

不同渗透压调节剂对 *Candida krusei* 生理代谢的影响*刘宏娟¹ 刘德华^{1**} 钟建江²(清华大学化学工程系 北京 100084)¹(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)²

摘要: 比较了氯化钠、氯化钾、甘露醇存在的高渗环境下克鲁氏假丝酵母 (*Candida krusei*) 的生理代谢。3 种渗透压调节剂对 *C. krusei* 生理代谢影响有显著差异。与甘露醇相比, 氯化钠和氯化钾对细胞生长的影响更为显著, 而氯化钾对细胞的毒性则又小于氯化钠。细胞对糖的消耗速率依次为甘露醇 > 氯化钾 > 氯化钠。甘油和海藻糖是 *C. krusei* 在高渗环境下的主要相容性溶质。氯化钠和氯化钾对甘油合成的促进作用明显高于甘露醇。在 0.6mol/L 氯化钠、氯化钾、甘露醇存在时, 细胞甘油浓度较对照提高了 74%、63%、57%; 胞内甘油最大含量也分别达到对照的 3.1、2.4 和 1.8 倍。高渗环境下胞内海藻糖含量在发酵前期均有所降低, 但发酵后期在 0.6mol/L 氯化钾和甘露醇存在时海藻糖迅速积累, 其含量分别达对照的 1.6 和 1.4 倍。

关键词: *Candida krusei*, 甘油, 海藻糖, 高渗胁迫

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2005) 06-0032-05

Effect of Different Osmotica on the Metabolism of *Candida krusei**LIU Hong-Juan¹ LIU De-Hua^{1**} ZHONG Jian-Jiang²(Institute of Applied Chemistry, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)¹(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)²

Abstract: The metabolism of *Candida krusei* was compared in different osmotic conditions by using NaCl, KCl and mannitol as osmotica. The significant different metabolism of *C. krusei* at different osmotic stress was observed. NaCl and KCl affected the cell growth much more than mannitol. Furthermore, NaCl was more toxic than KCl to *C. krusei* cell. The sugar consumption rate of the cell from high to low was mannitol > KCl > NaCl. Glycerol and trehalose were the most prominent compatible solutes in *C. krusei*. The glycerol production was enhanced with the osmotica concentration increasing and NaCl, KCl were much effective than mannitol. The glycerol concentration was increased 74%, 63%, 57% and the intracellular glycerol was 3.1, 2.4, 1.8 fold to the control respectively when 0.6mol/L NaCl, KCl and mannitol existed. During the early stage of fermentation, the trehalose all decreased compared with the control. However, the trehalose content was higher than the control in the late stage of fermentation when 0.6mol/L KCl and mannitol existed. The trehalose content was 1.6 and 1.4 fold to that of control respectively.

Key words: *Candida krusei*, Glycerol, Trehalose, Osmotic stress

当酵母生存的环境中水活度下降时, 细胞内的水分会流向环境。处于低水活度中的微生物细胞用于抵御胞内水分外流的通用机制是提高胞内一种或多种特殊溶质的累

* 中国博士后科学基金资助 (No. 20040350090)

** 通讯作者 Tel: 010-62794742, E-mail: dhliu@tainghua.edu.cn

收稿日期: 2005-01-18, 修回日期: 2005-03-04

积。甘油是酵母细胞中最主要的相容性溶质,耐高渗酵母可积累大量的甘油来平衡外界的高渗胁迫^[1]。海藻糖作为许多生物的抗逆代谢物可以起到保护生物膜的完整性和维持生物活性的作用^[2],在热胁迫下海藻糖大量积累以抵御细胞脱水的侵害。Mackenzie 等^[3]研究了一株酿酒酵母,发现其耐受性与胞内海藻糖含量密切相关,表明酿酒酵母细胞内海藻糖可能也具有抵御高渗胁迫的功能。细胞对高渗环境应答还受到环境中盐离子的影响。在酿酒酵母的研究中发现,Na⁺对细胞具有毒性,细胞通过 Na⁺-K⁺ 质子泵维持胞内较高 K⁺ 浓度从而降低 Na⁺ 在胞内的聚集^[4]。近年来利用耐高渗酵母生产甘油引起了人们的极大兴趣,对耐高渗酵母抵御极端环境的机理研究也逐渐引起重视。*Candida krusei* 是一种耐高渗酵母,具有较高的甘油产率和丰富的海藻糖含量^[5],但其甘油和海藻糖在高渗环境中的功能还不清楚。本文考察了不同高渗环境中 *Candida krusei* 的生理代谢特性,并对其耐高渗机理进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:克鲁氏假丝酵母 (*Candida krusei*) ICM-Y-05。

1.1.2 培养基:斜面培养基为葡萄糖 200g,玉米浆 3g,尿素 3g,琼脂 20g,定容至 1L, pH 值 4.0~4.5;种子培养基为葡萄糖 100g,玉米浆 3g,尿素 3g,定容至 1L, pH 值 4.0~4.5;发酵培养基为葡萄糖 50g,磷酸氢二钾 0.3g,七水硫酸镁 0.25g,尿素 2.5g,定容至 1L, pH 值 4.0~4.5。

1.2 方法

1.2.1 培养条件:斜面试种后 35℃ 培养 1d,接入种子培养基 35℃, 150 r/min 培养 24h。摇瓶发酵采用 500mL 摇瓶装量 50mL,摇床转速 200 r/min。

1.2.2 细胞干重的测定:先称出干燥的 1.5mL Enppendorf 空管的重量,取 1mL 发酵液放于管中 10,000r/min 离心 10min,去上清液,洗涤两次后在 80℃ 烘干至恒重,用电子天平称重,计算得出每毫升发酵液中细胞的干重。

1.2.3 发酵液产物测定:使用高效液相色谱(日本岛津公司)测定,色谱柱为 Aminex[®] resin-based 柱(Bio-Red,美国)。柱温 65℃;流动相为 0.005mol/L H₂SO₄,流速为 0.800mL/min;检测器为 RID-10A 检测器(岛津公司);进样量为 20μL。

1.2.4 胞内海藻糖和胞内甘油的提取和测定:取 1mL 发酵液 10,000r/min 离心 10min,用冰冷的蒸馏水洗涤 2 次。所得细胞用 700W 微波炉微波破碎。破碎方式为破碎 60s,间歇 30s,3 次循环后用 1mL 蒸馏水提取 1h。离心后上清液用高效液相色谱分析海藻糖的含量。色谱条件同 1.2.3。

胞内海藻糖和胞内甘油的含量定义为每克细胞干重所含海藻糖和甘油的质量。

2 结果与讨论

2.1 细胞生长及底物消耗

为避免高浓度葡萄糖造成的渗透压影响,发酵培养基初糖浓度均采用 50g/L。在培养基中分别加入 0.3 及 0.6 mol/L 氯化钠、氯化钾或甘露醇作为渗透压调节剂,对照为常规培养。3 种渗透压调节剂对细胞生长及底物消耗的影响分别见图 1A 和 1B。由图 1A 可知,3 种渗透压调节剂均对细胞生长有一定影响。加入渗透压调节剂的细胞生物

量低于对照, 且生物量随渗透压调节剂浓度的增加而降低。在 0.6 mol/L 氯化钠、氯化钾和甘露醇加入时细胞最大生物量分别为 6.8、6.3 和 6.5 g/L, 而对照为 10.1 g/L。这说明较高的渗透压会抑制 *C. krusei* 细胞生长。从影响程度来看, 氯化钠 > 氯化钾 > 甘露醇。细胞底物消耗情况如图 1B。加入甘露醇并不影响细胞对底物的消耗, 无论是 0.3 mol/L 还是 0.6 mol/L, 细胞在 36 h 均已将糖耗完。而对于氯化钠和氯化钾的存在, 细胞对糖的消耗则明显慢于对照。3 种渗透压调节剂存在时, 细胞对糖的消耗速率依次为甘露醇 > 氯化钾 > 氯化钠。Zhao 等^[6]对长春花 (*Catharanthus roseus*) 植物细胞的研究中发现在氯化钠和氯化钾的高渗环境中, *C. roseus* 细胞的存活率显著下降了, 但当细胞置于甘露醇的高渗环境中时细胞干重反而增加了。这说明不同的渗透压调节剂对不同细胞的生长影响不同, 我们对 *C. krusei* 的研究中也观察到了类似的现象。但与其研究不同的是在氯化钠、氯化钾、甘露醇存在的高渗环境中 *C. krusei* 的细胞生长并未促进反而受到了抑制。

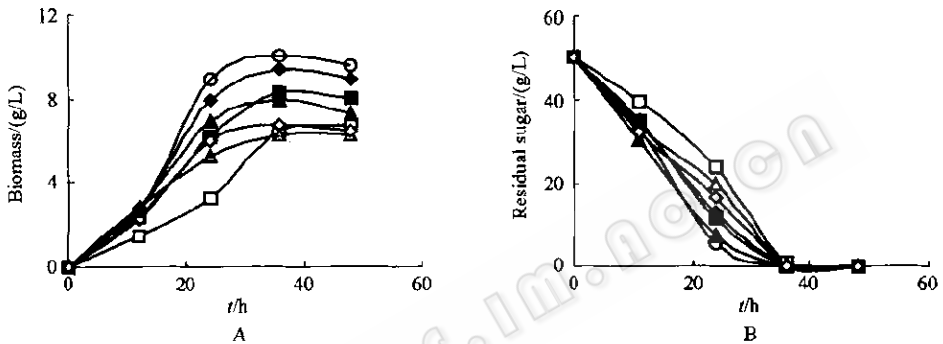


图 1 氯化钠、氯化钾和甘露醇对细胞生长及底物消耗的影响

—○— Control, —■— 0.3 mol/L NaCl, —□— 0.6 mol/L NaCl, —▲— 0.3 mol/L KCl, —△— 0.6 mol/L KCl, —◆— 0.3 mol/L mannitol, —◇— 0.6 mol/L mannitol

2.2 甘油合成

3 种渗透压调节剂对细胞甘油合成的影响如图 2 和表 1 所示。由图中可知, 高渗环境下细胞甘油的产量均高于对照, 分别为对照的 142% (0.3 mol/L 氯化钠)、174% (0.6 mol/L 氯化钠)、123% (0.3 mol/L 氯化钾)、163% (0.6 mol/L 氯化钾)、114% (0.3 mol/L 甘露醇) 和 157% (0.6 mol/L 甘露醇)。这说明由于 3 种渗透压调节剂造成的高渗环境对细胞的甘油合成均有促进作用但又各有差异。在 0.3 和 0.6 mol/L 甘露醇存在时, 细胞在 24 h 和 36 h 就达到了甘油的最高产量 7.3 和 10 g/L, 随后甘油开始反耗。加入氯化钠和加入氯化钾的情况相似, 但氯化钠较氯化钾造成的渗透压对甘油的促进作用更强一些。当加入 0.3 mol/L 的氯化钠就已经表现出了较强的促进作用, 甘油的浓度 36 h 已达到 9 g/L。加入 0.6 mol/L 氯化钠时在 48 h 取得了最高的甘油浓度 11.1 g/L 和最高甘油得率 0.22 (表 1)。氯化钠对酿酒酵母甘油合成的促进作用已有广泛报道, 而氯化钾与甘露醇对渗透压的不同调节作用也已在很多领域的研究中得到重视。我们的实验结果表明添加甘露醇对细胞的影响与添加氯化钠和氯化钾对 *C. krusei* 的影响有明显不同。Gomez^[4]阐述了钠离子对 *S. cerevisiae* 细胞的毒害作用是由于钠离子可竞争性地抑制细胞对钾离子的摄取, 导致钾离子在胞内浓度降低而使钠离子在胞内聚集。Ansell 等^[7]认为甘露醇对培养基水活度的改变程度与钠离子、钾离子不同, 在相同

的摩尔浓度下甘露醇引起的水活度改变小于钾离子和钠离子的作用，而钾离子的作用又小于钠离子。因此，不同的渗透压调节剂对细胞的生理影响也有所差异。

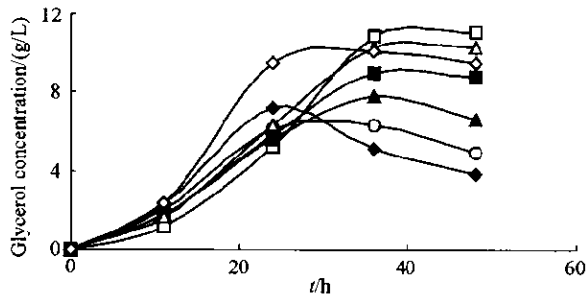


图2 氯化钠、氯化钾和甘露醇对细胞甘油合成的影响

—○— Control, —■— 0.3 mol/L NaCl, —□— 0.6 mol/L NaCl, —▲— 0.3 mol/L KCl, —△— 0.6 mol/L KCl, —◆— 0.3 mol/L mannitol, —◇— 0.6 mol/L mannitol

表1 加入氯化钠、氯化钾、甘露醇时细胞发酵参数

Parameter	Control	0.3 mol/L NaCl	0.6 mol/L NaCl	0.3 mol/L KCl	0.6 mol/L KCl	0.3 mol/L mannitol	0.6 mol/L mannitol
Glycerol concentration (g/L)	6.4	9.0	11.1	7.8	10.3	7.3	10
Y _{y/s} (g/g)	0.13	0.18	0.22	0.16	0.21	0.14	0.2
Y _{y/s} (mol/mol)	0.25	0.35	0.43	0.3	0.4	0.28	0.39
Productivity (g/Lh)	0.18	0.25	0.23	0.22	0.22	0.30	0.28

注: Y_{y/s} (g/g) 为甘油对葡萄糖的质量得率, Y_{y/s} (mol/mol) 为甘油对葡萄糖的摩尔得率

2.3 海藻糖及胞内甘油合成

细胞海藻糖及胞内甘油积累情况如图 3A 和 3B 所示。对照细胞在 24h 胞内海藻糖积累已达最高, 24 ~ 36h 基本维持恒定, 36h 后糖已耗尽, 此时海藻糖作为一种储存性碳源在细胞内迅速积累。在不同高渗环境中, 细胞胞内海藻糖合成的变化各不相同。在发酵前期胞内海藻糖含量较对照低, 但在发酵后期底物耗完后, 氯化钾和甘露醇存在时海藻糖积累速率均超过了对照。Hounsa 在对酿酒酵母的研究中报道了在含氯化钠的高渗环境中细胞内的海藻糖聚集^[8], Hallsworth 等^[9]在对白僵菌 (*Beauveria bassiana*), 绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 和粉拟青霉 (*Paecilomyces farinosus*) 的研究中发现在常规培养时细胞内的海藻糖含量均很低, 但在含氯化钾的高渗环境培养时, *B. bassiana* 和 *M. anisopliae* 孢子中的海藻糖含量达到 0.5%, 而 *P. farinosus* 则达到 2.1%。而在本文的研究中, 仅在发酵后期氯化钾和甘露醇存在时海藻糖才大量积累。因此不同的生物体对高渗透压的耐受机理也有所不同。由图 3B 可知, 渗透压调节剂的加入引起了甘油在细胞内的聚集。加入甘露醇胞内甘油聚集量较加入氯化钠和氯化钾时低。加入 0.6mol/L 氯化钠时胞内甘油含量达对照的 3.13 倍。因此认为耐高渗酵母在高渗环境中一方面通过大量合成相容性溶质 (如甘油) 来平衡外界高渗透压, 另一方面可能胞内甘油输出也随之减弱, 使得大量的甘油滞留在胞内以抵御外界高渗透压对细胞所造成的伤害。Redkar 等^[10]在将构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 细胞置于 2 mol/L 氯化钠高渗环境中时发现其胞内甘油含量增加 2.4 倍。Hounsa 等^[8]在对 *S. cerevisiae* 的研究

中也观察到了类似的现象。氯化钠、氯化钾和甘露醇加入时细胞胞内甘油含量的明显差异是由于氯化钠、氯化钾、甘露醇对培养基水活度造成的影响不同而产生的。

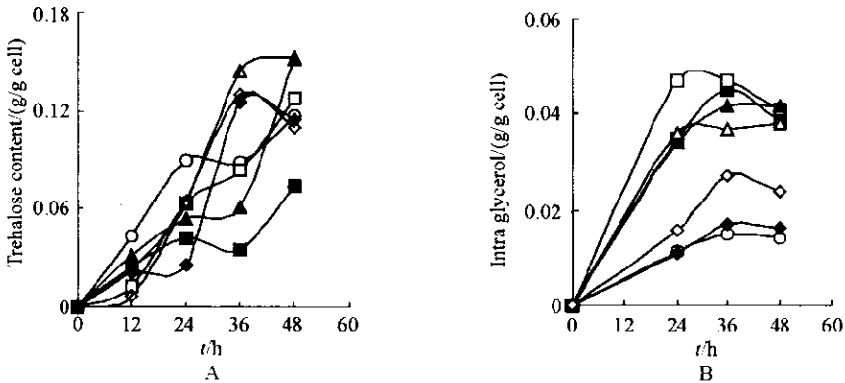


图3 氯化钠、氯化钾和甘露醇对细胞海藻糖和胞内甘油含量的影响

—○— Control, —■— 0.3 mol/L NaCl, —□— 0.6 mol/L NaCl, —▲— 0.3 mol/L KCl, —△— 0.6 mol/L KCl, —◆— 0.3 mol/L mannitol, —◇— 0.6 mol/L mannitol

从实验结果还可看到,甘油与海藻糖的合成与渗透压调节剂的浓度密切相关,这说明甘油与海藻糖在 *C. krusei* 细胞抵御渗透压胁迫的过程中也起到了重要的保护作用,但甘油的合成在高渗环境下均得到促进,而海藻糖的含量在高渗环境下却有所降低。因此甘油与海藻糖在对细胞的保护机制上有所类似但又有差异,究竟二者之间是否存在一定的代谢相关性,在对细胞的保护功能上是否具有协同作用还值得继续研究。

3 结论

研究结果表明,不同渗透压调节剂对 *C. krusei* 细胞生长、底物消耗、甘油合成及海藻糖积累影响不同。从对细胞生长的影响程度来看,氯化钠 > 氯化钾 > 甘露醇。氯化钠和氯化钾对甘油合成的促进作用明显高于甘露醇,高渗环境下胞内海藻糖含量降低。在氯化钾和甘露醇存在时在发酵后期海藻糖含量超过了对照。氯化钠,氯化钾和甘露醇对细胞渗透压调节的差异一方面是由于钠钾离子对细胞具有一定毒性, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵的作用使得细胞对钠离子的排阻大于钾离子,因此相同摩尔浓度的氯化钠,氯化钾对细胞代谢的影响不同。而甘露醇是一种糖醇类物质,它一方面对细胞无毒性另一方面对水活度的影响要小于氯化钠、氯化钾,因此对细胞的影响相对较小。

参考文献

- [1] 王正祥, 方慧英, 诸葛健. 微生物学通报, 1999, 26: 24 ~ 26.
- [2] Singer M A, Lindquist S. Trends Biotechnol, 1998, 16: 460 ~ 468.
- [3] Mackenzie K F, Singh K K, Grown A D. J Gen Microbiol, 1988, 134: 1661 ~ 1666.
- [4] Gomez M J, Luyten k, Ramos J. FEMS Microbiol Lett, 1996, 135: 157 ~ 160.
- [5] Liu H J, Liu D H, Zhong J J. Biotechnol. Prog, 2003, 19: 1615 ~ 1619.
- [6] Zhao J, Zhu W H, Hu Q, et al. Biotechnol Lett, 2000, 22: 1227 ~ 1231.
- [7] Ansell R, Granath K, Hohmann S, et al. EMBOJ, 1997, 16: 2179 ~ 2187.
- [8] Hounsa C G, Brandt E V, Thevelein J, et al. Microbiology, 1998, 144: 671 ~ 680.
- [9] Hallsworth J E, Magan N. Lett Appl Microbiol, 1994, 18: 8 ~ 11.
- [10] Redkar R J, Locy R D, Singh N K. Experimental Mycology, 1995, 19: 241 ~ 246.