

# 魔芋多糖固定化酿酒酵母生理生化特性的研究

陈家任 贾成禹

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

本文报道魔芋多糖载体固定化酿酒酵母的生理生化特性。批式发酵试验结果表明, 固定化细胞与自然细胞相比较, 前者的糖利用速度和乙醇生成速度分别提高 28.1% 和 32.2%, 而细胞增殖速度减少了 28.0%。前者细胞内大分子组成和某些酶活力分析结果说明, 固定化细胞蛋白质(包括含氮量、粗蛋白)、去氧核糖核酸、细胞内聚多糖含量和 EMP 代谢途径的某些酶活性都发生了变化。

**关键词** 魔芋多糖; 固定化酵母

随着微生物细胞固定化技术的发展和日益广泛的应用, 近年来, 一些学者曾对固定化微生物的特性开始进行研究, 但工作还很不深入, 还不能作出满意解释, 并对其应用加以指导。随着细胞-细胞, 细胞-酶共固定化新技术的出现, 需要找出最适条件, 以实现串联催化目的。作者对魔芋多糖固定化酿酒酵母的生理生化特性进行了研究, 将结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌株

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由成都啤酒厂提供, 保藏在麦芽汁琼脂斜面上。

### (二) 培养基和培养方法

1. 生长培养基(%): 葡萄糖 5, 酵母膏 0.35,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, pH5.5,  $1\text{kg}/\text{cm}^2$  灭菌 25 分钟。

2. 发酵培养基(%): 葡萄糖 15, 酵母膏 0.2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.15,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1, pH5.5,  $1\text{kg}/\text{cm}^2$  灭菌 25 分钟。

3. 酵母细胞的培养和收集: 见参考文献[1]。

献[1]。

### (三) 固定化细胞的制备

按参考文献[1]方法进行。

### (四) 固定化细胞的生长和发酵

按参考文献[1]方法。

### (五) 分析方法

1. 细胞生长测定: 用生理盐水洗出固定化制剂内酵母细胞, 稀释后与自然细胞一样, 用血球计数板在显微镜下直接计数, 算出每毫升固定化制剂的细胞数, 观察细胞出芽率, 用美蓝染色判别细胞的死活。

2. 还原糖浓度测定: 按 Miller<sup>[2]</sup> 改良的 3, 5-二硝基水杨酸比色法和裴林氏滴定法<sup>[3]</sup>。

3. 乙醇浓度测定: 用康氏微量扩散法<sup>[4]</sup>和蒸馏比色法<sup>[5]</sup>。

4. 细胞内 DNA 提取和分析: 参照参考文献[6]进行。待测细胞在生长培养基内增殖, 使细胞同步于静止期, 收集菌体, 蒸馏水洗涤后, 用  $0.5\text{mol}/\text{L}$  预冷的  $\text{HClO}_4$ ,

本文于 1990 年 6 月 14 日收到。

本项工作得国家科委“7·5”经费资助。

中国科学院成都职工大学学生蓝君、李力、李凯儒参加部分实验工作; 我所古明选同志提供文献资料。

洗一次, 把自然细胞和固定化细胞浓度都调整到  $2.0 \times 10^7$  个细胞/ml, 离心收集相同体积的菌体, 用  $0.5\text{mol/L HClO}_4$ , 在  $70^\circ\text{C}$  分别提取三次, 每次 15 分钟, 合并提取液, 稀释后在  $260\text{nm}$  处测定紫外吸收值, 按小牛胸腺 DNA (Sigma) 制作标准曲线计算 DNA 含量, 并计算出细胞 DNA 含量, 再由总的细胞数算出每个细胞 DNA 的近似值。

5. 细胞内蛋白质的提取与分析: 按上述方法收集菌体并把细胞浓度都调整到  $2.0 \times 10^7$  个细胞/ml, 取相同体积菌悬液, 按照 Stickland<sup>[7]</sup> 双缩脲方法直接提取和测定, 算出细胞蛋白质总量, 再由总细胞数算出每个细胞的蛋白质近似值。菌体含氮量、粗蛋白测定是把收集菌体干燥到恒重, 用 Kjeltec 1030 仪器自动测定。

6. 脱氢酶活力测定: (1) 乙醇脱氢酶提取和酶活力测定: 按前述方法收集和洗涤细胞, 加入  $0.06\text{mol/L KH}_2\text{PO}_4$  溶液, 调整细胞浓度为  $2.0 \times 10^7$  个细胞/ml, 冰浴下用超声击碎器处理 15 分钟, 在  $37^\circ\text{C}$  和  $25^\circ\text{C}$  相继提取 2 小时和 3 小时,  $13000\text{r/min}$  离心 15 分钟得清晰酶液。乙醇脱氢酶活力按 Racker<sup>[9]</sup> 方法, 用岛津 UV-260 双波长记录式可见紫外分光光度计在  $37^\circ\text{C}$  下测定。(2) 总脱氢酶活力测定: 按参考文献[10]的方法, 保温反应一定时间, 在  $90^\circ\text{C}$  水浴中用正丁醇提取后, 在  $500\text{nm}$  波长处测定吸收值, 比较自然细胞和固定化细胞的酶活力。

7. 细胞内聚多糖测定: 按参考文献[8]方法。

8. 固定化细胞扫描样品制备和观察: 试样制备按参考文献[11]的方法, 喷金后置 xyxy 型扫描电镜  $20\text{kV}$  下观察。

## 结果与讨论

### (一) 固定化酿酒酵母的生理特性

1. 固定化酿酒酵母细胞的生长: 酿酒酵母细胞固定到魔芋多糖载体后, 生长速度明显低于自然细胞(见图 1), 绝对值也略低于自然细胞。经光学显微镜进一步观察, 两者的细胞形态基本相同, 着色率一般在 3—5%。但统计结果表明, 固定化细胞出芽率为 18%, 明显低于自然细胞的出芽率(25%)。说明细胞被固定到载体后, 与细胞生长、分裂有关的某些酶活性受到了影响。

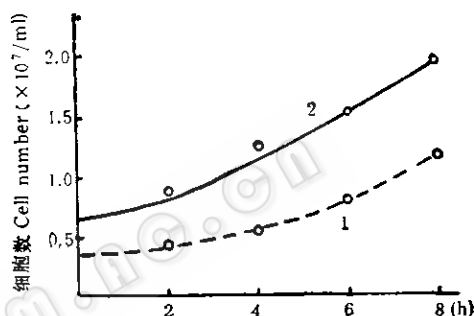


图 1 固定化对细胞生长的影响

Fig. 1 Growth of immobilized and free cells

1. 固定化细胞 Immobilized cells

2. 自然细胞 Free cells

2. 固定化细胞的糖代谢: 从图 2、3 看出, 酿酒酵母细胞固定化后, 其还原糖利用速度和乙醇生成速度比自然细胞分别提高了 28.1% 和 32.2%。曾有报道, 固定化

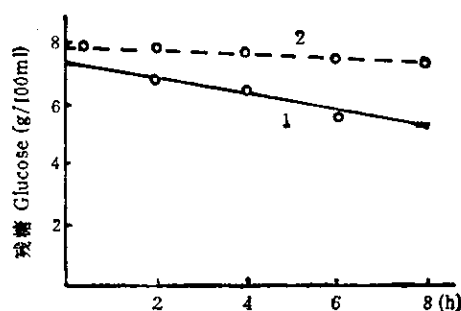


图 2 固定化细胞对还原糖的利用

Fig. 2 Glucose consume of immobilized and free cells

1. 固定化细胞 Immobilized cells

2. 自然细胞 Free cells

洗一次, 把自然细胞和固定化细胞浓度都调整到  $2.0 \times 10^7$  个细胞/ml, 离心收集相同体积的菌体, 用  $0.5\text{mol/L HClO}_4$ , 在  $70^\circ\text{C}$  分别提取三次, 每次 15 分钟, 合并提取液, 稀释后在  $260\text{nm}$  处测定紫外吸收值, 按小牛胸腺 DNA (Sigma) 制作标准曲线计算 DNA 含量, 并计算出细胞 DNA 含量, 再由总的细胞数算出每个细胞 DNA 的近似值。

5. 细胞内蛋白质的提取与分析: 按上述方法收集菌体并把细胞浓度都调整到  $2.0 \times 10^7$  个细胞/ml, 取相同体积菌悬液, 按照 Stickland<sup>[7]</sup> 双缩脲方法直接提取和测定, 算出细胞蛋白质总量, 再由总细胞数算出每个细胞的蛋白质近似值。菌体含氮量、粗蛋白测定是把收集菌体干燥到恒重, 用 Kjeltec 1030 仪器自动测定。

6. 脱氢酶活力测定: (1) 乙醇脱氢酶提取和酶活力测定: 按前述方法收集和洗涤细胞, 加入  $0.06\text{mol/L KH}_2\text{PO}_4$  溶液, 调整细胞浓度为  $2.0 \times 10^7$  个细胞/ml, 冰浴下用超声击碎器处理 15 分钟, 在  $37^\circ\text{C}$  和  $25^\circ\text{C}$  相继提取 2 小时和 3 小时,  $13000\text{r/min}$  离心 15 分钟得清晰酶液。乙醇脱氢酶活力按 Racker<sup>[9]</sup> 方法, 用岛津 UV-260 双波长记录式可见紫外分光光度计在  $37^\circ\text{C}$  下测定。(2) 总脱氢酶活力测定: 按参考文献[10]的方法, 保温反应一定时间, 在  $90^\circ\text{C}$  水浴中用正丁醇提取后, 在  $500\text{nm}$  波长处测定吸收值, 比较自然细胞和固定化细胞的酶活力。

7. 细胞内聚多糖测定: 按参考文献[8]方法。

8. 固定化细胞扫描样品制备和观察: 试样制备按参考文献[11]的方法, 喷金后置 xyxy 型扫描电镜  $20\text{kV}$  下观察。

## 结果与讨论

### (一) 固定化酿酒酵母的生理特性

1. 固定化酿酒酵母细胞的生长: 酿酒酵母细胞固定到魔芋多糖载体后, 生长速度明显低于自然细胞(见图 1), 绝对值也略低于自然细胞。经光学显微镜进一步观察, 两者的细胞形态基本相同, 着色率一般在 3—5%。但统计结果表明, 固定化细胞出芽率为 18%, 明显低于自然细胞的出芽率(25%)。说明细胞被固定到载体后, 与细胞生长、分裂有关的某些酶活性受到了影响。

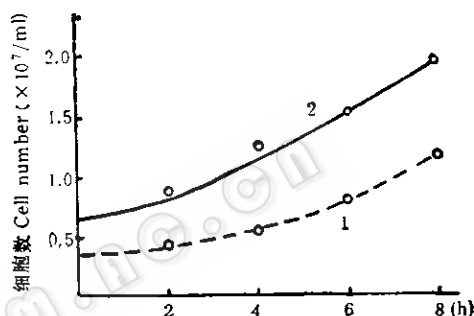


图 1 固定化对细胞生长的影响

Fig. 1 Growth of immobilized and free cells

1. 固定化细胞 Immobilized cells

2. 自然细胞 Free cells

2. 固定化细胞的糖代谢: 从图 2、3 看出, 酿酒酵母细胞固定化后, 其还原糖利用速度和乙醇生成速度比自然细胞分别提高了 28.1% 和 32.2%。曾有报道, 固定化

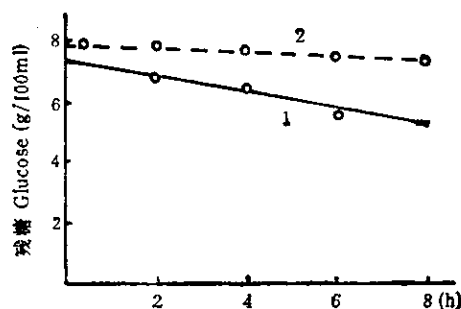


图 2 固定化细胞对还原糖的利用

Fig. 2 Glucose consume of immobilized and free cells

1. 固定化细胞 Immobilized cells

2. 自然细胞 Free cells

作用增加了反应介质中的固定化细胞密度或改善了固定化细胞的营养物质的供给,从而提高了固定化细胞对物质的消耗速度<sup>[12]</sup>。结合上文推测,固定化作用加速了细胞 EMP 代谢途径的某些或某种酶促反应。另外,在还原糖利用率相同情况下,

性

1. 固定化对酿酒酵母细胞内 DNA 含量的影响: Pauline 曾报道<sup>[12]</sup>, 吸附在琼脂上对数期的酿酒酵母细胞 DNA 含量比自然细胞高 3.8 倍。我们的试验结果也有类似的情形。由表 1 可以看出,在相同培养条件下,同步于静止期的固定化细胞内的 DNA 含量高于自然细胞,而且随着固定化细胞使用批次的增加,固定化细胞的 DNA 含量还有增加,这是前人未曾报道的结果,表明固定化作用对细胞的 DNA 可能有累积作用。

2. 固定化酿酒酵母细胞蛋白质含量分析: 由表 2 可以看出,在相同条件下,处于静止期固定化细胞所含氮量、粗蛋白量均比自然细胞约低 10%。不同方法固定化,其结果类似。此外,固定化酿酒酵母细胞经蛋白质提取,双缩脲方法测定的结果,也可进一步证实。这可能是由于固定化改变了细胞壁通透性的缘故,与菌龄和培养条件无关。

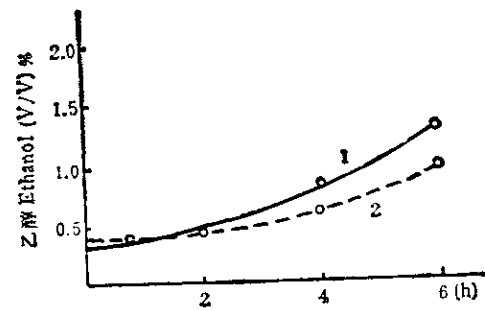


图3 固定化细胞和自然细胞的乙醇生成  
Fig. 3 Ethanol product of immobilized and free cells  
1.固定化细胞 Immobilized cells  
2.自然细胞 Free cells

固定化作用对乙醇生成量未构成明显的影响。

(二) 固定化酿酒酵母细胞的生化特

表 1 固定化对酵母细胞内 DNA 含量的影响  
Table 1 Effect of immobilization on cell DNA content

DNA (10 <sup>-10</sup> mg/细胞 cell)	自然细胞 Free cells	固定化细胞 Immobilized cells	
	第 3 批试验 3th runs	第 3 批试验 3th runs	第 49 批试验 49th runs
	0.99	3.50	18.70

表 2 固定化细胞和自然细胞的蛋白质含量  
Table 2 Protein content of immobilized and free cells

固定化方法 Methods of immobiliza- tion	自然细胞 Free cells			固定化细胞 Immobilized cells		
	N (%)	粗蛋白(%) Raw protein	蛋白质 Protein (mg/细胞 cell)	N (%)	粗蛋白(%) Raw protein	蛋白质 Protein (mg/细胞 cell)
KGM	8.605	54.07	6.009×10 <sup>-4</sup>	7.879	49.33	5.495×10 <sup>-4</sup>
Glatin*			33.6			21.8

\* 荧光强度<sup>[13]</sup>

3. 固定化酵母细胞内聚多糖测定: 固定化酿酒酵母细胞内聚多糖含量  $19.20 \text{ g}/10^{10}$  个细胞, 比自然细胞 ( $3.25 \text{ g}/10^{10}$  个细胞) 明显增多, 这可能是固定化影响固定化细胞环境溶氧的扩散, 改变细胞所处环境氧分压的结果, 作为能量贮藏形成聚多糖增多, 表明酿酒酵母细胞被固定后, 更趋于维持代谢的生理状态。

### (三) 固定化对细胞总脱氢酶和乙醇脱氢酶活力的影响

固定化细胞和自然细胞分别在  $37^\circ\text{C}$  保温 2 小时、4 小时和 6 小时观察, 前者溶液依次为浅微红、粉红、红色, 后者为粉红、红色、深红色, 表明在固定化细胞反应溶液中 TTC 还原速度明显低于自然细胞。定量分析结果表明, 固定化细胞的 TTC 还原速度约为自然细胞的 74%。由于 TTC 反应主要与细胞呼吸链起氧化还原反应, 因此可用其作为衡量细胞呼吸、细胞活性

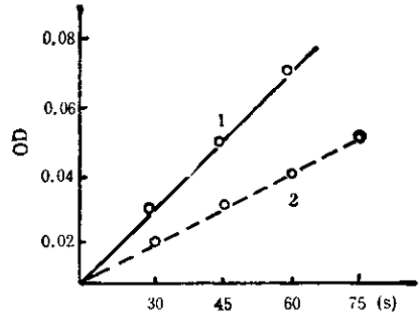


图 4 固定化细胞和自然细胞的乙醇脱氢酶活力  
Fig. 4 Ethanol DHase of immobilized and free cells

1. 固定化细胞 Immobilized cells
2. 自然细胞 Free cells

的依据。固定化细胞 TTC 还原速度减慢, 表明固定化细胞的活力受到了影响。从图 4 看出, 固定化对酵母细胞 EMP 糖代谢末端的乙醇脱氢酶无不良影响, 反而有活化作用。

### (四) 魔芋多糖固定化细胞扫描电镜观察

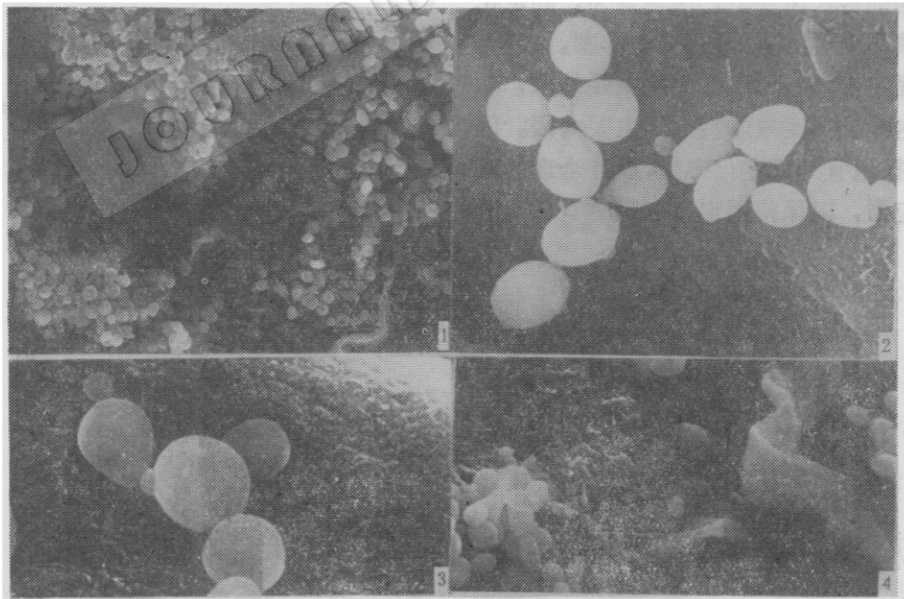


图 5 固定化细胞的扫描电镜照片

Fig. 5 Scanning electron micrographs of immobilized yeast cells

1. 载体内部固定化细胞 Immobilized cells inside the KGM ( $\times 400$ )
2. 固定化酵母的芽殖方式 Budding pattern of immobilized cells ( $\times 2000$ )
3. 靠近载体表面的子细胞 Daughter cell near the surface of KGM ( $\times 3000$ )
4. 远离载体表面的子细胞 Daughter cell far from the surface of KGM ( $\times 1000$ )

从图 5 看出,在固定化细胞中的一些细胞表面多处同时呈现似芽点的隆起。与自然细胞不同,固定化细胞形成的子细胞常常没有固定的部位。一些子细胞紧靠活化载体表面,脱离母细胞后会被吸附在载体上。另一些子细胞则远离活化载体的表面,这些子细胞一旦与母细胞分离,将会被释放入本体溶液中。

近年来微生物细胞固定化技术及其应用有了很大发展,但有关固定化细胞的生理生化的报道较少。本试验的魔芋多糖固定化酿酒酵母,其细胞活力、生长速度、生物量、出芽率明显低于自然细胞,而细胞内聚多糖含量、细胞对物质的消耗速度、乙醇生成速度、乙醇脱氢酶活力均高于自然细胞。细胞内 DNA 含量、细胞蛋白质含量都与自然细胞不同。说明固定化酿酒酵母细胞处在一种不同于自然细胞的维持代谢的生理状态。Mattason, B. 曾提出水活度变化的细胞代谢模型。作者认为,固定化及其微环境对物质传递、扩散抑制,可能是造成固定化细胞代谢变化的主要外因,而细胞内呼吸强度减弱则是其主要内因。因此,选择适宜的固定化方法,设计合理的细胞反应器,以保持固定化细胞具有较高的

呼吸活性,从而达到提高固定化细胞操作稳定性的目的。

## 参 考 文 献

- [1] 陈家任、贾成禹: 中国专利 891097104, 1989, 12, 30.
- [2] Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**: 426—428, 1959.
- [3] 中山大学生物系: 生物技术导论, 人民教育出版社, 北京, 第 22—25 页, 1978.
- [4] 楼纯菊: 微生物学通报, **11**(5): 235, 1984.
- [5] 天津轻工学院等: 工业发酵分析, 轻工业出版社, 北京, 第 64—66 页, 1978.
- [6] Ogur, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**: 178—184, 1952.
- [7] Stickland, L. H. et al.: *J. Gen. Microbial.*, **5**: 698, 1951.
- [8] 微生物研究法讨论会: 微生物实验法, 程光胜译, 科学出版社, 北京, 第 198—200 页, 1981.
- [9] Racker, E.: *Methods in Enzymology*, (ed. Colowick, S. P. et al.), Academic Press, Inc. New York and London, **1**: 500—502, 1952.
- [10] 第二军医大学电镜室等: 细胞超显微结构与功能, 上海科技出版社, 上海, 第 151—159 页, 1981.
- [11] Ghose, T. K. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **17**: 119—124, 1982.
- [12] Pauline, M. D. et al.: *ibid.*, **28**: 73—87, 1936.
- [13] Mattasson, B. et al.: *Eur. J. Microbial. Biotechnol.*, **16**: 52—59, 1982.

## STUDIED ON PHSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARA- CTERISTICS OF YEAST CELLS IMMOBILIZED WITH KGM

Chen Jiaren Jia Chengyu

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu)

The phsiological and biochemical propertics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on Konjac Glucomannan (KGM) were found to be different from those of the suspended yeast cells. In batch fermentation experiment it was shown that the rate of ethanol production and glucose consumption were 28.1% and 32.2% higher than the free cells. But their growth rate was reduced by

28.0%. Measurements of intracellular DNA, protein, polysaccharide and some enzymic activity of EMP metabolism pathway showed that the observed changes in the immobilized yeast cells have arisen.

### Key words

Konjac glucomannan; Immobilized yeast