

The Research on Energy-Matter of ATP Regeneration System by Immobilized Yeast Cells

Hao Huang¹, Zhonghua Yang, Guanghui Wang, Jun Chen

Biological engineering institute, chemical engineering and technology College, Wu Han University of Science and Technology, Wu Han, China

hhzy310@yahoo.com.cn

Abstract: The immobilized yeast cells of better mechanical structure and mass transfer can be made by the mixture of PVA and sodium alginate. The better immobilization conditions were as follows: PVA7%, sodium alginate1.2%, microbial cells 2g/10ml, immobilization time 24h. The reflection of the immobilized balls can reach to 70h and the product of ATP can reach to297.1 mg/l. The immobilized balls can be used for energy-matter ATP regeneration system.

Keywords: immobilize; sodium alginate; PVA; ATP

固定化酿酒酵母产能量物质 ATP 再生体系的研究

黄皓¹, 杨忠华, 王光辉, 陈俊

1.武汉科技大学化工学院生物工程系, 武汉, 中国, 430081

hhzy310@yahoo.com.cn

摘要: 利用海藻酸钠-聚乙烯醇混合胶体固定化酿酒酵母可制备出机械强度高, 传质效果好的凝胶颗粒, 其最佳的固定化条件为: 聚乙烯醇浓度 7%, 海藻酸钠浓度 1.2%, 菌体添加量 2g/10ml, 固定化时间 24h。固定化小球能连续反应 70h 以上, ATP 产量达 297.1 mg/L, 可用作 ATP 能量物质的再生体系。

关键词: 固定化; 海藻酸钠; 聚乙烯醇; 三磷酸腺苷

1 引言

机体能量的来源是食物。食物被消化后, 营养成分进入细胞转化为各类有机物。动物细胞再通过呼吸作用将贮藏在有机物中的能量释放出来, 除了一部分转化为热能外, 其余的贮存在 ATP 中。

因此, 人和动物的各项生命活动所需要的能量均来自 ATP。

利用酵母糖酵解一分子葡萄糖可使二分子 ADP 磷酸化的特性, 并应用固定化技术将酵母细胞固定化, 便可成为能反复使用的 ATP 再生体系。这种固定化酵母是带有 ATP 再生的多酶体系的综合应用, 它可以用于 S-腺苷甲硫氨酸, 辅酶 A, 胞二磷胆碱^[1], 谷胱甘肽^[2], 三磷酸腺苷^[3]等需要 ATP 供给能量的各种生物合成反应。

聚乙烯醇 (PVA) 作为一种新型的微生物固定化载体, 具有强度高, 化学稳定性好, 抗微生物分解性能强, 对微生物无毒, 价格低廉等一系列优点, 是一种具有较大潜力的细胞固定化材料, 近年来获得了较为广泛的应用^[4]。但其与固定剂硼酸发生化学反应时形成凝胶的速度较慢, 滴下时间相差不大的两液滴相碰时会粘在一起, 并逐步溶合成一团, 使 PVA 凝胶成球困难。若将海藻酸钠加入 PVA 凝胶中可使颗粒制备时不易凝集, 易于操作, 并有效地改善了原本紧密的网格结构, 提高了疏松度, 降低了传质阻力。故本研究采用 PVA-海藻酸钠混合载体进行实验, 综合利用两种载体材料各自的优势进行细胞的固定化, 制备出机械强度高, 传质效果好, ATP 产率高的球状固定化酵母颗粒, 为 ATP 再生体系的制备奠定基础。

2 材料和方法

资助信息: 武汉科技大学 2009-2010 创新基金项目

2.1 材料

菌种：酿酒酵母，由武汉科技大学化工学院生物工程系菌种保藏室提供。

培养基：斜面培养基 (g/L)：葡萄糖：20；蛋白胨：10；酵母膏：10；琼脂：20 液体培养基 (g/L)：葡萄糖：20；蛋白胨：10；酵母膏：10

载体材料及固化剂：海藻酸钠（化学级），上海化学试剂站分装；聚乙烯醇（PVA）（化学级），平均聚合度为 1750 ± 50 ，国际集团化学试剂有限公司；氯化钾（分析纯），天津化学试剂一厂；硼酸（分析纯），重庆川江化学试剂厂；ATP 标准品（分析纯），美国 Amresco 公司进口分装。

主要仪器：恒温摇床 HQ-45B（中国科学院武汉科学仪器厂）；恒温培养箱 303-2（上海市崇明实验仪器厂）；电热手提蒸汽消毒器 YXQ.SG41.280（上海医用核子仪器厂）

2.2 方法

2.2.1 固定化细胞制备方法

将一环成熟的斜面种子接种于 30ml 液体培养基中， 28°C ，120r/min 振荡培养 24h，培养液装于无菌离心管中，3000r/min 离心 10min，然后用无菌生理盐水洗涤，再次离心，得到湿酵母细胞。

取一定体积已溶解的 PVA，再向其中加入一定量的海藻酸钠后灭菌冷却，加入一定体积的酵母菌悬液，混匀后用 10mL 注射器（带有 10#针头）滴入经灭菌的 50mL（250 mL 三角瓶中）固定剂溶液（饱和硼酸 + 2%CaCl₂）中进行成型（直径为 3mm 的珠状颗粒），于 4°C 硬化处理 24h。

2.2.2 固定化细胞性能测定

1) ATP 生产能力测定

在 100ml 三角烧瓶中，加入 10g 固定化酵母和 10ml 底物溶液（其中含葡萄糖 400mmol/L，K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液 100mmol/L，硫酸镁 10mmol/L）， 28°C 振荡反应 2h，转速为 120r/min。将标准的 ATP 样品用 100mmol/L 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液配制成不同浓度，在 254nm 处测定吸收值，绘制标准曲线。用电泳法对反应液中的 ATP 进行分离^[5]，用紫外分光光度法测定含量。

2) 拉伸强度测定^[6]

将固定化小球一端固定，另一端施加一定拉力，直至小球断裂为止，以此拉力值来衡量小球的拉伸强度；每种配比各取三十个小球进行测量，取其平均值作为此配比下小球的拉伸强度。

3) 弹性的测定^[7]

以一定压力弹压固定化小球 10s，用游标卡尺测量其变形回复前后小球直径，以此比值来衡量小球的弹性；每种配比各取三十个小球进行测量，取其平均值作为此配比下小球的弹性。

2.2.3 固定化细胞条件优化

1) 海藻酸钠、PVA 浓度配比

本试验采用 PVA 作为主要载体，海藻酸钠作为辅助载体进行实验。PVA 浓度过高，颗粒网格结构紧密，传质阻力大，不利于 ATP 产物的释放；若海藻酸钠浓度过高，颗粒强度下降，不利于固定化颗粒的连续反应。

2) 酵母添加量

酵母添加量是影响固定化细胞颗粒综合性能的又一重要指标。添加量过少，载体中酵母细胞填充不足，不仅浪费原料，且会增大反应所需的颗粒数量；若添加量过多会造成酵母细胞泄露，影响小球的强度。

3) 固定化时间

固定化时间是胶体与固定剂反应形成凝胶的时间。固定化时间越长，小球硬化程度越强，传质阻力越大，不利于 ATP 产量的提高；若固定化时间太短，小球强度不够，反应过程中会有颗粒破损现象，不利于固定化颗粒地连续反应。

3 结果与分析

3.1 ATP 标准曲线的绘制

如图 3.1，ATP 标准曲线方程为： $y=0.0582x$ ，相关度 R^2 为 0.9965，式中 x 表示不同浓度的 ATP 标准溶液在 254nm 处的吸光度， y 表示其相应的浓度。

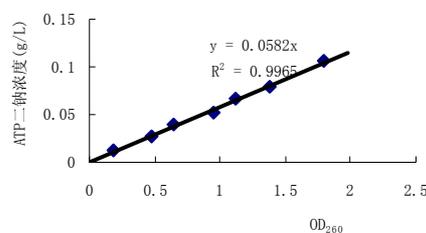


Figure 1 standard curve of ATP

图 1 ATP 标准曲线

3.2 固定化条件对固定化细胞的影响

3.2.1 不同载体对固定化细胞的影响

Table 1. The comparison of immobilization regular carries
表 1. 各种固定化载体比较

载体	6%PVA	1%海藻酸钠	6%PVA+1%海藻酸钠
固定剂	饱和硼酸	2%CaCl ₂	饱和硼酸+2%CaCl ₂
成球性能	差	好	较好
拉伸强度/N	90.2	46.5	81.8
弹性	0.6	0.4	0.8
ATP 产量 (mg/l)	18.85	30.43	26.74

注：成球性能表示凝胶溶液用针管滴入固定剂中时形成固定化小球颗粒的能力。

其它固定化条件为：酵母添加量 2g/10ml，固定化时间 24h。

由表 1 可以看出，当以 6%PVA 为载体时，接连滴入的凝胶颗粒容易凝集，不易于操作；颗粒表层凝胶网格结构较紧密，传质效果差导致 ATP 产量低。而以 1%海藻酸钠为载体时，凝胶滴入固定剂中能够很快成球，颗粒之间无凝集现象，有利于固定化小球颗粒的制备；凝胶颗粒网格孔隙大，传质阻力小，ATP 容易释放出来，但凝胶颗粒强度差，较脆，不利于固定化反应。当海藻酸钠加入 PVA 凝胶溶液后，制备的颗粒强度无较大改变，但 ATP 产量有所提高；并且海藻酸钠的填充使颗粒制备时不易凝集，易于操作，说明海藻酸钠的添加使固定化颗粒的综合性能有所提高。

3.2.2 海藻酸钠、PVA 浓度配比的影响

两种载体浓度的配比是影响固定化小球颗粒各项性能的主要因素，现以小球的强度及 ATP 产量作为主要指标，其它参数为辅助指标来衡量固定化小球的综合性能。

Table2.The influence of sodium alginate and PVA concentration
表 2.不同海藻酸钠、PVA 配比的影响

PVA/%	6	6	6	6	2	4	7
海藻酸钠/%	0.5	1.2	1.8	2.0	1.2	1.2	1.2

拉 伸	81.8	80.0	/	51.4	64.5	89	92
强度/N	83.2	较好	较差	好	好	一般	较差
成球性能	差		/	0.4	0.6	0.8	0.6
弹性	0.6	0.8	0.8	/	28.6	27.3	26
ATPmg/l	20.2	26.7	28.1				

注：固定化小球其余固定化条件为：固定剂 2%CaCl₂+饱和硼酸，菌体添加量为 2g/10ml，硬化时间 24h。/ 表示参数未检测。

由表 2 可以看出，影响固定化颗粒拉伸强度的主要影响因素为 PVA 的浓度，随着 PVA 浓度的增加，载体强度有所提高，但与此同时会使载体网格结构紧密，使传质阻力增加，导致 ATP 的释放困难；而且当 PVA 浓度>9%时，胶液粘度过大，影响成球性，故 PVA 的浓度最好取 7%左右。海藻酸钠的浓度对固定化颗粒的强度影响不大，但若海藻酸钠浓度过低，混合胶体滴入成型剂时，由于 PVA 与硼酸反应较慢，导致成球性能差；而当海藻酸钠浓度太高时，胶液在 45℃时粘度太大，成型困难，故取其浓度为 1.2%。

3.2.3 酵母添加量的影响

Table3. The influence of the quantity of yeast cells
表 3 酵母添加量的影响

酵母添加量 (g/10ml)	1	2	3	4
拉伸强度/N	92.4	89.6	61.2	54.5
弹性	0.8	0.8	0.6	0.4
成球性能	好	好	一般	差
ATP(mg/l)	20.58	26.61	30.08	40.10

注：其它固定化条件为：PVA 浓度 7%，海藻酸钠浓度 1.2%，硬化时间 24h。

酵母添加量对固定化小球颗粒性能及 ATP 产量的影响见表 3。随着湿菌体添加量的增加，固定化细胞的机械强度有所降低，当添加量达到 4g/10ml 时，固定化颗粒的强度、弹性极差，而且菌体泄漏增加，不适合作为 ATP 再生体系的载体。根据 ATP 产量及固定化小球颗粒各项性能综合考虑，选择湿酵母的添加量为 2g/10ml。

3.2.4 固定化时间的影响

Table4. The influence of immobilized time
表4 固定化时间的影响

固定化时间/h	8	16	24	36	48
拉伸					
强度/N	54.6	71.3	89.5	93.6	102.9
弹性	0.4	0.6	0.8	0.6	0.6
ATPmg/l	32.15	28.69	26.11	21.32	18.43

注：其它固定化条件为：PVA 浓度 7%，海藻酸钠 1.2%。

由表 4 可以看出，随着固定化时间的延长，固定化细胞的机械强度有所增加，但固定化时间过长会使颗粒的凝胶网络结构紧密，导致 ATP 产量降低，故固定化时间取 24h 为宜。

综上所述，确定海藻酸钠-PVA 固定化酵母制备 ATP 再生体系的最佳条件为：PVA 浓度为 7%，海藻酸钠浓度为 1.2%，菌体添加量为 2g/10ml，固定化时间为 24h。

3.3 固定化细胞合成 ATP 能力测定

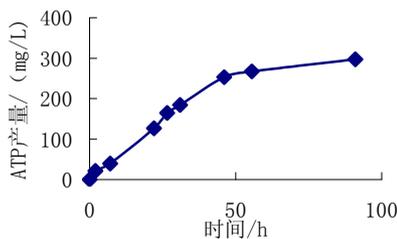


Figure 2 standard curve of yeast cell producing ATP
图2 固定化酵母 ATP 生产能力曲线

将上述最佳条件下制备的固定化小球颗粒置于反应液中进行反应，随着时间的增加，ATP 产量逐渐提高，至反应达到 70h 后，ATP 增长速率逐渐下降，此时需重新添加营养物质以满足固定化酵母细胞的生长需求。反应过程中固定化细胞颗粒没有破损现象，反应液经镜检发现，几乎无游离的酵母细胞，说明固定化颗粒并没有细胞泄露的情况。故此固定化酵母细胞颗粒可用作 ATP 再生体系，并能够连续提供 ATP。

3.4 固定化 ATP 再生体系与游离酵母体系比较

3.4.1 葡萄糖浓度的变化

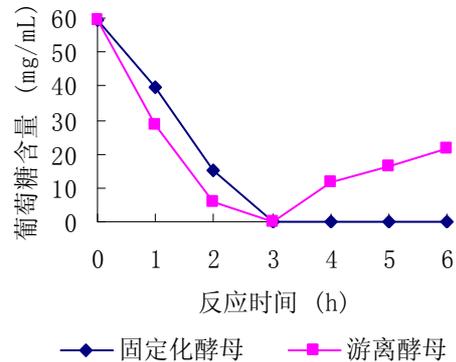


Figure 3 Changes of glucose in immobilized yeast system and dissociated yeast system

图3 固定化酵母与游离酵母葡萄糖的变化

共固定化凝胶颗粒与游离酵母细胞进行 ATP 再生反应时反应液中葡萄糖浓度的变化见图 3。由上图可见，共固定化凝胶颗粒及游离酵母反应液在约 3h 左右葡萄糖均消耗完毕。共固定化凝胶颗粒在 3h 之后反应液中几乎检测不到还原糖；而游离酵母 3h 之后还原糖的含量反而有所增加，推测可能是由于酵母细胞缺乏营养导致自溶，胞内还原糖释放到反应液中引起还原糖含量的增加。游离酵母的自溶将对 ATP 再生体系中目的产物的分离提纯造成困难。

3.4.2 ATP 生成量的变化

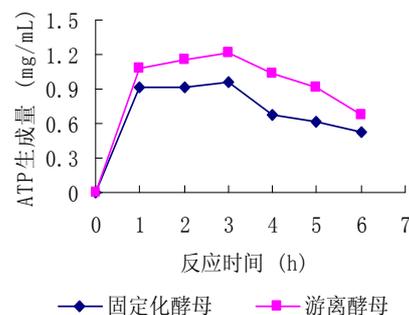


Figure4 Changes of ATP in immobilized yeast system and dissociated yeast system

图4 固定化酵母与游离酵母 ATP 含量的变化

共固定化凝胶颗粒与游离酵母细胞进行 ATP 再生反应时反应液中 ATP 生成量的变化见图 4。共固定化凝胶颗粒与游离酵母在 3h 之前 ATP 的产量均有较大的增长，3h 之后，由于葡萄糖的耗尽，ATP 在胞内 ATP 酶的作用下迅速分解，含量呈下降趋势。整个反应过程中，游离酵母反应体系中 ATP 的含量均略高

于固定化酵母细胞反应体系，可能是因为共固定化凝胶颗粒传质效果要差于游离酵母。由图还可以看出，ATP 维持最大值的时间很短，易回返。因此要获得 ATP，反应必须在很短的时间内中止。应用共固定化凝胶颗粒可以使反应的固液迅速分离，避免 ATP 的降解。而应用游离细胞时，因固液分离耗时较长，造成 ATP 的大量回返。

3.4.3 磷酸盐含量的变化

酵母细胞利用葡萄糖和腺苷生成 ATP，必须消耗磷酸盐。共固定化凝胶颗粒与游离酵母进行 ATP 再生反应时反应液中磷酸盐含量的变化见图 5。

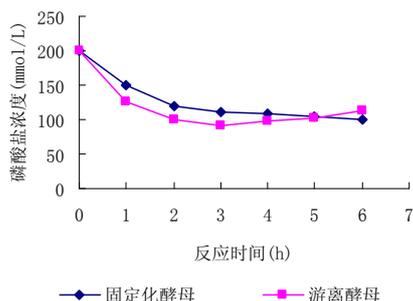


Figure 5 Changes of PO₄³⁻ in immobilized yeast system and dissociated yeast system

图 5 固定化酵母与游离酵母反应体系中 PO₄³⁻浓度的变化

由图可知，共固定化凝胶颗粒与游离酵母从开始反应到反应 3h 时，磷酸盐的浓度均呈下降趋势，而且游离酵母磷酸盐的消耗量略高于固定化酵母细胞，可能是由于游离酵母与反应液接触较为充分，对磷酸盐的利用较为完全。当 3h 之后，共固定化凝胶颗粒反应液磷酸盐浓度几乎不变，可能是由于葡萄糖在 3h 已经消耗完毕，糖酵解途径终止的原因。而游离酵母磷酸盐浓度在 3h 之后呈上升趋势，可能是由于 ATP 在细胞内 ATP 酶的作用下迅速分解成 ADP、AMP 而使反应液中无机磷的含量逐渐升高。

4 总结

4.1 固定化载体选择

以 PVA 为主载体，添加海藻酸钠作为辅助载体后，固定化颗粒综合性能有所提高。

4.2 固定化条件优化

确定固定化酿酒酵母凝胶颗粒最佳制备条件为：

PVA 浓度 7%，海藻酸钠浓度 1.2%，菌体添加量 2g/10ml，固定化时间 24h。

4.3 固定化细胞产 ATP

在添加葡萄糖，磷酸盐，硫酸镁的反应液中，固定化小球能够连续反应达 70h 以上，ATP 产量达 297.1mg/L，可用作 ATP 再生体系来廉价生产一些需要 ATP 能量物质供给的生物活性物质合成过程。

4.4 固定化 ATP 再生体系与游离酵母体系比较

虽然共固定化凝胶颗粒在传质方面不如游离酵母，但由于其自身所具备的特性(如固液分离操作容易、抗污染能力强、可连续使用等)使其更适合作为 ATP 再生反应体系。

致谢

在此，感谢生物工程系杨忠华、王光辉、陈俊等几位老师在实验过程中的协助与指导！感谢生物工程实验室侯亚利老师在实验仪器设备上给予的帮助！

References (参考文献)

- [1] Krajewska Barbara, Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations [J], *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35(2-3), P126-139.
- [2] George D, Markham, The Sequence of metK, the Structural Gene for S-Adenosyl methionine Synthetase in *Escherichia coli*[J], *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 259 (23), P14505-14507.
- [3] Mathur M, Satpathy M, Sachar RC, Phytohormonal regulation of S-adenosyl-L-methionine synthetase by gibberellic acid in wheat aleurones[J], *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1137, P338-348.
- [4] Shiomi N, Fukuda H, Murata K, Kimura A, Improvement of S-Adenosylmethionine production by integration of the ethionine-resistance gene into chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J], *Appl microbial biotechnol*, 1995, 42, P730-733.
- [5] Morana A, Rosa AD, Carteni M, et al, S-adenosyl-L-methionine Noleoyltaurate: pharmacokinetic of the orally administered salt in rat[J], *Int J Pharm*, 2001, 230, P47-50.
- [6] Hoffman JL, Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine [J], *Biochemistry*, 2006, 25(15), P444-448.
- [7] Bottiglieri T, Ademetionine (S-adenosylmethionine) neurology: Implication for drug therapies in psychiatric and neurological disorders[J], *Expert Opin Invest Drugs*, 2007, 6(4), P417-430.
- [8] Berger R, Nowak H, A new medical approach to the treatment of osteoarthritis Report of an open phase IV study with ademetionine (Gumbaral) [J], *Am J Med*, 2007, 83, P84-90.