

2-苯乙醇对酿酒酵母生理生化特性影响

王航¹ 孟春¹ 石贤爱^{1,2} 郭养浩^{1,2*}

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

(2. 福建省医疗器械和医药技术重点实验室 福建 福州 350002)

摘要: 【目的】研究在不同浓度 2-苯乙醇作用下, 酵母生理生化特性的变化规律, 为优化 2-苯乙醇生物合成过程提供重要依据。【方法】透射电镜观察细胞形态; 流式细胞术检测细胞膜渗透性、胞内 ROS 浓度、线粒体膜电位; 实时荧光定量 PCR 检测关键酶基因表达。【结果】随着 2-苯乙醇浓度增加(从 0 到 4.0 g/L), 酵母细胞分解代谢能力、细胞膜渗透性及 *aro10* 基因表达量逐渐降低; 线粒体膜电位逐渐增加; 胞内 ROS 浓度先增加后减少。当 2-苯乙醇浓度从 2.4 g/L 增加到 3.0 g/L, 酵母的分解代谢能力、细胞膜渗透性、*aro10* 基因表达水平等生理生化特性都发生较为显著的变化。【结论】产物原位转移过程中水相 2-苯乙醇浓度可考虑控制在 2.4–3.0 g/L。

关键词: 2-苯乙醇, 酿酒酵母, 生理生化特性, 流式细胞术

Effects of 2-phenylethanol on physiological and biochemical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Hang¹ MENG Chun¹ SHI Xian-Ai^{1,2} GUO Yang-Hao^{1,2*}

(1. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. Fujian Key Laboratory of Medical Instrument and Pharmaceutical Technology, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] To provide useful basis for enhancing the biosynthesis of 2-phenylethanol (PEA), we studied the variation of physiological and biochemical characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain R-UV3 treated on varied concentrations of PEA.

基金项目: 福州大学科研启动基金项目(No. 0460022445)

*通讯作者: Tel: 86-591-22866379; 信箱: bioeng@fzu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-19; 接受日期: 2011-12-21

[Methods] Morphological observation was performed by a transmission electron microscope. Membrane permeabilization, intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential after staining with propidium iodide, dihydroethidium and rhodamine 123 respectively were investigated at the single-cell level with flow cytometry. The expression of *aro10* gene was determined by real-time fluorescence quantitative PCR. **[Results]** With the increasing PEA concentration (0–4.0 g/L), the membrane permeabilization, glycometabolism and expression of *aro10* gene in the yeast cell decreased and mitochondrial membrane potential increased. ROS increased when PEA concentration was below 3.0 g/L and decreased when PEA concentration was beyond 3.0 g/L. The physiological and biochemical characteristics of the yeast, such as membrane permeabilization, glycometabolism and expression of *aro10* gene, varied notably as PEA concentration increased from 2.4 g/L to 3.0 g/L. **[Conclusions]** The aqueous PEA concentration should be controlled at 2.4–3.0 g/L when in situ PEA removal technology was performed.

Keywords: 2-phenylethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Physiological and biochemical characteristic, Flow cytometry

2-苯乙醇(2-Phenylethanol, PEA)是一种具有玫瑰香味的高级醇, 香味淡雅细腻, 香气轻柔甜和, 在医药、食品、化妆品、烟草和日化用品等行业逐渐得到广泛应用, 成为芳香族化合物中最重要的香料品种。天然 PEA 香味纯正, 无不良副产物, 日益受到消费者青睐, 其市场价格远高于化学合成的 PEA^[1]。利用酵母催化 L-苯丙氨酸(L-Phe)生成 PEA 是工业化生产天然 PEA 的有效途径。

目标产物 PEA 对酵母的抑制效应远大于副产物乙醇, 是 PEA 生物合成过程主要瓶颈。了解 PEA 对酵母的胁迫机制及酵母的抵抗机理有助于深化对酵母合成 PEA 过程的认识, 为解除 PEA 抑制效应提供依据。有机溶剂对酵母细胞作用位点众多, 细胞对环境胁迫作用的抵抗机制也十分复杂, 至今仍未完全弄清楚。醇对酵母胁迫的研究多集中于乙醇, 对 PEA 的研究较少见。流式细胞术可在单细胞水平对群体细胞进行分析, 具有分析速度快、灵敏度高、测量指标多、信息量大等优点, 是进行细胞生理生化特性研究的有力工具。利用流式细胞术对 PEA 作用后酵母细胞生理

生化特性变化进行研究, 未见相关报道。本文研究在不同浓度 PEA 作用下, 酵母分解代谢能力、细胞形态、细胞膜渗透性、胞内 ROS 浓度、线粒体膜电位、关键酶基因的表达等生理生化特性的变化规律, 为优化 PEA 生物合成过程提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 酿酒酵母 R-UV3 由本实验室选育^[2]。

1.1.2 主要仪器: 荧光定量 PCR 仪(ABI Prism 7500), Applied Biosystems 公司; 透射电镜(JEM1010), JEOL 公司; 流式细胞仪(Coulter EpicsXL), Becton Coulter 公司; 冷冻离心机(Z323K), Hermle 公司。

1.1.3 主要试剂: 碘化丙啶、罗丹明 123 和二氢乙啶(98%), Sigma 公司; TRIZOL 试剂, 美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒, TaKaRa 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR[®] Green), Applied Biosystems 公司。

1.1.4 培养基: ① 种子培养基(g/L): 葡萄糖

20.0, 蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0, pH 5.0; ② 糖代谢测试培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, KH_2PO_4 1.0, 脲 2.0, MgSO_4 0.3, CaCl_2 0.2, pH 5.0; ③ 分批转化培养基(g/L): 葡萄糖 60.0, KH_2PO_4 1.0, 脲 1.0, L-Phe 10.0, MgSO_4 0.3, CaCl_2 0.2, pH 5.0。

1.2 方法

1.2.1 种子培养: 从斜面接种至装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C 下 250 r/min 振荡培养 12–14 h 至对数期。

1.2.2 酵母 PEA 处理方法: 收集对数期酵母种子, 以 0.6% (干重)接种量接入装有 25 mL 分批转化培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、250 r/min 振荡培养 18 h, 离心收集菌体, 无菌水洗涤 2 次后, 转接入装有 25 mL 含 PEA 培养基的 250 mL 摇瓶中, 每小时补加 0.25 g 葡萄糖溶液(50%, W/W), 30 °C、250 r/min 培养 24 h。

1.2.3 糖代谢保留值测定: 见文献[2]。

1.2.4 碘化丙啶染色: 离心收集经 PEA 处理 24 h 的酵母细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后稀释至 10^7 个细胞/mL, 取 100 μL 细胞加 1 μL 2.5 mg/L 的碘化丙啶, 37 °C 避光孵育 50 min, 加 900 μL PBS, 混匀, 流式细胞仪检测(激发光 488 nm, FL3 检测器测 605–635 nm 发射光强度), 计数 10 000 个细胞。

1.2.5 二氢乙啶染色: 离心收集经 PEA 处理 24 h 的酵母细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后稀释至 10^7 个细

胞/mL, 取 100 μL 细胞加 900 μL 含 0.01% 十四烷基三甲基溴铵的 PBS 和 1 μL 30 mg/L 的二氢乙啶, 37 °C 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测(激发光 488 nm, FL3 检测器测 605–635 nm 发射光强度), 计数 10 000 个细胞。

1.2.6 罗丹明 123 染色: 离心收集经 PEA 处理 24 h 的酵母细胞, 用 PBS 洗涤两次后稀释至 10^7 个细胞/mL, 取 100 μL 细胞加 900 μL PBS 和 2 μL 1 mg/L 的罗丹明 123, 37 °C 避光孵育 20 min, 流式细胞仪检测(激发光 488 nm, FL1 检测器测 505–545 nm 发射光强度), 计数 10 000 个细胞。

1.2.7 透射电镜观察: 离心收集经 PEA 处理 24 h 的酵母细胞, 每 10^7 个细胞加入 1 mL 的 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛固定液, 4 °C 下固定 3 d 后, 委托福建医科大学电镜实验室制成 50 nm 薄切片, 使用透射电镜进行观察, 电压 80 kV。

1.2.8 *aro10* 基因相对表达量检测: 取 1 mL 酵母细胞(约 10^8 个), 离心去上清, 加入 1 mL 1% 蜗牛酶液和 20 μL 5% 二硫苏糖醇溶液, 37 °C 振荡脱壁 30 min。4 °C、1 000 \times g 离心 10 min 去除上清液, 加入 1 mL TRIZOL 试剂, 按文献[3]提取 RNA。按逆转录试剂盒说明书将提取到的 RNA 逆转录成 cDNA。利用 SYBR Green 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测, PCR 引物见表 1。PCR 反应参数设置见表 2。

表 1 基因的上下游引物
Table 1 The primers of the cloned genes

| 基因 Gene | 序列 Sequence (5'→3') | | 产物 Product (bp) |
|--------------|------------------------|----------------------------|--------------------|
| <i>actin</i> | Forward | TCCAATGAACCCTAAATCAAACAGAG | 205 |
| | Reverse | CAAAATGGCGTGAGGTAGAGAGAAAC | |
| <i>aro10</i> | Forward | CCCTGGTGATGTTGTCGTTTGTG | 177 |
| | Reverse | TTGATGTGAGCGTTTGTGAGTGGTC | |

表 2 实时荧光定量 PCR 反应参数
Table 2 Parameters of real-time PCR

| 步骤 Step | 温度 Temperature (°C) | 时间 Time (min) | 循环 Cycle |
|-----------------|------------------------|------------------|-------------|
| Predegeneration | 94 | 3.0 | 1 |
| Degeneration | 94 | 0.5 | |
| Annealing | 60 | 0.5 | 40 |
| Prolonging | 72 | 0.5 | |
| Terminating | 72 | 5.0 | 1 |
| | 95 | 2.0 | |
| Melting Curve | 72 | 1.0 | |
| | 95 | 0.5 | 1 |
| | 30 | 1.0 | |

每个样品做 4 个重复样, 以 *actin* 为内对照, $\Delta C_t = aro10$ 的平均 $C_t - actin$ 的平均 C_t ; 以不加 L-Phe 组为阴性对照, $\Delta\Delta C_t =$ 样品组 $\Delta C_t -$ 不加 L-Phe 组 ΔC_t , 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表征 *aro10* 基因的相对表达量。

2 结果与讨论

2.1 PEA 对酵母糖代谢活性的影响

分解代谢是细胞生理活动的基础。酵母细胞的糖代谢活性可表征其生理生化状态及生物活性。测定了外加不同浓度 PEA 作用 24 h 后酵母的糖代谢保留值, 结果见图 1。酵母糖代谢保留值随 PEA 浓度增加而降低, 在 PEA 浓度超过 2.4 g/L 后, 下降趋势变得更加显著, PEA 浓度大于 3.0 g/L 后, 下降趋势又有所趋缓。在 4.0 g/L PEA 作用后, 糖代谢保留值仍有 0.43, 说明此时酵母还未完全死亡, 仍有分解代谢能力。

2.2 PEA 对酵母细胞形态的影响

酵母分别经 0、2.7 和 4.0 g/L PEA 作用 24 h 后, 切片做透射电镜观察(图 2)。图 2A 是未经处理的酵母细胞, 其细胞壁与细胞质界限清晰, 内部结构完好可见, 外形圆滑。图 2B 是经 2.7 g/L

PEA 作用的酵母细胞, 与图 2A 所观察到的细胞无明显差别。图 2C 和 2D 是经 4.0 g/L PEA 作用的酵母细胞, 细胞内部结构变得模糊不清, 细胞质染色明显变浅, 可能是因为细胞膜渗透性增强, 胞内物质大量外漏。

2.3 PEA 对细胞膜渗透性的影响

细胞膜是隔离胞内外物质的天然屏障, 细胞膜渗透性的增强会导致胞内重要物质泄露, 从而使细胞失去活性^[4]。以碘化丙啶(Propidium iodide, PI)为染色剂, 用流式细胞仪测定了经不同浓度 PEA 作用 24 h 后细胞膜渗透性的变化, 结果见图 3。由图 3 可知, 当外加 PEA 浓度小于 0.8 g/L 时, 绝大多数酵母细胞的荧光值小于 1, 未被 PI

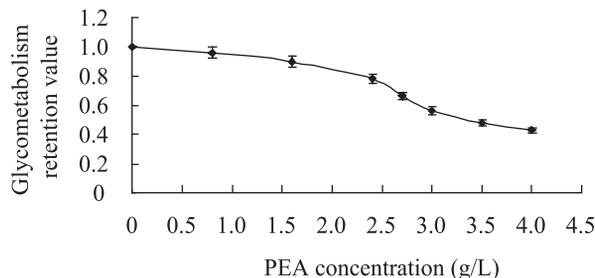


图 1 PEA 对酵母糖代谢保留值的影响
Fig. 1 Effects of PEA on glycometabolism retention value of yeast

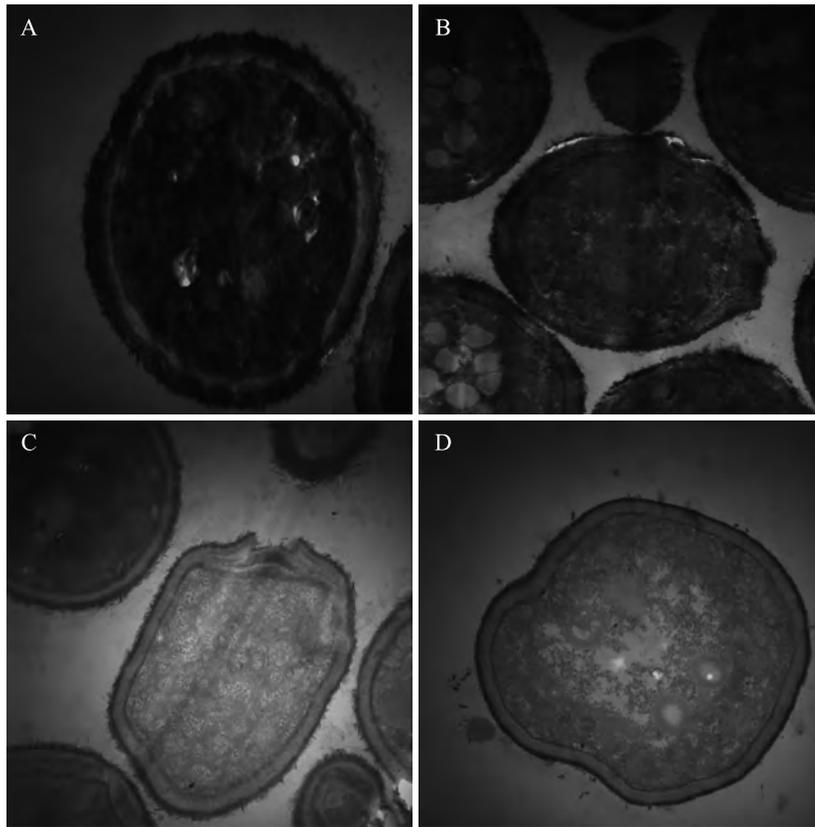


图 2 不同浓度 PEA 作用后酵母细胞透射电镜图

Fig. 2 TEM micrographs of yeast on varied PEA concentrations

注: A: 未经 PEA 处理, $\times 30\ 000$; B: 2.7 g/L PEA 作用 24 h, $\times 30\ 000$; C 和 D: 4.0 g/L PEA 作用 24 h, $\times 30\ 000$.

Note: A: Without PEA, $\times 30\ 000$; B: With 2.7 g/L PEA for 24 h, $\times 30\ 000$; C, D: With 4 g/L PEA for 24 h, $\times 30\ 000$.

渗透, 说明绝大多数细胞的细胞膜完好。随着外加 PEA 浓度增加, 荧光值大于 1 的细胞越来越多, 说明越来越多细胞的细胞膜受到破坏。特别是当外加 PEA 浓度由 2.4 g/L 增加到 3.0 g/L, 被 PI 渗透的酵母明显增加, 而且荧光值较高的细胞也明显增多, 说明细胞膜受损的程度明显加大。当 PEA 浓度大于 3.0 g/L 后, 在较弱的荧光区域分化出一个小峰, 说明细胞群体产生了分化。

2.4 PEA 对细胞内 ROS 水平的影响

活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)是细胞代谢的副产物。ROS 浓度过高, 会氧化核酸、蛋白质、脂肪等生物大分子, 使其失去生物功能, 从而抑制细胞活性。当细胞受到环境胁迫时, 可能产生大量的 ROS, 从而诱导细胞凋亡^[5]。以二

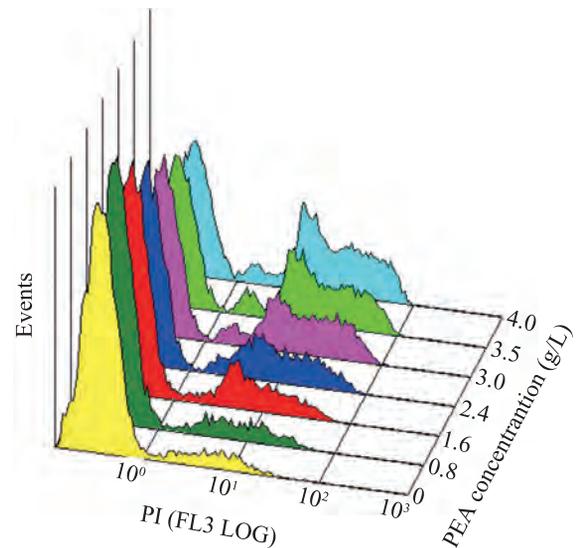


图 3 酵母细胞膜渗透性流式检测直方图

Fig. 3 Evaluation of permeability of yeast cell membrane by flow cytometry

氩乙啶(Dihydroethidium, DHE)为染色剂,用流式细胞仪测定了经不同浓度 PEA 作用 24 h 后细胞内 ROS 水平,结果见图 4。由图 4 可知,随着 PEA 浓度增加,产生较强荧光的细胞数逐渐增加,同时峰形也向荧光值高的方向偏移,说明越来越多细胞的 ROS 浓度增加了。PEA 浓度从 1.6 g/L 增加到 2.4 g/L 时,ROS 急剧增加,PEA 超过 3.0 g/L 后,ROS 浓度反而下降,这可能是由于细胞受到越来越大的伤害,产生 ROS 的能力反而下降。

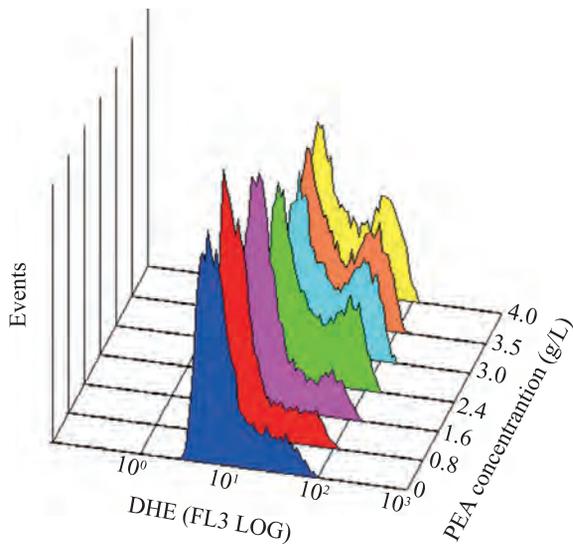


图 4 酵母细胞内 ROS 水平流式检测直方图
Fig. 4 Evaluation of intracellular ROS content by flow cytometry

2.5 PEA 对线粒体膜的影响

线粒体是真核细胞中的重要细胞器,在细胞凋亡过程中起重要作用。线粒体功能在增强酵母细胞对乙醇耐受性上起十分重要的作用^[6]。以罗丹明 123 (Rhodamine 123, RH123)为探针,用流式细胞仪测定经不同浓度 PEA 作用后酵母细胞线粒体膜电位,结果见图 5。由图 5 可知,随着 PEA 浓度增加,在荧光值较高区域逐渐出现新细胞峰,峰的数量也逐渐增多,说明细胞种群呈分化趋势,特别是 PEA 超过 3.0 g/L 后,出现了几个荧光值较高的峰,细胞种群明显分化。当 PEA 浓

度超过 3.5 g/L 后,高荧光值细胞急剧增多,说明大量细胞线粒体膜电位显著增大。线粒体膜电位增大说明泵出线粒体膜的质子多于流回基质的质子,而质子的泵出在分解代谢过程产生,质子的流入由合成代谢介导,因而线粒体膜电位增大反映分解代谢水平超过合成代谢,二者解偶联。Stark 等^[7]观察到随着外加 PEA 浓度的升高,细胞比耗氧速率增加,而细胞对糖得率却下降,从动力学角度为 PEA 导致细胞分解代谢和合成代谢解偶联提供了证据。许多研究表明,细胞线粒体膜电位升高往往导致 ROS 浓度升高^[8]。

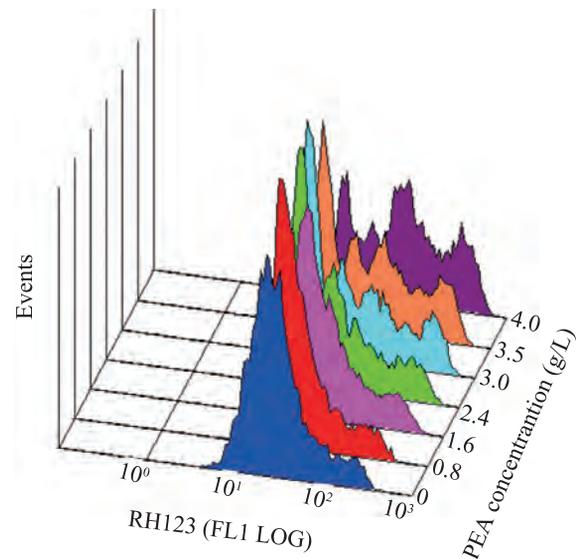


图 5 酵母细胞线粒体膜电位流式检测直方图
Fig. 5 Evaluation of mitochondrial membrane potential of yeast by flow cytometry

2.6 PEA 对 *aro10* 基因表达的影响

苯丙酮酸脱羧酶是 L-Phe 生成 PEA 途径中的关键酶之一,*aro10* 是酿酒酵母中编码苯丙酮酸脱羧酶的主要基因^[9]。将酵母细胞在含 1% L-Phe 的 PEA 培养基培养 3 h 后,测定 *aro10* 基因相对表达量,结果见图 6。PEA 的加入降低了 *aro10* 的表达,在 PEA 浓度达到 2.4 g/L 后表达水平急剧下降,PEA 浓度超过 3.0 g/L,*aro10* 的表达逐渐回到不加 L-Phe 的水平。*aro10* 相对表达量随外

加 PEA 浓度的变化关系与 q_{Phe} 随 PEA 浓度的变化趋势^[10]很相似, 可见, PEA 抑制 L-Phe 转化的重要机理之一, 是 PEA 抑制 *aro10* 基因的转录。由于苯丙酮酸脱羧酶受 L-Phe 诱导, 因而 PEA 导致 *aro10* 基因表达水平下降的原因可能是 PEA 抑制了 L-Phe 的摄入。

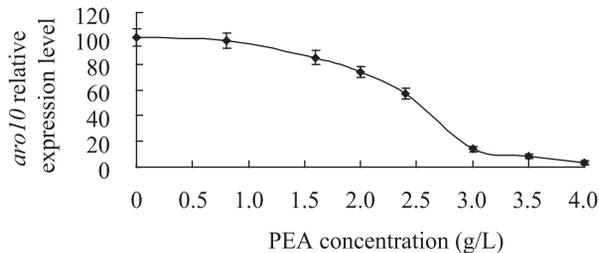


图 6 PEA 对 *aro10* 基因表达的影响

Fig. 6 Effects of PEA on expression of *aro10* gene

综上, 当 PEA 浓度由 2.4 g/L 增加到 3.0 g/L, R-UV3 酵母的分解代谢能力、细胞膜渗透性、*aro10* 基因表达水平等生理生化特性都发生较为显著的变化, 从而导致生物转化活性急剧下降^[10]。从补料分批转化过程^[10]来看, 当反应液中 PEA 浓度超过 3.0 g/L 后, PEA 的增长明显变慢, 也印证了这一敏感区间的存在。PEA 对酵母细胞作用规律的研究结果不仅具有理论意义, 而且对实施产物原位转移(In Situ Product Removal, ISPR)过程中水相 PEA 浓度控制具有实际指导作用。在 ISPR 过程中, 通过有效控制水相 PEA 浓度, 可令酵母细胞保持较大的催化活性, 从而提高时空得率。根据本文研究结果, ISPR 过程水相 PEA 浓度可考虑控制在 2.4–3.0 g/L。

参 考 文 献

[1] Etschmann MMW, Bluemke W, Sell D, et al.

Biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(1): 1–8.

[2] 王航, 董清风, 孟春, 等. 高产 2-苯乙醇酿酒酵母的选育[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2010, 38(1): 153–156.

[3] Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, et al. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 120–122.

[4] Ingram LO, Buttke TM. Effects of alcohols on micro-organisms[J]. Advances in Microbial Physiology, 1984, 25: 253–300.

[5] Baek D, Jin YH, Jeong JC, et al. Suppression of reactive oxygen species by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Phytochemistry, 2008, 69(2): 333–338.

[6] Aguilera A, Benítez T. Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Archives of Microbiology, 1985, 142(4): 389–392.

[7] Stark D, Zala D, Münch T, et al. Inhibition aspects of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(2): 212–223.

[8] Pozniakovskiy AI, Knorre DA, Markova OV, et al. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast[J]. The Journal of Cell Biology, 2005, 168(2): 257–269.

[9] Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, et al. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4534–4541.

[10] Wang H, Dong QF, Guan A, et al. Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(1): 26–31.