

酿酒酵母悬浮培养体系的建立及其对香豆素的微生物转化研究

欧巧明^{1,2}, 丁兰¹

(1. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)(2. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 本文以酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*) 悬浮培养细胞为研究对象, 筛选优化悬浮培养转化体系, 同时探讨香豆素在其中发生的变化; 根据不同起始细胞培养密度下的细胞形态, 生长曲线和 pH 值变化, 选择最适起始密度和最适 pH 值, 并利用此微生物转化体系对天然香精香豆素 (Coumarins) 进行初步的转化试验。结果表明: 起始细胞培养密度为 8×10^6 个/mL、温度 27 ± 1 °C, 转速 110 r/min, pH 值为 4.5~5.5, 黑暗条件为最适转化体系, 并初步认定香豆素已进入酵母细胞, 该转化体系可能对香豆素具有吸收、转化作用。

关键词: 酿酒酵母; 悬浮培养; 生物转化; 香豆素

中图分类号: TS261.1⁺1; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)06-0004-04

Establishment of a Culture System for Yeast Cell Suspension (*Sacharomyces cerevisiae*) and Microbiotransformation of Coumarins

OU Qiao-ming^{1,2}, DING Lan¹

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

(2. Bio-tech Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China)

Abstract: To get a better system for biotransformation and analysis of coumarins, cell suspension cultures of the yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) were established. The best primary cultural density and the pH value of the system for preliminary transformation test of coumarins were determined by investigating the change of cell morphology, growth curve and the pH value of the cultures during a yeast cell growth cycle. Results showed that the best cultural density, temperature, shaking speed and the pH value were 8×10^6 /ml, 27 ± 1 °C, 110 r/min and 4.5~5.5, respectively. Besides, dark cultures were preferred. It was concluded that coumarins could be absorbed and transformed in the achieved yeast cell cultures.

Key words: *sacharomyces cerevisiae*; cell suspension cultures; biotransformation; coumarins

微生物转化 (microbiotransformation) 是生物转化技术应用的分支, 是利用微生物代谢过程中产生的酶对底物进行某种有机修饰化学反应。反应涉及到羟甲基化、环氧化、Backer Villiger 反应、氢化、脱氢等^[1]。因为微生物转化具有明显的位置选择性、立体选择性和对映选择性, 因此在天然次生代谢产物的修饰^[2]、有机化合物的不对称合成^[3]、对映异构体的拆分^[4]以及以天然活性成分为基础的创新药物研究与开发等方面显示出巨大的应用潜力。

收稿日期: 2007-03-29

基金项目: 甘肃省教育厅项目 (0601-27)

作者简介: 欧巧明(1977-), 男, 助理研究员, 在读硕士, 研究方向为植物生物技术及天然药物活性

通讯作者: 丁兰

酵母是微生物转化中最主要的单细胞真菌, 具生长快、易于遗传操作、能对外源药物及蛋白进行加工和修饰、不产生有毒产物等优点, 广泛应用于还原反应和水解反应。已有部分研究者对酵母的生物转化培养进行了研究^[4-6]。目前, 酵母转化培养体系及酵母酶系研究已成为国内外有机合成化学和生物技术研究的新的研究热点和生长点^[7], 并广泛应用于医药、食品、化工工业。

但目前, 应用酿酒酵母悬浮培养体系对植物天然药物香豆素的生物转化研究未见有报道。因此, 本研究拟通过对酿酒酵母的细胞悬浮培养以及影响因素的研究, 建立酿酒酵母的悬浮培养转化体系, 并用该体系对香豆素 (HA-1) 进行生物转化研究, 为相关药物的微生物转化与合成研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌种及培养条件

酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*): 西北师范大学生命科学院提供。菌种保存在 YPD 斜面培养基上, 4 °C 储存。

转化底物: 天然香精香豆素 (Coumarins), 白色结晶, 分子式 $C_9H_6O_2$, 为顺式邻羟基桂皮酸内, 具有 α , β -不饱和 δ 内酯结构, 包含香豆素 A 和 B 两种物质, 常以游离状态及苷类存在于生物体内, 具特异香气, 为食品化工工业和日用烟草的重要香精。用二甲亚砜 (DMSO) 溶解待用。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基及培养条件

酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*) 悬浮培养的培养基: 葡萄糖 20 g/L, 酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, pH 5.4。

取上述培养基 20 mL 置于 100 mL 三角瓶中, 灭菌 20 min 后, 冷却至 37 °C, 接种一环斜面酿酒酵母种子, 置于恒温摇床上, 转速 110 r/min, 温度 27 ± 1 °C, 黑暗条件下悬浮震荡培养。

1.2.2 酿酒酵母生长的检测

用血球计数板检测起始悬浮培养菌液的细胞数, 计算起始悬浮培养液细胞密度, 同时根据不同起始密度对细胞存活率的影响, 确定最适起始密度, 然后根据需要的起始密度, 用新鲜培养液稀释后, 进行下一步的微生物转化反应。

从接种第 1 d 起用美蓝检查酵母细胞活性: 取 0.1% 美蓝生理盐水溶液与细胞悬液以 100:1 (v/v) 混合, 2 min 后取混合液置于血球计数板上计数, 未被染色的为活细胞。取 3 次重复平均值, 绘制酿酒酵母的生长曲线。

在测定生长曲线的同时, 每天定时在 Olympus 光学显微镜下观察细胞大小、形状及分裂情况。并定期用 pH5-9V 型酸度计测量 pH, 取 3 次重复平均值。

1.2.3 酿酒酵母对香豆素的微生物转化过程

将酵母接种于装有 80 mL 培养液的 250 mL 摇瓶中, 悬浮震荡培养, 待其生长进入对数生长期中期时, 加入香豆素。步骤如下: 在无菌条件下, 吸取酵母培养液 2 mL 逐滴加入 1 mg/mL 香豆素溶液, 轻轻摇晃, 然后将此混合液慢慢加入上述培养液中即可。上述条件下震荡培养 100 h 后终止转化培养。

1.2.4 转化产物的提取分离

酿酒酵母转化培养 100 h 后取酵母培养液, 25 °C 下 2000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀细胞。沉淀的酵母细胞溶解在 30 mL 的蒸馏水中经超声波细胞破碎仪破碎 10 min 以后, 加入 10 mL 乙酸乙酯中止反应, 连续萃取 3 次, 萃取液合并。乙酸乙酯萃取物在 40 °C 的旋转蒸发仪上浓缩至干, 经甲醇溶解后, 带状点样于薄层板上, 取对照样品 (酿酒酵母培养液和香豆素溶液) 随行点样。

2 结果与分析

2.1 不同起始细胞培养密度下酿酒酵母悬浮培养细胞的形态和生长曲线

本实验设计 3 个起始细胞培养密度梯度: 1 号: 8.0×10^6 个/mL, 2 号: 2.0×10^7 个/mL, 3 号: 4.0×10^7 个/mL, 分析起始密度对细胞培养周期的影响。

在酿酒酵母细胞一个悬浮培养周期 (约 20 d) 内, 不同细胞起始密度下, 其各个生长时期的长短和到达对数生长期的时间有明显差别 (图 1)。

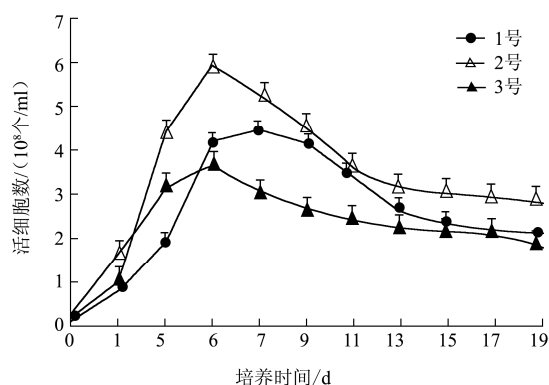


图 1 不同起始细胞密度对酿酒酵母生长曲线变化的影响

Fig.1 Effect of primary cultural density to growth curve of yeast cell

从图 1 可看出, 起始密度为 8.0×10^6 个/mL 时, 酿酒酵母细胞的生长延滞期短, 对数生长期和静止期延长, 细胞密度最大为 4.48×10^8 个/mL, 衰亡期长而缓慢。起始密度为 2.0×10^7 个/mL 时, 生长延滞期短, 对数生长期提前, 静止期极短, 之后迅速进入衰亡期, 衰亡期短而迅速。起始密度为 4.0×10^7 个/mL 时, 没有出现延滞期, 直接进入对数生长期, 静止期很短, 细胞密度最小 (3.7×10^8 个/mL), 衰亡期长而缓慢。因此, 起始细胞密度为 8.0×10^6 个/mL 的酿酒酵母悬浮系的对数生长期与静止期时间较长, 衰亡期长而缓慢, 是最适合的转化起始密度。

表 1 不同起始密度和培养时间对酵母细胞形态和生长的影响

Table 1 Effect of the primary density and cultural time to character and growth of yeast cell

培养时间/d	酵母细胞生长特征		
	8.0×10 ⁶ 个/mL	2.0×10 ⁷ 个/mL	4.0×10 ⁷ 个/mL
1	细胞分裂缓慢, 均一, 圆形	分裂极旺, 细胞大小较均一	分裂较旺, 有超大裂殖细胞
2~4	分裂出芽旺盛, 单个小细胞极少	分裂出芽旺盛, 小细胞增多, 出芽细胞占 85%以上	出芽旺盛, 小细胞增多, 出芽细胞占 85%以上
5~10	分裂出芽旺盛, 单个小细胞增多, 大小不均	单个小细胞增多, 出芽细胞逐渐减少, 小而均一	单个小细胞增多, 大小均一, 出芽细胞逐渐减少
10~22	分裂出芽减少, 大小不均, 有裂解细胞	有出芽, 大小均一, 出现裂解细胞	出芽极少, 大小不均, 裂解细胞增多

2.2 不同细胞起始密度对培养液 pH 值变化的影响

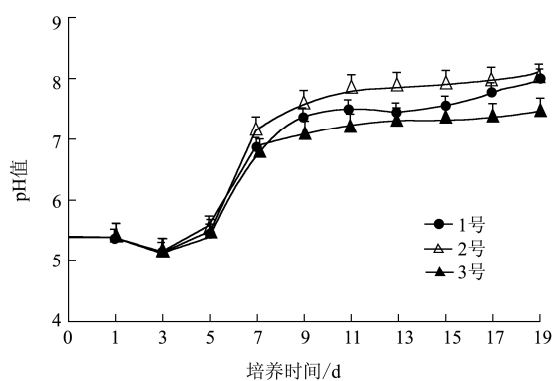


图 2 不同细胞起始密度对酿酒酵母培养液 pH 值变化的影响

Fig.2 Effect of primary cultural density to pH value of yeast cell cultural dissolve

如图 2 所示, 不同细胞起始密度下, 酿酒酵母培养液 pH 值均是先降低后持续升高, 13 d 后趋于平缓。这是因为在生长周期前期, 酿酒酵母细胞生长代谢旺盛, 呼吸强度大, 有机酸的释放较多, 加之该阶段酿酒酵母细胞主要以 NH₄⁺为氮源, 所以 pH 降低。后期 pH 的升高是由于氮源 NH₄⁺利用完后, 酿酒酵母细胞主要以 NO₃⁻作为氮源, 硝酸盐的消耗使培养基趋向碱性, 因而使 pH 持续升高。不同起始培养密度对 pH 值变化影响无明显差异。

2.3 酿酒酵母细胞悬浮培养体系对香豆素 (HA-1) 的生物转化与薄层层析鉴定

香豆素包含香豆素 A 和 B 两种物质, 因其极性极为相似, 在薄层层析图谱中表现为一个点。从图 3 可以看出, 薄层层析板上共出现了 5 种不同颜色的显色点。在上清液萃取物和细胞沉淀萃取物泳道上分别出现了 2 个和 4 个与香豆素标样、酵母空白对照的 Rf 值均不相同的显色点, 其 Rf 值分别为: 0.074、0.353、0.485、0.647、0.706, 其中两者间有 1 个显色点的 Rf 值 (0.706) 相同, 4 个显色点的 Rf 值 (0.074、0.353、

0.647、0.735) 不相同; 而且对比 2、3 泳道说明香豆素已进入了酵母细胞内, 并发生了改变。这可以初步认定酵母悬浮培养体系对香豆素可能具有吸收和转化作用。

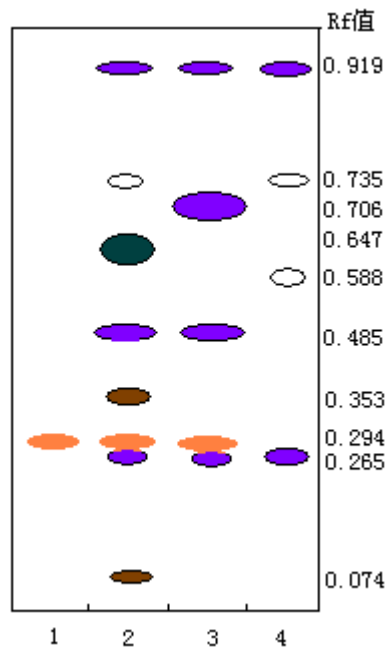


图 3 酿酒酵母转化香豆素的薄层层析鉴定图谱及 Rf 值

Fig.3 The atlas of thin-layer chromatography identification and Rf value after Coumarins was biotransformed by yeast cell

注: 1 为香豆素标样, 2 为上清液萃取物, 3 为细胞沉淀萃取物, 4 为酵母空白对照。吸附剂: 硅胶 H-60; 展开剂为氯仿: 甲醇=15:1; 显色剂: 8%浓硫酸乙醇溶液

3 讨论

生物界许多基本代谢途径和酶系是相同的, 而酵母由于其繁殖和基础代谢迅速, 体内酶体系相对简单,

而成为生物转化和生物合成,尤其是天然药物活性成分生物转化研究中最重要转化材料,应用酿酒酵母悬浮培养转化体系对植物天然药物活性成分进行生物转化研究目前尚不多见。

本实验通过对酿酒酵母(*Sacharomyces cerevisiae*)悬浮培养转化体系以及该体系对两种香豆素的微生物转化研究得出:(1)生长曲线是酿酒酵母悬浮培养转化体系的重要生长状态指标,对后期培养的不同步化控制以及转化效率有重要指导意义。(2)悬浮培养过程中可适当降低起始细胞培养密度,有利于延长对数生长期与静止期的时间,该实验中,起始密度为 8×10^6 个/mL 时最适作为药物转化体系的起始密度。(3)虽然不同起始培养密度对 pH 值变化影响无明显差异,但酵母细胞生长的最适 pH 值为 4.5~5.5,最低为 2.0~3.0,最高为 7.0~8.0。而该实验中培养后期 pH 值已达到 8.08,已超过了最高 pH 值。因此,实验中应该根据不同生物转化需要,适当降低起始培养的 pH 值,可能更有利于延长对数生长期与静止期的时间。(4)确定酿酒酵母的最适生物转化体系为:黑暗条件下起始细胞培养密度为 8×10^6 个/mL,温度 27 ± 1 °C,转速 110 r/min, pH 值为 4.5~5.5。

另外,根据酿酒酵母细胞悬浮培养体系对香豆素的生物转化与薄层层析鉴定图谱表明香豆素已进入了酵母细胞内并发生了改变,并可初步认定酵母悬浮培养体系对香豆素可能具有吸收和转化作用,但尚不能排除薄层层析图谱中出现的特异点不是因为加入香豆素后酿酒酵母细胞代谢发生变化而诱导产生的产物。

因此,要得到确定的结论还要对其产物进行进一步的分离、纯化鉴定研究。另外,香豆素是如何进入酵母细胞并产生变化的原因也都有待进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Wendy A, Loughlin. Biotransformation in organic synthesis [J]. *Bioresource Technol.*, 2000,74:49-62
- [2] Greg O.Buchanan, Paul B.Reese. Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159 [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56:141-151
- [3] Kaoru Nakamura, Keishi Takenake, Mikio Fujii, et al. Asymmetric synthesis of both enantiomers of secondary alcohols by reduction with a single microbe [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43:3629-3631
- [4] Ken-ichi Fuhshuku, Nobutaka Funa, Tomohiro Akeboshi, et al. Access to Wieland-Miescher ketones in an enantiomerically pure form by a Kinetic resolution with yeast-mediated reduction [J]. *J. Org. Chem.*, 2000,65:129-135
- [5] 朱彤波,陈军,张益,等.提高三角酵母细胞 DAO 表现活力的透性化研究[J].*生物工程学报*,2001,17(1):73-75
- [6] 刘惠,林建平,吴坚平,等.酿酒酵母生物转化蛋氨酸生产 S-腺苷-L-蛋氨酸[J].*化学反应工程与工艺*,2002,18(4):310-314
- [7] Rosazza, J. P. N. *Microbial Transformations Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, fourth Edition, John Wiley & Sons [J]. Inc. 1995,16:611-615

调味品优劣鉴别

优质酱油: 倒入无色杯内,对光看,其为红褐或棕褐色,有光亮;倒入白瓷碗,汁黏稠度一致,再倒出时碗壁附着一层酱油;有香气,口尝有鲜味、咸味和甜味。

劣质酱油: 呈黄褐色,液面暗淡无光,汁液稀薄,对光可见悬浮物和沉淀物,香气淡,口味上有酸、苦、涩、焦、霉味。

优质食醋: 具有应有色泽(如熏醋为棕红色或深褐色,白醋为无色透明),有光泽,香气(为熏醋、熏香醋共有),酸味柔和,回味绵长,浓度适当,无沉淀悬浮物及霉花浮膜。

劣质食醋: 色浅淡,发乌,无香味,口味单薄,除酸味还有明显苦涩味,有沉淀或悬浮物。

假食醋: 冰醋酸兑水配制。可取 2 毫升在试管中加高锰酸钾 0.5 毫升搅匀,高锰酸钾褪色为真,反之为假。外观颜色浅淡,开瓶酸气冲眼睛,无香味,口味单薄,除酸味外还有明显苦涩味,常有沉淀或悬浮物。

优质味精: 取少量放在舌头上,感到冰凉,味道鲜美,有鱼鲜味;从外观上看,颗粒形状一致,色洁白有光泽,颗粒松散。

劣质味精: 颗粒大小不一,色发乌、发黄,甚至颗粒成团。

掺假味精: 品尝咸味大于鲜味,是掺食盐;如有苦味是掺氯化镁、硫酸镁;甜味是掺白砂糖;难于溶化又有冷滑黏糊之感是掺了木薯粉或石膏粉。【新闻来源】市场报