

固定化微环境对酿酒酵母代谢的影响

陈家任 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

本文报道不同载体固定化酵母的某些代谢行为和细胞形态。观察到以海藻酸钙凝胶固定酵母, 其发酵液总挥发酸量、乙酸量分别比自然细胞减少25.8%和50.0%, 而丁二酸量高出自然细胞36.5%。以海藻酸钙, 聚乙烯醇凝胶固定酵母, 其氨基氮的利用率比自然细胞分别提高31.1%和34.1%, 在固定化前后, 酵母菌对各种 α -氨基酸的利用速度亦都发生明显的变化。电镜观察, 酿酒酵母的细胞膜内陷、形成“凹池”。

关键词 固定化酿酒酵母; 代谢

微生物活细胞固定化技术及其在工、农、医和生化分析上应用, 已有不少报道^[1,2], 由于制剂具有较高产率、较好的操作稳定性、辅酶再生, 并可同时完成人们所希望的一步或多步酶促反应, 受到人们越来越大的关注。然而, 固定化微环境对固定化细胞代谢的影响, 报道很少, Hattori^[3]观察到吸附到Dowex-1的细菌的生理活性与自然细胞不同。Furusaka^[4]报道固定化微生物细胞的最适pH发生偏移。Navarro^[5]报道*S. carlsbergensis*经固定化后, 缩短了细胞的世代时间。Ghose^[6]观察到吸附在不同载体上的*S. cerevisiae*的呼吸熵与自然细胞不同。本文报道在不同载体上固定化的酿酒酵母的细胞形态及其代谢行为的变化。

材料与方 法

(一) 菌种

酿酒酵母(*S. cerevisiae*)由成都酒厂啤酒车间供给, 保存在麦芽汁琼脂斜面上。

(二) 培养基和培养条件

见前文^[7]。

(三) 细胞固定化技术

海藻酸盐固定化参照前文^[7]方法, 海藻酸钠浓度为5%, 聚乙烯醇固定化参照H. Maeda^[8]方法, 聚乙烯醇浓度7.5%。

(四) 挥发酸含量测定

不同时间定量取发酵液, 高速冷冻离心机上8000rpm离心15min, 吸取上清液并在离子色谱仪上测定, 色谱仪使用10× ϕ 8有机玻璃柱, 柱内填充YSG-SO₃H⁺型阳离子交换树脂, 微电导检测器检测。

(五) 发酵液中菌体浓度测定

参照Ghose^[6]方法测定。

(六) α -氨基氮和 α -氨基酸含量测定

不同时间定量取发酵液, 经高速冷冻离心机离心后, 上清液除糖并除蛋白后在岛津氨基酸自动分析仪上测定 α -氨基酸含量。上清液除糖并经酸水解后, 在岛津氨基酸自动分析仪上测定 α -氨基酸含量,

本文于1986年1月31日收到。

曾本秀、江跃林同志参加部分工作。分析工作得到刘大江、陈安刚、周绍英同志的协助; 蔡维东同志协助制作扫描电镜在此一并致谢。

以总氨基酸含量表示总氮量。

(七) 微生物细胞的扫描电镜观察

固定化微生物细胞或自然细胞的制样参照第二军医大学电镜室和复旦大学生物系电镜室方法^[9]，置国产 DX-3 型电镜上观察。

结果与讨论

(一) 固定化酵母发酵过程挥发酸含量变化

挥发酸是酿酒酵母麦芽汁厌氧发酵过程较主要产物之一，其含量明显影响产品的质量。从表1看出，在整个发酵过程，固定化酵母细胞的总挥发酸量明显低于自然细胞。进一步研究表明，总挥发酸浓度的差

表 1 发酵过程总挥发酸含量

Table 1 Volatile acid content during fermentation

发酵时间 Fermentation time (h)	固定化细胞挥发酸* Immobilized cell volatile acid (g/L)	自然细胞挥发酸 Native cell volatile acid (g/L)
6	0.14	0.18
12	0.18	0.07
18	0.30	0.32
24	0.25	0.36
30	0.23	0.31

* 海藻酸钙固定化酵母

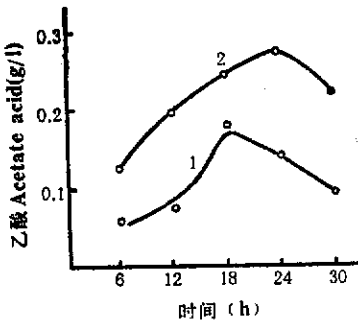


图 1 发酵过程乙酸量变化

Fig.1 Change of acetate acid during fermentation

1. 固定化细胞 Immobilized cell
2. 自然细胞 Native cell

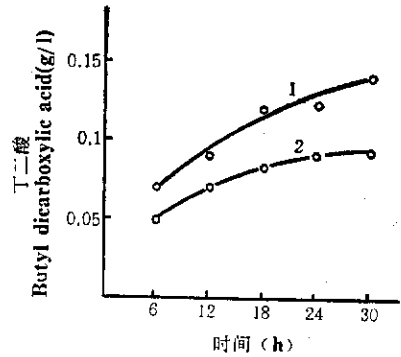


图 2 发酵过程丁二酸量消长

Fig.2 Change of butyl-dicarboxylic acid content during fermentation

1. 固定化细胞 Immobilized cell
2. 自然细胞 Native cell

异主要取决于代谢过程中乙酸和丁二酸量的变化，从图 1,2 看出整个发酵过程固定化细胞的乙酸量显著减少(约减少50%)，而丁二酸量明显增加(约增加36.5%)，代谢产物组成量的变化暗示固定化酵母代谢流发生了改变。

(二) 固定化微环境对固定化酵母菌利用有机氮源影响

结果见表 2。由表可知，在固定化微

表 2 发酵过程固定化酵母菌的α-氨基酸源利用

Table 2 The amino nitrogen utilization ratio for immobilized cell to native cell

固定化方法 Immobilized method	起始含氮量 Initial nitrogen contents (g/L)	残余氮量 Surplus nitrogen contents (g/L)	利用率 Utiliza- tion ratio (%)
海藻酸钙凝胶 Calcium alginate gel	3.27	0.913	72.1
聚乙烯醇 Polyvinyl alcohol	3.27	0.806	73.1
自然细胞 Native cell	3.27	1.929	40.9

环境中，酵母菌对氮源利用率高达70%以上。海藻酸钙和聚乙烯醇固定化酵母对氮的利用率分别比自然细胞提高 31.1% 和 34.1%。这表明酵母菌在固定化微环境

中,除利用麦芽汁培养液中的游离氨基酸外,还利用一部分二肽、三肽或其他多肽含氮物。从图3还可看出,在固定化微环境中,氮量曲线变化较陡,出现低谷。酵母菌摄取的氮量比自然细胞多,而“休克性”排出的氮量亦明显增加,推测固定化酵母的细胞壁通透性发生变化,并处于某种暂时能量短缺状态^[10],说明在固定化微环境中酵母菌对氮源利用比自然细胞更为复杂。

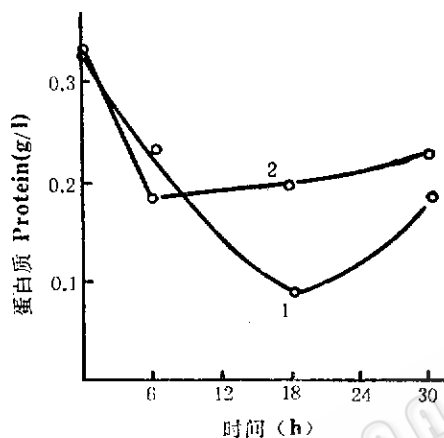


图3 固定化酵母和自然细胞的氮源利用曲线
Fig.3 Curve of nitrogen utilization for immobilized cell and native cell

1. 固定化细胞 Immobilized cell
2. 自然细胞 Native cell

(三) 固定化酵母发酵过程游离氨基酸含量测定

在自然细胞发酵液中,摄取率达38%以上的 α -氨基酸只有天门冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸。色氨酸和脯氨酸利用极微。但在固定化微环境中,除脯氨酸、色氨酸和丙氨酸较少外,其余的15种氨基酸的摄取率都在45%以上。海藻酸钙固定化酵母对天门冬氨酸、苏氨酸、谷氨酸、组氨酸和苯丙氨酸的摄取率高达80%以上,而聚乙烯醇固定化酵母,则以天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸和氨的

利用率最高。从图4看出,摄取率较大的氨基酸,其“休克性”排出的氨基酸量也较大,其消长趋势与氮源变化十分相似。

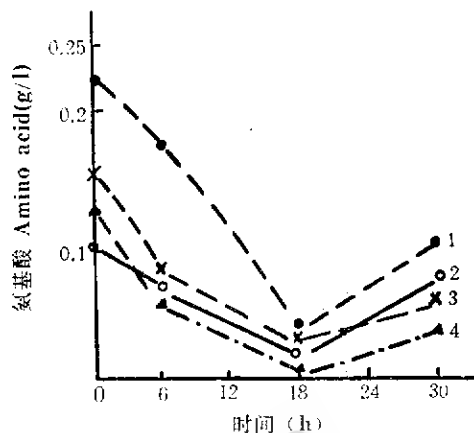


图4 发酵过程几种氨基酸消长曲线
Fig.4 The change of various amino acids during fermentation
1. Asp 2. Thr 3. Phe 4. Lys

(四) 发酵麦汁中乙醇和双乙酰含量测定

在发酵20h左右,残糖约为1.8%时,分别定量取样,用重量法测定乙醇含量,用邻苯二胺法测定双乙酰含量,结果见表3。从表3可看出,在本试验条件下,当发酵液残糖约1.8%时,固定化细胞和自然细胞的发酵液中双乙酰含量较接近,但乙醇含量固定化组略高。

(五) 固定化载体的化学性质对酵母细胞代谢的影响

在酵母细胞自然发酵过程,分别添加无菌的海藻酸钙凝胶10%(V/V)或0.3%(W/V)、0.6%(W/V)、1.0%(W/V)可溶性海藻酸钠,结果如表4。添加载体凝胶组的 α -氨基氮利用率、挥发酸总量与对照组十分接近。添加可溶性海藻酸钠组,即使浓度很低(0.3%),挥发酸总量明显减少, α -氨基氮利用率显著地提高。值得提到的是,不管是 α -氨基氮利用,还是挥发酸总量的变化都是随着可溶性海藻酸钠添加量增加,朝着相反方向很微地

表 3 发酵20h麦汁中乙醇和双乙酰含量
Table 3 Contents of ethyl alcohol and biacetyl in malt broth at 20 h

含 量 Contents 样品 Sample	残 糖 Surplus sugar	乙 醇 Ethyl alcohol % (V/V)		双 乙 酰 Biacetyl (mg/L)	
		固定化细胞 Immobilized cell	自然细胞 Native cell	固定化细胞 Immobilized cell	自然细胞 Native cell
1	1.8	4.0	3.7	0.441	0.443
2	2.3	3.6		0.348	
3	1.7	3.9	3.6	0.271	0.212
4	1.9	3.9		0.421	

表 4 固定化载体化学性质对酵母代谢的影响
Table 4 Effect of chemical nature of carries on yeast metabolism

	对照组 Control	海藻酸钙凝胶 Calcium alginate gel	可溶性海藻酸钠 Soluble sodium alginate		
			0.3%	0.6%	1.0%
挥发酸 Volatile acid	0.30	0.29	0.21	0.23	0.24
α -氨基氮 α -amino nitrogen	0.122	0.117	0.082	0.084	0.086

注：1. α -氨基氮按《工业发酵分析》，样品稀释70倍，用0.5cm 光径比色皿，570nm处测定

2. 各试验组和对照组分别加入0.4% (W/V) 氯化钙

变化。说明添加少量可溶性多聚物，虽然明显影响酵母细胞的代谢，但在凝胶包埋固定化酵母中，代谢行为变化的主要原因是由固定化微环境引起的。

(六) 固定化载体的物理状态对物料扩散的影响

分别把含有酪氨酸、苯丙氨酸、牛血清蛋白的4%海藻酸钠溶液4ml在1min内挤入4%氯化钙溶液中，形成 $\phi 1.8-2.0$ mm和 $\phi 4-4.5$ mm珠状凝胶，在不同波长下测定消光值。从图5可以看出，当凝胶颗粒从 $\phi 2.0$ mm增大到 $\phi 4-4.5$ mm，无论是极性很强的氨基酸、非极性氨基酸，还是蛋白质，其扩散速度显著减慢。在相同颗粒大小凝胶中，不同物料的扩散不同，

说明凝胶对不同底物、基质有着不同的约束和限制作用，以致在微环境中出现局部的产物积累，以及物料和pH的浓度梯度从而抑制或加速某种酶促反应。

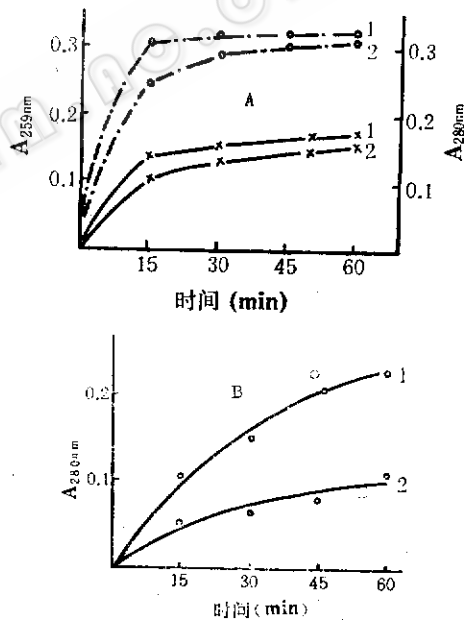


图 5 载体物理状态对物料扩散影响
Fig. 5 Diffusion limitation of physic state of carries on substrate

A. 苯丙氨酸、酪氨酸在凝胶中的扩散
Diffusion of phenylalanine and tyrosine in gel
1. $\phi 1.8-2.0$ mm 2. $\phi 4-4.5$ mm
o, Tyr x, Phe

B. 牛血清蛋白在凝胶中的扩散
Diffusion of bovine serum albumin in gel
1. $\phi 1.8-2.0$ mm 2. $\phi 4-4.5$ mm

(七) 固定化细胞的电镜观察

以海藻酸钙、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺

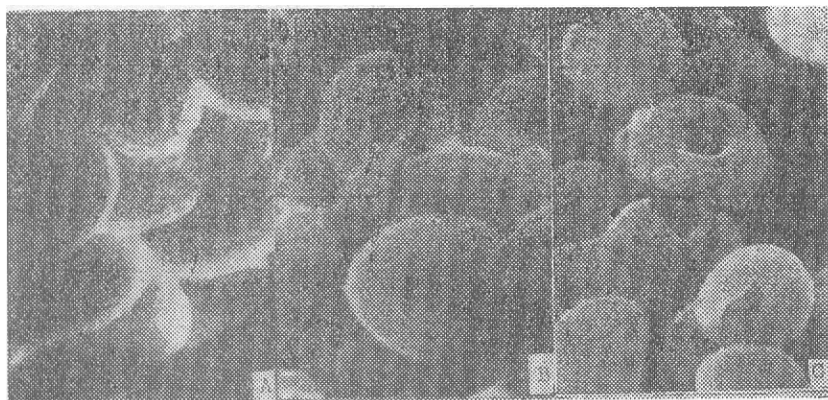


图 6 不同载体的固定化细胞扫描电镜观察

Fig. 6 Scanning electron micrograph of the gel bead of immobilized cells *S. cerevisiae* entrapped in various carries

A, B, C 分别为海藻酸钙、聚丙烯酰胺凝胶和聚乙烯醇凝胶固定化酵母细胞
A, B, C is immobilized yeast cells of calcium alginate, polyacrylamide gel and polyvinyl alcohol, respectively

凝胶固定化酵母,在麦汁培养液中增殖后进行扫描电镜观察。从图 6 可以看到不同载体包埋菌体,其细胞形态与自然细胞没有明显差别,都是卵圆形,有较好的细胞活性,一些酵母细胞呈侧面出芽裂殖,很少见到顶端出芽裂殖。从图还可以看到许多细胞的一端细胞膜内陷,形成“凹池”。

讨 论

为了阐明固定化细胞的活化机制,前人对固定化细胞进行过许多显微观察和电镜观察。Ghose 在试验中观察到吸附在载体 A 的酵母细胞呈椭圆形,而吸附在 CPG 载体上的酵母细胞呈杆状。我们试验的几种载体所包埋的酵母细胞形态没有差别,都呈卵圆形。令人感兴趣的是,观察到酵母细胞膜内陷现象。无论海藻酸钙、还是聚乙烯醇或聚丙烯酰胺凝胶,都有类似情况。以冰冻蚀刻制样,用透射电镜观察表明,固定化细胞的细胞膜与自然细胞并没有明显区别,膜上呈现明显的线粒体结构。固定化酵母细胞的细胞膜内陷成因及其在酵母细胞中的生物学意义(或

作用)尚待进一步研究。

Chibata 利用固定化酶、固定化细胞拆分 DL-氨基酸实现工业化以来,固定化细胞(包括活细胞固定化)可明显提高目的物产率、提高酶利用率已为人们所熟知,并在固定化技术及其应用方面做了大量工作,但固定化微环境对固定化细胞代谢行为的影响则报道甚少,其机理远未搞清。笔者在研究过程中观察到酵母代谢的主要产物乙醇在固定化酵母的发酵液中略高出自然细胞,而挥发酸总量略低于后者,而乙酸量和丁二酸量也有明显差别,产物组成比例明显差异,推测酵母细胞在固定化微环境中代谢流可能发生了变化。固定化酵母对有机氮和 α -氨基酸利用的进一步比较研究表明,细胞生长稳定期后,酵母细胞对有机氮和 α -氨基酸摄入量比自然细胞高出 30% 以上,而排出量也明显增加,这可能与细胞维持代谢有关。Shinyo 等^[11]用卡拉胶固定 *B. amyloliquefaciens* 证明,由于细胞处于较高维持代谢水平,细胞生长量减少了,而提高了 α -淀粉酶产量。而 Ghose 则认为在固定化

细胞反应体系中, 由于固相对液相中基质的吸附作用, 细胞处于较高基质浓度的环境之中。Bo. Mattasson^[12]等综合许多学者的独立观察, 提出了微环境对固定化细

胞代谢影响模型, 认为微环境通过降低水活度和氧分压调节细胞代谢。但是要清楚地解释这些现象, 目前看来仍是比较困难。

参 考 文 献

- [1] Fiechier, A., *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 15, Bruhische Universitätsdruckerei Gieben, p.89, 1980.
- [2] Venkatsubramanian, K., *Immobilized Microbial Cells*, American Chemical Society US, 1979.
- [3] Hattori, R., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18:285, 1972.
- [4] Furusaks, C. et al., *J. Biochem.*, 50:312, 1961.
- [5] Navarro, J. M. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 4:243, 1977.
- [6] Ghose, T. K. et al., *Biotechnol. and Bioeng.*, 24:805, 1982.
- [7] 陈家任等: 中国生化学会五次全国生化学术会议论文汇编, 北京, 1984.
- [8] Maeda, H. et al., *Biotechnol. and Bioeng.*, 17: 119, 1975.
- [9] 第二军医大学电镜室, 复旦大学生物系电镜室: 细胞超显微结构与功能, 科学出版社, 上海, 1983.
- [10] 天津轻工学院, 无锡轻工学院: 工业发酵分析, 轻工业出版社, 北京, 1982.
- [11] Shinyo, A. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14:7, 1982.
- [12] Mattasson, Bo. et al., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16:52, 1982.

THE EFFECTS OF IMMOBILIZED MICRO-ENVIRONMENT ON THE YEAST METABOLISM

Chen Jiaren Wu Yanyong

(Chengdu Biological Institute, Academia Sinica, Chengdu)

This article deals with some metabolic actions and the morphology of the cells of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on different supporters. The volatile acid and acetic acid contents in the fermentation liquid produced by cells immobilized by alginic acid gel decreased by 25.8% and 50.0%, respectively, as compared with those produced by native cells, whereas the butyldicarboxylic acid content increased by 36.5%. The amino nitrogen utilization ratio of the cells immobilized by calcium alginate and by PVA increased by 31.1% and 34.1%, respectively. Furthermore, remarkable changes in utilization ratio of various specific amino acids were observed when the cells were immobilized. Subsidence on cell membrane structure in alginate, PVA and polyacrylamide gels was confirmed by scanning electron micrography.

Key words

Immobilization; *S. cerevisiae*; metabolism