

研究简报

渗透压敏感和耐高渗酵母菌在海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠微囊中的生长和代谢

宁小娟^{1,2}, 孙志杰¹, 钟盛华², 林军章¹, 吕国军¹, 于炜婷¹, 朱静¹, 王为¹, 马小军¹

1 中国科学院大连化学物理研究所生物医学材料工程组, 大连 116023

2 江西农业大学理学院, 南昌 330045

摘要: 为了研究微囊微环境中渗透压对微囊内不同渗透压敏感性细胞生长、代谢的影响, 分别以渗透压敏感型酿酒酵母 Y02724 与耐高渗酵母 Hansel 为细胞模型, 考察了有氧条件下这两种细胞在海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸钠 (Alginate-chitosan-alginate, ACA) 微胶囊中的生长、代谢状态。主要检测了细胞比生长速率、最大产物生成量以及代谢物乙醇、甘油分泌量等的变化。实验结果分析表明, 渗透压胁迫可能是导致不同渗透压敏感性细胞在微囊微环境中生长代谢特征变化的因素之一, 即微囊微环境内可能存在渗透压胁迫。

关键词: 酵母, 渗透压胁迫, ACA 微囊, 微囊微环境, 生长代谢

Growth and Metabolism of Osmo-sensitive Yeast Y02724 and High-osmotic Resistant Yeast Hansel in Alginate-chitosan-alginate Microcapsules

Xiaojuan Ning^{1,2}, Zhijie Sun¹, Shenghua Zhong², Junzhang Lin¹, Guojun Lü¹, Weiting Yu¹, Jing Zhu¹, Wei Wang¹, and Xiaojun Ma¹

1 Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2 College of Science, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: To study the effect of the osmotic stress in the microenvironment on the growth and metabolism of the encapsulated cells under aerobic condition, Osmo-sensitive yeast Y02724 and high-osmotic resistant yeast Hansel were used as models to explore the growth and metabolism state of the cells cultivated in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules. The changes of the yeast cells' specific growth rate, maximum product quantity and the secretion of ethanol and glycerol were analyzed. For Y02724, the yield of ethanol was increased in the ACA microenvironment compared to suspension cultivation. For Hansel, the maximum growth speed of microencapsulated cultivation had no obvious difference compared to the suspension cultivation. Moreover, after encapsulation, the production of glycerol was decreased for both Y02724 and Hansel compared to suspension cultivation. In conclusion, osmotic stress existed in the ACA microcapsules and affected the growth and metabolism of the cells.

Keywords: yeast, osmotic stress, alginate-chitosan-alginate microcapsule, microenvironment, growth and metabolism

Received: October 29, 2007; **Accepted:** January 16, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 20736006), "Eleventh · Five" National Key Technology R & D Program (No. 2006BAD27B04), the National Basic Research Program of China (No. 2007CB714305), and the Youth Talent Science Foundation of Dalian City (No. 2007J23JH036).

Corresponding author: Xiaojun Ma. Tel: +86-411-84379139; Fax: +86-411-84379139; E-mail: maxj@dicp.ac.cn

国家自然科学基金重点基金 (No. 20736006), "十一五" 国家科技支撑计划项目 (No. 2006BAD27B04), 国家科技部 "973" 项目 (No. 2007CB714305), 大连市青年科技人才基金 (No. 2007J23JH036) 资助。

随着对生物技术和膜技术研究及认识的不断深入,微胶囊的应用领域正在不断拓宽,应用前景非常广阔。作为一种极有前途的载体,微胶囊已被用于动物细胞培养、细胞和酶的固定化、生化药物控制释放、抗癌药物筛选、人工器官及基因运载工具等生物医学领域^[1,2]。海藻酸盐、壳聚糖等天然多糖资源丰富、制备简单、价格便宜,极具作为生物微胶囊制备材料的潜力。将天然材料与合成高分子混合作为一种材料,既利用合成材料弥补天然材料强度不足,又利于弥补合成材料生物相容性较差的缺点。由于壳聚糖在自然界大量存在,其价格比聚赖氨酸低近 2500 倍^[3,4],同时它具有良好的生物相容性,因此,海藻酸钠-壳聚糖-海藻酸(Alginate-chitosan-alginate, ACA)微胶囊越来越广泛地应用于微生物固定化培养领域。

与悬浮培养环境相比,微囊为细胞提供了一个具有不同物质和环境梯度的特殊微环境,微囊微环境对囊内细胞的生长、代谢状况具有至关重要的影响。前人的研究表明,微囊微环境可以显著增强酿酒酵母细胞的抵抗高渗透压胁迫、氧化胁迫、乙醇胁迫以及热胁迫的能力。微囊微环境对细胞的驯化作用在微囊化细胞抗胁迫过程中发挥重要作用,而且微囊微环境对细胞还产生了一种胁迫作用,这种胁迫作用增强了细胞对抗外界环境高强度胁迫的能力^[5]。由于在细胞生物学等基础科学领域,酵母菌被作为研究真核细胞的重要模式细胞,因此,研究酵母菌在微囊中的生长代谢规律具有重要的意义。本文比较了渗透压敏感酿酒酵母 Y02724 与耐高渗的酵母 Hansel 在微囊微环境中的生长行为及其代谢产物的变化,有助于了解微胶囊微环境对细胞生长行为和代谢特性的影响,从而为完善 ACA 微囊的制备和应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

耐高渗酵母 Hansel(*Hansenula arabitoligenes* Fang 阿拉伯糖醇汉逊酵母,购自广东微生物研究所)和渗透压敏感酵母 Y02724 (BY4741; Mat a; his3 1; leu2 0; met15 0; ura3 0; YLR113w::kanMX4)(购自 Euroscarf) 均培养在葡萄糖浓度为 2% 的 YPD 培养基中,培养温度为 28℃。

壳聚糖经本实验室改性,脱乙酰度为 96%~98%。海藻酸钠购自青岛晶岩生物科技发展有限公司,使用前经滤膜过滤。其他试剂均为化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 Hansel 和 Y02724 的渗透压敏感性分析

将培养至对数生长期的 Hansel 和 Y02724 以合适密度均匀涂于含有不同浓度 NaCl 的 2% 琼脂-YPD 培养皿上,30℃ 下倒置静止培养 3~7 d,计数克隆数量,并计算克隆形成率(CFU)^[6]。

1.2.2 ACA 非凝胶化核心 ACA 微囊的制备

参照王勇等^[7]制备 ACA 微胶囊的方法略加改动。将悬浮培养所得的对数生长期的酿酒酵母经离心分离后,与浓度为 1.5%(W/V)的海藻酸钠均匀混合。在自制的大规模液滴发生器的作用下滴入 100 mmol/L 的氯化钙溶液中进行凝胶化反应,制备海藻酸钙凝胶珠,然后与 0.5%(W/V)的壳聚糖溶液进行成膜反应,最后用 0.05%(W/V)的海藻酸钠覆膜,以 55 mmol/L 的柠檬酸钠液化其内核。

1.2.3 微囊化酿酒酵母的有氧培养

0.8 mL ACA 微囊(微囊化 Hansel 和 Y02724)接入盛有 3.2 mL 葡萄糖浓度为 12.5 g/L 的 YPD 培养基的有氧培养瓶中,置于恒温振荡培养箱中,30℃,170 r/min 培养,每隔 3 h 取样、并测葡萄糖浓度,直到葡萄糖耗尽、停止培养,收集微囊并测定细胞密度。将同样数量的 Hansel 和 Y02724 接入 4 mL 葡萄糖浓度为 10 g/L 的 YPD 培养基中作为悬浮对照,培养条件同微囊化细胞。

1.2.4 发酵液成分分析

葡萄糖生物传感分析仪(SBA-40C, 山东科学院生物研究所)测定发酵液中葡萄糖浓度。气相色谱法(GC7890F, 上海天美公司)测定乙醇含量。HPLC (Waters)测定甘油含量,方法参看文献[8]。

1.2.5 细胞密度和细胞干重测定

破囊液处理释放 ACA 微囊中细胞^[8],3000 r/min 离心,分光光度计 600 nm 波长下测定细胞密度,称重法测定细胞干重。

1.2.6 参数计算

各种代谢参数由本实验室建立的修改后的 Richard 数学模型拟和,该模型是适合微囊化细胞专用的数学模型,具体推导方法参看文献[9]。

葡萄糖消耗模型:

$$S = S_0 \left\{ 1 - \left\{ 1 + (m-1)e^m \exp \left[\frac{R_{ms}}{S_0} m^{m-1} (\lambda - t) \right] \right\}^{\frac{1}{1-m}} \right\}$$

式中 S 为底物浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); S_0 为底物初始浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); m 为常数; R_{ms} 为底物最大消耗速率($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), λ 为葡萄糖消耗延迟时间(h)。

细胞生长模型:

$$X = A \cdot \left\{ 1 + (m-1)e^m \exp \left[\frac{\mu_m}{A} m^{m-1} (\lambda - t) \right] \right\}^{\frac{1}{1-m}}$$

A 为最大细胞数量(OD/mL); μ_m 为最大比生长速率(h^{-1}); m 为常数; λ 为葡萄糖消耗延迟时间(h)。

产物合成模型:

$$P = K_p \left\{ 1 + (m-1)e^m \exp \left[\frac{R_{mp}}{K_p} m^{m-1} (\lambda - t) \right] \right\}^{\frac{1}{1-m}}$$

K_p 最大产物生成量; R_{mp} 为最大产物生成速率; m 为常数; λ 为产物生成延迟时间(h)应用 Matlab 软件最小二乘法计算各种参数。每个实验数据均有三个平行样并以 $\bar{X} \pm S$ 表示。

2 结果

2.1 Hansel 和 Y02724 的渗透压敏感性

实验首先考察 Hansel 和 Y02724 两种菌对渗透压的敏感程度, 实验结果如图 1 所示, Hansel 细胞的克隆形成率(CFU)随着盐浓度的上升而缓慢下降, 直到盐浓度超过 1 mol/L 后其 CFU 才显著下降, CFU 为 10% 时所对应的盐浓度大约为 1.7 mol/L, 到 1.75 mol/L 时活率不再变化。而 $hog1^{[10]}$ 基因敲除的酿酒酵母细胞系 Y02724 表现出显著的渗透压敏感性, 其 CFU 从盐浓度为 0.25 mol/L 开始急剧下降, 到 0.5 mol/L 时, 活率接近零, 由此可知 Y02724 和 Hansel 的渗透压敏感性差异非常显著, 故可以用这两种菌作为研究微囊内渗透压胁迫环境的模型。

2.2 微囊化培养和悬浮培养条件下不同渗透压敏感细胞的生长和代谢变化

2.2.1 细胞生长

有氧条件下, 渗透压敏感细胞 Y02724 在微囊中的生长规律与悬浮培养显著不同($P < 0.05$), (图 2, 表 1), 即其最大比生长速率是悬浮培养的 1/2, 且最大生物量相当于悬浮培养的 80%。而微囊化 Hansel 的最大比生长速率 0.6003 与悬浮培养的 0.7264 相比

无显著差异($P > 0.05$), 最大生物量约为悬浮培养的 2.3 倍。微囊化 Y02724 的延迟时间与悬浮培养相比显著延长, 而 Hansel 的两种培养方式的延迟时间相差不大(表 1)。由此可知, 有氧条件下微囊微环境显著抑制了渗透压敏感细胞的生长, 但对于耐高渗的 Hansel 来说微囊化生长却占优势, 即说明微囊对其内部生长的细胞可能具有渗透胁迫作用。

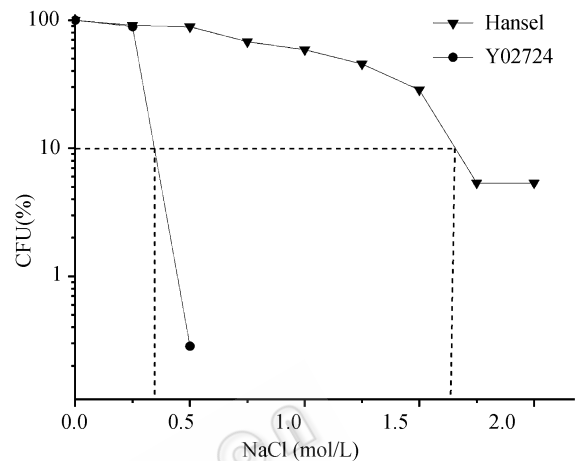


图 1 Y02724 和 Hansel 的渗透压敏感性

Fig. 1 Osmo-sensitivity of the yeast Y02724 and Hansel

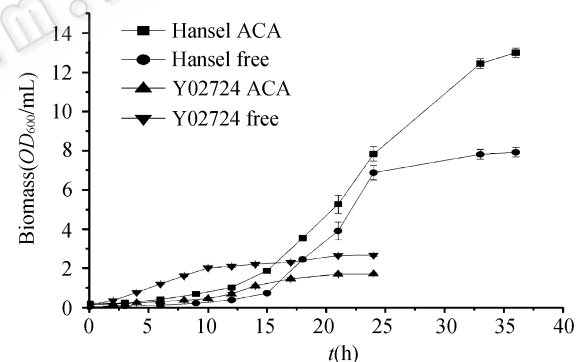


图 2 Y02724 和 Hansel 在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的生长行为变化

Fig. 2 Growth behavior of Y02724 and Hansel cultivated in microcapsules compared with suspended cultivation

表 1 Richard 模型模拟的 Y02724 和 Hansel 在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的生长和代谢参数

Table 1 Parameter of the growth and metabolism of Y02724 and Hansel cultivated in microcapsules compared with suspended cultivation simulated by Richard modle

		Maximum biomass	Maximum specific growth rate	Dely time
Y02724	Free	2.6685	0.2166	0.4304
	ACA	2.1799	0.1075	4.2694
Hansel	Free	8.3348	0.6003	14.135
	ACA	19.4425	0.7264	13.3066

2.2.2 葡萄糖消耗和乙醇生成

不同培养方式下 Y02724 细胞最大葡萄糖消耗速率(R_{ms})微囊化培养为 0.1546 略低于悬浮培养的 0.1724; 而在微囊微环境中耐高渗细胞 Hansel 的葡萄糖最大消耗速率 4.1245 显著低于悬浮培养的值 3.964(图 3, 表 2)。

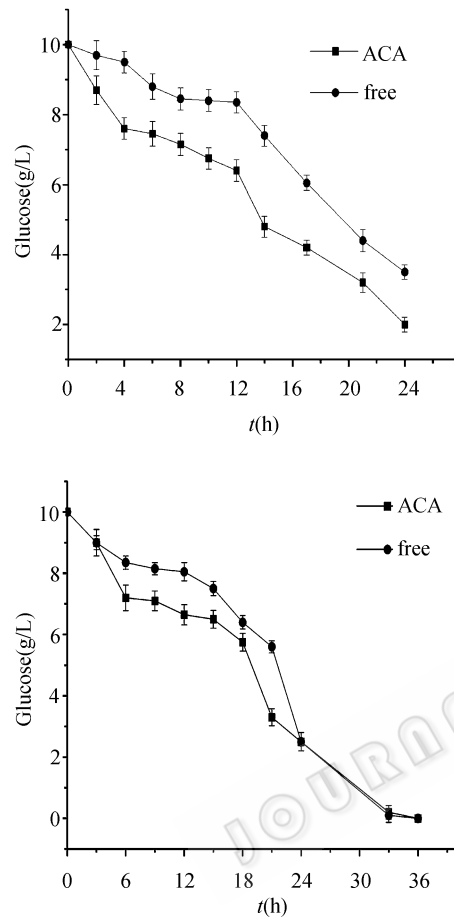


图 3 Y02724 和 Hansel 在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的葡萄糖代谢曲线

Fig. 3 Metabolism of glucose of Y02724 and Hansel cultivated in ACA microcapsules compared with suspended cultivation

表 2 Y02724 和 Hansel 在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的葡萄糖代谢参数

Table 2 Parameter of metabolism of glucose of Y02724 and Hansel cultivated in ACA microcapsules compared with suspended cultivation

		Maximum specific consumption rate	Dely time
Y02724	Free	0.1724	3.964
	ACA	0.1546	4.1245
Hansel	Free	0.4319	2.3761
	ACA	0.2483	2.1209

乙醇是酿酒酵母细胞的主要分泌产物, 不同培养方式使得渗透压敏感菌 Y02724 的乙醇分泌量显著变化。Richard 模型拟合结果结合实验结果表明, 微囊化培养增加了渗透压敏感的酿酒酵母细胞 Y02724 的乙醇产量和产物生成速率(图 4, 表 3), 延迟时间大大缩短。而对于耐高渗菌株 Hansel 不产乙醇。

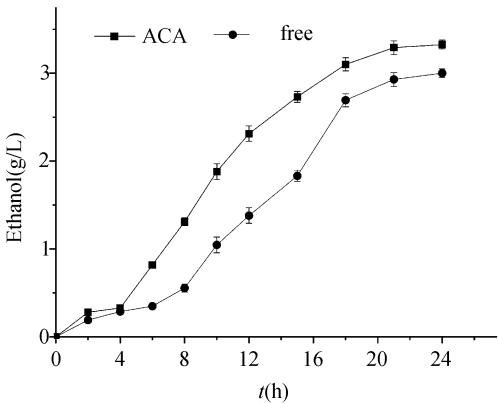


图 4 Y02724(渗透压敏感菌)在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的乙醇生成量变化

Fig. 4 Output of ethanol produced by Y02724 cultivated in ACA microcapsules compared with suspended cultivation

表 3 Y02724 在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的乙醇代谢参数

Table 3 Parameter of the metabolism of ethanol of Y02724 cultivated in ACA microcapsules compared with suspended cultivation

		Maximum producing rate	Dely time	Maximum product quantity
Y02724	Free	0.2273	6.1312	3.1064
	ACA	0.2648	3.0107	3.4284

因此, 与悬浮培养相比微囊化 Y02724 和 Hansel 的葡萄糖消耗速率均降低, 即在微囊微环境中两种细胞的生长均受到抑制; 但对于能产乙醇的 Y02724 来说, 微囊微环境有助于增加乙醇的生成速率和产量。

2.2.3 代谢产物得率分析

微囊化 Y02724 的乙醇得率达到 0.4157 g/L 葡萄糖, 较悬浮培养增加了约 40%。而 Hansel 酵母由于能在代谢过程中利用乙醇作为碳源, 所以不产乙醇。微囊化 Hansel 和微囊化 Y02724 的生物质得率均高于悬浮培养(见表 4)。由于甘油是与渗透压胁迫密切相关的代谢产物^[13], 因此考察了微囊环境对于甘油产率的影响。较悬浮培养, 微囊化 Hansel 的甘油得率降低了 50%, 微囊化 Y02724 的甘油得率降

低了 30.6%，这是因为在细胞与 ACA 微囊微环境接触后，由于微囊微环境胁迫效应的存在，细胞需要在胞内积累甘油以对抗胁迫环境，所以微囊化细胞分泌的甘油得率较低^[11]。

表 4 Y02724 和 Hansel 在 ACA 微囊培养和悬浮培养下的葡萄糖产物得率分析

Table 4 Obtainment rate of glucose of Y02724 and Hansel cultivated in ACA microcapsules compared with suspended cultivation

		Obtainment rate of glucose(g/L)		
		Biomass	Ethanol	Glycerol
Y02724	Free	0.34	0.3	0.005
	ACA	0.3875	0.4157	0.0035
Hansel	Free	0.143	—	0.0189
	ACA	0.173	—	0.0094

3 讨论

不同渗透压敏感细胞系在 ACA 微囊微环境中的生长代谢行为表明，微囊微环境中可能存在渗透压胁迫作用，因为与悬浮培养相比，微囊化培养的渗透敏感菌株 Y02724 的最大生物量及最大产物生成速率均显著降低，即渗透压敏感酿酒酵母的生长明显受到 ACA 微囊微环境的抑制(图 2)。而与之相对的，由于耐高渗的菌株 Hansel 对囊内的渗透胁迫不敏感，在其微囊化后生长速率与悬浮培养相比变化不大，其微囊化的最大生物量反而高于悬浮培养的结果，因此可知微囊微环境内存在渗透压胁迫。另外试验也发现细胞抗胁迫物质(甘油)^[12,13]因 ACA 微囊微环境的变化而变化，如甘油的得率分析表明，在有氧条件下不论是 Y02724 还是 Hansel 其微囊化甘油得率均低于悬浮培养，即进一步说明了微囊微环境中的渗透压胁迫作用较明显。由于微胶囊膜是一种选择性半透膜，小分子离子是可以自由通过的，因此，微囊内的渗透压应该是由非小分子物质引起，分析可能是海藻酸钠，壳聚糖等大分子引起的胶体渗透压。

研究结果表明在微囊的特殊微环境中不同特性的细胞具有不同的生长代谢行为，例如渗透压敏感的酿酒酵母其乙醇产量显著上升，而耐高渗酵母的最大生物量显著增加。这就提示可以根据不同的目的，选择具有不同表型的细胞进行微囊化培养，以发挥细胞和微囊的最大优势，另外也可以调整微囊

制作方法以产生具有不同特殊微环境的微囊以适应细胞生长的需要。

REFERENCES

- [1] Wang J, Liu P, Qian Y. Biodegradation of phthalic acid esters by immobilized microbial cells. *Environmental International*, 1997, **23**(6): 775–782.
- [2] Wang W, Liu XD, Xie YB, *et al.* Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *Journal of Material Chemistry*, 2006, **16**(32): 3252–3267.
- [3] Ramadas M, Paul W, Dileep KJ, *et al.* Lipoinulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetics rats. *Journal of Microcapsulation*, 2000, **17**(4): 405–411.
- [4] Liu XD, Yu WY, Zhang Y, *et al.* Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *Journal of Microencapsulation*, 2002, **19**(6): 775–782.
- [5] Sun ZJ, Lü GJ, Li SY, *et al.* Differential role of microenvironment in microencapsulation for improved cell tolerance to stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75**(6): 1419–1427.
- [6] Blomberg A. The osmotic hypersensitivity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is strain and growth media dependent: quantitative aspects of the phenomenon. *Yeast*, 1997, **13**(6): 529–539.
- [7] Wang Y, Xie YB, Ma XJ. Progress of studies on chitosan alginate microcapsule. *Progress in Biotechnology*, 1999, **19**(2): 13–15.
- [8] Sun ZJ, Lü GJ, Li SY, *et al.* Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Journal of Biotechnol*, 2007, **128**(1): 150–161.
- [9] Qi WT, Ma J, Yu WT, *et al.* Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate(ACA) microcapsules. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **38**(5): 697–704.
- [10] Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology Molecular. Biology Review*, 2002, **66**(2): 300–372.
- [11] Tsujimoto Y, Izawa S, Inoue Y. Cooperative regulation of *DOG2*, encoding 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase, by Snf1 kinase and the high-osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade in stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 2000, **182**(18): 5121–5126.
- [12] Onishi H. Studies on osmophilic yeasts Part XV. The effects of high concentration of sodium chloride on polyol production. *Agr Biol Chem*, 1963, **27**(7): 543–547.
- [13] Tamás MJ, Rep M, Thevelein JM, *et al.* Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett*, 2000, **472**(1): 159–165.