

# 用出芽短梗霉发酵生产卜多糖的研究\*

## (II)细胞色素水平与细胞形态和卜多糖产量的关系

陈 世 年

(华侨大学化工与生化工程系,泉州 362011)

**摘要** 研究发现较低的细胞色素水平是导致出芽短梗霉突变体 SN08 细胞形态,以及卜多糖生成量改变的主要原因。

**关键词** 出芽短梗霉,酵母样细胞,卜多糖,细胞色素

**分类号** TQ 929.2

卜多糖是细胞形态具有双型性的出芽短梗霉分泌的一种用途广泛、附加值高的真菌类多糖。虽然卜多糖是出芽短梗霉的正常代谢物,但只有在产生菌营养细胞呈酵母样时才有可能大量生成。Kazuhisa Ono 及作者<sup>[1~2]</sup>先后证实了 pH 值是影响出芽短梗霉细胞培养形态及卜多糖生成量的环境因子。除此以外,据报道<sup>[3]</sup>某些能损伤或阻碍呼吸功能的化合物(如 KCN、阿米妥、抗霉素 A、鱼藤酮)在破坏电子传递链的电子传递功能时,会使蒲头霉(*Mycotypha*)营养细胞的培养形态由菌丝型转变为酵母样表型。

作者在文[2]论述了用溴化乙锭(EB)和紫外线(UV)诱变选育出芽短梗霉突变体 SN08。现已知道 EB 是一种能引起酵母菌线粒体 DNA 突变并导致有机体呼吸功能缺损的极为有效的诱变剂<sup>[4]</sup>。为检查 SN08 细胞形态的改变及卜多糖的生成是否与呼吸和 ATP 生成途径有关,本文对 SN08 及其原养型 AS 3.3984 细胞色素氧化还原水平进行了研究。结果发现,SN08 的细胞形态及卜多糖的生成可能与发酵/呼吸之间平衡点的改变有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌种 出芽短梗霉(AS 3.3984)系中国科学院微生物研究所保存的菌种。SN08 是 AS 3.3984 的突变菌株<sup>[2]</sup>。

1.1.2 试剂 所用试剂均为市售分析纯和生化试剂级。

1.1.3 培养基 斜面培养基与发酵培养基与文[2]相同。

### 1.2 实验方法

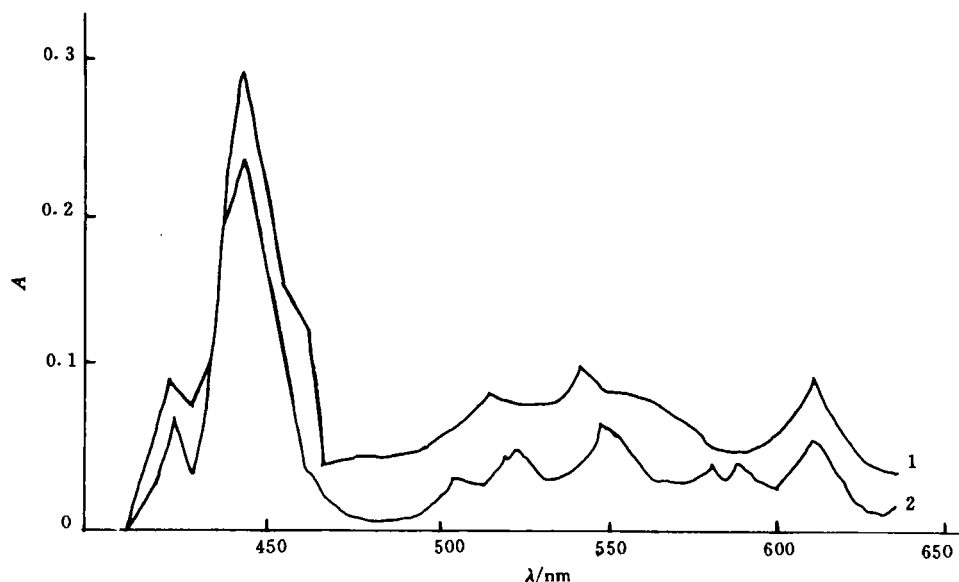
\* 本文 1995-10-31 收到;国家教委国内访问学者基金资助项目

1.2.1 培养条件 500mL 三角瓶定容100mL 发酵培养基(pH 6.0),接入斜面菌种后,培养物置于旋转式摇床( $220\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),在 $28^\circ\text{C}$ 下培养48h.

1.2.2 细胞色素水平分析 取培养48h 的菌体细胞采用差示光谱扫描法按文[5]进行,仪器为 Shimadazu 公司 UV-300 双波长光度计.

## 2 实验结果与讨论

Slonimiki 等人<sup>[6]</sup>发现用 EB 处理酵母菌,得到的突变体(99.8%)是呼吸缺陷型的非染色体“小菌落”.这种“小菌落”已证明是线粒体中的电子传递链丢失了 cyt b(COB 突变型),或 cyt  $a+a_3$ (OXI 突变型),或 Cyt b 与  $a+a_3$ (BOX 突变型),或 ATP 酶失活(PHO 突变型)的突变种.由于电子传递链组分的缺失,因此,电子传递链无法通过传递电子以形成质子迁移力来推动 ATP 的偶联生成,突变体所需的 ATP 是有机体细胞利用可发酵性碳源经 EMP 途径产生的.本研究则发现,突变体 SN08 细胞色素 c, b,  $a+a_3$  组分无一缺少(附图),这表明,突变体 SN08 与线粒体 TCA 循环和氧化磷酸化的功能仍然存在.由此看来,EB 对出芽短梗霉的诱变机制不同于酵母菌.



附图 SN08 及 AS 3.3984 细胞色素的氧化还原差示吸收光谱

1. 原养型 AS 3.3984 吸收光谱; 2. 突变株 SN08 吸收光谱

Barbara 等人<sup>[3]</sup>报道蒲头霉细胞由菌丝型转变为酵母样型,是由氧化磷酸化作用被抑制和 ATP 来源于底物水平磷酸化——EMP 途径所引起的.磷酸果糖激酶(PFK)是 EMP 途径的主要代谢调控点<sup>[7]</sup>,对细胞能荷水平,即对  $1/2[\text{ADP}] + [\text{ATP}]/[\text{AMP}] + [\text{ADP}] + [\text{ATP}]$  的状态十分敏感.当细胞中 ATP 水平高时,ATP 作为配体与 PFK 的变构中心结合使 PFK 失去活性;而当细胞 ATP 水平低时,PFK 则受到高水平的 ADP 与 AMP 的变构激活,此时低浓

度的 ATP 与 PFK 的催化中心结合, PFK 以高度活性形式出现. 此外, TCA 循环中的产物柠檬酸和 NADH 对 PFK 也有变构抑制作用. 因此, 对 PFK 的调控涉及到对发酵—呼吸两个阶段的调节. 从本研究的差示光谱扫描分析结果(表 1~3)可见, SN08 细胞色素除了 c, b 的  $\gamma$  吸收峰的 O.D 值高于 AS 3. 3984 外, 其细胞色素总体水平仍低于原养型, 尤其是  $a+a_3$  这一

表 1 SN08 和 AS 3. 3984 细胞色素 C 氧化还原水平 O.D 值的比较

$\lambda/\text{nm}$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
	550	521	415
SN08	0.061	0.039	0.071
AS 3. 3984	0.086	0.082	0.032

表 2 SN08 和 AS 3. 3984 细胞色素 b 氧化还原水平 O.D 值的比较

$\lambda/\text{nm}$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
	563	532	429
SN08	0.032	0.029	0.082
AS 3. 3984	0.064	0.071	0.064

表 3 SN08 和 AS 3. 3984 细胞色素  $a+a_3$  氧化还原水平 O.D 值的比较

$\lambda/\text{nm}$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
	600	439	443
SN08	0.025	0.096	0.16
AS 3. 3984	0.054	0.16	0.14

组分. 细胞色素是电子的载体, 在从辅酶 Q 到分子氧的电子传递过程中起着重要作用.  $a+a_3$  作为细胞色素氧化酶是电子传递链与分子氧的唯一连接物, 并且直接参与对分子氧的还原. 因此, 突变体 SN08 低水平的细胞色素表明, 尽管线粒体仍存在着完整的电子传递链, 然而由于氧化还原水平的降低, 使 TCA 及氧化磷酸化作用水平也随之降低. 导致 SN08 细胞内 ATP、柠檬酸、NADH 浓度的不足, 从而使 EMP 途径的主要限速因子 PFK 保持着较高的活性. 由此可以推论, 出芽短梗霉 SN08 细胞呈酵母样, 以及卜多糖的生成量增大与 EMP/TCA (发酵/呼吸) 之间的平衡点被改变有密切关系(表 4), 这一结论有助于为进一步完善卜多糖发酵参数控制的研究提供依据.

表 4 SN08 和 AS 3. 3984 培养 48h 卜多糖产量(P)与细胞形态的比较

菌株	$P/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞形态
SN08	4.5	以酵母样细胞为主
AS 3. 3984	3.0	以菌丝型细胞为主

### 3 结束语

卜多糖是出芽短梗霉的正常代谢产物. 然而, 只有在出芽短梗霉的细胞培养形态呈酵母样时才能大量生成. 本研究证实出芽短梗霉 SN08 酵母样细胞的出现主要是, 位于线粒体内膜上的电子传递链的细胞色素组分受溴化乙锭的损伤, 从而导致细胞色素氧化还原水平降低, 以及氧化磷酸化水平随之降低所引起的结果. 因此, 可以认为卜多糖的生物合成受到细胞能

荷水平的严格调控。

## 参 考 文 献

- 1 Ono K, Yasuda N, Ueda S. Effect of pH on pullulan eleaboration by aureobasidium pullulans S-I. Agric. Biol. Chem. ,1977,41(11):213~218
- 2 陈世年. 出芽短梗霉发酵生产卜多糖的研究. 华侨大学学报(自然科学版),1995,16(2):223~226
- 3 Barbara E S, Gunda K, Hinkelmann W. Factors affectting dimorphism in Mycotypha(Mucorales):a correlation with the fermentation/respiration equilibrium. J. Gener. Microbiol. ,1974,82:1~13
- 4 Slonimski P P, Perrodin G, Croft J H. Ethidium bromide induced of yeast mitochondria; Complete transformation of cells into respiratory deficient non-chrosomal "Petites". Biochem. Biophys. Res. Commun. , 1968,30(3):232~239
- 5 Haddock B A, Garland P B. Effect of sulphatelimited growth on mitochondrial electron transfer-adenine dinucleotide and the cytochromes in Torulopsis ntilis. J. Biochem. ,1971,(124):155~170
- 6 Slonimski P P, Tzagaloff A. Localization in yeast mitochondrial DNA of mutation expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH<sub>2</sub>-cytochrome C reductase. Eur. J. Biochem. ,1976,(61):27~41
- 7 杰弗里·佐贝编. 生物化学:上册. 曹凯鸣等译. 上海:复旦大学出版社,1989. 262~265

## Producing Pullulan by Aureobasidium Pullulans Fermentation

### (II) The Correlation of Pullulan Yield with Cytochrome Level and Cell Morphology of Aureobasidium Pullulans SN08

Chen Shinian

(Dept. of Chem. & Biochem. , Huaqiao Univ. , 362011, Quanzhou)

**Abstract** In producing pullulan by Aureobasidium pullulans fermentation, the yield of pullulan is found to be correlated with a fairly low level of cytochrome and the cell morphology of Aureobasidium pullulans SN08.

**Keywords** Aureobasidium pullulans, yeast-like cell, pullulan, cytochrome