

文章编号: 1673-1689(2011)02-0287-08

乙醇发酵中酿酒酵母辅酶 NAD^+ 及 $NADH$ 测定方法

李骆冰, 王永红, 庄英萍, 储炬, 张嗣良*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 乙醇发酵过程中酿酒酵母细胞辅酶 NAD^+ 和 $NADH$ 质量分数及其比例反映了胞内的氧化还原状态和细胞代谢活性, 具有重要的生理意义。作者主要研究了加热萃取、珠磨破碎、反复冻融破碎 3 种方法对乙醇发酵过程酿酒酵母细胞辅酶 NAD^+ 和 $NADH$ 提取和测定的影响, 提出基于珠磨破碎、辅以加酸或碱并加热的萃取模式, 以及合适的酶循环反应体系, 从而建立了高效的胞内 NAD^+ 和 $NADH$ 检测方法。

关键词: 酿酒酵母; NAD^+ / $NADH$; 珠磨破碎法; 酶循环法

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Determination of Coenzyme NAD^+ and $NADH$ of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Ethanol Production

LI Luo-bing, WANG Yong-hong, ZHUANG Ying-ping, CHU Zhu, ZHANG Si-liang*
(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Due to the importance of NAD^+ and $NADH$ levels in the yeast metabolism, the determination of intracellular $NADH/NAD^+$ is a very interesting for ethanol production. In this study, Three $NADH./NAD^+$ extracting methods, including heating, freeze-thaw cycles, shaking bead, for the disruption and extraction of the NAD^+ and $NADH$ in yeast cells were investigated and compared. Finally an efficient process for extraction and detection of NAD^+ and $NADH$ in yeast cells was established as follows. Yeast cells were disrupted by shaking bead while NAD^+ and $NADH$ were extracted by acid or alkali, then the extracts were detected under the favorable enzymatic cycling system II.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, NAD^+ / $NADH$, shaking bead, enzymatic cycling

NAD^+ (氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 和 $NADH$ (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 是酵母发

酵产乙醇代谢过程中的一对极为重要的氧化还原代谢辅酶^[1-2]。在酵母细胞内 NAD^+ 和 $NADH$ 二

收稿日期: 2010-01-20

基金项目: 上海市重点学科建设项目(B505)。

* 通信作者: 张嗣良(1940-), 男, 浙江瑞安人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化方面的研究。

Email: siliangz@ecust.edu.cn

者相互转化,同化或异化过程都会导致 NAD^+ 被还原为 NADH ,为维持细胞内的氧化还原平衡, NADH 需被重氧化。酵母细胞中存在至少 5 条 NADH 重氧化代谢途径,如乙醇生成途径,甘油生成途径等,酵母细胞内的 NAD^+ 和 NADH 水平一定程度上决定着细胞内的代谢流分布^[3]。酵母细胞内的 NAD^+ 和 NADH 比例不仅调节着氧化还原平衡,而且是细胞的代谢活性指标,在代谢过程及控制上有着极为重要的作用^[4]。酵母细胞内的 NAD^+ 和 NADH 水平与细胞所处环境的氧化还原状态息息相关,在乙醇发酵过程中可通过控制胞外氧化还原状态来调节细胞的生长及产物生成^[5]。因此考察乙醇发酵过程中细胞内 NAD^+ 和 NADH 水平对了解细胞代谢有举足轻重的作用。

检测酵母细胞内辅酶 NAD^+ 和 NADH 的关键步骤为:胞内辅酶的高效提取及辅酶含量的准确测定。辅酶的提取方法主要有酸碱加热提取^[6,7],细胞破碎提取^[8]等,针对不同种类不同发酵体系的细胞提取方法不能通用。关于酿酒酵母辅酶 NAD^+ 和 NADH 提取方法众说纷纭,并且辅酶分子自身不够稳定,因此探讨乙醇发酵体系中辅酶的提取方法显得尤为重要。

目前测定微生物细胞内 NAD^+ 和 NADH 采用的方法有 HPLC、荧光法及酶循环法^[8-12]。利用 HPLC 测定辅酶时,样品处理对测定影响较大,样品处理过程中积累的盐离子及发酵液中的蛋白质对测定均有较大干扰,导致检测灵敏度降低^[10]。荧光法相对成本更高,降低了使用的可能性。酶循环测定方法反应温和,无污染,灵敏度高且操作简便。

酶循环法的反应原理见图 1^[8]。

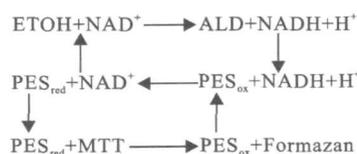


图 1 定量测定 NAD^+ 和 NADH 的反应程序

Fig. 1 Reaction scheme for quantitative determination of the levels of NAD^+ and NADH

其中 ETOH、ALD、PES、MTT 和 Formazan 分别为乙醇、乙醛、吩嗪乙基硫酸盐、噻唑蓝和甲簪。当体系中存在以上底物及辅酶 NAD^+ 和 NADH 时,在乙醇脱氢酶(ADH)催化作用下,辅酶参加循环反应直至底物消耗完。反应过程中不断生成蓝色的物质甲簪(Formazan),从而使体系在 570 nm 下的吸光值不断发生变化^[13]。在一定温度及反应时间内,酶反应速率与样品中辅酶浓度呈线性关

系。据此,通过与标准品的反应速率进行对比,能够准确测得样品中辅酶的浓度。基于此反应原理,作者主要目的在于研究酿酒酵母细胞内辅酶 NAD^+ 和 NADH 的提取方法,并建立合适的酶循环反应体系,最终建立一套完善高效的酵母细胞内辅酶 NAD^+ 和 NADH 检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂

ADH、MTT、PES、Bicine:均购买自 Sigma 公司;乙醇等其余试剂:均为分析纯,购买自国药集团公司。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基组成(组分 g/dL) 葡萄糖 4, KH_2PO_4 0.35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75;微量元素 1 mL/L,维生素溶液 1 mL/L^[14]。

1.2.2 发酵培养基组成(组分 g/dL) 葡萄糖 10, KH_2PO_4 0.35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75;微量元素 1 mL/L,维生素溶液 1 mL/L。

1.2.3 微量元素组成(mg/L) EDTA 30, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.0, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8, H_3BO_3 2.0, KI 0.2。

1.2.4 维生素溶液组成(mg/L) Biotin 0.05, Calcium pantothenate 1, Nicotinic acid 1, Inositol 25, Thiamin · HCl 1, Pyridoxine · HCl 1, Para-aminobenzoic acid 0.2。

1.3 培养方法

1.3.1 菌种活化及保藏 称取 5 g 活性干酵母,置于已灭菌的 2 g/dL 的 100 mL 葡萄糖溶液中,于 30 °C 下孵育 30 min,活菌浓度为 2×10^8 CFU/mL。活化后的菌液稀释至一定的浓度,取 100 μL 涂布在固体培养基上,获得单菌落,4 °C 保藏。

1.3.2 种子培养方法

1) 一级种子培养:从平板上挑取一个单菌落,接入已灭菌的 30 mL 种子培养基中,30 °C,200 r/min 条件下培养 16 h。

2) 二级种子培养:将培养 16 h 的一级种子液转入 120 mL 种子培养基中,30 °C、200 r/min 条件下培养 16 h。

1.3.3 摇瓶发酵条件 以 10% 接种体积分数接入一级种子液,500 mL 摇瓶装液量为 150 mL,转速 200 r/min,温度 30 °C。

1.3.4 2.5 L 发酵罐批培养条件 以 10% 接种体

积分数将二级种子液接入发酵培养基, 2.5 L 发酵罐装液量 1.5 L, 搅拌转速为 250~300 r/min, 温度 30 °C, 0~6 h 通气 0.2 vvm。分别于接种后 5 h 和 8 h 取样一次, 每次取 3 份平行样品, 测定发酵样品的生物量及辅酶含量。

1.4 生物量测定

取 40 mL 发酵液置于已知重量干燥的 50 mL 离心管中, 10 000 r/min 下离心 10 min, 去上清液, 用无菌水清洗, 重复离心操作 2 遍。置于 60 °C 下烘干至恒重后称重, 每个样品 3 个重复, 测酵母细胞干重。

1.5 辅酶提取方法

1.5.1 辅酶 NAD⁺ 提取方法

1) 方法 1: 1 mL 样品加入 300 μL HCl (0.4 mol/L), 50 °C 加热 10 min, 冷却至 0 °C 后用 KOH 溶液 (0.2 mol/L) 滴定中和, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4 °C) 保留上清液, 立即用于酶循环反应测定。

2) 方法 2: 注入 1 mL HClO₄ 溶液中 (35 g/dL, -20 °C), 终止细胞代谢。0 °C 与 -20 °C 间反复冻融, 破坏细胞结构提取 NAD⁺ 同时破坏 NADH, 实验中考察不同的冻融次数对提取的影响。冻融结束后冰浴条件下用 2 mol/L KOH 滴定调节提取液 pH 至 7.0, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4 °C) 保留上清液, 立即用于酶循环反应测定。

3) 方法 3: 注入 1 mL HClO₄ 溶液中 (35 g/dL; -20 °C), 终止细胞代谢。加入等体积玻璃珠 (*D* 0.5 mm), 30 s 振荡、30 s 冰浴重复操作, 70 °C 下保温 7 min, 破坏细胞及 NADH 的同时提取 NAD⁺, 考察反复振荡操作时间对提取的影响。细胞破碎结束后冰浴条件下用 2 mol/L KOH 滴定调节提取液 pH 至 7.0, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4 °C) 保留上清液, 进行酶循环反应测定。

1.5.2 辅酶 NADH 提取方法

1) 方法 1: 1 mL 样品加入 300 μL KOH (0.4 mol/L), 50 °C 加热 10 min, 冷却至 0 °C 后用 HCl (0.2 mol/L) 滴定中和至 pH 7.0, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4 °C) 保留上清液, 立即进行酶循环反应测定。

2) 方法 2: 3 mL 样品注入 1 mL 2 mol/L KOH 乙醇 (体积分数 50%; -20 °C) 溶液中, 终止细胞代谢。70 °C 加热 7 min, 冷却至 0 °C 后用 HCl (1 mol/L) 滴定中和, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4 °C) 保留上清液, 立即进入酶循环反应。

3) 方法 3: 3 mL 样品注入 1 mL 2 mol/L KOH 乙醇 (体积分数 50%; -20 °C) 溶液中, 终止细胞代

谢。加入等体积玻璃珠 (*D* 0.5 mm), 30 s 振荡、30 s 冰浴重复操作 8 次, 70 °C 保温 7 min, 破坏细胞及 NAD⁺ 的同时提取 NADH。冰浴条件下用 HCl (1 mol/L) 滴定提取液 pH 7.0, 离心保留上清液, 立即酶循环反应进行测定。

2 结果与讨论

2.1 酶循环法反应体系的确立

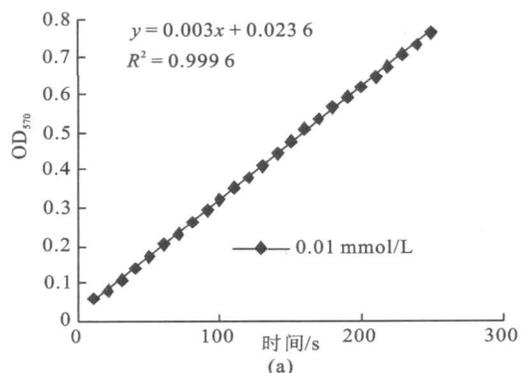
现有文献报道中所使用的酶循环法反应体系各有不同^[10, 12], 实验中以标准品 NAD⁺ 反应速率为指标考查 2 种不同的反应体系, 从而确立较为合适的酶循环反应体系。2 种体系的组成成分及规格见表 1, 其中乙醇脱氢酶最后加入以启动反应。不同反应体系下测定 NAD⁺ 标准品的反应速率。结果表明: 体系 1 反应速度快, 体系 2 相对较慢。

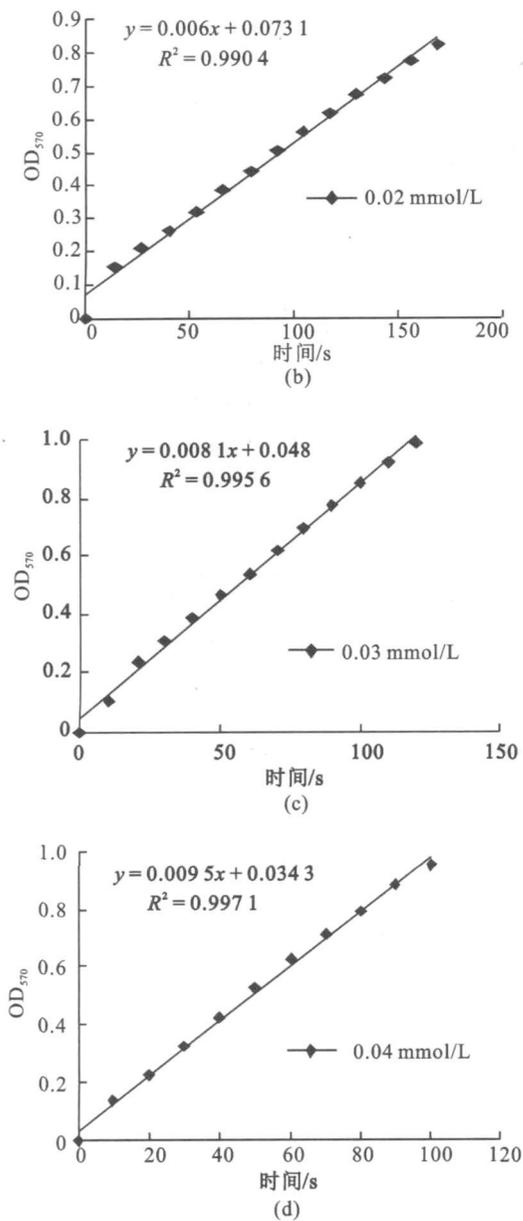
表 1 两种反应酶循环反应体系

Tab. 1 Two type of enzymatic cycling system

组成成分	体系 1		体系 2	
	规格	体积/μL	规格	体积/μL
Bicine buffer	1.0 mol/L (pH 8.0)	200	0.1 mol/L (pH 7.4)	2000
EDTA	15.2 g/L (pH 8.0)	200	-	-
PES	5.6 g/L	400	4.0 g/L	200
MTT	1.7 g/L	200	5.0 g/L	100
EtOH	分析纯	200	分析纯	75
Sample	-	100	-	50
ADH	150 U	50	100 U	20

NAD⁺ 标准品浓度范围为 0.01~0.04 mmol/L, 体系 1 条件下的反应动力学过程见图 2。

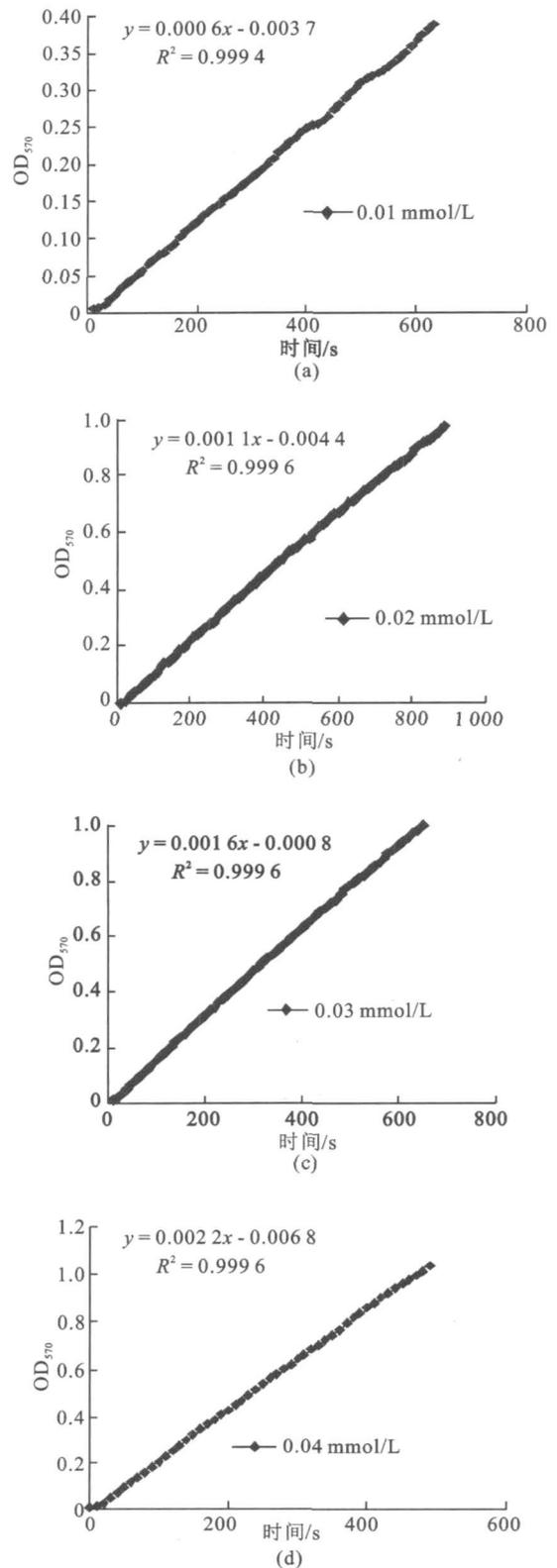


图2 体系1中 NAD^+ 标准品反应动力学Fig. 2 Reaction kinetics of NAD^+ standards under the system I

该体系条件下反应迅速, 2~3 min内吸光值超过有效测定范围, 得到的辅酶浓度与反应速率标准曲线为: $y = 4.5056x - 0.005$ ($R^2 = 0.9832$)。其中相关系数 R^2 较低, 可能由于过快的反应速度导致较大的测定误差。体系2实验结果表明, 体系2中酶反应速率较低, 15 min内仍能保持反应速率稳定, 吸光值与时间呈良好的线性关系且吸光值未超过有效的测定范围。

如图3所示, 当标品浓度为0.04 mmol/L时, 反应速率仅为0.0022 ($\Delta A_{570\text{ nm}} / \Delta S$)。然而在反应体系1条件下, 当标品浓度为0.01 mmol/L时, 反应速率已经达到0.003 ($\Delta A_{570\text{ nm}} / \Delta S$)。由体系2得

到的 NAD^+ 标准曲线为 $y = 0.3183x - 0.0008$ ($R^2 = 0.9966$), 相关系数高。因此酶循环反应体系2更加适合于辅酶浓度的测定, 可减小测量误差, 使检测结果准确率更高。

图3 体系2中 NAD^+ 标准品反应动力学Fig. 3 Reaction kinetics of NAD^+ standards under the system II

2.2 辅酶提取方法探讨

2.2.1 辅酶 NAD⁺ 的提取方法 NAD⁺ 在酸性条件下稳定, 酸的水溶液可用于提取生物细胞内辅酶 NAD⁺ [9-10]。作者主要考察乙醇发酵中酿酒酵母细胞辅酶 NAD⁺ 的 3 种提取方法。

方法 1 处理样品的酶循环反应速率为 0, 说明单纯加盐酸加热方法不能有效提取出真菌酵母细胞的辅酶。可能由于提取体系中的盐酸不能有效增加细胞膜的通透性, 不足以破坏酿酒酵母的细胞结构, 导致提取失败, 因此盐酸不适合于酵母细胞内氧化型辅酶的提取。

方法 2 分别进行 3 组实验考察不同的冻融次数对辅酶 NAD⁺ 提取的影响, 不同冻融次数下细胞破碎程度可能有差别。冻融次数分别为 1 次, 2 次, 3 次, 样品反应速率结果见图 4。

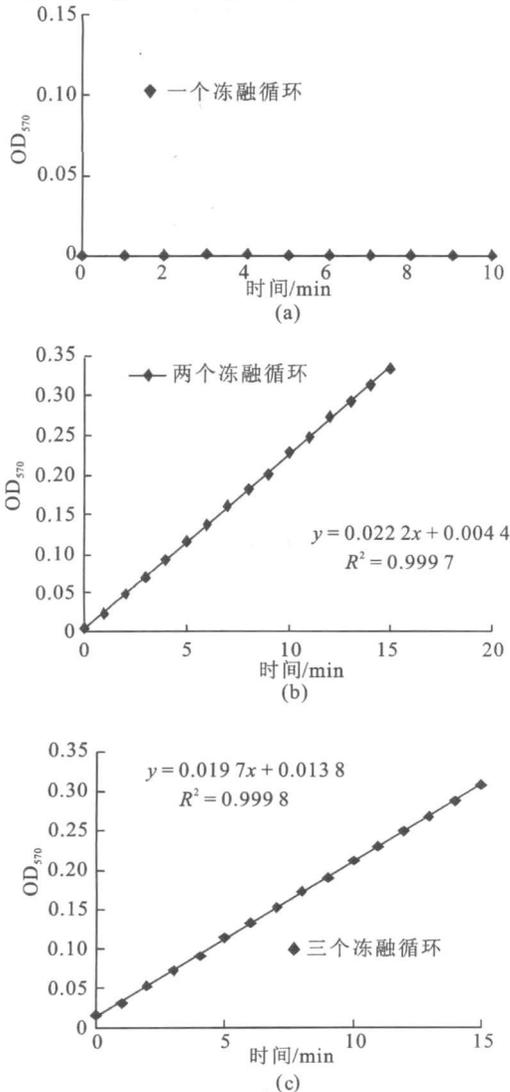


图 4 不同冻融次数处理的样品中 NAD⁺ 的反应动力学
Fig. 4 Reaction kinetics of NAD⁺ obtained with one, two or three freeze-thaw cycles

由图 4 可知, 冻融一次的样品酶循环反应速率为 0, 即未能提取出胞内的 NAD⁺。冻融 2 次与 3 次处理的样品酶反应速率相似, 表明冻融 2 次就可以高效的破碎细胞, 提取胞内的 NAD⁺。对照标准曲线得到的辅酶浓度见表 2。

表 2 不同处理方法所得样品的胞内 NAD⁺ 浓度

Tab. 2 Concentrations of NAD⁺ in samples obtained from different pretreatment methods

预处理方法	NAD ⁺ 浓度/ (mmol/L)	NAD ⁺ 摩尔质量/ (mmol/g)
一个冻融循环	0	0
两个冻融循环	0.022 2	0.004 8
三个冻融循环	0.019 7	0.004 2
珠磨破碎 8 min	0.026 6	0.005 9
珠磨破碎 10 min	0.024 2	0.005 3
珠磨破碎 13 min	0.027 0	0.005 9

方法 3 主要探讨了振荡时间对提取 NAD⁺ 的影响, 不同的振荡时间可能会对细胞破碎率产生影响。30 s 振荡、30 s 冰浴反复间歇操作分别为 8、10、13 次, 即破碎时间分别为 8、10、13 min, 处理后样品所测定的辅酶的反应动力学如图 5。由图 5 可知, 8~13 min 处理的样品测定反应速率一致, 表明 8 min 已经能够完全破碎酵母细胞并有效提取酵母细胞内的辅酶 NAD⁺。

运用方法 2 与方法 3 提取同样品的细胞内辅酶, 浓度测定结果见表 2。珠磨破碎法处理的样品浓度(0.0059 mmol/g) (以 DCW 计) 要稍高于冻融循环破碎法处理样品的浓度(0.0048 mmol/g) (以 DCW 计), 表明珠磨破碎法能够更高效的提取胞内辅酶 NAD⁺。并且珠磨破碎辅助加高氯酸加热提取方法处理样品的总时间仅 15 min, 而反复冻融法至少需要 2 h, 较长的操作时间内环境因素可能会导致氧化还原型辅酶的相互转化及辅酶的降解, 因此方法 3 有效避免了长时间操作带来的不利影响并且操作简便。方法 3 中设计了标准品的对照组实验, 其中 0.020 mmol/L NAD⁺ 标准品经过相同提取条件处理后测定浓度为 0.020 mmol/L (实验重复 3 次, 标准偏差为 ± 0.001), 0.020 mmol/L NADH 标准品经过相同提取条件酸处理后酶循环反应速率几乎为零, 即提取过程不会造成辅酶 NAD⁺ 的损失并能完全破坏 NADH, 从而实现了辅酶 NAD⁺ 的高效检测。实验结果表明, 珠磨破碎细胞辅助加高氯酸方法能够有效提取乙醇发酵样品中酿酒酵母细胞的辅酶 NAD⁺。

2.2.2 辅酶NADH的提取方法 NADH在碱性条件下稳定,利用碱溶液可提取胞内NADH,在已有文献报道基础上^[8,15],作者考察了辅酶NADH样品的3种处理方法。

方法1处理的样品进行酶反应速率为0,即利用碱的水溶液加热提取酵母胞内NADH不可行。该方法不足以破坏酵母细胞结构,不能增加细胞膜的通透性,从而无法有效地提取出辅酶NADH。

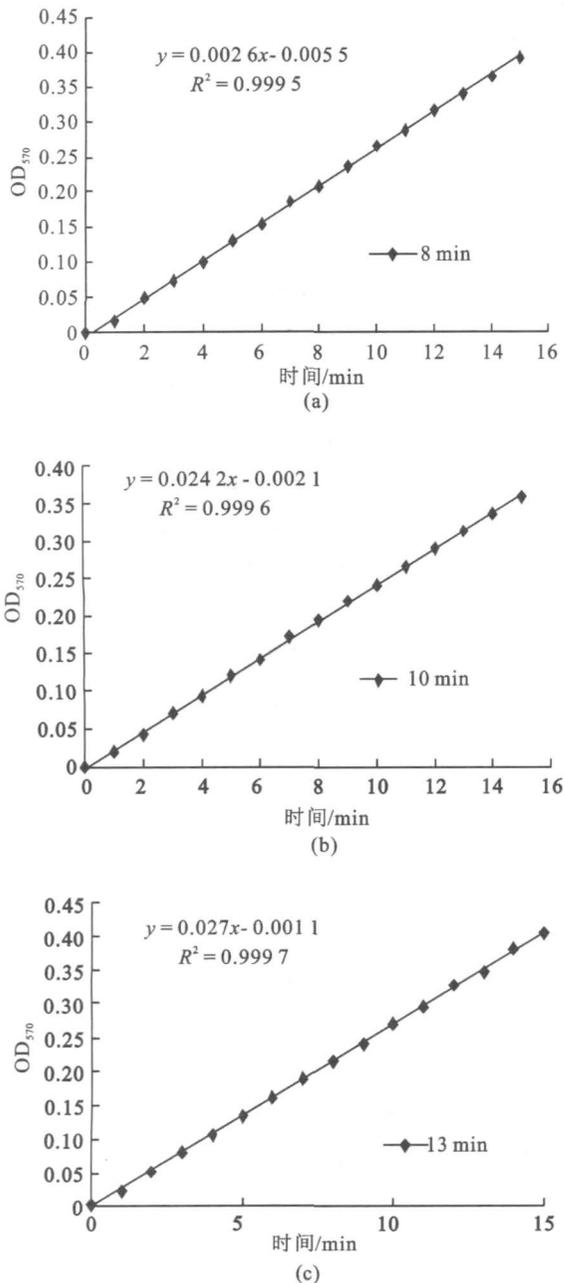


图5 不同珠磨破碎时间处理的样品中NAD⁺的反应动力学

Fig. 5 Reaction kinetics of NAD⁺ obtained with eight-, ten- or thirteen- minute shaking with glass beads

方法2中KOH溶液中含有乙醇,能够破坏酵母细胞膜增加膜通透性,因此辅以加热可能会得到较为理想的结果。作者考察碱溶液用量与样品的比例(由1:3增加至1:1),对辅酶NADH提取的影响以及不同处理方法测定的酶反应动力学见图6。

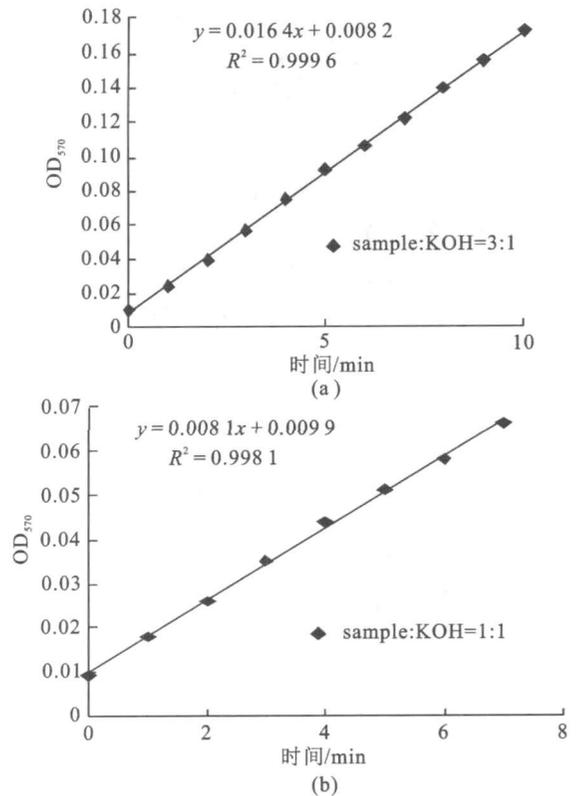


图6 不同KOH用量处理样品中的NADH的反应动力学

Fig. 6 Reaction kinetics of NADH extraction with different KOH concentrations

由于KOH浓度的差异,中和时加入的酸量不同,导致样品的稀释率有所不同,样品中细胞干重为5.6 g/L。当KOH与样品比例为1:3时,测得NADH浓度为0.008 mmol/g(以DCW计);而KOH与样品比例为1:1时,测定样品中NADH为0.0064 mmol/g(以DCW计)。当KOH与样品比例为1:3时已经能够有效的提取胞内的辅酶,KOH浓度过大反而不利于胞内NADH的提取,这可能与NADH的不稳定性有关。

按照方法3提取样品进行酶循环反应测定,得到胞内的NADH摩尔质量为0.009 mmol/g(以DCW计)。比较以上3种方法可见,方法3最适合胞内辅酶NADH的测定。而0.02 mmol/L标准品对照实验同样表明方法3能较完全的提取辅酶NADH,并有效破坏氧化型辅酶(NAD⁺)。这种胞内NADH提取方法与NAD⁺提取方法采用相同的物理辅助破碎方法,达到相同的细胞破碎效率,可

以有效减小提取过程中的系统误差。

至此建立了完整且高效的检测乙醇发酵中酵母细胞内的辅酶 NAD⁺ 及 NADH 的方法。进一步利用这套方法测定 2.5 L 乙醇发酵体系中酿酒酵母辅酶的浓度,考察不同胞外氧化还原状态下胞内的辅酶水平。

2.2.3 2.5 L 发酵罐乙醇发酵过程中辅酶的测定
为探究方法的稳定性和可行性,实验考察了 2.5 L 发酵罐乙醇发酵过程中,不同氧化还原状态下酵母细胞内辅酶 NAD⁺ 和 NADH 的水平。接种后 5 h 后,酵母细胞生物量为 9.5 g/L,胞外氧化还原电位 80 mV。培养 8 h 取样,测得酵母生物量为 10.0 g/L,胞外氧化还原电位为-200 mV。分别检测这

两种不同氧化还原状态下胞内辅酶浓度,两种状态下的 3 份平行样品测 NAD⁺ 及 NADH 样品的预处理方法均为提取方法 3。

酶循环反应 NAD⁺ 及 NADH 的标准曲线分别为:

$y = 0.3682x - 0.021$ ($R^2 = 0.9941$), 其中 x 为样品酶反应速率 ($\Delta A_{570\text{nm}} / \Delta S$), y 为辅酶浓度 (mmol/L)。

$y = 0.3769x - 0.0002$ ($R^2 = 0.9975$), 其中 x 为样品酶反应速率 ($\Delta A_{570\text{nm}} / \Delta S$), y 为辅酶浓度 (mmol/L)。

不同 ORP 水平下胞内 NAD⁺ 及 NADH 浓度见表 3。

表 3 不同 ORP 水平下胞内 NAD⁺ 及 NADH 浓度

Tab. 3 Intracellular NAD⁺ and NADH contents under different ORP levels

氧化还原电位/mV	NAD ⁺ 浓度/ (mmol/L)	NAD ⁺ 摩尔质量/ (mmol/g)	NADH 浓度/ (mmol/L)	NADH 摩尔质量/ (mmol/g)	NAD ⁺ / NADH	NAD ⁺ + NADH 摩尔质量/ (mmol/g)
80	0.0551 ± 0.00015	0.0058	0.0504 ± 0.00010	0.0053	1.280	0.0110
-200	0.0510 ± 0.00021	0.0051	0.0570 ± 0.00015	0.0057	0.869	0.0108

^a平均值 ± 标准偏差

NAD⁺ 及 NADH 浓度与文献[8]处于相近水平。结果显示:不同氧化还原状态下酿酒酵母 NAD⁺ 及 NADH 总量没有显著差异,但氧化型与还原型辅酶的比例却有所不同。停止通氧后,酵母细胞内还原型辅酶浓度相对增多,而氧化型辅酶浓度减少,表明此时细胞处于相对还原的状态。

不同氧化还原状态下实验结果进一步表明,作者建立的酿酒酵母细胞 NAD⁺ 及 NADH 浓度测定方法是可行的。这套提取方法为分析乙醇发酵体系中细胞代谢情况提供了方法上的保障,也为深入探讨氧化还原电位控制对于乙醇发酵影响提供了基础。

3 结 语

作者通过考察两种酶循环反应体系下辅酶的

反应速率,确定体系 2 可提供合适的反应速率,使辅酶的酶循环法测定更加精确。通过对酸碱加热提取、反复冻融破碎提取及珠磨破碎提取方法的研究,表明珠磨破碎 8 min、辅助加酸/碱加热处理 7 min 提取酵母细胞胞内辅酶的方法简便易行,快速且准确。同时,2.5 L 发酵罐乙醇发酵体系中的测定结果进一步肯定了方法的可行性和准确性。作者所建立的 NAD⁺ 和 NADH 高效提取、准确测定方法为分析乙醇发酵体系中酵母细胞胞内代谢水平提供了方法上的保障。

参考文献(References):

- [1] Canelas AB, VanGulik WM, Heijnen JJ. Determination of the cytosolic free NAD/NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under steady-state and highly dynamic conditions [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100: 734-743.
- [2] Pham TH, Mauvais G, Vergoignan C, et al. Gaseous environments modify physiology in the brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* during batch alcoholic fermentation [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105: 858-874.
- [3] Bakker BM, Overkamp KM, VanMaris AJ, et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccha-*

- romyces cerevisiae*[J]. **FEMS Microbiol**, 2001, 25: 15– 37.
- [4] Rigoulet M, Aguilaniu H, Avret N, et al. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Mol Cell Biochem**, 2004, 256: 73– 81.
- [5] Franzen CJ. Metabolic flux analysis of RQ-controlled microaerobic ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 2003, 20: 117– 132.
- [6] Du CY, Zhang YP, Li Y, Cao ZA. Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1, 3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2006, 69: 554– 563.
- [7] Menzel K, Ahrens K, Zeng A, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: IV. enzymes and fluxes of pyruvate metabolism [J]. **Biotechnol Bioeng**, 1998, 60: 617– 626.
- [8] Mailinger W, Baumeister A, Reuss M, et al. Rapid and highly automated determination of adenine and pyridine nucleotides in extracts of *Saccharomyces cerevisiae* using a micro robotic sample preparation-HPLC system [J]. **J Biotechnol**, 1998, 63: 155– 157.
- [9] Miller RH, Loffhagen N, Babel W. Rapid extraction of (di) nucleotides from bacterial cells and determination by ion pair reversed-phase HPLC [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1996, 25: 29– 35.
- [10] Theobald U, Mailinger W, Baltes M, et al. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. experimental observations[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1996, 55: 305– 316.
- [11] Yamada K, Hara N, Shibata T, et al. The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. **Analytical Biochemistry**, 2006, 352: 282– 285.
- [12] T JW, Wimpenny, Firth A. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen[J]. **J Bacteriol**, 1972, 111: 24– 32.
- [13] Bernowsky C, Swan M. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide [J]. **Anal Biochem**, 1973, 53: 452– 458.
- [14] Verduyn C, Postma E, Dijken J. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures [J]. **J Gen Microbiol**, 1990, 136: 395– 403.
- [15] 李建, 陈可泉, 黄秀梅, 等. 厌氧发酵有机酸体系中 NAD^+ 和 NADH 测定方法的建立[J]. **食品科技**, 2008, 33(12): 254– 257.
- LI Jian, CHEN Ke-quan, HUANG Xin-mei, et al. Establishment of the determination of NAD^+ and NADH in the anaerobic fermentation of organic acids [J]. **Food Science and Technology**, 2008, 33(12): 254– 257. (in Chinese)

简 讯:

“2011 微生态与健康生活方式国际论坛”在上海举行

2011年3月23日,第十五届中国国际食品添加剂和配料展览会(FIC 2011)暨第二十一届全国食品添加剂生产应用技术展示会在上海举行。来自20多个国家和地区的1000多家参展公司、几十家新闻媒体云集上海光大会展中心。

会议期间,国家生物产业(德州)基地、中国发酵工业协会携手中国乳制品工业协会、中国焙烤食品糖制品协会、中国食品添加剂和配料协会及保龄宝生物股份有限公司在上海光大会展中心成功举办了“2011微生态与健康生活方式国际论坛”,本刊编辑部应邀出席了此次会议。