

# 酵母菌耐高渗机理研究

郑美娟<sup>1</sup>, 余华顺<sup>2</sup>

(1.三峡大学化学与生命科学学院,湖北 宜昌 443002;2.安琪酵母股份有限公司,湖北 宜昌 443003)

**摘要:** 综述了参与酵母菌耐高渗调控的一些基本物质,如基因、酶、功能蛋白质和一些小分子物质等。综合分析了酵母菌耐高渗的调控机理,为研究者利用分子生物学的方法筛选耐高渗的酵母菌奠定良好的理论基础。

**关键词:** 酵母菌; 耐高渗; 调控机理

中图分类号:TS261.1;TS262.3;Q93-3

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2008)10-0037-03

## Study on Osmotolerance Mechanism of Microzyme

ZHENG Mei-Juan<sup>1</sup> and YU Hua-Shun<sup>2</sup>

(1.College of Chemistry and Life Sciences, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002;

2. Angel Yeast Co. Ltd, Yichang, Hubei 443003, China)

**Abstract:** Some basic substances such as gene, enzyme, functional protein and small molecular substances involved in osmotolerance regulation & control of microzyme were reviewed. Furthermore, the osmotolerance regulation & control mechanism of microzyme was analyzed comprehensively, which provided scholars theoretical knowledge during the selection of proper microzyme with strong osmotolerance.

**Key words:** yeast; osmotolerance; regulation & control mechanism

随着分子生物学的发展,人们对酵母菌耐逆性的研究越来越深入。在酵母菌耐高温、高渗和高乙醇方面已进行了深入研究并有大量的文献报道。在酵母菌耐高渗方面的研究也取得了重要的进展,研究发现酵母菌耐高渗受几种调控机制的调节。目前研究比较清楚的是高渗透性甘油促分裂原蛋白激酶途径的调控,下面将详细叙述 HOG MAPK 途径中的感应元件及其他元件之间的相互作用。

### 1 酵母菌耐高渗的遗传特性

在特殊的环境条件下(如从糖蜜、花粉、葡萄汁等)能够筛选到耐高渗菌株,同时也证明菌株的耐高渗特性是可以遗传的,不是适应的结果<sup>[1-2]</sup>。可以利用这个特性筛选耐高渗的酵母菌,为生产提供菌种服务。

### 2 酵母菌中与耐高渗相关的基因、酶和大小分子

从 20 世纪真正进入分子生物学时代后,人们对酵母菌的耐高渗的机理有了更详细的研究,在分子水平上加深了理解和认识。目前发现与渗透相关的基因有 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter gene 即 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运基因<sup>[3]</sup>,海藻糖合成酶基因(tps),依赖 c-AMP 蛋白质激酶的基因,酪氨酸磷酸(酯)酶基因(ptp2、ptp3),3-磷酸甘油脱氢酶基因(gpd1、gpd2),还有 sho1、sln1、hog1、rck2、ssk1、

ssk2、ssk22、rck2、ptc1、ptc2 等基因<sup>[4]</sup>;一些重要的酶和蛋白质就是以上基因编码的产物,如 3-磷酸甘油脱氢酶(Gpd1p、Gpd2p),还有 Rck2p、Ptp2p 和 Ptp3p 等等;在耐高渗细胞群体中还分离到与渗透耐性有关的物质:如海藻糖、甘油、多元醇、赤藓糖醇和寡聚果糖等等。正是这些基因以及这些基因产生的酶和蛋白质,加上这些酶作用产生的产物调节着酵母菌的渗透耐性。

### 3 酵母菌耐高渗的 HOGMAPK 途径分子调节机理

通过对酵母菌耐高渗的分子机理进行研究和分析,发现这些和耐性相关的基因、酶和一些小分子物质共同组成了酵母菌的几种耐高渗的调控体系,其中对 HOG MAPK 途径研究的最为清楚。在高渗环境条件下,通过 HOG-MAP 激酶的诱导并级联提高膨压剂甘油的水平使酵母产生渗透耐性。另有研究者也通过研究认为酵母细胞暴露在胞外渗透势时能够激活分裂原活化蛋白激酶(MAPK)Hog1,Hog1 的激活导致一系列渗透适应反应,使得细胞能够适应高渗环境生长。通过对 HOG1 MAPK 途径的研究发现,细胞渗透耐性主要通过两个途径进行协调控制,这两个途径相对相互独立,但又不是绝对分开,两种途径采用不同的方式进行控制。以 Sln1p 为感应元件的路径是一种组成性的表达,受渗透胁迫的

收稿日期:2008-07-31

作者简介:郑美娟,女,湖北武穴人,讲师,农学硕士学位,从事教学和科研工作。

强弱成一种线性感应关系,以 Sho1p 为感应元件的路径是一种开关式的调控,前者比后者更灵敏。

### 3.1 Sln1p 为感应元件的上游支路

Sln1p 由 1220 个氨基酸残基组成,蛋白质由 4 个不同的部分组成:环分开的两个推测跨膜区、一个接头区、一个组氨酸激酶区和一个受体区<sup>[4]</sup>。它是 HOG 途径中一种负调控因子,定位在细胞膜上。细胞在高渗条件下(细胞收缩),Sln1p 组氨酸激酶被抑制,Sln1p 的磷酸化水平降低,导致 Ypd1p 的磷酸化受抑制,最后 Ssk1p 磷酸化的量降低,去磷酸化的 Ssk1p 和 Ssk2p 的结合促使 Ssk2p 的自我磷酸化,从而激活 HOG 途径;细胞在低渗条件下(细胞膨胀),Sln1p 组氨酸激酶被激活,这样整个路径正好相反,Ypd1p、Ssk1p 的磷酸化水平增加,磷酸化的 Ssk1p 不能激活 Ssk2p 进行自我磷酸化,从而抑制了 HOG 途径。这就是人们提出的负调控系统:Sln1p-Ypd1p-Ssk1p 磷酸基传递系统<sup>[4]</sup>。具体见图 1。

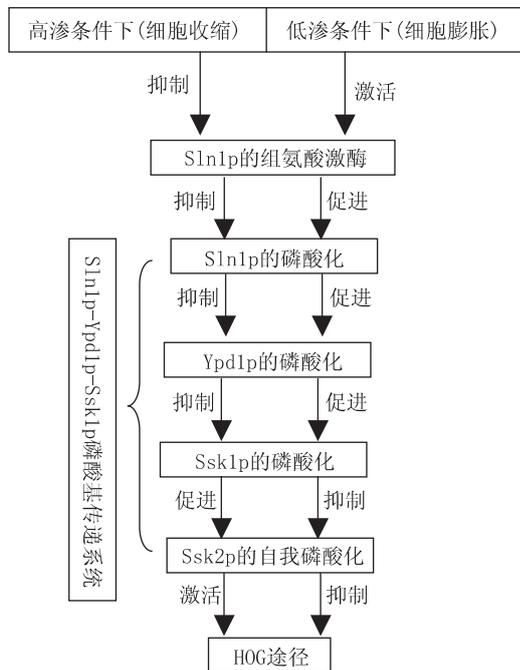


图 1 Sln1p 为感应元件的上游支路

### 3.2 Sho1p 为感应元件的上游支路

Sho1p 由 367 个氨基酸残基组成,蛋白质包括 4 个推测的跨膜区、一个接头区和一个蛋白质相互作用的 SH3 区<sup>[4]</sup>。细胞在高渗条件下,一些相关蛋白作用,促使 Sho1p 亲水的 SH3 区域被解蔽,接着和 Pbs2p 结合,形成复合物回到细胞表面,在这个过程中将产生信号复合物,这个复合物激活 Rho 类似蛋白 Cdc42p,从而依次激活 PAK 激酶 Ste20p(同源的 Cla4p)和 MAPKK(Ste11p),最后激活 Pbs2p,从而激活 HOG 途径。据报道,Cdc42p、Ste20p 和 Ste11p 对于 Sho1p-Pbs2p 复合物来说不是必

需的。由于此支路是一种开关调控方式,细胞在低渗条件下,Sho1p 亲水的 SH3 区域被隐蔽,不能和 Pbs2p 结合,从而抑制 HOG 途径<sup>[4]</sup>。具体见图 2。

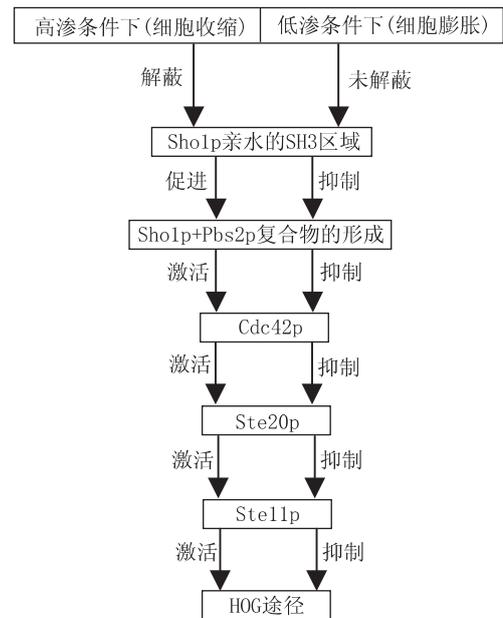


图 2 Sho1p 为感应元件的上游支路

### 3.3 HOG 路径

MAPKKK(Ssk2p、Ste11p)的存在促使细胞质中的 MAPKK(Pbs2p)磷酸化,紧接着磷酸化的 Pbs2p 作用于 MAPK(Hog1p)两个保守的磷酸化位点:Thr174 和 Tyr176<sup>[5~6]</sup>,胞质中 Hog1p 的磷酸化迅速改变 Hog1p 在细胞质和细胞核的分配比例,促进 Hog1p 向核内转移<sup>[7]</sup>。Hog1p 的磷酸化和核内的局部分布都是短暂的。根据渗透胁迫的强度,这种现象可维持几分钟到几小时<sup>[5,8~9]</sup>。

### 3.4 HOG 的反馈调节

Hog1p 的磷酸化激活 3-磷酸甘油脱氢酶基因(gpd1)的转录和翻译,开始在细胞中合成甘油,从而提高细胞中甘油的含量,用来改变细胞体内的渗透压,抵抗细胞外界的高渗透势。当甘油产生的膨压达到一定程度时,细胞开始膨胀,Sln1p 的路径开始对 HOG 途径进行抑制。

在用 Hog1 作诱饵进行双杂交检测来识别 MAPK 作用的底物过程中,发现 Rck2 蛋白激酶和 Hog1 相互作用,Hog1 磷酸化 Ser159 后引起 Rck2 激酶活性的增强,Rck2 的过量表达部分抑制渗透敏感的 hog1 和 pbs2 细胞<sup>[10]</sup>。这说明在调控体系中 Rck2 很可能在 Hog1 的下游,激活其他途径,提高酵母细胞耐渗能力。Sln1p 为感应元件的上游支路见图 1;Sho1p 为感应元件的上游支路见图 2。

另外, 通过 Thr/Ser 磷酸酶 (Ptc1p、Ptc2p、Ptc3p) 和 Tyr 磷酸酶 (Ptp2p、Ptp3p) 的作用对磷酸化的 Pbs2p 和 Hog1p 进行去磷酸化调控, 这是因为磷酸酶的过量表达能够抑制这种 HOG 途径由于不恰当的激活引起细胞致死的现象<sup>[11]</sup>。具体见图 3。

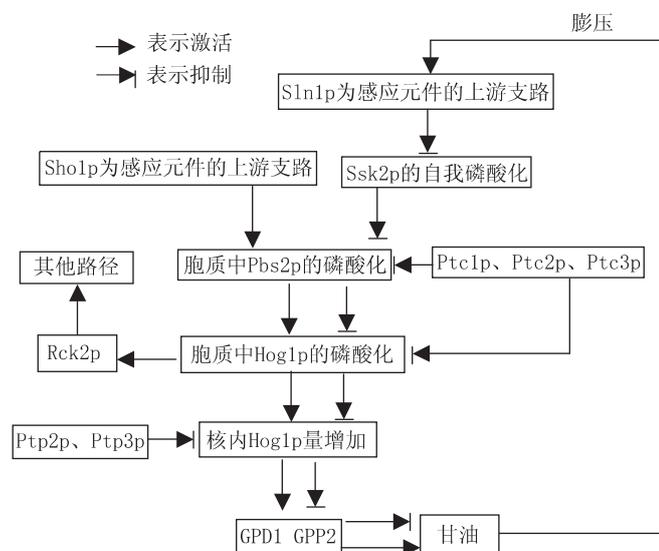


图3 HOG 路径及其反馈调节

通过以上分析, 我们可以将酵母菌的 HOG1-MAPK 途径耐高渗调控机理总结如下: 在渗透胁迫下, 通过分支途径来感应和传递胁迫信号。首先 Sho1p 感应渗透胁迫, 把信号传递给 Pbs2p, Pbs2p 传给 Hog1p, 活化的 Hog1p 作用于 *gpd1*、*gpp2* 等相应的基因, 促使渗透物甘油等的合成, 从而改变细胞的渗透势, 来抵抗高渗透压对细胞造成的伤害。在不同的酵母菌中可能磷酸化的 Hog1p 进一步激活 Rck2p, 激活别的路径对酵母渗透耐性进行调控。当细胞受到的胁迫消失或者细胞中渗透物甘油等物质的含量超过一定值时, 这时细胞吸水, 产生膨压, Sln1 分支途径能够感受细胞的膨压, 对渗透胁迫进行负调控。同时反馈抑制因子 Ptp2p 和 Ptp3p 通过对 Hog1p 的去磷酸化以及 Ptc1p、Ptc2p 和 Ptc3p 对磷酸化的 Pbs2p 去磷酸化来反馈调控 HOG 路径, 阻止甘油的合成。

#### 4 酵母菌中其他耐高渗的调控机理

在酵母菌中除了高渗透甘油促分裂原蛋白激酶途径调控外, 在不同的酵母菌中还存在不同的渗透调控途径。如有的酵母菌在外部渗透压升高时细胞内迅速合成海藻糖或肝糖, 从而提高酵母菌耐高渗的能力<sup>[12-13]</sup>。渗透胁迫条件下依赖 cAMP 蛋白激酶与渗透耐性相关基因表达有密切的联系<sup>[14]</sup>。这些系统可能存在不同的酵母菌中, 也可能同一酵母菌会同时存在多种系统。我们可以测定各种蛋白酶活和研究蛋白质的表达来确定特定

酵母菌所采用的渗透调控系统, 通过常规诱变和基因定向改良等方法来提高或抑制调控系统中的关键酶活性, 筛选和构建出耐高渗菌株。HOG 路径及其反馈调节见图 3。

#### 5 酵母菌耐高渗和其他因素的关系

酵母菌耐高渗还与其生理特性有关: 如耐高渗可能与液泡有关, 酵母菌在耐和不耐高盐的条件下, 液泡的形态是不同的, 酶的分泌也有很大的变化; 另外耐高渗酵母菌在高渗条件下, 吸收营养物质的能力强<sup>[15]</sup>。也有研究指出, 在高盐浓度生长的细胞同时也伴随着对酒精耐性的提高, 这说明耐高渗和耐高酒精浓度有很强的相关性<sup>[14]</sup>, 但也有人认为这两种耐性之间没有相关性<sup>[2]</sup>。

#### 6 耐高渗酵母菌应用前景

当人们研究清楚酵母菌的耐高渗遗传特性和调控机理后, 可采用不同的途径来筛选得到耐高渗的酵母菌。当得到了一株生产特性比较好的酵母菌株时, 如果其耐高渗能力比较弱时, 可以采用物理(或者化学)诱变或者利用基因工程定向改良的方法和手段, 筛选 HOG MAPK 途径中任何有利于提高酵母菌的耐渗透能力的突变菌株。当然还可以从筛选海藻糖合成酶活性高的菌株中筛选耐高渗菌株。总之我们对酵母菌耐高渗的机理研究越清楚, 筛选工作越有目标, 一株好菌株短时间、快速地被筛选将给企业和社会带来巨大的经济效益。

#### 参考文献:

- [1] Park YK, Koo MH, Oliveira IM. Biochemical characteristics of osmophilic yeasts isolated from pollens and honey[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(11): 1872-1873.
- [2] Miklos I, Sipiczki M, Benko Z. Osmotolerant yeasts isolated from Tokaj wines[J]. *J Basic Microbiol*, 1994, 34(6): 379-385.
- [3] Iwaki T, Higashida Y, Tsuji H, Tamai Y, Watanabe Y. Characterization of a second gene (ZSOD2) of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* and functional expression of ZSOD2 and ZSOD2 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 1998, 14(13): 1167-1174.
- [4] Stefan hohmann. Osmotic Stress signaling and osmoadaptation in yeasts[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 300-372.
- [5] Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin. An osmosensing signal transduction pathway in yeast [J]. *Science*, 1993, 259: 1760-1763.
- [6] Schü Iler, G., J. L. Brewster, M. R. Alexander, M. C. Gustin, and H. Ruis. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene[J]. *EMBO J*. 1994,

(下转第 43 页)

### 3 结论

对休哈塔假丝酵母进行紫外诱变,将诱变后的突变株进行 TTC 平板显色培养。从平板上挑取显红色菌株 150 株和显白色菌株 100 株,进行摇瓶发酵测定乙醇产量,将其与未经过诱变的菌种的摇瓶发酵的乙醇产量进行比较。得到结果为显红色突变株 150 株的正突变率为 29%,负突变率为 10%,显白色突变株 100 株的正突变率为 0,负突变率为 56%。显红色突变株中产量增加较多的突变株有 S28 和 S39,其乙醇产量分别增加了 3.08 g/L 及 2.46 g/L,显白色突变株中产量下降较多的有 Q11 和 Q59,其乙醇产量分别下降了 3.80 g/L 及 3.58 g/L。再将 S28 突变株进行氮离子注入诱变,将诱变后的突变株进行 TTC 平板显色培养。从平板上挑取显红色菌株 100 株,进行摇瓶发酵测定乙醇产量,将其与只经过紫外诱变未经过氮离子注入诱变的 S28 菌株的摇瓶发酵的乙醇产量进行比较。结果为 100 株显红色的突变株中部分突变株的乙醇产量较出发菌株都有较

大的提高,其中增加较多的有 SY24、SY43、SY58 和 SY126,其乙醇产量分别增加了 1.71g/L、1.73g/L、1.94g/L 和 1.75g/L。经实验验证,TTC 平板能将乙醇产量较低的菌株淘汰,并且筛选出乙醇产量较高的菌株。因此可以将 TTC 作为 *C. shehatae* 产乙醇能力的显色剂。

#### 参考文献:

- [1] 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程[M].上海:复旦大学出版社,1993.
- [2] 王梅,张澎湃,帅桂兰.TTC在黄酒酵母选育中的应用[J].酿酒,2001,(5):62-64.
- [3] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2001.
- [4] Yu S,Wayman M and Parekh SK, Fermentation to ethanol of pentose-containing spent sulphite liquor[J].Biotechnol Bioeng. 1987,29:1144-1150.
- [5] 余世袁,罗廉,李杰,等.休哈塔假丝酵母对半纤维素戊糖和己糖的同步发酵[J].林产化学与工业,1991,11(1):17-24.
- [6] 王亚楠,肖冬光.快速测定啤酒酒精度和真正发酵度的方法[J].酿酒,2002,(11):84-86.

\*\*\*\*\*  
(上接第 39 页)

- 13:4382-4389.
- [7] Ferrigno, P., F. Posas, D. Koepp, H. Saito, and P. A. Silver. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAP kinase requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1[J]. EMBO J, 1998, 17: 5606-5614.
  - [8] Maeda, T., S.M. Wurgler-Murphy, and H. Saito. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast[J]. Nature, 1994, 369: 242-245.
  - [9] Mattison, C. P., and I. M. Ota. Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast[J]. Genes Dev, 2000, 14: 1229-1235.
  - [10] Bilisland-Marchesan E, Arino J, Saito H, Sunnerhagen P, Posas F. Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(11): 3887-95.
  - [11] Jacoby, T., H. Flanagan, A. Faykin, A. G. Seto, C. Mattison, and I. Ota. Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the

- osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1[J]. J. Biol. Chem, 1997, 272: 17749-17755.
- [12] Eleutherio EC, Ribeiro MJ, Pereira MD, Maia FM, Panek AD. Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochem Mol Biol Int, 1995, 36(6): 1217-1223.
  - [13] Sharma SC. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 152(1): 11-15.
  - [14] Norbeck J, Blomberg A. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2000, 16(2): 121-137.
  - [15] Mahmoud MI. The effect of the water activity of the milieu on rates of glucose uptake by the osmophilic yeasts *Saccharomyces rouxii* and *Debaryomyces hansenii*[J]. Zentralbl Bakteriologie Naturwiss, 1978, 133(7-8): 726-732.

## 今年我国食品工业销售收入将达 4 万亿元

本刊讯:中国食品工业协会会长王文哲 2008 年 9 月 20 日在第六届中国食品安全年会上介绍,今年 1 至 7 月份,全国食品增加值增长 15.86%,全国食品工业累计实现食品工业总产值 23332.92 亿元;完成销售额 22830.89 亿元,同比增长 34.6%。预计今年我国食品工业销售收入将达 40000 亿元。

在食品工业持续快速健康发展的同时,通过各级部门通力合作和大力监管,我国食品安全状况得到改善和提高。据国家抽检结果显示,今年上半年我国粮食加工品、副食调味品、肉制品、酒类、饮料饮品、休闲食品 33 类 3288 家企业生产的 3813 种食品抽样合格率为 98.4%,同比提高 4 个百分点,比 2006 年提高近 9 个百分点。(小小)