

冷冻干燥条件下酿酒酵母细胞脂肪酸组成变化的研究*

陈声明 吕 琴 汪志平 贾小明 余晓宁

(浙江农业大学环境保护系 杭州 310029)

摘 要 以气相色谱法测定酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) F159 细胞膜类脂中脂肪酸的组成。结果表明,在低温干燥条件下,酿酒酵母细胞能自身调节脂肪酸的不饱和度,出现 $C_{16:1}$ 脂肪酸含量增加, $C_{16:0}$ 脂肪酸含量略有所增,而 $C_{18:0}$ 脂肪酸含量却有下降,不饱和和直链脂肪酸之和与饱和和直链脂肪酸之和的比值增加。说明这些变化使酿酒酵母细胞膜保持流动状态而维持细胞的稳定性和活性。初步探讨了冷冻干燥对酿酒酵母细胞脂肪酸组成的影响,为进一步探索和研究微生物抗冷冻干燥生理生化机制提供了依据。

关键词 酿酒酵母, 冷冻干燥, 脂肪酸

微生物细胞成分的分析在微生物研究中的重要性已逐步被人们所认识。脂肪酸是微生物细胞膜中含量丰富且稳定的一种化学组分,以细胞脂肪酸特征组分为依据的微生物气相色谱化学分类法进展十分迅速。1963年 Able 等首先提出气相色谱分析用于微生物的鉴定和分类^[1]。气相色谱分析比传统测定方法更为简便快捷。1986年 Kock 等提出脂肪酸图谱作为标准条件下酵母菌鉴定和分类的依据^[2],这种方法用于酵母菌类群的分类和鉴定越来越受到人们的重视。此外,还发现即使单株菌也有其特殊的脂肪酸图谱^[3]。

许多种类的微生物经过冷冻干燥处理后仍能保持活性,这与其自身的生理生化调节机制有关。其中微生物细胞膜类脂中的脂肪酸组成发生了改变^[4]。本文报道冷冻干燥后酿酒酵母细胞膜脂肪酸组成变化的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) F159 由浙江农业大学微生物教研室提供。

1.2 样品制备

酵母细胞在马铃薯蔗糖琼脂培养基上,30℃ 培养 3d,菌苔洗入 200ml (500ml 三角瓶) 马铃薯蔗糖液体培养基中,30℃ 140 r/min 摇床上振荡培养 50h 后,酿酒酵母达到对数生长末期(细胞数为 1.9×10^9 个/ml),3000r/min 离心 10min,收集菌体,再在

*本研究为中俄国际科技合作项目。

本文作者还有杜广晔。

本文于 1996 年 2 月 28 日收到。

56℃水浴中灭活后,置60℃恒温箱中过夜,4℃冰箱保存,得到冷冻干燥前的湿菌体(编号为 S_1)。

同样方法收集菌体后,加入20ml灭菌脱脂牛奶,-10℃预先冻结过夜,然后在ALPHA I-5型冷冻干燥机中-20℃冷冻干燥25h,真空度达0.05mPa,此时水分含量为1.5%(Karl Fischer方法测定)。蜡封口,4℃过夜。开封后,倒入20ml马铃薯蔗糖液体培养基中,80℃水浴2min。此时细胞活菌数为 2.08×10^6 个/ml,在3000 r/min下离心10 min,收集菌体,再于60℃恒温箱中过夜,4℃保存,得到冷冻干燥后的湿菌体(编号为 S_2)。

1.3 全细胞脂肪酸甲酯制备

精确称取湿菌体 S_1 、 S_2 各0.05g,放入10ml磨口玻璃试管中,加塞于100℃水浴30min。冷至室温后,加6mol/L盐酸50%甲醇溶液2ml,塞紧,80℃水浴10min。快速冷却后,加入1.25ml正丁烷与石油醚(V:V=1:1),去水相用3ml 1.2%NaOH溶液,洗有机浸出物,静置片刻,吸取2/3上层液体于小试管内待测,每次取样2 μ l进行气相色谱分析。

标准脂肪酸甲酯试剂:配制1 μ g/ml C_{160} , C_{161} , C_{181} 直链饱和与直链不饱和脂肪酸甲酯(SIGMA)己烷液。

1.4 气相色谱工作条件

气相色谱仪为日本岛津GC-9A型,配有C-R3A型微机和双氢焰检测器(FID)。色谱柱为2m \times 3mm玻璃柱(10%DEGS固定液,载体为WAW-DMCS 80~100目)。柱温200℃,汽化室280℃。载气(高纯氮)有氮气₁ 100ml/min和氮气₂ 50ml/min,空气0.55kg/cm²,氢气₁为0.75kg/cm²,氢气₂为0.75kg/cm²。

2 结果和讨论

2.1 样品预处理与脂肪酸的提取

目前用于色谱分析预处理的反应试管有两种:一种是带有聚四氟乙烯帽的玻璃试管;另一种是熔封玻璃安瓿管。前者可能混有杂质,后者手续繁杂,速度慢。作者对反应试管进行改良,采用带塞玻璃磨口试管,这样既不会将任何杂质带入反应液内,又不必熔封试管口,操作简便。

1986年Kock等人提出酵母细胞脂肪酸提取的一种标准方法^[5]。作者所采用的方法却是与细菌细胞脂肪酸提取类似的另一种方法。由于目前尚无统一的微生物细胞脂肪酸分析程序,而且某些细胞脂肪酸还存有取代基,至今没有找到一种对样品进行预处理的通用方法,如细胞的水解,常用碱性水解或酸性水解法,作者则采用碱性水解法,此法适用于酵母细胞的水解,而且试剂来源也较容易。细胞样品的用量与所用色谱仪的性能有关,实际上目前只对分离较好、含量较高的成分进行鉴别^[6]。因此,对于样品的预处理、脂肪的提取及分析尚有待进一步研究。

2.2 酿酒酵母细胞脂肪酸图谱

本实验条件下,可得到几种脂肪酸色谱峰,用[直链不饱和脂肪酸棕榈油酸(C_{161})和油酸(C_{181})及直链饱和脂肪酸硬脂酸(C_{160})]三种脂肪酸甲酯作为内标物,与样品液混



图1 酿酒酵母细胞长链脂肪酸气相色谱分析
Fig. 1 Gas chromatographic analysis of long chain fatty acids of *Saccharomyces cerevisiae* cells

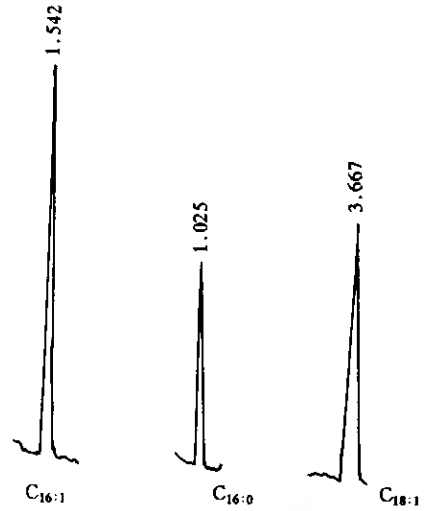


图2 标准脂肪酸样品的气相色谱图
Fig. 2 Gas chromatograms of standard fatty acid sample

合同时进行共色谱分析,并在色谱图中标识出脂肪甲酯的位置(图1)。同时,以标准脂肪酸甲酯作外标定性(图2),将各脂肪酸甲酯的色谱峰的出峰保留时间(RT)(保留时间是指打入样品2min后开始的相对时间)及微机处理采用面积归一化法打印出峰面积和相对百分含量(图3、表1和表2),并以标准脂肪酸甲酯为外标作标准曲线,从而得到色谱峰的绝对含量。

1991年 Bendova 等人^[7]对20株酿酒酵母菌株的脂肪酸组成进行了分析,发现不同菌株其脂肪酸图谱也不同,但大多数以不饱和直链脂肪酸棕榈油酸(C_{16})和油酸($C_{18:1}$)的含量居多。因此,本研究所显示出的酿酒酵母脂肪酸图谱是可信的。

2.3 冷冻干燥对酿酒酵母细胞膜脂肪酸组成的影响

试验结果可以看出,供试酿酒酵母菌株以 $C_{16:1}$ 脂肪酸含量最高(59.6%),

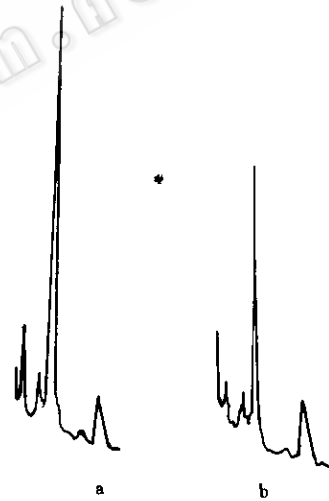


图3 酿酒酵母脂肪酸组成的气相色谱图
a. 冷冻干燥前细胞脂肪酸组成(S_1)的气相色谱图;
b. 冷冻干燥后细胞脂肪酸组成(S_2)的气相色谱图。
Fig. 3 Gas chromatograms of *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid composition
a. Gas chromatograms of the cellular fatty acid composition before lyophilization (S_1);
b. Gas chromatograms of the cellular fatty acid composition after lyophilization (S_2).

表1 S₁处理的脂肪酸分析结果Table 1 Results of fatty acid analysis of S₁ treatment

号码 Numbers	保留时间 <i>t</i> / min	峰面积 Area / mm ²	相对含量 Pre cent / (%)
1	0.3	22972	9.0103
2	0.998	17422	6.8336
3	1.205	4178	1.6389
4	1.217	168244	65.9912
5	2.918	6450	2.5301
6	3.622	35683	13.996

表2 S₂处理的脂肪酸分析结果Table 2 Results of fatty acid analysis of S₂ treatment

号码 Numbers	保留时间 <i>t</i> / min	峰面积 Area / mm ²	相对含量 Per cent / (%)
1	0.325	101987	5.8983
2	1.02	11879	6.871
3	1.545	103196	59.6914
4	2.945	4856	2.8087
5	3.65	42755	24.7306

表3 冷冻干燥对细胞脂肪酸组成的影响

Table 3 Effects of lyophilization on cellular fatty acid composition

	冷冻干燥之前(S ₁) Before lyophilization				冷冻干燥之后(S ₂) After lyophilization			
	峰面积 Area / mm ²	相对含量 Per cent / (%)	峰高 High / mm ²	绝对含量 Content / μg	峰面积 Area / mm ²	相对含量 Pre cent / (%)	峰高 High / mm	绝对含量 Content / μg
C ₁₆₀	11879	6.8710	4.8	0.0012	17422	6.8336	5.5	0.0013
C ₁₆₁	103196	59.6914	33.4	0.0120	168244	65.9912	51.6	0.0185
C _{18:1}	42755	24.7306	7.8	0.0035	35683	13.9960	6.0	0.0028

C_{18:1} 脂肪酸含量次之(24.73%), C₁₆₀ 脂肪酸含量再次之(6.9%)。经冷冻干燥处理后, C₁₆₁ 脂肪酸百分含量明显增加(66.0%), C₁₆₀ 脂肪酸百分含量略有增加, 而 C_{18:1} 脂

肪酸百分含量则略有下降(表 3)。但最终结果显示出: 不饱和直链脂肪酸组分之和(即棕榈油酸 $C_{16:1}$ 和油酸 $C_{18:1}$ 之和)与饱和直链脂肪酸的绝对含量之比, 在冷冻干燥后变化很大, 由冷冻干燥之前的 12.3 增加到冷冻干燥后的 16.5(表 4)。 $C_{16:1}$ 脂肪酸的相对百分含量在冷冻干燥后有较大增加, 由 56.69% 增加到 65.99%。

表 4 冷冻干燥对不饱和直链脂肪酸($C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$)与饱和脂肪酸($C_{16:0}$)的比值影响

Table 4 Effects of lyophilization on the ratio of total unsaturated straight-chain fatty acid to total saturated straight-chain fatty acid

	S_1	S_2
$C_{16:0}$ (μg)	0.0012	0.0013
$C_{16:0}+C_{18:0}$ (μg)	0.0155	0.0213
$C_{16:0}+C_{18:0} / C_{16:0}$	12.3	16.5

外界环境发生变化, 微生物细胞膜首先受到冲击^[8], 因此可以推测, 细胞对冷冻干燥的反应可通过测定膜性质的变化而得知。膜液晶态和结晶态的转变温度取决于脂肪酸的组成, 特别是不饱和程度。脂肪酸的不饱和度越高, 其相应的转变温度越低。生物活体能在适宜生长温度时, 以调节膜类脂的不饱和度, 使膜为流体状态。而膜只有处于充分的液态时, 才能出现膜的合成、膜跨膜的运输, 被膜束缚的酶才有活力。

通过以上研究, 初步探讨了冷冻干燥对酵母细胞膜类脂中脂肪酸组成的影响, 而对脂肪酸合成代谢及其酶调节作用有待进一步研究, 以便为进一步阐明微生物抗冷冻干燥的生理生化机制提供依据。

参 考 文 献

- [1] Abel K, Schmertzing H, Peterson J I. *J Bacteriol*, 85: 1039 ~ 1044.
- [2] Contrell M, Viljoen B C, Kock J L F et al. *J Gen Microbiol*, 1986, 132: 2401 ~ 2403.
- [3] Augustyn O P H, Kock J L F, Ferreira D. *Syst Appl Microbiol*, 1990, 13: 40 ~ 55.
- [4] Russel N J. *Chem Technol and Biotechnol*, 1988, 42(4): 312.
- [5] Kock J L F. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, 23: 499 ~ 501.
- [6] 周 方, 朱厚础, 唐光江, 等. 微生物学报, 1987, 27(2): 95 ~ 104.
- [7] Bendova O, Richter V, Janderova B et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 35: 810 ~ 812.
- [8] 李钟庆编著. 微生物菌种保藏技术. 北京: 科学出版社, 1989.

STUDY OF CHANGE ON CELLULAR FATTY ACID COMPOSITION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UNDER LYOPHILIZATION CONDITIONS

Chen Shengming Lu Qin Wang Zhiping Jia Xiaoming Yu Xiaoning

(Department of Environment Science, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract The determination to lipid fatty acid composition in cellular membrane of *Saccharomyces cerevisiae* by means of gas chromatography (GC) was discussed. The results show that the cells of *S. cerevisiae* can themselves adjust unsaturability for fatty acids under lyophilization conditions. It occurred that $C_{16:1}$ fatty acid increased, $C_{16:0}$ fatty acid slightly increased while $C_{18:1}$ fatty acid decreased; the ratio of total unsaturated straight-chain fatty acid to total saturated straight-chain fatty acid increased. All the changes concerned keep the mobility, stability and activity of cellular membrane of *S. cerevisiae*. The research initia-tively approached the freezing and drying effect on the cellular fatty acid of *S. cerevisiae*, and provided the basis for further exploration and research on the anti-freezing and anti-drying mechanism physiologically and biochemically.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Lyophilization, Fatty acid