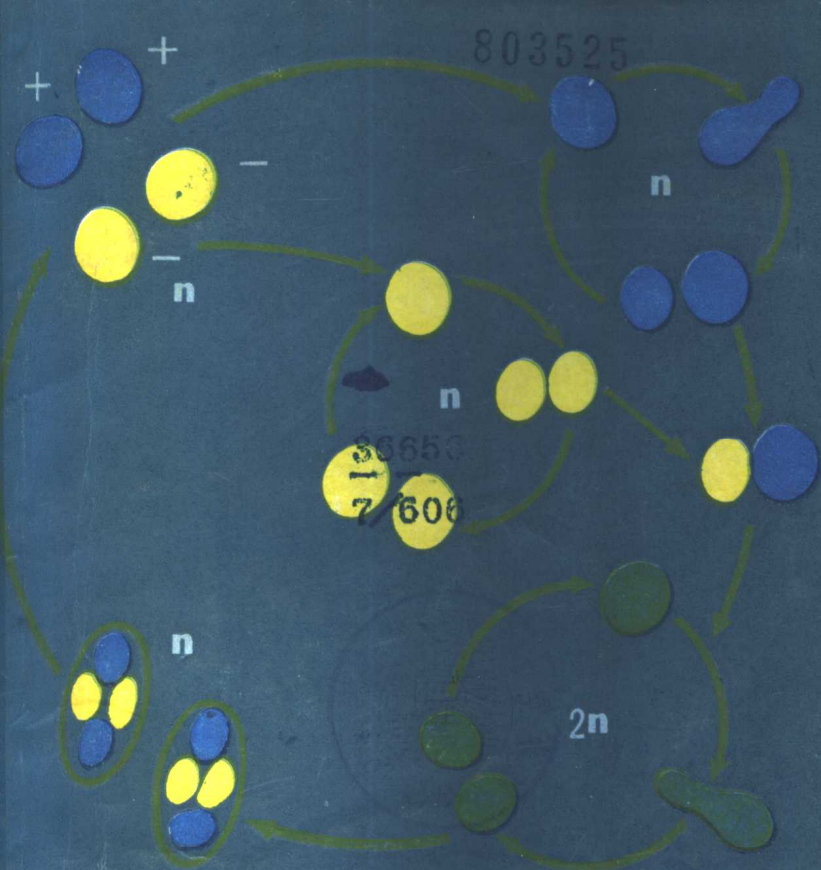




酵母菌生物学

[英] D.R.贝里 著 楼纯菊 徐士菊 译

复旦大学出版社

酵母菌生物学

[英] D.R. 贝里著

楼纯菊 徐士菊译

周德庆校

复旦大学出版社

1986年

BIOLOGY OF YEASTS (THE INSTITUTE OF BIOLOGY'S
STUDIES IN BIOLOGY, NO 140)

David R. Berry
Edward Arnold, 1982

酵母菌生物学

复旦大学出版社出版

新华书店上海发行所发行

复旦大学印刷厂印刷

字数 61 千 开本 787×1092 1/32 印张 2.625

1987 年 1 月第一版 1987 年 1 月第一次印刷

印数: 1—4,000

书号: 13253·049 定价: 0.55 元

序

在本书中,我试图向读者介绍一个广泛的研究领域,在这里,不论是过去还是现在,其研究工作都集中于用一种微生物——酿酒酵母来进行的。这样一个单一的真菌种,曾被全世界不同的社会用于生产面包或酒精饮料,故它是一个早为人们熟知并有明显经济价值的微生物。此外,酵母菌还是一种用于研究生命系统的最感兴趣的生物对象。在本书的编写中,我力图说明,由于控制传统发酵过程例如酿制啤酒的需要,是如何推动对酵母菌的科学研究的,目前的科学研究又是如何促使新型酵母工业发展的,等等。读者不妨问问自己,你每天要耗费多少酵母或酵母产品?

尽管本书只是一本有关酵母菌的入门书,然而读者还是可以领略一番有关生理学、细胞生物学和遗传学领域中的一些最新技术和概念,这是因为,在研究酵母之类的一种生物时,既可利用来自一切其他生物的研究成果,也可将其研究成果在整个生物科学中发挥重大的影响。

D. R. 贝里

1982 年于英国格拉斯哥

(徐士菊译)

目 录

序

一、绪论：酵母菌的历史

(一) 人类对酵母菌的早期开发	1
(二) 酵母菌的早期科学研究	2
(三) 酵母菌分类的发展	3
(四) 酿造酵母和面包酵母	4

二、酵母细胞的结构

(一) 细胞形态学	5
(二) 细胞壁	6
(三) 细胞膜	8
(四) 核	9
(五) 线粒体	9
(六) 其他细胞质结构	11

三、酵母菌的营养和代谢

(一) 营养要求	13
(二) 酵母菌的生长	14
(三) 酵母菌的代谢	16
(四) 代谢的调节	20

四、酵母菌的细胞生物学

(一) 染色体的结构	22
(二) DNA 的复制	24
(三) RNA	25
(四) 蛋白质的生物合成	27
(五) 酶产生的调节	27
(六) 线粒体	28

五、细胞的生长和分裂

(一) 细胞周期的性质	30
(二) 细胞周期中核的行为	31
(三) 细胞壁的合成	32
(四) 芽体的形成	34
(五) 细胞同步技术	35
(六) 细胞周期中的生化变化	36
(七) 细胞周期的遗传学	37
(八) 细胞周期的控制	39

六、有性生殖

(一) 质配	42
(二) 孢子形成	44
(三) 孢子形成——真核细胞性分化的一个模式	50
(四) 孢子发芽	51

七、遗传和遗传操作

(一) 遗传标记的选择	52
(二) 重组	53
(三) 线粒体遗传	56
(四) 原生质球(sphaeroplast)的融合	57
(五) 转化作用和基因转移	58
(六) 酵母菌的类病毒颗粒(virus-like particles)	60

八、工业用的酵母菌

(一) 酵母菌在乙醇饮料生产中的作用	64
(二) 含香化合物的种类	64
(三) 发酵过程	65
(四) 醇汽油(gasohol)的生产	68
(五) 面包酵母和生物菌体的生产	69
(六) 酵母菌的衍生物	71
(七) 结束语	72

附录

补充读物

一、绪论：酵母菌的历史

(一) 人类对酵母菌的早期开发

在人类的进化过程中,虽然一直蒙受致病微生物的危害,但酵母菌却是被人类应用的第一个微生物。我们有充分理由把酵母菌看作是由人类祖先所开发的许多工具之一。人类利用酵母菌的首次记载,被认为是在公元前 6000 年由埃及生产的称作“布扎”(boozah)的酸啤酒。这种啤酒的生产方法,是将发芽的大麦碾碎后揉成面团,再由面团发酵而成。生产啤酒和葡萄酒以及生产发酵面包的工序,在后来的数千年时间内,很可能是平行发展的。公元前 1200 年时,在埃及已能很好地证实发酵和不发酵面包间的差别,并知道利用前次的面团去接种后次的面包料或葡萄汁,以生产面包或发酵葡萄酒。酿酒和制作面包的工艺技术,从埃及先传到希腊,然后再传到罗马和罗马帝国。

在罗马帝国衰落后的一段时期里,有关酿酒的记载很少,然而,十分清楚的是,在十三至十四世纪时,北欧的一些修道院都能酿酒。据史料记载,在这一时期,仅德国就有 400~500 所修道院酿制啤酒。早在 1188 年,英国的亨利二世就曾对啤酒征收过首次超额税。

蒸馏乙醇饮料的起源,基本上还停留在猜测阶段。据传,在公元前 1000 年,中国已有蒸馏乙醇饮料的记载;业已清楚,在十二世纪时,爱尔兰已有威士忌酒了。可以相信,蒸馏酒的工艺很可能是从中东传入欧洲的,这一看法可从来自阿拉伯文的乙醇

“alcohol”这个词得以证明。另外,蒸馏乙醇饮料的生产似乎还与宗教的建立结合起来的,在苏格兰有关威士忌酒的最早文献中,有一篇就提到该酒是在1494年由一个名叫考尔(John Cor)的修道士生产的(表1)。

表1. 酿酒酵母在工业应用和科学研究中的若干重大进展

(摘自 *Yeast Technology* by G. Reed and H. J.

Peppler, A. V. I. Publishing, Company, 1973. 等资料)

公元前6000年:	埃及已有酿酒
公元前1000年:	在中国已饮用蒸馏酒
1192年:	爱尔兰已生产威士忌酒
1200~1300年:	北欧普遍建立起酿酒厂
1680年:	列文虎克(Leeuwenhoek)首次观察到酵母菌
1832年:	皮尔逊和弗拉伊斯(Persoon and Fries)认为酵母菌是真菌
1838年:	梅叶尔(Meyer)把酿制啤酒的酵母菌命名为酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
1839年:	施旺(Schwann)描述了酵母菌的子囊孢子
1863年:	巴斯德(Pasteur)确证了酵母菌在发酵中的作用
1866年:	德巴利(de Barry)证实了酵母菌的生活史
1881年:	汉逊(Hansen)获得了酵母菌的纯培养
1896年:	汉逊发表了科学的酵母菌分类系统
1897年:	布希纳(Buchner)报道了酵母菌无细胞抽提物的发酵作用
1934年:	文奇(Wingé)证实了在酵母菌生活史中存在单倍体阶段和双倍体阶段的交替
1943年:	林德格伦(Lindegren)报道了酵母属中异宗接合现象

(二) 酵母菌的早期科学研究

人类对酵母菌构造的认识,是依靠了显微镜的发明,事实上,首次对酵母菌的认识,应归功于列文虎克在1680年对它的描述。然而,人们在当时还未联想到,由他所描述的那种酵母菌构造竟是一种活的生物。现在还难以确定,究竟谁是把酵母菌看作能引起葡萄酒和啤酒乙醇发酵中的活生物的第一个科学

家。十八世纪末叶,有人提出发酵的生机论学说,至1818年,尔克斯莱本(Erxleben)提出酵母菌是引起乙醇发酵的原因。可是,一般人都同意把巴斯德于1866年在其《关于葡萄酒的研究》(*Etudes sur Vin*)一文中所发表的结果,作为确立酵母菌在使糖发酵为乙醇中作用的明证。这一发现标志着微生物学发展中的一个重要的里程碑。另一个重要的里程碑,就是汉逊在1881年创立的用单细胞分离法获得酵母菌的纯培养。纯培养的应用,对促进酵母菌和其他微生物分类学和生理学的发展,奠定了必要的基础。1897年,布希纳通过研磨酵母细胞,获得了无细胞抽提物,它能把糖发酵为乙醇,从而为现代生物化学的发展奠定了一块基石。随后,在这一领域中作出重大贡献的研究当推EMP(Embden-Meyerhof-Parnas)途径的阐明。从此以后,酵母菌即成为研究生理学和生物化学各种课题的受人欢迎的对象。对爱好酒精饮料的人特别感兴趣的,是欧立希(Ehrlich)于1906年研究了氨基酸代谢和产生芳香杂醇(fusel alcohols)——一类由酵母菌产生的重要芳香化合物之间的关系。

在微生物遗传学领域中的早期发展,也起始于对酵母菌的研究。在酵母菌生活史中,单倍体和双倍体阶段的交替是由文奇于1935年提出的,随后,他又在酵母菌的有性生殖中证明了孟德尔式的基因分离规律。这些研究开辟了广泛研究酵母菌遗传学的道路,从而为我们认识遗传物质的本质和真核微生物的遗传机制作出了重大贡献。

(三) 酵母菌分类的发展

自1680年列文虎克首次描述酵母菌以来,虽然酵母菌的特征性出芽形式已为人所共知,但是要对酵母菌作较为精确的描述和鉴定,则常常还是一个问题。由于大多数酵母菌的营养型

细胞没有任何明显的形态学特征，故很难用直接观察法加以鉴定。最初，酵母属“*Saccharomyces*”这一名称被用于从酒精饮料中分离出来的各种酵母菌，并且根据它们的来源，梅叶尔于1837年认为有三个种，即来自葡萄酒的葡萄酒酵母菌(*Saccharomyces vini*)，来自啤酒的酿酒酵母(*S. cerevisiae*，旧译“啤酒酵母”)和来自苹果酒的苹果酒酵母(*S. pomorum*)。酵母菌的有性孢子是在1837年时由施旺找到的，但直到1870年时，才把酵母属规定为只产生子囊孢子的一类酵母菌。

(四) 酿造酵母和面包酵母

酵母属大约包括四十个种，每个种都通过出芽产生球状或椭圆状的细胞，在子囊内产生子囊孢子，并能有效地把糖转化为乙醇。在酿酒业中，酵母属中的最重要的种是由汉逊分离到的纯培养物，并被他人称为“*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker” (椭圆酿酒酵母)。属于酿酒酵母这个种的不同菌株，已被广泛地用于酿制啤酒、蒸馏酒、葡萄酒，以及生产面包酵母和大量饲料酵母。可是，这个种在不同时期曾给予不同的定义。新近在巴奈特等(Barnett, Payne和Yarrow, 1980)撰写的专著中，已把原来属于酿酒酵母这个种的有关菌株进行分类，随后归到以前分类系统中的十八个不同种上，其中的卡尔酵母(*S. carlsbergensis*)是特别惹人注意的，因为它是后发酵(fermentation of lager)用的“底层酵母”，具有公认的代谢蜜二糖的能力。虽然在酿酒业中广泛涉及到卡尔酵母，但在1970年时，范德华尔特(Van de Walt)却重新把它归属到葡萄汁酵母(*S. uvarum*)中，而最近巴奈特等则又把它归入酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中。

(徐士菊译)

二、酵母细胞的结构

(一) 细胞形态学

酿酒酵母呈圆形、卵形或椭圆形,其宽度为 $2.5\sim 10\mu\text{m}$, 长度为 $4.5\sim 21\mu\text{m}$ 。在光学显微镜下,很难观察到未染色细胞的细致结构,甚至当细胞质的内含物已为人们所熟知时,还是难以知道它们是否存在液泡、颗粒或核。虽然通过特殊染色可获得更多的知识,但是只有当发明电子显微镜以后,才能显示出酵母细胞的清晰图像。典型酵母细胞的特征见图 2-1。从图中可看出,细胞由一层厚的细胞壁所包围,再向内有可能辨认出典型细胞的许多特征:质膜、核、线粒体、内质网、液泡、囊泡和颗粒。它们的结构和功能将在本章的其余部分另行讨论。

生长着的酵母细胞群的明显特征是具有芽体,它们是通过细胞分裂而产生的。子细胞由芽体开始,在细胞生长周期中一直在长大,直到长成与母细胞同样大小时为止。酵母细胞的主要生长都发生在芽体形成阶段,故芽体

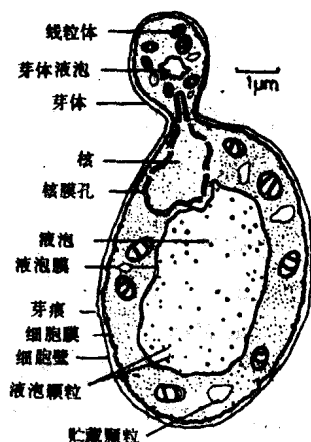


图 2-1 典型酵母细胞的切片, 图示细胞的主要结构特征及其分布 (据 Webster, 1980, *Introduction to Fungi*, p. 273, Cambridge University Press.)

的大小几乎与它分离前的成熟母细胞相同。细胞分裂以后，很快就发生分离，可是在芽细胞分离以前，常常又发生新的细胞分裂，所以细胞常呈簇状。细胞分离的部位是在母细胞上留下标记的芽痕处，而在子细胞上则为蒂痕处。在光学显微镜下无法看到芽痕，但用荧光染料，例如钙荧光素或樱草灵染色后借荧光显微术则可看到。芽痕和蒂痕的极其清晰的结构也可以在扫描电镜照片上显示出来。在酿酒酵母的细胞壁上的同一部位决不可能同时长出两个芽，故每次产生一个芽时，就会在母细胞的壁上产生一个新芽痕。通过计算芽痕的数目，可确定某一细胞已产生过的芽体数。此法也可用于测定细胞年龄。在任何酵母群体中，50%的细胞是由最近一代的细胞分裂所产生，故具有一个蒂痕，而无芽痕。在其余的50%中，25%具有一个芽痕，12.5%具有两个芽痕，而12.5%则具有两个以上的芽痕(图2-3c)。

在某些菌株中，长在液体培养物中的细胞，相互粘连在一起，形成细胞团，它沉入培养器皿的底部。这种被称作结絮的现象，在酿造工业中具有重要的意义。

(二) 细胞壁

细胞壁是一种坚韧的结构，其厚度为 25nm，重量约占细胞干重的25%。对细胞壁作化学分析后指出，其主要成分是葡聚糖和甘露聚糖，同时，还含有几丁质和蛋白质，葡聚糖是葡萄糖单位的复杂分枝状聚合物，它们位于酵母细胞壁的内层，与质膜相毗邻〔见二、(三)〕。葡聚糖是细胞壁的主要结构成分，因为如把它去除，细胞壁就会完全解体。甘露聚糖是一种甘露糖的复杂聚合物，主要分布在细胞壁的外层。由于有可能去除甘露聚糖而不改变细胞的外形，故说明它对保持细胞壁的完整性并不必要。第三种糖类成分是几丁质，它是 N-乙酰葡萄糖胺的多聚物，

可在酿酒酵母的细胞壁与芽痕结合处发现。通过用合适的分解酶处理细胞壁来分离芽痕，可以发现几丁质是以环状形式分布在芽痕周围。占细胞壁干重的 10% 是蛋白质成分，这类蛋白质中至少有几种是以与细胞壁结合的酶的形式存在。与酵母细胞壁相结合的几种酶已被描述过，这些酶包括葡聚糖酶和甘露聚糖酶，它们可能参与细胞壁的软化，以促使芽体形成，还包括蔗糖酶、碱性磷酸酶和脂酶，它们中有几种例如蔗糖酶是甘露糖蛋白，内含高达 50% 甘露聚糖，以构成完整的酶分子。细胞壁中所含的许多其他蛋白质也与甘露聚糖相结合，故在细胞壁中，它可能起着结构上的作用，而不是酶促作用。细胞壁的细致构造还未完全弄清楚，但当前的理论倾向于它是一种三层结构，其内

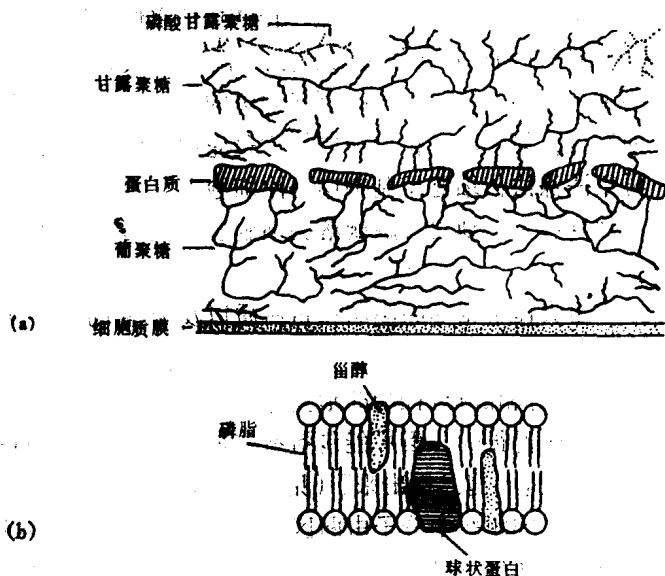


图 2-2 (a) 酵母细胞壁结构的模式图，表明葡聚糖和甘露聚糖在不同层次上的分布；(b) 磷脂膜例如细胞质膜的模式图 (据 Rose, A. H., 1976, *Chemical Microbiology*, p. 30. Butterworth, London.)

层葡聚糖层与外层甘露聚糖层间，借一层富含蛋白质的中层相隔开(图 2-2a)。

(三) 细胞膜

用电子显微镜所观察到的酵母细胞膜或质膜是一种三层结构，它与细胞壁的内表面紧密结合，通常具有光滑的外表，但在细胞生长的某些阶段，可看到内褶。要了解质膜的化学成分，就需要采用能获得不含其他细胞成分，包括不含其他膜在内的纯净质膜的分离技术。有一种技术是制备原生质体的技术，用这种技术得到的细胞，其细胞壁是用合适的分解酶，例如用蜗牛消化酶[玛瑙螺(*Helix pomatia*)肠道分解酶的制剂]的处理而去除。假如再把原生质体置于等渗糖液中，则它们依然是完整的细胞，但当把它们放置在较稀的悬浮液中时，就极易破裂，这样，不同的细胞器包括质膜在内，可把破裂的原生质体的制剂进行离心而取得。另一种可供选用的技术是先用机械的方法破碎细胞，再用洗涤法从细胞壁制剂中去除细胞内含物，让质膜仍旧附着于细胞壁上，通过分解酶溶去细胞壁，就可将质膜分离出来。

质膜由大体上相等的类脂和蛋白质以及少量的糖类所构成。主要的类脂是以甘油的单、双和三酯，甘油磷脂以及甾醇(例如麦角甾醇和酵母甾醇)的形式存在。对质膜中所含的蛋白质的性质了解得很少，但可能包括参与吸收糖和氨基酸的一些酶。质膜的结构模型已提出来了(见图 2-2b)。磷脂是一种中极两性的分子，亦即每个分子由两区所构成，其一区为疏水性的(排斥水的)，而另一区则为亲水性的(吸引水的)。认为磷脂是以这种方式排列的：分子的亲水部分排在膜的外侧，而疏水部分则排在膜的内侧。蛋白质分子可能排列在膜的表面或是嵌在

膜中。

质膜是细胞内的主要细胞器。它包围着细胞内含物，并起着渗透屏障的作用，控制运送溶质出入细胞。有可靠的证据证明，质膜参与控制酵母细胞壁的合成。酿酒酵母与众不同之处在于，当它生长在严格的厌氧条件下时，不能合成某些不饱和脂肪酸和甾醇，故如要使其继续生长，就必须在培养基中提供这些成分。因为所提供的脂肪酸和甾醇会掺入细胞膜中，所以供应不同的脂肪酸和甾醇就有可能影响质膜的化学组成。通过应用这种技术，了解到膜类脂成分的改变影响着细胞的渗透性、细胞对温度的敏感性和对溶质的吸收特性。

(四) 核

可用相差显微镜对核进行观察，它通常位于细胞和芽体之间。应用特殊染色，例如碱性品红或姬姆瑟染色法，可观察到核内的染色体。可是，有关酵母核研究方面的知识还很有限，因为单个染色体很小，其大小与大肠杆菌的染色体相似，故不论用光学显微镜或是电子显微镜，都无法辨认其分散的结构。在细胞的整个生长周期中，核膜都保持完整状态。在电镜照片中，可以看到核膜是一种双层膜，在膜上存在着有一定间隔的小孔。与核膜相结合的是一个称为小板(plaque)的结构，它具有与动物细胞的中心粒相类似的功能。小板这种特殊结构是一种多层盘，微管就从这里延伸至核和细胞质，它们起着酵母核的纺锤体作用，其行为在不同的细胞核分裂阶段中已作了观察(见四)(图 2-3d)。

(五) 线粒体

在好氧条件下生长的酵母菌的电镜照片中，其线粒体容易

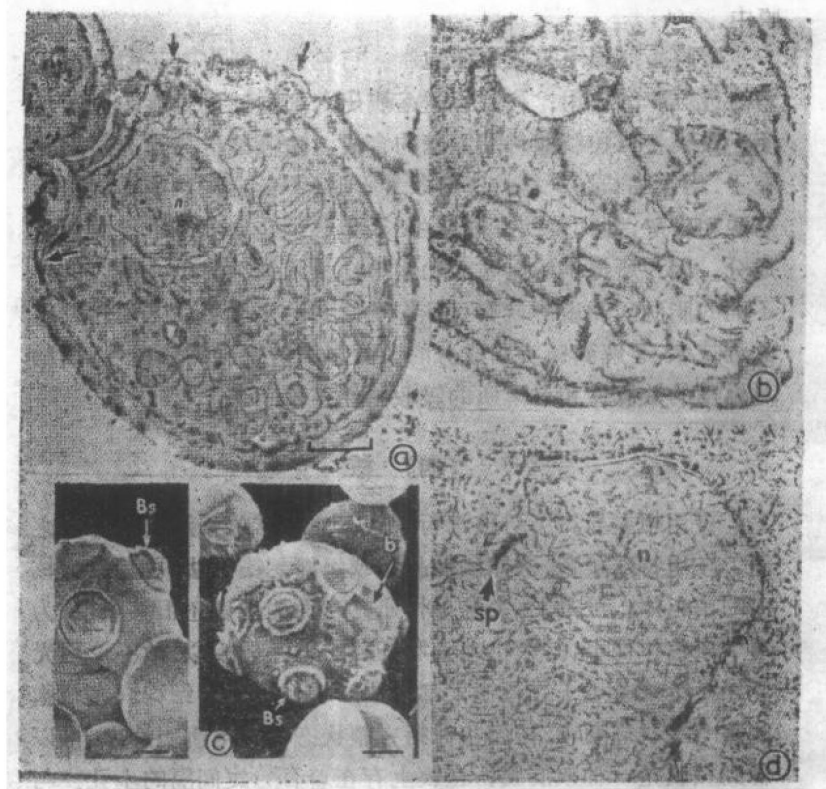


图 2-3 显示酵母亚细胞结构的电镜照片。(a) 出芽细胞的切片，可观察到芽痕(箭头处)、核(n)和正在形成的细胞隔膜(据 Marchant and Smith, 1968, *J. Gen. Microbiol.*, 53, 168.); (b) 存在线粒体的好氧性酵母细胞的切片(据 Smith *et al.*, 1969, *J. Gen. Microbiol.*, 56, 54.); (c) 显示芽痕(Bs)和蒂痕(bs)的扫描电镜照片(据 Belin, 1972, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 38, 343); (d) 显示核分裂时与微管相连接的纺锤板(sp)的切片(据 Byers and Goetsch, 1973, *Cold Spring Harbour Symp.*, 38, 123.)

辨认(见三),它是一种由双层膜包围的呈球状的或杆状的结构。它们具有由内膜折叠而形成的嵴(图 2-3b)。

在线粒体的结构方面，以及线粒体的膜和基质中许多线粒体酶的分布方面已经做过大量的研究。三羧酸循环中的多数酶存在于线粒体的基质中。因此参与电子传递和氧化磷酸化的酶是与包括嵴在内的内膜结合在一起的。

有一段时期，因为在厌氧条件下生长的酵母菌或在分解物阻遏的酵母菌中无法检测线粒体，并且它们还缺乏与线粒体结合的许多酶，所以，就认为这类酵母菌没有线粒体。最近，应用了冰冻蚀刻技术指出，明显缺乏线粒体是由于不适当的固定技术之故。在缺少类脂条件下进行厌氧生长的细胞，具有极其简单的线粒体，它们由双层膜的外层所构成，但无嵴。加入诸如油酸或麦角甾醇等的类脂可促使嵴的形成。缺氧、加入类脂或培养基中葡萄糖的含量等都会影响线粒体的形成。因此，与早先的看法相反，当从厌氧条件转移到好氧条件下时，线粒体只是在结构上发生改变，而不是重新产生线粒体。

(六) 其他细胞质结构

酵母细胞的细胞质含有为人们所熟知的内质网的双层膜系统。正象在其他生物中那样，在这些膜中，有些是与核糖体相结合的。可是，内质网似乎还具有许多其他的细胞功能。内质网和其他细胞器的相互关系还不清楚，然而，在内质网、线粒体的外层膜和质膜之间是连续的。内质网也参与细胞中囊泡的形成。在这方面，它的行为在一定程度上与某些其他生物的高尔基器相类似。不过，在酵母菌中是否真有高尔基器存在，至今尚不清楚。在酵母细胞中虽已观察到膜盘，但是其数量很少，而且还难以明确地看作是高尔基器。

类脂颗粒同样存在在细胞质中，因此，它们似乎也来自内质网。