

文章编号:1673-1689(2009)03-0356-05

耐高渗酿酒酵母的代谢流分析

李晓军, 徐鹏, 栾静, 苗君, 赵长新*

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 研究了指数生长期的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在高渗胁迫下的生理代谢。甘油和海藻糖是酿酒酵母的主要相容性溶质。在高渗环境下, 胞外酒精质量浓度、甘油质量浓度、海藻糖质量浓度分别较对照提高 100%、400% 和 11%。代谢流分析表明, 高渗环境下, 从节点 6-磷酸葡萄糖合成海藻糖的碳流较常规培养增加了 47.3%; 从节点磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛合成甘油的碳流增加了 55.7%; 从节点丙酮酸流向乙醇的碳流增加了 300%, 而流向三羧酸 (TCA) 循环的流量减少了 21.7%。

关键词: 酿酒酵母; 高渗胁迫; 甘油; 海藻糖; 代谢流分析

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

The Metabolic Flux Analysis of the Osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*

LI Xiao-Jun, XU Peng, LUAN Jing, MIAO Jun, ZHAO Chang-Xin*

(College of Biology and Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: The physiological metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under high osmotic stress was studied. Glycerol and trehalose are the primary compatible solutes in *S. cerevisiae*. Under high osmotic stress, the content of ethanol, glycerol and trehalose was increased by 100%, 400% and 11%, respectively, as compared with that of the control. Furthermore, the metabolic flux analysis indicated that the carbon flux for trehalose synthesis at glucose-6-phosphate node increased by 47.3% under hyperosmotic stress. The carbon flux for glycerol synthesis at dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) node also increased 55.7%. The carbon flux for ethanol synthesis at pyruvate node increased by 300%, while the carbon flux channeled into TCA cycle decreased by 21.7%.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, osmotic stress, glycerol, trehalose, metabolic flux analysis

浓醪发酵是利用耐高渗酵母在较高的底物浓度下进行的发酵。高浓度发酵具有许多优点,例

如:提高设备利用率;增加产物生产强度;减少热能和水的消耗;降低生产成本等^[1]。鉴于此,浓醪发

收稿日期:2008-06-05

基金项目:国家“十一五”科技支撑项目(2007BAK36B01)。

* 通讯作者: 赵长新(1955-),男,教授,硕士生导师,主要从事发酵工程的研究。Email:zhaochangxin@126.com。

酵已成为发酵界和工业微生物界研究的热点。近年来,人们通过代谢工程方法改变细胞内部的代谢流分布,使底物更有效地转化为产物。代谢流分析(Metabolic flux analysis, MFA)^[2]是代谢工程中用以指导遗传操作的重要手段,是代谢网络分析的基本方法。作者考察了一株耐高渗酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在由高浓度糖所形成的高渗透压(简称高渗)环境下的生理特性,并对其高渗透压胁迫下的代谢流进行了分析,这对进一步研究耐高渗酵母耐高渗机理提供了有益的参考,同时也为耐高渗酵母的遗传操作和发酵控制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) FCC2146。由大连工业大学食品发酵菌种保藏所提供。

1.1.2 培养基

斜面培养基:葡萄糖 1 g/dL,酵母膏 1 g/dL,碳酸钙 1.5 g/dL,琼脂 2.0 g/dL。

种子培养基:葡萄糖 2 g/dL,蛋白胨 2 g/dL,酵母膏 2 g/dL。

高渗发酵培养基:葡萄糖 30 g/dL,蛋白胨 1 g/dL,酵母膏 1 g/dL。

普通发酵培养基:葡萄糖 10 g/dL,蛋白胨 1 g/dL,酵母膏 1 g/dL。

培养基 pH 均为 5.4~5.6,121 °C 高压蒸汽灭菌 20~30 min。

1.1.3 乳酸标准溶液 乳酸标准溶液采用超纯水配制,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用;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 培养条件 斜面接种后 30 °C 培养 3 d,接入种子培养基,30 °C、120 r/min 振荡培养 12 h,制备处于指数生长期的细胞悬浊液。种子培养基在 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min。洗涤一次后以 1% 接种量(体积分数)接入高渗发酵培养基和普通发酵培养基中,30 °C、120 r/min 在往复振荡摇床培养。定时无菌操作移取发酵液用于分析。

1.2.2 细胞干重的测定 取 10 mL 发酵液,4 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,洗涤两次后在 80 °C 烘干至恒重,用电子天平称重,计算得出每升发酵液中细胞的干重。

万方数据

1.2.3 酒精的测定 利用气相色谱仪(GC122型,上海分析仪器厂制)测定发酵液的酒精含量^[3]。

1.2.4 还原糖的测定 利用 3,5-二硝基水杨酸法测定发酵液中的还原糖^[4]。

1.2.5 甘油的测定 利用比色法测定发酵液的甘油含量^[5]。

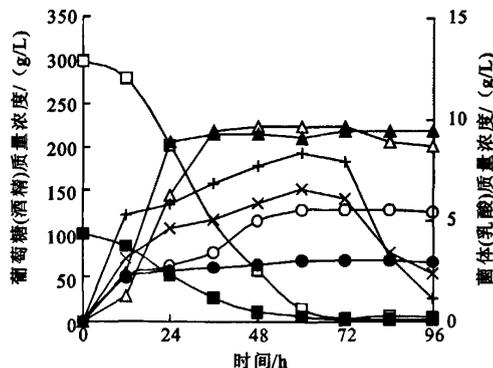
1.2.6 胞内海藻糖的测定 利用蒽酮-硫酸法测定酵母中海藻糖的含量^[6]。

1.2.7 乳酸的测定 使用高效液相色谱仪(Jasco,日产)测定。流动相:0.1 mol/L KH₂PO₄ 缓冲溶液(磷酸调节 pH 至 2.9);体积流量 0.8 mL/min;柱温 25 °C;检测器波长 215 nm;进样量 20 μL/次。发酵液 5 °C、18 000 r/min 离心 10 min 后,用一次性无菌注射器(2 mL 容积)配合 0.22 μm 的针筒式水膜过滤器直接进样检测。

2 结果与讨论

2.1 高渗胁迫下酿酒酵母的代谢特性

指数生长期的细胞对高渗环境最为敏感,将处在指数生长期的种子液接入高渗发酵培养基和普通发酵培养基中。细胞生长、底物消耗及产物生成情况如图 1、2 和图 3 所示。



高渗培养: □ 葡萄糖; △ 菌体干重; × 乳酸; ○ 酒精
常规培养: ■ 葡萄糖; ▲ 菌体干重; + 乳酸; ● 酒精

图1 高渗培养和常规培养细胞生长、底物消耗,酒精、乳酸合成

Fig. 1 Biomass, glucose consumption, ethanol and lactic acid synthesis of *S. cerevisiae* under osmotic and normal conditions

由图 1 可知,高渗培养基和普通培养基中的细胞生长没有显著差异,这说明指数生长期的细胞能较好地抵御渗透压胁迫。细胞的葡萄糖消耗速率在高渗培养基中有所减慢,普通培养基中细胞在 72 h 糖已耗完,而高渗培养基中糖耗延迟至 84 h。普通培养基中酒精质量浓度在 60 h 达到 69.3 g/L,

随后酒精含量基本稳定。而高渗培养基中的酒精在72 h达到最高值127.8 g/L,是普通培养基酒精质量浓度的2倍。在高渗条件下乳酸的合成明显受到抑制,最大值由普通培养的8.3 g/L降为高渗时的6.5 g/L。

图2是海藻糖合成情况。海藻糖在高渗培养条件下,早期含量较普通培养基有所偏低,但在发酵40 h以后海藻糖含量一直维持较高水平。高渗培养时海藻糖质量分数最高达细胞干重的13.8%,而普通培养时的则为12.4%。海藻糖是一种典型的应激性代谢物,在高渗胁迫环境下对细胞的生物膜、蛋白质和核酸等大分子具有良好的保护作用^[7]。

图3是甘油的合成情况。甘油合成在高渗培养中明显高于普通培养,高渗培养条件下甘油产量最高达6.6 g/L,而普通培养甘油最高达1.3 g/L。甘油是一种良好的生物相容性溶质。由于含有羟基,亲水性能好,能有效地维持细胞内水活度,保护细胞免受脱水的侵害^[8]。

比较以上结果可知,高渗环境中酿酒酵母产物的生成均出现了延迟期。

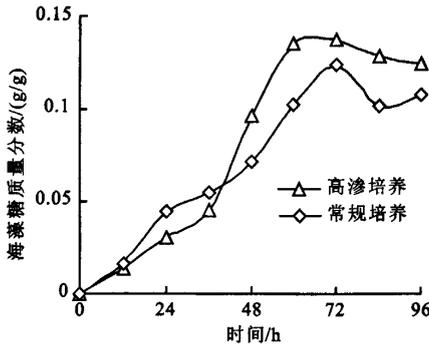


图2 高渗培养和常规培养的细胞海藻糖合成

Fig. 2 Intracellular trehalose content of *S. cerevisiae* under osmotic and normal conditions

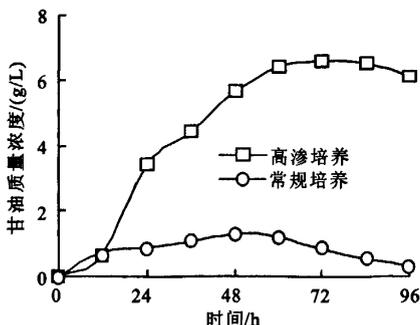
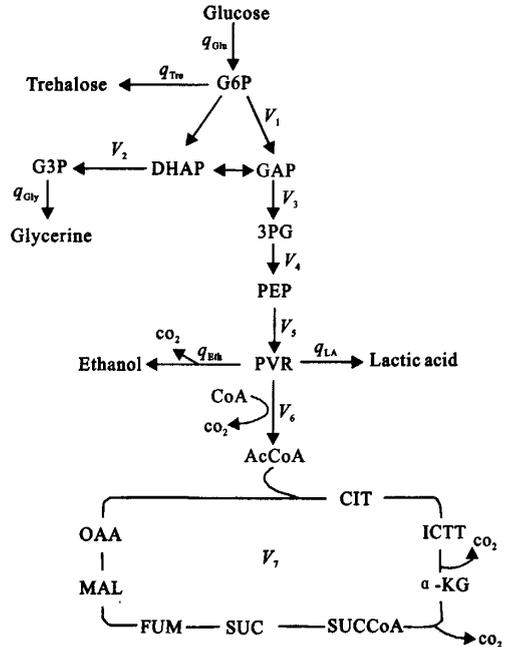


图3 高渗培养和常规培养的甘油合成

Fig. 3 Glycerol content of *S. cerevisiae* under osmotic and normal conditions

2.2 代谢网络的构建

酿酒酵母在高渗培养下产物的形成出现了延迟期,且甘油和海藻糖的合成均较常规培养有显著提高。因此进一步比较高渗培养和常规培养时酿酒酵母细胞产物生成期的代谢流分布情况。*S. cerevisiae*产物生成期(42~48 h)细胞生长趋于稳定,来自底物葡萄糖的碳流量主要用于产物合成。此阶段的碳代谢网络如图4所示^[9-11]。其中葡萄糖消耗速率和胞外代谢产物(如酒精、海藻糖、甘油和乳酸)生成速率经测定后换算为代谢通量 q (如 q_{glu} 等)。代谢通量定义为单位细胞在单位时间内代谢产物物质的量的变化^[11-13],即用比速率表示,单位是 $mmol/(g \cdot h)$ 。 $V_i (i=1 \sim 7)$ 表示未知流量。图4中的代谢节点平衡式和代谢方程式如表1和表2所示。



G6P; Glucose-6-phosphate; GAP; Glyceraldehydes-3-phosphate; DHAP; Dihydroxyacetone phosphate; G3P; Glycerol-3-phosphate; 3PG; 3-phosphoglycerate; PEP; Phosphoenolpyruvate; PYR; Pyruvate; AcCoA; Acetyl coenzyme; CIT; Citrate; ICIT; Isocitrate; MAL; Malate; SUC; Succinate; SUCCoA; SuccinateCoA; FUM; Fumarate; OAA; Oxaloacetate; α -KG; α -ketoglutarate; CoA; Coenzyme A

图4 *S. cerevisiae*在产物生成期的物质代谢网络

Fig. 4 Mass metabolic network of *S. cerevisiae* at product synthesis stage

2.3 代谢流分析

2.3.1 代谢流分析 根据所建立的代谢网络和代谢流分析方法,用 Matlab 软件求解产物生成期(42~48 h)细胞的代谢流分布,如表3所示。

表 1 代谢节点平衡方程式

Tab. 1 Equilibrium equations at different metabolic nodes

代谢产物与平衡方程式	
G6P:	$q_{Glu} = 2 q_{Tre} + V_1$
GAP&DHAP:	$2 V_1 = V_2 + V_3$
G3P:	$V_2 = q_{Gly}$
3PG:	$V_3 = V_4$
PEP:	$V_4 = V_5$
PYR:	$V_5 = V_6 + q_{Eth} + q_{LA}$
AcCoA:	$V_6 = V_7$

表 2 不同代谢产物的化学计量关系和代谢反应式

Tab. 2 Stoichiometric relationships and metabolic reactions of different metabolites

代谢通量	代谢反应式
q_{Glu}	Glucose + ATP = G6P + ADP
q_{Tre}	G6P + 0.5 ATP = 0.5 Tre + 0.5 ADP
q_{Gly}	G3P + ADP = Gly + ATP
q_{LA}	PYR + NADH = LA + NAD ⁺
q_{Eth}	PYR + NADH = Eth + NAD ⁺
V_1	G6P + ATP = DHAP + GAP + ADP
V_2	DHAP + NADH = G3P + NAD ⁺
V_3	GAP + NAD ⁺ + ADP = 3PG + NADH + ATP
V_4	3PG = PEP
V_5	PEP + ADP = PYR + ATP
V_6	PYR + COA + NAD ⁺ = AcCoA + CO ₂ + NADH
V_7	AcCoA + OAA = CIT
	CIT = ICIT
	ICIT + NAD ⁺ = α KG + CO ₂ + NADH
	α KG + NAD ⁺ = SUCCOA + CO ₂ + NADH
	SUCCOA + ADP = SUC + ATP
	SUC + FAD = FUM + FADH ₂
	FUM = MAL
	MAL + NAD ⁺ = NADH + OAA

表 3 高渗培养和常规培养酿酒酵母的代谢流分布

Tab. 3 Metabolic flux distribution of *S. cerevisiae* at product synthesis stage under osmotic and normal conditions

代谢通量	代谢通量值	
	高渗培养	常规培养
q_{Glu}	0.591 2	0.213 8
q_{Tre}	0.005 7	0.001 4

续表 3

代谢通量	代谢通量值	
	高渗培养	常规培养
q_{Gly}	0.015 9	0.003 7
q_{LA}	0.007 1	0.009 1
q_{Eth}	0.321 8	0.028 6
V_1	0.579 8	0.211 0
V_2	0.015 9	0.003 7
V_3	1.143 7	0.418 3
V_4	1.143 7	0.418 3
V_5	1.143 7	0.418 3
V_6	0.814 8	0.380 6
V_7	0.814 8	0.380 6

2.3.2 节点代谢流分布 由表 3 可知,高渗环境下酿酒酵母的代谢流分布发生了明显改变。作者又进一步分析了影响生成物产出的 3 个重要代谢节点,即六磷酸葡萄糖(G6P)、磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛(DHAP 和 GAP)、丙酮酸(PYR)处的代谢流分布情况(用归一法将进入代谢节点的流量设为 100),如图 5 所示。

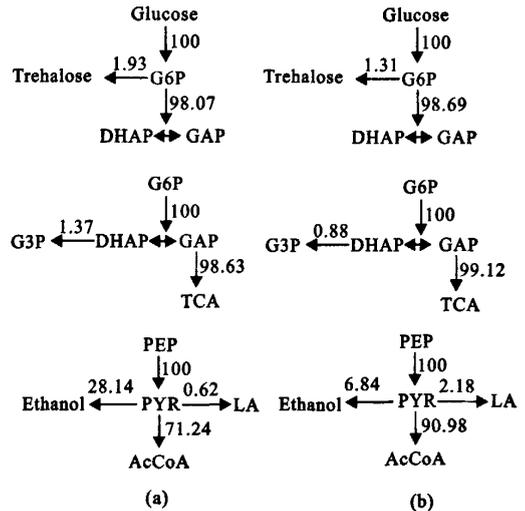


图 5 高渗培养(a)和常规培养(b)不同节点处的代谢流分布

Fig. 5 Metabolic flux distribution under different metabolic nodes (a) osmotic condition (b) normal condition

由图 5(b)可知,常规培养时,由于细胞生长基本维持恒定,来自底物葡萄糖的碳流量有 1.31%流向海藻糖,而 98.69%的碳流量流向 DHAP&GAP;由 G6P 节点的代谢流分布可知,0.88%的碳流量流向了三磷酸甘油(用于合成甘油),99.12%的碳流量进入 TCA 循环;由 PEP 节点的代谢流分布可知,

从PYR流向乳酸的碳流量为2.18%，流向乙酰辅酶A进入TCA循环的碳流量为90.98%，用于合成酒精的碳流量为6.84%。与常规培养相比较，高渗培养时(图5(a))用于海藻糖合成的碳流量增加了0.62%。从节点DHAP&GAP流向三磷酸甘油的碳流量为1.37%，较常规培养时增加了55.68%。节点PYR处的代谢流分布变化最大，从该节点流向乙醇的碳流量为28.14%，比常规培养增加3.1倍，而流向TCA循环的碳流量减少了21.70%，并且从该节点流向乳酸的碳流量比常规培养减少了71.56%。

3 结 语

上述研究结果表明，在高渗透压的外界环境

下，相应于胞外水活度的降低，酵母细胞的生理代谢发生了一系列变化以抵御外界渗透压胁迫的侵害。在高渗环境下酿酒酵母的碳流量偏向乙醇而偏离了TCA循环。在代谢节点G6P、DHAP&GAP代谢流分布均呈现一定变化，而节点PYR处的代谢流分布变化最为明显。由于甘油和海藻糖是酿酒酵母细胞内的重要相容性溶质，因此酿酒酵母在高渗环境下的代谢流分布的变化也反映了甘油与海藻糖在高渗环境下对酿酒酵母的重要保护功能。此外，通过对节点PYR、G6P和DHAP&GAP处代谢流分布的研究，可以为酿酒酵母工艺优化及菌种改造提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] 顾国贤. 酿造酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 211—223.
- [2] Bonarius H P J, Schmid G, Tramper J. Flux analysis of underdetermined metabolic networks; the quest for the missing constraints[J]. *Trends Biotechnol*, 1997, 15: 308—314.
- [3] 张超, 胡可萍, 端裕树, 等. 快速气相色谱法分析白酒中的香味组分[J]. 色谱, 2007(4): 586—589.
ZHANG Cao, HU Ke-ping, DUAN Yu-shu, et al. Analysis of flavor compositions of chinese distillate Spirits by fast gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007(4): 586—589. (in Chinese)
- [4] 季更生, 王杏文, 勇强, 等. 树干毕赤酵母酒精发酵碳元素代谢流向分析[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(10): 64—69.
JI Gen-sheng, WANG Xin-wen, YONG Qiang, et al. Analysis of carbon metabolic effluence on ethanol fermentation by *pichia stipitis*[J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(10): 64—69. (in Chinese)
- [5] Martijn R, Marcus K, Johan M, et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000(12): 8290—8300.
- [6] Julio C Ferreira, Vania M, Paschoalin F, et al. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts[J]. *Food Chemistry*, 1997, 60(2): 251—254.
- [7] 张玉华, 凌沛学, 籍保平. 海藻糖的研究现状及其应用前景[J]. 食品与药品, 2005, 7(3): 8—13.
ZHANG Yu-hua, LING Pei-xue, JI Bao-ping. Current status of research trehalose and its prospective applications[J]. *Food and Drug*, 2005, 7(3): 8—13. (in Chinese)
- [8] Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(2): 1087—1092.
- [9] 沈同. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1994: 78—278.
- [10] 刘宏娟, 刘德华, 钟健江. 高渗透压胁迫下 *Gandida krusei* 的代谢分析[J]. 高校化学工程学报, 2006, 4(20): 559—564.
LIU Hong-juan, LIU De-hua, ZHONG Jiang-jiang. The metabolic flux analysis of *candida krusei* at osmotic stress[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2006, 4(20): 559—564. (in Chinese)
- [11] Stephanopoulos G, Aristos A J, Nielson J. *Metabolic Engineering—Principles and Methodologies* [M]//赵学明, 白冬梅译. 北京: 化学出版社, 2003: 182—206.
- [12] 王健, 张蓓, 张克旭, 等. L-色氨酸产生菌 TQ2223 的途径分析[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2003, 22(5): 15—18.
WANG Jian, ZHANG Bei, ZHANG Ke-xu, et al. Pathway analysis for production of L-Tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* TQ2223[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry(Food Science and Biotechnology)*, 2003, 22(5): 15—18. (in Chinese)
- [13] Cortassa S, Aon M A. Flux of carbon phosphorylation and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 47(2): 193—208.

(责任编辑: 秦和平)