

酿酒酵母产乙醛脱氢酶发酵条件的研究

吴桂英¹,金 放²,吴元欣²

(1.黄石理工学院化学与材料工程学院,湖北 黄石 435003;2.武汉工程大学化工与制药学院,湖北 武汉 430073)

摘 要: 选择了一株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 菌 As 2.399,通过单因素和正交实验得到酿酒酵母产乙醛脱氢酶(Aldehyde Dehydrogenase, ALDH)的最优发酵条件。结果表明,产 ALDH 的最优培养条件为温度 30 ℃、pH 值为 6、通气量为 200 mL、接种量为 7%。液体发酵培养中 pH 值对 ALDH 活性的影响最大。

关键词: 酿酒酵母; 乙醛脱氢酶; 发酵

中图分类号:TS261.1 Q93-3 Q55

文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2009)05-0026-03

Study on the Fermentation Conditions for Aldehyde Dehydrogenase Production by *Saccharomyces cerevisiae*

WU Gui-ying¹, JIN Fang² and WU Yuan-xin²

(1.School of Chemical & Materials Engineering, Huangshi Institute of Technology,Huangshi,Hubei 435003; 2.Chemical Engineering & Pharmacy College of Wuhan Engineering University, Wuhan, Hubei 430073, China)

Abstract: A strain yeast *Saccharomyces cerevisiae* As2.399 was selected to produce ALDH. The fermentation conditions of yeast were optimized by single factor and orthogonal test. The results showed that high quality ALDH could be produced when the temperature was at 30 ℃,the initial pH value was 6.0, and 20 mL air flow and 7 % inoculation quantity.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; aldehyde dehydrogenase; fermentation

乙醇在人体内的代谢主要靠体内的两种酶^[1],一种是乙醇脱氢酶(Alcohol Dehydrogenase, ADH),另一种是乙醛脱氢酶。前者使乙醇转化为乙醛,后者使乙醛进一步转化为乙酸,最终分解为二氧化碳和水。人体中,一般都存在前一种酶,而且数量基本是相等的。但缺少后一种酶的人就比较多,ALDH 的缺少,使乙醇不能被完全分解为水和二氧化碳,而是以乙醛的形式继续留在体内。有资料表明^[2],乙醛在人体内的过度堆积是醉酒的主要原因。目前,ALDH 主要是从动物的肝脏、胰腺或肝细胞线粒体中分离提取,但其资源有限且价格昂贵,因此很难大规模生产。为了拓展 ALDH 的来源,国内外科学工作者开始探索从微生物细胞中提取 ALDH。由于微生物发酵的生产周期短,培养基价格低廉,酶制剂可以实现大规模、低成本的工业化生产,因此利用微生物细胞中提取 ALDH 具有很大的市场前景。目前,已知酿酒酵母菌是高产 ALDH 的菌株,本文从中国普通微生物菌种保藏中心选择了一株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 菌 As 2.399。采用恒温振荡培养箱进行液体的扩大培养,通过单因素和正交实验得到酿酒酵母产乙醛脱氢酶的最优发

酵培养条件,使目标产物乙醛脱氢酶的活性较高。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

菌种:酿酒酵母 AY92022 (*Saccharomyces cerevisiae* AY92022)。

YEPD 固体培养基:蛋白胨 2%,酵母膏 1%,葡萄糖 2%,琼脂 2%,pH6.0,121 ℃,灭菌 20 min。

液体培养基:蛋白胨 0.5%,酵母膏 0.3%,麦芽汁 0.3%,pH5.5,121 ℃,灭菌 20 min。

1.2 种子的培养

挑取单菌落接种于 5 mL 的液体培养基中,28 ℃摇床培养 16 h,摇床转速为 200 r/min。

1.3 摇床发酵培养

将培养好的种子液按一定的接种量接入三角瓶中,在摇床的不同温度 and 不同转速下培养。

1.4 乙醛脱氢酶(ALDH)活性的测定^[3~8]

在 340 nm 处测定 ALDH 催化乙醛脱氢生成乙酸所用的酶量。定义 1min $A_{340\text{nm}}$ 增加 0.001 为 1 个活力单

基金项目 湖北省国家科技合作重点项目计划(006CA013),黄石理工学院院级项目(08yjz13Q)。

收稿日期:2009-02-24

作者简介 吴桂英(1979-),女,湖北红安人,讲师,研究方向:生物化工。

位(U)。

2 结果与分析

2.1 产酶单因素实验

2.1.1 初始 pH 值对 ALDH 酶形成的影响

将 20 mL 产酶培养基的初始 pH 值分别调至 3、4、5、6、7、8、9 和 10,按前述方法接种,培养 16 h 后,测定生物量 ALDH 的酶活,结果见表 1。

表 1 初始 pH 值对乙醛脱氢酶形成的影响

初始 pH 值	生物量 (mg 湿细胞/mL)	总活性 (U/mL)	比活力 (U/mg 湿细胞)
3	31.532	0.331	0.011
4	39.832	0.454	0.011
5	40.242	0.546	0.014
6	43.150	0.476	0.011
7	38.489	0.421	0.011
8	33.331	0.364	0.011
9	27.998	0.315	0.011
10	25.541	0.284	0.011

由表 1 的结果可看出,初始 pH 值在 4~6 之间时菌体的生长最佳,初始 pH 值对菌体生长和总产 ALDH 酶量的影响较大,但对比活力的影响不是很大。

2.1.2 通气量对 ALDH 形成的影响

在容量 100 mL、150 mL、200 mL、250 mL 和 300 mL 的锥形摇瓶中分别装入 20 mL 的产酶培养基,按前述方法接种,培养 16 h 后,测定生物量,收集菌体,破菌测定 ALDH 的酶活,结果见表 2。

表 2 通气量对乙醛脱氢酶形成的影响

装量 (mL)	生物量 (mg 湿细胞/mL)	总活性 (U/mL)	比活力 (U/mg 湿细胞)
100	30.187	0.315	0.010
150	36.866	0.369	0.010
200	41.025	0.487	0.012
250	45.863	0.529	0.012
300	49.351	0.372	0.008

从表 2 中可以看出,通气量越大,菌体生长越好。但通气量过大时产 ALDH 的酶量和比活力反而下降。

2.1.3 培养温度对 ALDH 形成的影响

取 20 mL 的产酶培养基,按前述方法接种,在不同温度下培养 16 h,其他条件不变,测定生物量后,收集菌体,破菌测定 ALDH 的酶活,结果见表 3。

表 3 培养温度对乙醛脱氢酶形成的影响

培养温度 (°C)	生物量 (mg 湿细胞/mL)	总活性 (U/mL)	比活力 (U/mg 湿细胞)
20	31.210	0.265	0.008
25	41.886	0.347	0.008
30	48.241	0.543	0.011
35	42.113	0.486	0.012
40	34.354	0.222	0.006

从表 3 可以看出,酵母菌是一个中温菌,30 °C 左右是其生长和产 ALDH 酶的最适温度。

2.1.4 接种量对 ALDH 酶形成的影响

选用不同的接种量(v/v,%),添加在 20 mL 的产酶培养基中,在 30 °C、200 r/min 的摇床上培养 16 h,测定生物量后,收集菌体,破菌测定 ALDH 的酶活,结果见表 4。

表 4 接种量对乙醛脱氢酶形成的影响

接种量 (%)	生物量 (mg 湿细胞/mL)	总活性 (U/mL)	比活力 (U/mg 湿细胞)
1	27.233	0.315	0.012
3	35.015	0.428	0.012
5	43.221	0.587	0.014
7	44.963	0.524	0.012
9	56.884	0.447	0.008

从表 4 可以看出,接种量越大,细胞生物量越大,当接种量为 5 %时,乙醛脱氢酶的总活性和比活力最高。这可能是因为接种量越大,生长快的菌体较早进入产酶的下降期所致。

2.2 产酶正交实验

根据以上各产酶单因素实验结果,以培养温度(A)、初始 pH 值(B)、通气量(C)、接种量(D)为影响菌体产酶的主要因素。选用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交实验。

表 5 酵母产酶正交实验结果

序号	因素				ALDH 活性 (U/mL)
	A 温度(°C)	B pH 值	C 通气量(mL)	D 接种量(v/v, %)	
1	1 (25)	1 (4)	1 (150)	1 (3)	0.313
2	1	2 (5)	2 (200)	2 (5)	0.313
3	1	3 (6)	3 (250)	3 (7)	0.545
4	2 (30)	1	2	3	0.535
5	2	2	3	1	0.298
6	2	3	1	2	0.453
7	3 (35)	1	3	2	0.374
8	3	2	1	3	0.119
9	3	3	2	1	0.472
k_1	0.390	0.407	0.295	0.361	
k_2	0.429	0.243	0.440	0.380	
k_3	0.322	0.490	0.406	0.400	
R	0.107	0.247	0.145	0.039	

从表 5 中比较得出,ALDH 活性最高的实验组合为 $A_1B_3C_3D_3$,从图 1 计算得到的较佳组合为 $A_2B_3C_2D_3$,所以应进行验证性实验。验证实验组合 $A_2B_3C_2D_3$ 得到的 ALDH 活性为 0.823,比直接比较出来的结果好,所以 ALDH 活性的最优发酵培养条件为 $A_2B_3C_2D_3$,即:温度为 30 °C、pH 值为 6、通气量为 200 mL、接种量为 7 %。

3 结论

通过单因素和正交实验得出:得到活性最高的

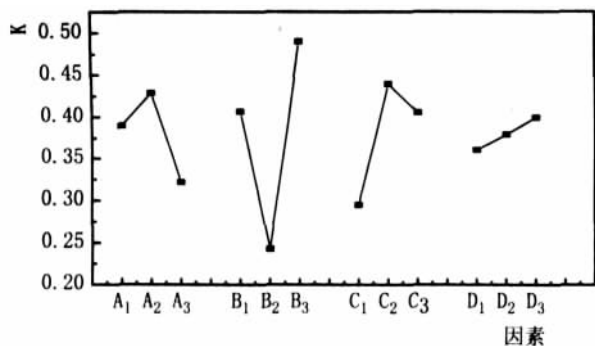


图 1 影响 ALDH 活性的因子水平与 k 值的关系图

ALDH 的最优发酵培养条件是温度为 30℃、pH 值为 6、通气量为 200 mL、接种量为 7%。液体发酵培养中 pH 值对 ALDH 活性的影响最大。正交实验与单因素实验相比有一定的出入,原因可能是各种因素相互作用影响的结果。

参考文献:

- [1] 梅启明,朱英国.ADH 在光敏感核不育水稻中反应特征研究[J].遗传学报,1991,18(3):277-281.
- [2] 陈维莉.酒与化学[J].化学教学,1999,(12):38-39.
- [3] Thurner C, VeLa C, Linda T.M, MeiLe L, Teuber M.. Bio-chemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase compLex from *Acetobacter europaeus*[J]. Archives of Microbiology, 1997, 168(2):81-91.
- [4] Russo J, Barnes A, Berger K, et al. 4-(N, N-dipropylamino) benzaldehyde inhibits the oxidation of all-trans retinal to all-trans retinoic acid by ALDH4A1, but not the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells exposed to all-trans retinal[J]. BMC Pharmacology, 2002,(2):4.
- [5] Dela Lande I.,Stepien J.M, Philpott A.C. et al. Aldehyde dehydrogenase, nitric oxide synthase and superoxide in ex vivo nitrate tolerance in rat aorta[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 496:141-149.
- [6] Lin Y. P, Cheng T. J. Why can't Chinese Han drink alcohol Hepatitis B virus infection and the evolution of acetaldehyde dehydrogenase deficiency[J]. Medical Hypotheses,2002, 59(2): 204-207.
- [7] Tian F, Zhu Y.X, Long H et al. liquid chromatography coupled with multi-channel electrochemical detection for the determination of daidzin in rat blood sampled by an automated blood sampling system[J]. Journal of Chromatography B,2002, 772: 173-177.
- [8] Sanchez L.B. Aldehyde dehydrogenase(CoA-Acetylating) the mechanism of ethanol formation in the Mitochondrial Protist, *Giardia lamblia*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998, 354(1):57-64.
- [9] Salusjarvi L, Poutanen M, Pitkanen J P, et al. Proteins analysis of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2003, 20:295-314.
- [10] Bradford M. Arelpkd. and sensitive method for quantities [J].Anal Biochem.1976,(72):248-254.
- [11] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M].北京:1999.78-79.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [13] Stephan E.Brey.Samodh de Costa,Peter J.Rogers.et al.The effect of proteinase A on foam-active polypeptides during high and gravity fermentation [J].Journal of the Institute of Brewing,2003,(3):194-202.
- [14] Guo-Qing He, Zhao-Yue Wang.Relationship of proteinase activity,foam proteins,and head retention in unpasteurized beer [J].American Society of Brewing Chemists 2006,(1):33-38.

(上接第 25 页)

Saccharomyces genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains[J]. Biol. Chem, 1998, 273 (42): 27565-27572.

“武陵酒”冠名湖南省经济人物十杰评选

本刊讯 湖南省经济界最高荣誉奖项的年度盛事——“中国名酒武陵酒·第八届湖南十大杰出经济人物评选”于 2009 年 4 月 9 日全面启动。当日,该活动的新闻发布会在长沙蓉园宾馆隆重举行。湖南武陵商贸有限公司成为该评选活动举办以来的首家全程独家冠名的股份制企业。

本届评选活动确立的主题为“社会责任与管理创新”。经过反复酝酿和层层筛选,最后甄选出 15 位候选人,并在此次新闻发布会上予以隆重推出。他们都是所在行业或所在地区的领军人物,为全省乃至全国经济的发展起到了积极和深远的作用,做出了杰出贡献。评选结果将在 5 月底揭晓。

无论是从酿酒成就,还是从品牌文化,武陵酒此次赞助第八届湖南十大杰出经济人物评选活动,可谓是珠联璧合。作为本次活动的战略合作伙伴之一,湖南武陵商贸有限公司董事长黄星耀代表公司出席,并就武陵酒赞助此次活动的意义进行了精辟阐述。被喻为“湖南奥斯卡”的“湖南经济十杰评选”与贵为“中国名酒、酱香新贵”的酱香武陵酒,两个行业巅峰品牌的无缝嫁接,必定能产生巨大的社会能量,从而更好地张扬“十杰”评选的人气和武陵酒的香气。(小小)