

文章编号:1673-1689(2006)03-0063-04

离子对啤酒酵母代谢产酸的影响

孙付保^{1,2}, 任洪艳^{1,2}, 赵长新¹

(1. 大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 中科院过程工程研究所 生物化工国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 在离子型培养基中分别添加 6.804, 13.610, 27.216 g/L 的 KH_2PO_4 以及 66.39, 138.75, 277.4 mg/L 的 CaCl_2 , 对通风发酵过程中的不同 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度影响啤酒酵母代谢产 6 种有机酸含量的动态变化进行了跟踪检测。研究结果表明, K^+ 、 Ca^{2+} 可能通过作用于酵母细胞膜上的膜蛋白或调控生理代谢网络中代谢流相关的酶, 从而使不同的 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度影响啤酒酵母响应产酸的峰值和峰值响应时间; 在通风发酵过程中, 啤酒酵母代谢产乳酸较多(多达 8.3 mg/mL), 产琥珀酸较少(不超过 250 $\mu\text{g/mL}$); 发酵终点时, 随 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度增大, 啤酒酵母代谢产酒石酸和琥珀酸等含量减少。

关键词: K^+ ; Ca^{2+} ; 离子; 啤酒酵母; 有机酸; 代谢

中图分类号: TQ 920.4

文献标识码: A

Ion Influence on Organic Acid Metabolized by Beer Yeast

SUN Fu-bao^{1,2}, REN Hong-yan^{1,2}, ZHAO Chang-xin¹

(1. College of Bio & Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China; 2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: In the beer yeast culture when adding KH_2PO_4 at the levels of 6.804, 13.610, 27.216 g/L and CaCl_2 the levels of at 66.39, 138.75, 277.4 mg/L, the dynamic changes of six organic acids produced were determined and analyzed. The result showed that K^+ and Ca^{2+} might functionally modify and regulate the protein in the yeast cell membrane and the enzyme involved with metabolic flux in the metabolic network. As a result, different K^+ and Ca^{2+} concentrations influenced the acids peak area and relevant retention time. In the aerobic fermentation, lactic acid accumulated severely (up to 8.3 mg/mL), whereas very little amber acid was produced (no more than 250 $\mu\text{g/mL}$). The final tartaric acid and amber acid decreased with the increase of K^+ and Ca^{2+} concentrations.

Key words: K^+ ; Ca^{2+} ; ion; beer yeast; organic acid; metabolism

啤酒种类和风味的差异性,很大程度上与原料、酿造条件和酿造用水等因素有关,这实际上与

收稿日期:2005-03-11; 修回日期:2005-05-25.

基金项目:辽宁省教育厅高校科研基金项目(2020701093).

作者简介:孙付保(1975-),男,河南南阳人,发酵工程博士研究生.

培养时各种无机离子种类和数量的微观差异性密切相关。发酵过程要做到能保持某些条件不变,才能研究单一组分改变对细胞功能的影响^[1]。因此通过改变培养基中的离子浓度来判断某一代谢中间物是否参与代谢甚或影响细胞生理,而这已成为代谢控制分析的主要内容,胞内代谢物水平的信息是描述细胞代谢控制的依据^[2]。在国内开展了很多金属离子影响酵母生长繁殖及其代谢产物方面的研究^[3-6],但金属离子影响啤酒酵母代谢产酸方面未曾见报道。鉴于此,在已经开展的金属离子对啤酒酵母代谢双乙酰研究^[7]的基础上,作者以营养环境中含量较高的 K^+ 、 Ca^{2+} 为切入点,应用高效液相色谱(HPLC)技术,对通风条件下离子影响啤酒酵母产柠檬酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸、乙酸和乳酸等的动态变化进行了分析研究,以期探讨啤酒酵母细胞的代谢产酸规律。

1 材料与方法

1.1 试验材料

- 1.1.1 菌种 啤酒酵母由大连华润啤酒厂提供。
- 1.1.2 主要培养基 发酵培养基:蔗糖 100 g,蛋白胨 10 g, $NH_4H_2PO_4$ 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 492 mg, Na_2HPO_4 895.4 mg, $CaCl_2$ 277.4 mg,加去离子水 1 000 mL, KH_2PO_4 和 $CaCl_2$ 含量见表 1。

表 1 培养基中两种离子的质量浓度

Tab.1 Content of two ions in the culture

样品	KH_2PO_4 质量浓度/(g/L)	$CaCl_2$ 质量浓度/(mg/L)
①号	6.804	277.4
②号	13.610	277.4
③号	27.216	277.4
④号	13.610	66.39
⑤号	13.610	138.75

- 1.1.3 仪器设备 超高速冷冻离心机(B-22M), Thermo IEC 公司制造;台式微波炉(National-NN-K580MFS),上海松下微波炉有限公司制造;0.22 μm 针筒式水膜过滤器,大连依利特公司制造;高效液相色谱仪(日本 Jasco 公司制造), μ Bondapak C_{18} 柱(日本 Jasco 公司制造);10 $\mu m \times 3.9 mm \times 300 mm$;预分离柱: C_{18} 填料, Sep-Pak C_{18} (国产 S-P 柱);流动相:0.01 mol/L KH_2PO_3 水溶液, pH 2.65(磷酸调节),用 0.45 μm 孔径的合成纤维素酯滤膜进行真空超滤,超声波脱气 20 min。

标准有机酸溶液采用超纯水配制,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用。标准有机酸:酒石酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、乙酸和乳酸(色谱纯或分析

纯);超纯水;娃哈哈纯净水经 0.45 μm 孔径的合成纤维素酯滤膜进行真空超滤。

1.2 实验方法

- 1.2.1 菌体培养 见文献[8]。
- 1.2.2 还原糖的测定 培养基配比时葡萄糖含量较高,定期测还原糖时稀释 100 倍,用二硝基苯酚(DNS)法进行测定^[9]。
- 1.2.3 发酵液预处理 取 20 mL 发酵液,于 5 $^{\circ}C$ 18 000 r/min 超高速冷冻离心 10 min。上清液存样以用来测定发酵液中的有机酸。
- 1.2.4 高效液相色谱法(HPLC)对有机酸的测定 色谱条件为流速 0.7 mL/min;监测器波长 215 nm;柱压 100 KPa;柱温为室温;灵敏度 0.04;进样量 20 μL /次。

经上述 18 000 r/min 离心 10 min 后的发酵液,用一次性无菌注射器(2 mL)配合 0.22 μm 的针筒式水膜过滤器直接进样检测^[10]。

2 结果与分析

- 2.1 不同 K^+ 离子浓度对 6 种有机酸代谢的影响 在不同 K^+ 离子浓度的培养基中,用 HPLC 法对发酵液中的 6 种有机酸含量变化进行 8 次跟踪监测,结果见图 1~图 3 和表 2。

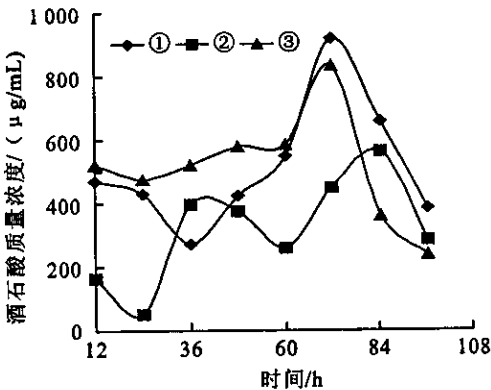


图 1 不同 K^+ 浓度影响酒石酸的变化

Fig. 1 Influence of different K^+ on tararic acid change

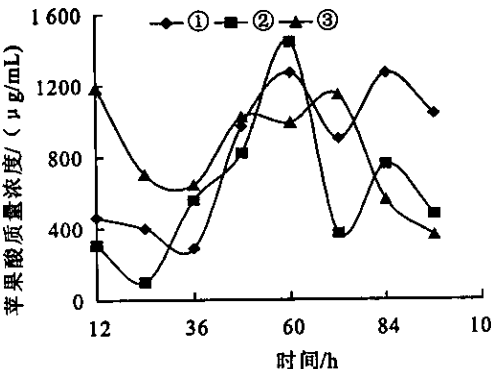


图 2 不同 K^+ 浓度影响苹果酸的变化

Fig. 2 Influence of different K^+ on malic acid change

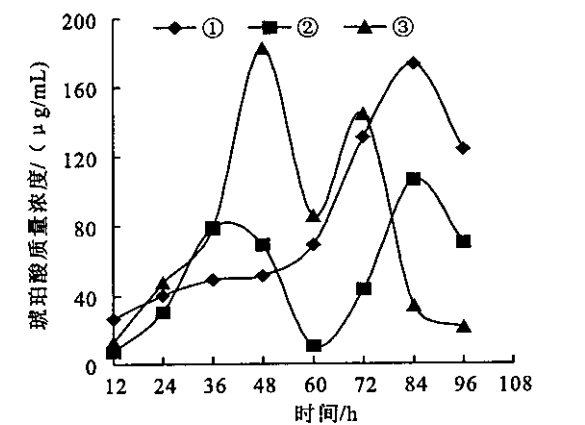


图 3 不同 K⁺ 浓度影响琥珀酸的变化

Fig. 3 Influence of different K⁺ on amber acid change

表 2 其余 3 种有机酸含量的部分数据

Tab. 2 Content of other three orgainc acids

培养 时间/ h	柠檬酸质量 浓度/(μg/mL)			乳酸质量浓度/ (mg/mL)		冰乙酸质量 浓度/(μg/mL)	
	②	③	⑤	③	⑤	④	⑤
12	17.5	544.3	170.6	5.8	3.3	498.7	694.9
24	27.8	481.9	264.2	5.2	4.3	330.2	868.8
36	47.2	114.4	146.9	6.8	5.2	304.4	752.4
48	69.6	198.1	17.1	7.4	2.9	261.2	671.1
60	24.9	407.5	341.4	8.3	3.7	123.0	未检出
72	198.7	365.8	201.6	7.9	3.3	未检出	未检出
84	304.4	137.4	134.4	3.2	1.2	未检出	未检出
96	54.6	65.6	85.7	1.1	1.3	未检出	未检出

从图 1~3 可以看出, K⁺ 影响发酵液中酒石酸、苹果酸、琥珀酸含量变化, K⁺ 浓度影响了各种机酸代谢动态变化的峰值和峰值时间。发酵后期(84~96 h)发酵液中 3 种有机酸含量均下降, 且随着 3 种离子型培养基中 K⁺ 浓度的增大, 每种酸含量下降加快; 到发酵终点(96 h)时, K⁺ 离子浓度越大, 发酵终点时有机酸的含量越低。这表明, K⁺ 在一定的浓度范围能刺激酵母生理代谢产酸, 结合赵长新等人^[11]研究的啤酒酵母发酵过程离子含量动态变化结果, 有机酸动态变化很可能是离子流的综合性响应结果, 最终导致离子影响了酵母生理代谢的代谢通量。

2.2 不同 Ca²⁺ 浓度对有机酸代谢的影响

对于通风发酵的 3 个不同 Ca²⁺ 浓度的培养基, 用 HPLC 色谱技术对 6 种有机酸的含量变化进行了 8 次的定性定量跟踪监测, 结果见图 4~图 6。不同的 Ca²⁺ 浓度同样影响 3 种有机酸代谢的峰值和峰值时间。从发酵结束时看, 随着 Ca²⁺ 浓度增加,

酒石酸、琥珀酸含量减少, 表明在一定的浓度范围内, 发酵后期 Ca²⁺ 浓度增加有利于酵母细胞对酒石酸和琥珀酸作为含碳代谢物质的吸收利用。Ca²⁺ 对苹果酸的影响与酒石酸、琥珀酸略有不同。结合表 2 可以看出: 通风发酵结束时, 发酵液中的有机酸以乳酸含量最高, 苹果酸次之, 琥珀酸含量较少, 柠檬酸极少甚至没有, 而乙酸不存在(未检出)

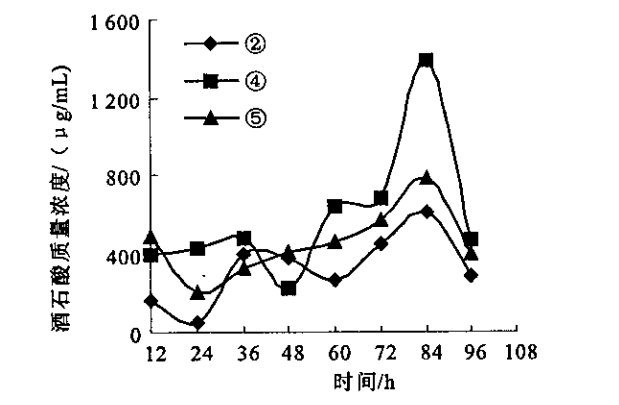


图 4 不同 Ca²⁺ 浓度影响酒石酸的变化

Fig. 4 Influence of different Ca²⁺ on tartaric acid change

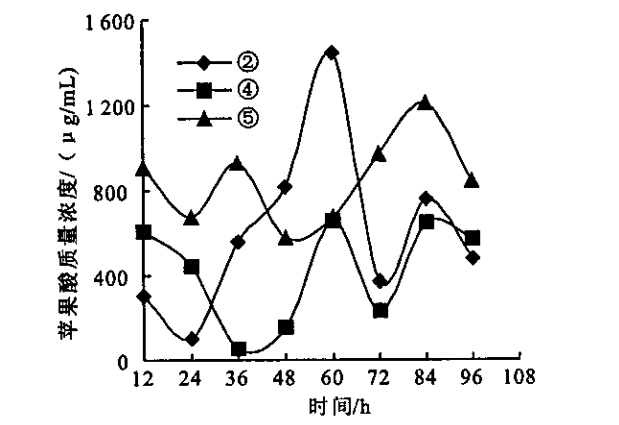


图 5 不同 Ca²⁺ 浓度影响苹果酸的变化

Fig. 5 Influence of different Ca²⁺ on malic acid change

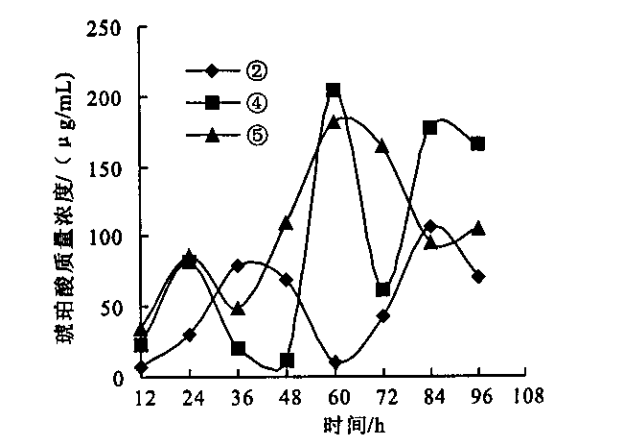


图 6 不同 Ca²⁺ 浓度影响琥珀酸的变化

Fig. 6 Influence of different Ca²⁺ on amber acid change

在酵母细胞胞内, K^+ 和 Ca^{2+} 作为激活剂以及辅酶或辅基, 积极参与许多有机酸的代谢。另外, 酵母作为真核细胞, 细胞膜上存在大量的膜转运蛋白(离子载体)和通道蛋白, 其中包括 K^+ 、 Ca^{2+} 等离子通道以及可能的钙激活钾通道(K_{Ca})等。 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 跨膜运送过程属于主动运输, 这些离子也可能与其它离子, 比如 H^+ 、 Cl^- 和有机酸根离子等共同通过膜蛋白, 比如柠檬酸的跨膜运输就是由渗透性的 $Citrate^{3-}$ 形式通过载体柠檬酸结合蛋白 $H_2citrate^-$ 或 $Mg-citrat^-$ 等来实现的^[12, 13]。根据它们跨膜方式不同, 可分为单向(unisport)运送和协同(cotransport)运送——同向(symport)和反向(antiport)运送。因而在细胞膜区域, 不同的 K^+ 浓度很可能通过影响与有机酸的交换或协同频率实现功能。

参考文献：

[1] Ostergaard S, Olsson L, Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **MicrobiolMol BiolRev**, 2000, 64(1): 34—42.

[2] Stephanopoulos G, Aristodou A, Nielsen J. Metabolic Engineering[M]. San Diego: Academic Press, 1998.

[3] 蒋爱芹, 陆玲, 张超英, 等. 酿酒酵母细胞增殖对 Ca^{2+} 需求的新证据[J]. 菌物系统, 2003, 22(1): 128—134.

[4] 袁生, 鲁仲谋, 尹丽红. 酿酒酵母和栗酒裂殖酵母细胞增殖对 Ca^{2+} 依赖性的比较研究[J]. 实验生物学报, 1999, 32(1): 39—45.

[5] 张建民 王转斌. 重金属离子对酵母影响的研究[J]. 微生物学通报, 1999, 26 (1): 18—20.

[6] 李俊林, 刘东亚. 麦汁中锌离子的控制与测定[J]. 酿酒, 2002, 4(29): 43—44.

[7] 孙付保, 赵长新, 张春玲. 金属离子对双乙酰代谢影响的初步研究[J]. 酿酒, 2004, 2(31): 51—53.

[8] 孙付保, 赵长新, 任洪艳, 等. 啤酒酵母发酵产有机酸的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 51—54.

[9] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 22.

[10] 王世崇, 赵长新, 孙付保, 等. MS-HPLC 法检测啤酒酵母胞内代谢有机酸的变化[J]. 酿酒, 2005, 32(2): 44—46.

[11] 赵长新, 孙付保, 窦少华, 等. 啤酒酵母发酵过程中钠、钾、镁、钙等离子含量变化的检测[J]. 分析测试学报, 2004, 3(23): 103—105.

[12] Rentsch D, Maritinoia E. Citrate transport into Barley mesophyll vacuoles-comparison with malate-uptake activity [J]. **Planta**, 1991, 184: 532—537.

[13] Oleski N, Mahdavi P, Bennett A B. Transport properties of the tomato fruit tonoplast. II Citrat transport[J]. **Plant physiol**, 1987, 84: 997—1000.

(责任编辑: 李春丽)

3 结 论

离子型培养基在通风发酵过程中, K^+ 、 Ca^{2+} 可通过作用于酵母细胞膜上的膜蛋白(载体蛋白和通道蛋白)或调控生理代谢网络中代谢流相关的酶, 从而使不同的 K^+ 、 Ca^{2+} 浓度不仅影响啤酒酵母代谢产酸动态变化的峰值, 而且影响峰值的产生时间。

啤酒酵母代谢产乳酸较多(多达 8.3 mg/mL), 产琥珀酸较少(不超过 250 μ g/mL)。发酵终点时, 在 6.804~27.216 g/L 内, 随着 K^+ 浓度增大, 啤酒酵母代谢产酒石酸、苹果酸和琥珀酸含量减少; Ca^{2+} 在 66.39~277.4 mg/L 时, 随 Ca^{2+} 增加, 啤酒酵母产酒石酸和琥珀酸减少。