

# 生物技术中的水活度

邓元修

(华中理工大学生物工程系, 武汉)

一切生命都离不开水, 但水的可利用性不单纯取决于水的含量。吸附于表面的水随被吸附的紧密程度和生物获取它的能力而表现出不同的可利用性。溶质溶解于水时或多或少地成为水合物也影响水的可利用性。从生物技术的角度出发, 水的活度就是表示生命活动中水的可利用性的一个概念。

水活度的概念引自物理化学中关于溶剂活度的描述。

在一定的温度与压力下, 理想溶液中溶剂克分子分数等于该溶液上溶剂蒸气分压与纯溶剂蒸气压力之比:

$$\text{溶剂克分子分数} = P/P_0$$

对非理想溶液而言, 该比值不代表该溶液中溶剂的实际克分子分数, 而代表有效克分子分数。

当溶剂克分子分数为 1, 即纯溶剂时, 为理想状态。若将其活度定为 1, 则可按该标准确定该溶剂在其它溶液中的“行为浓度。”即是说, 任何溶液中溶剂的活度可从与理想溶剂活度值之比来确定。在实践中, 意味着溶液中溶剂活度等于该溶液中的有效克分子分数。

因此, 在水溶液中:

$$\text{水活度}(A_w) = \text{水有效克分子分数} = P/P_0$$

或者可以更形象地说, 水活度表示该水溶液中水的有效含量。

当水溶液与局部环境平衡时, 水活度等于大气相对湿度:

$$R.H = A_w$$

因此, 可以用测定相对湿度的办法, 例如用湿度计来直接测定  $A_w$ 。然而, 在某些情况下则需要一些精确方法来测定或估计局部微环境中的  $A_w$ <sup>[1]</sup>, 例如固定化细胞颗粒中甚至胞体内外  $A_w$  的方法。

## (一) $A_w$ 与微生物

至今为止, 生物技术中有关  $A_w$  研究和应用得最多的是微生物, 包括细菌, 酵母, 丝状真菌和藻类。

众所周知, 微生物能在一个含水量变化范围很大的环境中生长。一般来说, 霉菌能在较为干燥的环境中生长, 酵母对水的要求比霉菌稍高, 而细菌对环境水份的依赖最强。进一步研究发现它们的生长, 代谢和孢子生成等不单取决于水量, 在很多情况下更取决于有效含水量即  $A_w$ 。

1. 底物  $A_w$  对微生物生长的影响: 当用甘油调节

培养基使其具有不同的  $A_w$ , 发现对绿色木霉 *Trichoderma viride* TS 和娄地青霉 *Penicillium roquefortii* 的生长率有明显的影晌<sup>[2]</sup>。当  $A_w$  低于 0.90 (相当于 513.43% 甘油溶液) 时, 绿色木霉停止生长, 其最佳生长的  $A_w$  为 0.99 (相当于 51.06% 甘油溶液)。使用甜菜浆也得出相似结论<sup>[3]</sup>。而娄地青霉生长的最适  $A_w$  为 0.97 (相当于 152.96% 甘油溶液), 当  $A_w$  为 0.90 时停止生长。

在最适  $A_w$  值以外,  $A_w$  的微小变化都极大地影响这两株菌的生长速率, 并且存在一个临界  $A_w$  值, 低于该值菌株不能正常生长。然而, 当环境  $A_w$  略低于该临界值, 经过一个长的时滞 (绿色木霉至少 72 小时, 娄地青霉为 120 小时) 仍然能看到一个微弱的生长现象。

当用角叉菜胶降低  $A_w$  发现解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 生长下降但  $\alpha$ -淀粉酶生成增加<sup>[4]</sup>。此外, 当用氯化钠降低  $A_w$  同样观察到肺炎克氏杆菌 *Klebsiella pneumoniae* 生长下降而维持代谢增强的现象<sup>[5]</sup>。

2. 底物  $A_w$  对微生物代谢的影响: 底物  $A_w$  变化对微生物代谢的影响已经作了许多研究, 然而  $A_w$  影响代谢过程的细节了解得还不多。

如上所述, 研究绿色木霉和娄地青霉时发现, 当环境  $A_w$  略低于临界值, 经过较长的时滞又重新恢复微弱的生长, 提示似乎存在一个与临界  $A_w$  以上的代谢途径不同的“应急”代谢途径。在恶劣的  $A_w$  条件下, 该途径有关通道在时滞期间被接通, 然后发挥作用以维持微生物的生长。

耐盐藻 *Dunaliella* 对环境含盐量的适应范围很广, 在 0.1—5mol/L 的饱和盐溶液中均能生长<sup>[6]</sup>。研究发现, 该藻随基质盐浓度的增加, 代谢转向甘油生成途径, 其甘油积累量也随之增加。当盐浓度达到 5mol/L 时, 胞内甘油浓度达到 7mol/L, 即相当于 50% 甘油溶液的惊人程度。但此时其代谢时间由最适条件下的 5 小时增加到 72 小时。这些甘油, 当环境  $A_w$  增加时能重新进入代谢循环而被利用, 因而又可视作为一种食物贮备。

与甘油大量积累的同时,  $\beta$ -胡萝卜素含量也增加。因为甘油积累是为了对抗环境  $A_w$  变化, 该途径在消耗 ATP 的基础上使 NADH 转变成 NADPH, 而  $\beta$ -胡萝卜素的生成要消耗 NADPH。再者,  $\beta$ -胡萝卜

素的增加对菌体本身对抗环境  $A_w$  下降似乎没有直接作用,因而很可能 $\beta$ -胡萝卜素的合成是被 NADPH 生成所“触发”,只是一种“被动”的代谢模式变化的副产物。

在支链孢霉 *Alternaria alternata* 中也发现类似情况。当环境  $A_w$  下降,甘露醇积累, NADPH 生成<sup>[11]</sup>。而嗜盐外硫红螺菌 *Ecotithiorhodospira halochloris* 则随环境  $A_w$  下降而合成甜菜碱<sup>[12]</sup>。

在以上例子中,微生物代谢模式变化与环境渗透压变化之间存在一种呼应关系。在这种情况下,体内积累的代谢物起着渗透压调节作用。这显然是对环境  $A_w$  变化的一种自我保护的反应。

用热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 进行木糖发酵,当向培养基中加入 18% 的 PEG1540 使  $A_w$  为 0.993 时,其代谢从木糖醇转向乙醇合成<sup>[13]</sup>。因为乙醇发酵是无氧代谢过程,与介质氧分压有密切关系,增加 PEG 浓度提高了培养基粘度,其结果影响了培养基溶氧及氧传递速率,这对乙醇生成是必要的,因此推测这是代谢模式变化的重要原因。

在无氧发酵情况下,  $A_w$  变化与介质溶氧变化无关,此时可能通过改变其它物质传递等等而发生作用。然而,这可能仅仅是比较表面的原因。更重要的原因大概是酶活性和稳定性的变化,因为已经发现  $A_w$  可以影响酶的活性和稳定性,而这种变化与代谢和产物模式的变化是必然相关的。

在蛋白质的水合过程中,水的等温吸附可用于解释蛋白质变性和酶的活性,在一定的温度时,反映水量和  $A_w$  的关系。对多数球蛋白,这是一条“S”形曲线,其转效点在  $A_w$  0.8 和 0.2。低  $A_w$  段被认为是紧密束缚于蛋白质表面的单层水分子;中段是二层或数层水分子;而  $A_w$  0.8 以上范围为毛细管状态的水。

当用丙酮使蛋白质变性或热变性<sup>[10,11]</sup> 都要求相当于  $A_w$  0.8 的有效含水量。而在庚醇中的猪胰脂肪酶,当水量降到 0.015% 时,半衰期由 15 分钟增加到 12 小时<sup>[12]</sup>。

当底物水量相当于  $A_w$  0.2 以上,酶表现活性<sup>[13,14]</sup>,意味着当水量少于单层水分子时,酶不能作用于底物。似乎,水作为一种分散介质使酶与底物接触是酶表现活性的条件之一。

在酶催化的水解反应中,反应的平衡与水分子消耗有关。显然,当环境  $A_w$  下降,反应有可能在促进合成的方向上建立新的平衡。

在淀粉水解时广泛使用糖化酶。但是,当用 43.7% 葡萄糖溶液培养产生糖化酶,发现麦芽糖和异麦芽糖合成<sup>[15]</sup>。此外,用 10% 纤维二糖溶液培养产生纤维二糖酶时表现出转糖苷酶活性<sup>[16]</sup>。值得注意的是在该浓度糖溶液的  $A_w$  水平上,其它水解酶的水解活性下降了。

一般认为,酶促反应是双向的,因而类似例子中反应平衡向左移动是由于高浓度降解物的作用还是低  $A_w$  的作用,或者二者兼有之,还有待进一步工作。

研究  $A_w$ , pH 和温度对少根根霉 *Rhizopus arrhizus* 脂肪酶活性的影响时发现,酶活性与  $A_w$  有关<sup>[14]</sup>。  $A_w$  对  $K_m$  的影响在 0.8—0.9 范围最明显,表观  $K_m$  被二元醇降低 50%,被甘油降低 80%。温度和 pH 对该酶活性影响主要取决于用来降低  $A_w$  的醇的种类。当  $A_w$  由 1 降到 0.65,使用甘油时使最佳 pH 增加约 0.5 单位;而乙二醇有相反的作用。当用丙二醇使  $A_w$  降到 0.74 时,最适温度由 37℃ 上升到 50℃。但乙二醇和二甘醇对温度没有明显影响。

最近,用芹菜作材料研究时发现<sup>[17]</sup>,细胞壁细胞膜和液泡膜的物理和化学状态与  $A_w$  有关。在不同的  $A_w$  下分别表现可逆或不可逆变化。由于细胞壁和生物膜在生命活动中的特殊重要作用,所以有理由认为可能是  $A_w$  影响细胞代谢活动的一个重要原因。

3.  $A_w$  对微生物孢子生成的影响: 对绿色木霉和娄地青霉的研究发现<sup>[2]</sup>,环境  $A_w$  的变化可以影响孢子生成。当  $A_w$  为 0.98 时,绿色木霉的生孢子能力最强;而  $A_w$  为 0.96 时娄地青霉的孢子生成能力最强。当偏离上述值时孢子生成能力急剧下降。这二株菌的最适孢子生成所需  $A_w$  均低于最适生长所需的  $A_w$ 。此外,绿色木霉生长所需的最低  $A_w$  为 0.90,而孢子生成所需的最低  $A_w$  为 0.96。

至于  $A_w$  通过什么途径影响孢子生成还不清楚。

## (二) $A_w$ 在生物技术中的应用

由于  $A_w$  对微生物的生长和代谢过程存在不同程度的影响,尤其是对酶的稳定性和活性的作用,因而在生物技术的许多领域中有实用价值。

1. 菌种保存: 在食品、发酵、医药及其它领域普遍使用菌种保存技术。在保持微生物及动植物细胞高度存活率的贮存方法中,已广泛使用一定浓度的甘油及其它溶液或冷冻来降低  $A_w$ 。发现某些  $A_w$  条件下处理菌种可能导致 DNA 断裂,因而细胞死亡或突变<sup>[18]</sup>。例如,在  $A_w$  低于 0.53 时干燥大肠杆菌 *E. Coli* DNA 断裂并由精氨酸缺陷型诱导出原养型突变,而在  $A_w$  0.75 时没有发现类似情况。所以更好的长期保存菌种的方法和保存机制仍在深入研究中。

2. 食品技术: 食品技术是  $A_w$  研究得最早,应用得最多的一个领域。例如,早就运用各种降低  $A_w$  的方法,即加入盐,糖,冷冻或干燥来避免食物腐败变质。而用糖降低感染伤口的  $A_w$ ,抑制感染病菌以利于伤口康复的方法已成功地用于治疗。

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是一个重要的食品腐败菌,因为它能在许多微生物难以生长的  $A_w$  (0.86) 的环境中生长,所以被广泛研究和重视。此外,中等湿度食物的开发中已经使用特殊的添

加剂如 PEG200,400 等以控制  $A_w$ , 甚至某些蛋白质也可用于降低  $A_w$  而抑制细菌生长<sup>[19]</sup>。

对黄曲霉 *Aspergillus flavus*, 鲜绿青霉 *Penicillium viridicatum* 和禾本科镰刀霉 *Fusarium graminearum* 的研究发现<sup>[20]</sup>, 当 25℃,  $A_w$  在 0.95 和 0.98 时, 黄曲霉毒素生成最多; 当 25℃,  $A_w$  在 0.98 和 16℃,  $A_w$  在 0.95 时玉米赤霉烯酮生成最多; 而当 25℃ 时在 0.9—0.98 的大范围  $A_w$  下赭曲毒素 A 都能大量积累。

这些研究成果都将对食品保存与加工过程起指导作用, 以保持或改善食品品质。

3. 发酵技术: 当环境  $A_w$  改变, 微生物代谢调整, 代谢产物相应发生变化, 因而可以达到获得特定产物的目的。

如前所述, 耐盐藻积累大量甘油以适应环境  $A_w$  的下降, 工业上可用于甘油生产。此外, 某些最大渗透压耐受菌积累脯氨酸, 耐受较低的积累 L-氨基丁酸, 耐受最低的积累谷氨酸<sup>[21]</sup>。还发现在两种链霉菌中, 当增加培养基盐度以降低  $A_w$ , 其反应是酸性氨基酸(谷氨酸, 天门冬氨酸)减少而中性氨基酸(脯氨酸, 丙氨酸, 谷氨酰胺)积累增加<sup>[22]</sup>。

在绿色木霉发酵中<sup>[23]</sup>,  $A_w$  及改变  $A_w$  所使用的物质对多聚半乳糖醛酸酶, D-木糖酶及  $\beta$ -葡萄糖苷酶的合成有明显影响。多聚半乳糖醛酸酶和 D-木糖酶在  $A_w$  0.995 时产量最高,  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 0.96—0.98 时产量最高。在用于降低  $A_w$  的氯化钠, 甘油和山梨醇中, 山梨醇具有改变多聚半乳糖醛酸酶和 D-木糖酶的热稳定性的作用。

显然, 这些研究在发酵工业的优良菌种选育和发酵工艺中都有重要价值。

在实用化的仪器设备方面, 已经研制出灵敏的 ( $\pm 0.007$  单位) 传感器系统以用于生物反应器中液体培养基  $A_w$  的连续测定和调节<sup>[24]</sup>。

4. 细胞和酶的固定化技术: 近年来, 由于固定化技术在生物转化中的特殊优势而被专门研究。固定化酶或细胞因为密度增大而提高了转化效率, 但另一方面, 局部  $A_w$  变化及传质障碍等又使问题复杂化。虽然, 由于培养液流动可以使固定化小球间隙间甚至固定化小球内部浅表层的物质状态及  $A_w$  得到改善, 但在小球内部由于扩散障碍等原因, 产物大分子滞留并使水分子“组织化”,  $A_w$  始终处于较低的水平, 细胞代谢流可能发生变化, 并在相应的  $A_w$  上建立一个新的代谢与产物模式。

用 5% 海藻酸钠和 7.5% 聚乙烯醇分别固定酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 研究固定化微环境对代谢的影响<sup>[25]</sup>, 发现乙酸生成减少约 50%, 丁二酸增加约 36.5%, 而总挥发酸浓度下降 25.8%, 暗示代谢流发生变化。对氨基氮的利用率在两种固化方法中

分别提高 31.1% 和 34.1%, 同时  $\alpha$ -氨基酸的排出也明显增加, 这可能与提高了维持代谢水平有关。

在酿酒酵母乙醇批次发酵中, 当加入 0.5% 海藻酸钠时也可以引起产率明显改变<sup>[26]</sup>。而用糜蛋白酶合成类蛋白时, 用 4% 琼脂糖固定化可以使合成活性增加 60%。表明即使是较低水平的聚合物浓度也对与  $A_w$  有关的生化反应发生影响。

5. 环境技术: 前面提到的肺炎克氏杆菌是一种通常生长在土壤和废水中的细菌, 当用氯化钠降低环境  $A_w$ , 其细胞生长量下降而维持代谢增加。按活性污泥法废水处理的观点, 这是一个有希望的结果, 可惜伴随产生的氧也下降了。目前环境工程专家正在寻找一种细胞量生成尽可能低而氧生成量尽可能高的  $A_w$  的适当方法, 以期在该技术上取得突破性的进展。

虽然多年以前水活度与生命活动的关系就被发现了, 但对  $A_w$  的研究不够全面深入, 因而在生物技术领域中的应用也远不如水的 pH, 温度和溶氧等, 而它们早已成为必须常规考虑的重要因素。

然而, 随着研究的深入, 生命活动中  $A_w$  的重要性已越来越被重视, 因而建议在生物技术中与 pH 等一样作为重要环境条件使用。尤其是对  $A_w$  与 pH, 溶氧, 温度等因素的相互作用的研究, 提示我们设计某一生物反应过程时可能必须综合考虑这些因素的协同效应, 才能充分开发生物技术的潜力, 进一步提高产量, 或者为寻找有生产价值的产物工艺途径提供可能。

## 参 考 文 献

1. Chirife, J. et al.: *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 475—479, 1981.
2. Gervais, P. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 31: 457—463, 1988.
3. Grajek, W. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 537, 1987.
4. Shinmyo, A. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 7—12, 1982.
5. Esener, A. A. et al.: in *Advances in Biotechnol.* 1: 339—344, 1980.
6. Ben-Amotz, A. et al.: *TIBS*, 11: 297—299, 1981.
7. Hult, K.: *Eur. J. Biochem.*, 88: 607—612, 1982.
8. Galinski, E.A.: *FEMS Microbiology Letter*, 13: 357—360, 1982.
9. Hahn-Hägerdal, B. et al.: *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 173—175, 1985.
10. Hägerdal, B.: *J. Food Sci.*, 43: 22—26, 1978.
11. Hägerdal, B.: *J. Food Sci.*, 41: 933—937, 1976.
12. Zaks, A. et al.: *Science*, 224: 1249—1251, 1984.
13. Acker, L. et al.: *Lebensm. Unters. Forsch.*, 11: 349—356, 1959.
14. Touraine, Frederique et al.: *Sci. Aliments*, 7: 411—431, 1987.

(下转第 311 页)