD;

质量分数 60% 的葡萄糖培养基 (M4): 葡萄糖质量分数为 60%, 其余配方同 YEPD。

1.3 方法

1.3.1 耐高渗酵母的分离 采用 Hajny 等人的方法分离耐高渗酵母, 具体操作见文献 [9]。

1.3.2 耐高渗酵母产多元醇的调查 将以上述方法分离所得的耐高渗酵母接种于摇瓶发酵培养基 (250 mL 的三角瓶装液量为 20 mL), 培养条件为: 往复式摇床 110 r/min, 30 °C, 2 ~ 3 d。采用纸上层析检测发酵液中多元醇产物, 所用展开剂是正丁醇-乙醇-水 (体积比为 95 : 5 : 18), 层析结果的显色参照文献 [10]。

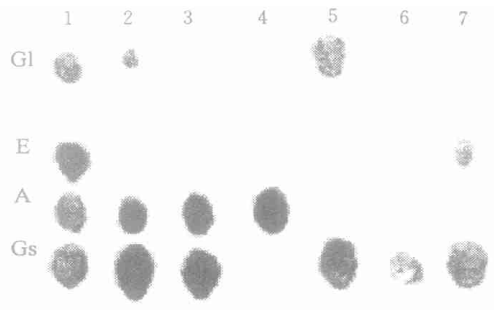
1.3.3 高渗条件下酵母生长特征的测定 接种斜面培养物至种子培养基 (250 mL 的三角瓶装液量为 30 mL), 置往复式摇床通风摇荡培养, 培养条件为: 110 r/min, 30 °C。待种子培养物长好后, 再转接至 M1 培养基、M2 培养基、M3 培养基和 M4 培养基等 4 种生长培养基中 (250 mL 的三角瓶装液量 30 mL, 接种量为 5%), 培养条件与种子培养相同。定时取样, 将样品稀释 10 倍后, 用分光光度比浊法于 640 nm 处测菌浓。

2 结果和讨论

2.1 耐高渗酵母的分离和产多元醇的调查结果

从 88 份自然样品分离得到 26 株酵母, 并对这些酵母进行了摇瓶发酵产醇调查, 结果见图 1 和表 1。

在所分离的耐高渗酵母中, 以产阿拉伯醇的酵母居多, 约占全部酵母总数的 60%, 其中单产阿拉伯醇的酵母占全部酵母总数的 23%, 混产阿拉伯醇和甘油的酵母占全部酵母总数的 37%。单产甘油的酵母约占全部酵母总数的 8%。产赤藓糖醇的酵母占全部酵母总数的 9%, 其中单产赤



G1-甘油; E-赤藓糖醇; A-阿拉伯醇; Gs-葡萄糖

图中 1 列为标准样, 2~7 列分别是分离得到的不同产醇类别的酵母

图 1 酵母生产多元醇的纸层析检测结果

藓糖醇的酵母约占全部酵母总数的 4% .从花中分离的酵母产醇类别要比从土中分离的酵母产醇类别丰富 .

表 1 耐高渗酵母产多元醇的情况

多元醇产物	从各种样品中分离的酵母数					酵母总数
	土样	花样	蜂和蜂产品	水果	其它	
阿拉伯醇	21	29	1	6	4	61
赤藓糖醇	0	5	5	0	0	10
甘油	11	5	0	3	2	21
赤藓糖醇+ 阿拉伯醇+ 甘油	4	2	0	0	2	8
赤藓糖醇+ 阿拉伯醇	1	1	0	0	1	3
赤藓糖醇+ 甘油	0	1	2	0	0	3
阿拉伯醇+ 甘油	42	41	2	13	2	100
其它	27	28	3	2	1	61
总计						267

2.2 产多元醇酵母的耐高渗生长特征

根据产多元醇类别的不同,挑选 6株耐高渗酵母进行研究.其中,产赤藓糖醇的酵母 10株,产阿拉伯醇的酵母 1株,产甘油的酵母 8株,混产赤藓糖醇和甘油的酵母 1株,混产赤藓糖醇和阿拉伯醇的酵母 2株,混产赤藓糖醇、阿拉伯醇和甘油的酵母 4株,混产阿拉伯醇和甘油的酵母 20株,研究了它们在 M1 M2 M3和 M4培养基中的生长特征,结果见表 2

从表中可知,产赤藓糖醇的酵母(单产和混产)绝大多数为第I类生长类型;产阿拉伯醇的酵母大多数为第II类生长类型;混产阿拉伯醇和甘油的酵母绝大多数为第II类和第III类生长类型;在产甘油的酵母中,不到半数为第II类生长类型,过半数为第III类生长类型.所调查的酵母中,产赤藓糖醇的酵母耐高渗生长能力最强,产阿拉伯醇的酵母耐高渗生长能力次之,混产阿拉伯醇和甘油的酵母耐高渗生长能力再次之,产甘油的酵母耐高渗生长能力最弱.

表 2 产多元醇酵母在 4种生长培养基的生长类型

产醇类别	生长类型			总计
	I	II	III	
	赤藓糖醇	10	0	
阿拉伯醇	2	12	3	17
甘油	0	3	5	8
赤藓糖醇+ 甘油	1	0	0	1
赤藓糖醇+ 阿拉伯醇	1	1	0	2
赤藓糖醇+ 阿拉伯醇+ 甘油	4	0	0	4
阿拉伯醇+ 甘油	1	10	9	20

注: I 培养 52 h后在 M1 M2 M3和 M4中均可生长;

II 培养 52 h后只在 M1 M3和 M4中生长;

III 培养 52 h后只在 M3和 M4中生长.

产不同类别多元醇的酵母在 M3和 M4培养基中的生长特征见图 2和图 3,可知产赤藓糖醇的酵母在两种培养基中的迟滞期都不超过 10 h,并且生长快,生成的细胞量大.产阿拉伯醇的酵母在两种培养基中的迟滞期均超过 10 h(15号菌在质量分数为 50%的葡萄糖培养基上的迟滞期短于 10 h),甚至 20 h,生长速度慢,生成的细胞量小.产甘油的酵母在质量分数为 50%的葡萄糖培养基上的迟滞期也超过 10 h,生长速度慢,生成的细胞量小.混产阿拉伯醇和甘油的酵母也是这种情况.实验结果表明,与 YEPD培养基和质量浓度为 20 g/dL的葡萄糖培养基相比,质量分数为 50%的葡萄糖培养基和质量分数为 60%的葡萄糖培养基对产醇类别不同的酵母的生长具有明显地选择性,糖质量分数越高,选择性越强.

耐高渗酵母在相对低渗的环境中也能产多元醇, Brown等人^[3]所实验的耐高渗酵母生长于基础培养基时(水分活度为 0.997),胞内多元醇也存在,而且主要是阿拉伯醇.酵母通过

胞内积累多元醇等相容性溶质来适应高渗环境生长,甘油被认为是主要的相容性溶质.但在另一些报道中^[11-13],甘油未参与酵母的耐高渗生长机制,因此,酵母的耐高渗机制是复杂的.作者将进一步研究在高渗环境下,这些产醇类别不同的酵母靠积累何种多元醇来适应高渗环境的生长.即便它们靠胞内积累甘油来适应高渗环境,那么,它们在耐高渗生长能力方面的差异又如何解释?从本文的结果直观地看,耐高渗酵母在相对低渗环境下产多元醇的类别与其耐高渗生长能力存在关联,通过对它们产多元醇机制的研究也许能解释这一差异.

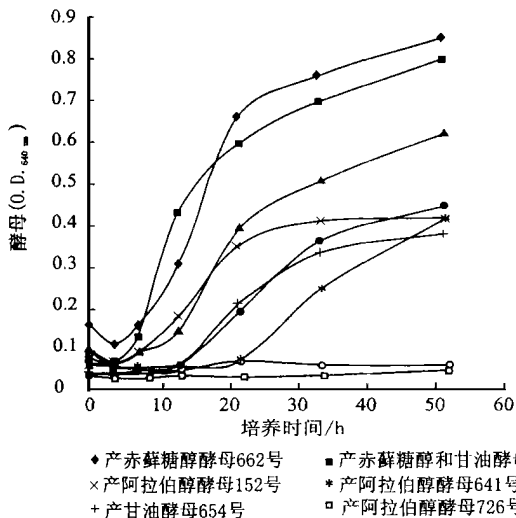


图2 不同产醇类别的酵母在质量分数为50%的葡萄糖培养基中的生长

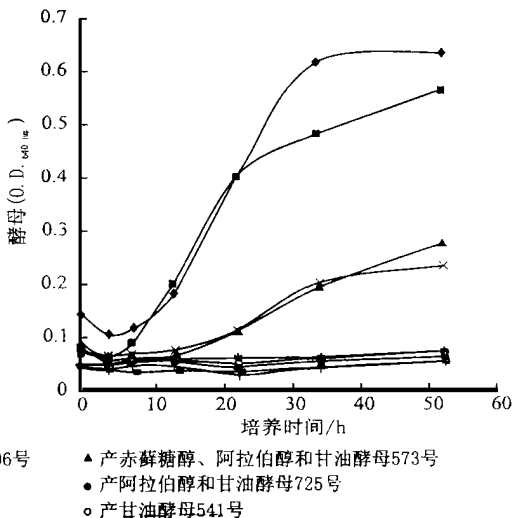


图3 不同产醇类别的酵母在质量分数为60%的葡萄糖培养基中的生长

参考文献:

- [1] VAN DER WALT J.P. The yeasts A taxonomic study [M]. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1970. 34- 113
- [2] SPENCER J.F.T, SALLANS H.R. Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts [J]. Can J Microbiol, 1956, 2 72- 79
- [3] BROWN A.D, SIMPSON J.R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols [J]. J Gen Microbiol, 1972, 72 589- 591
- [4] MORAN J.W, WITTER J.R. Effect of sugars on D-arabitol production and glucose metabolism in Saccharomyces rouxii [J]. J Bacteriol, 1979, 138 823- 830
- [5] TILBURY R.H. Studies on the microbiological deterioration of raw cane sugar [D]. Bristol: Uni of Bristol, 1962
- [6] ANAND J.C, BROWN A.D. Growth rate patterns of the so-called osmophilic and nonosmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol [J]. J Gen Microbiol, 1968, 52 205- 212
- [7] ONISHI H. Studies on osmophilic yeasts I: Salt-tolerance and sugar-tolerance of osmophilic soy-yeasts [J]. Bull Agric Chem Soc Jpn. 1957, 21 137- 142
- [8] TOKUOKA K, ISHITANE T. Accumulation of polyols and sugars in some sugar-tolerant yeasts [J]. J Gen Appl Microbiol, 1992, 38 35- 46
- [9] HAJNY G.J, SMITH J.H, GARVER J.C. Erythritol production by a yeastlike fungus [J]. Appl

- [10] TREV ELYAN W E, PROCTER D P. Detection of sugars on paper chromatograms [J]. Nature, 1950, 166 444~ 445
- [11] NOBRE M F, COSTA M S DA. The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress [J]. Can J Microbiol, 1985, 31 1061~ 1064
- [12] VAN ZYL P J, PRIOR B A. Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33 12~ 17
- [13] LUXO C, NOBRE M F. Intercellular polyol accumulation by yeastlike fungi of the genera *Geotrichum* and *Endomyces* in response to water stress(NaCl) [J]. Can J Microbiol, 1993, 39 868~ 873

Growth Patterns of Polyol-Producing Yeasts in Response to Water Stress

YUAN Ye, WANG Zheng-xiang, ZHUGE Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract A total of 267 strains of osmotolerant yeasts were isolated from flowers, fruits, soil and honey. A survey of these osmotolerant yeasts showed that glycerol, erythritol and arabitol were produced by 206 strains. The growth curves of 62 strains of polyol-producing yeasts in the four kinds of media with different glucose concentrations were compared, and a striking observation was made that the erythritol-producing strains were the most osmotolerant in the high glucose medium with concentration of up to 60% (w/w), those of arabitol-producing strains were less osmotolerant, and those of glycerol-producing strains were the least. It appeared that the extent of differences in osmotolerance of polyol-producing yeasts were mrrrelated to the type of palyols produced by the motderant yeasts.

Key words osmotolerant yeasts, polyols, glucose, growth curves