

应加强对单细胞生物分批培养生长曲线中减速期的认识和教学

邱立友* 王明道 宋安东 张世敏 刘新育 高玉千 戚元成

(河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘要: 根据单细胞生物分批培养过程中比生长速率(μ)的变化, 其生长曲线分为延滞期、加速期、对数期、减速期、稳定期和衰亡期 6 个时期。与其他生长时期相比, 在减速期生物的生长、基质的利用、产物的合成和基因表达谱等方面有显著的不同, 并对发酵生产有着重要作用。然而, 长期以来, 对减速期的认识和教学相当薄弱, 亟需加强对减速期的认识和教学。

关键词: 单细胞生物, 分批培养生长曲线, 减速期, 生长动力学, 产物合成, 基因表达谱

Should Strengthen Cognizing and Teaching to the Deceleration Phase of Single Cell Organisms Growth Curve in Batch Cultivation

QIU Li-You* WANG Ming-Dao SONG An-Dong ZHANG Shi-Min
LIU Xin-Yu GAO Yu-Qian QI Yuan-Cheng

(College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: The growth curve of single cell organisms in batch cultivation could divide into 6 phases, lag phase, acceleration phase, log phase, deceleration phase, stationary phase, and death phase, based on specific growth rate during cultivation process. There were significantly differences between deceleration phase and the other phases in cell growth, substrate consumption, product formation, and genes express profile. The deceleration phase was highly important to fermentation process. However, cognizing and teaching to the deceleration phase had been considerably weakened since a long period. So it should be strengthened.

Keywords: Single cell organisms, Growth curve in batch cultivation, Deceleration phase, Growth kinetics, Product formation, Genes express profile

单细胞生物包括细菌、酵母菌和动植物细胞等, 在分批培养时的生长曲线具有相似的变化过程, 长期以来, 将其生长曲线分为 4 个时期, 即延滞期(lag phase)、对数期或指数期(log or exponential phase)、

稳定期(stationary phase)和衰亡期(death phase)。其实, 根据单细胞生物分批培养过程中比生长速率(μ)的变化, 可将其生长曲线分为延滞期($\mu = 0$)、加速期 (acceleration phase)($0 < \mu < \mu_{\max}$, μ_{\max} 为最大比生长

* 通讯作者: Tel: 0371-6355 5175; ✉: qliyou@henau.edu.cn

收稿日期: 2007-08-01; 接受日期: 2007-09-28

速率)、对数期($\mu = \mu_{\max}$)、减速期(deceleration phase) ($0 < \mu < \mu_{\max}$)、稳定期($\mu = 0$)和衰亡期($\mu < 0$)共6个时期(图1)^[2]。在此6个时期中, 减速期对生物的生长和产物形成同样有着重要作用, 应加强对减速期的教学和认识。

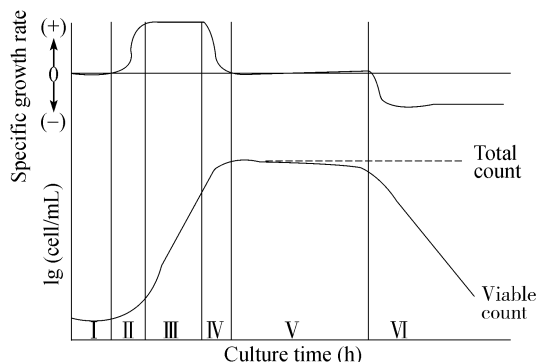


图1 单细胞生物分批培养生长曲线(修改自文献[1])

Fig. 1 The growth curve of single cell organisms in batch cultivation (Modified from [1])

延滞期; 加速期; 对数期; 减速期; 稳定期; 衰亡期

lag phase; acceleration phase; log phase; deceleration phase; stationary phase; death phase

延滞期是生物适应新环境、诱导和合成生长所需的酶及合成核酸等, 为生长做准备。该阶段生物细胞数量没有增加, $\mu = 0$ 。经过延滞期后, 细胞开始大量繁殖, 进入一个短暂的加速期并很快到达指数期。加速期往往比较短暂, 常被合并于延滞期。

对数期又称指数期, 生物以最大比生长速率 μ_{\max} 生长。经过较长时间的指数生长, 使得营养物质缺乏, 尤其是某种(些)关键营养物质的浓度降低成为生长限制性基质、代谢产物(尤其是有毒代谢产物)的积累等, 导致生长速率下降, 当 $\mu < \mu_{\max}$ 即进入减速期。在减速期, 微生物的比生长速率由指数期的最大值迅速下降至零, 接着进入稳定期, 稳定期比生长速率为零。许多次生代谢产物自减速期开始合成, 稳定期仍然持续合成, 所以, 又称稳定期为分化期(idiophase)^[3]。

1 减速期的特点

(1) 该时期相当短, 在该时期比生长速率的降低可能是由于一种或几种必需营养物质的消耗(营养限制), 也可能是有毒代谢产物的积累(毒素限制, 如酵母菌酒精发酵生成的乙醇), 或者是二者的共同

作用;

(2) 该时期的生长不稳定, 生长速率、比生长速率、世代时间和倍增时间是变化的;

(3) 细胞内部结构发生改变, 以增加生存的机会;

(4) 紧接着迅速进入稳定期。

2 减速期生物生长的动力学

在减速期, 由于基质的消耗, 生长速率减缓直至停止生长, 可用 μ 与残留的生长限制性基质的关系即莫诺方程^[4]描述:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s}$$

式中, s —— 残留的限制性基质浓度; K_s —— 基质利用常数, 数值上等于当 $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$ 时的基质浓度, 是

生物对某种基质的亲和力大小的量度。 K_s 越大, 表示生物对基质的亲和力越小; K_s 越小, 表示生物对基质的亲和力越大。

莫诺方程的图示见图2。在图2中, A至B区相当于对数期, 基质浓度过剩, 生物以最大比生长速率进行生长。C至A区相当于减速期, 由于生物的生长对基质的消耗, 导致基质浓度成为生长限制性因素, 不再能够支撑最大比生长速率。如果生物对该限制性基质具有很高的亲和力(即低的 K_s 值), 比生长速率将直到基质浓度下降到很低的水平时才受到影响, 这种情况下, 减速期持续时间会很短; 相反, 若生物对该限制性基质的亲和力很低(即 K_s

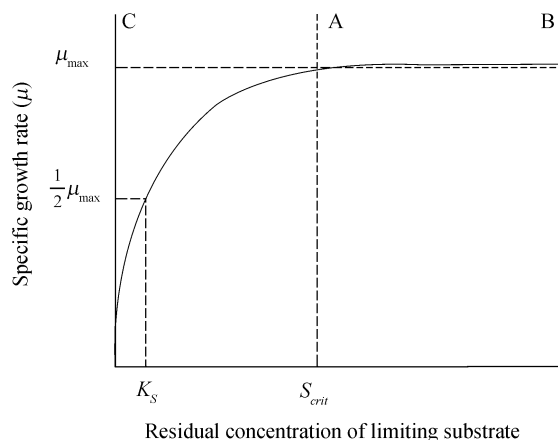


图2 限制性基质残留浓度与比生长速率的关系(引自[2])

Fig. 2 The relationship between residual limiting substrate concentration and special growth rate (From [2])

值大), 则即使当基质浓度相对较高时, 比生长速率也会受到显著的影响, 在此情况下, 减速期将持续一个相当长的时间。

3 减速期生物代谢产物的合成

在培养细胞生产代谢产物时, 产物的最大形成速率往往是在生长受到限制的情况下得到。采用适当的限制性基质限制细胞的生长, 有利于提高产物的生产效率。酵母菌 Y33::YFD71-3 是腺嘌呤、组氨酸和亮氨酸缺陷的基因工程菌, 摇瓶培养, 当菌体生长受腺嘌呤限制时分泌的蛋白量明显增加; 而当菌体生长受亮氨酸限制时, 则蛋白的合成受到影响^[5]。这是因为生长受到腺嘌呤限制时, 过量的氨基酸可用于蛋白质的合成, 而生长受亮氨酸限制时, 蛋白质的合成也受到了限制。

分批培养过程中, 瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)在延滞期、对数期、减速期和稳定期均可利用乳糖产生乳酸, 而在衰亡期开始就不再合成乳酸。人们将瑞士乳杆菌的延滞期和对数期统称为生长偶联期(growth-associated phase)^[6]。在适宜的发酵条件下, 瑞士乳杆菌在减速期的短短 2 h 内产生的乳酸量几乎占总产量的 50%, 最大的产物形成速率是在最大生长速率之后的 0.5 h~1 h, 即减速期的开始阶段。而在生长偶联期, 产物的形成速率仅接近于分批培养全过程的平均值。与之相反, 在稳定期乳酸的产率则比较低。

在自然生境中, 由于环境条件的限制, 微生物的生长速率是相当低的, 因此可以认为微生物主要是处于减速期和稳定期。在利用恒化器进行连续培养时, 受到限制性基质浓度的影响, 微生物以低生长速率生长并产生次级代谢产物, 微生物的生长稳定处于减速期的某一过程。同样, 在补料分批发酵过程中, 通过补料维持低浓度的营养物质, 微生物保持低的比生长速率并合成次级代谢产物, 微生物生长亦处于减速期。

连续发酵采用不同的限制性基质, 产物的比形成速率明显不同^[7], 对其机理的探讨将是一个十分有意义的课题。

4 减速期生物基因表达

应用化学合成培养基, 以葡萄糖作限制性基质, 利用尼龙膜杂交分析了乳酸乳杆菌 IL-1403(*L. lac-*

tis IL-1403)在对数期、减速期和稳定期全基因组的转录水平, 结果表明, 培养开始后由于指数期(0 h~5 h)对营养的迅速利用, 葡萄糖浓度降低即进入一个时间较短的减速期, 培养 6 h后葡萄糖耗尽, 到达稳定期。在稳定期的前 1.5 h, 虽然简单的碳源葡萄糖被耗尽, 但是, 培养基中的一些氨基酸可用作碳源^[8]。

乳酸乳杆菌 IL-1403 在整个发酵过程中至少有 704 个基因的表达达到显著水平(*t* 测验, $P < 0.05$), 但当碳缺乏时, 基因组仅有 30%的基因参与碳缺乏反应。总的来说, 下调的基因数量是上调的基因数量的 2 倍多, 与 mRNA 合成和降解有关的基因表达谱是在葡萄糖被耗尽之前即启动了。其实, 这些基因表达谱的变化首先是在葡萄糖浓度接近其临界值 14 mmol/L 时就开始了; 当碳缺乏持续 1.25 h时, 基因表达谱进一步发生改变, 但变化比较缓慢, 直到碳完全耗尽^[8]。

减速期过量表达的 226 个基因在碳缺乏时一直保持过量表达; 相反, 在减速期下调表达的基因(411 个基因)仍保持下调表达; 有少数基因(67 个基因)是在减速期或是在碳缺乏起始时被瞬时诱导表达的^[8]。

乳酸乳杆菌 IL-1403 对碳缺乏的反应可分为 3 种类型, 即全局性反应(global response)、对葡萄糖缺乏的特异性反应(responses specific to glucose exhaustion)和其它反应(other responses)。

(1) 全局性反应

碳缺乏时, 绝大部分与细胞生长有关的基因的表达量降低, 尤其是编码各种 RNA 多聚酶亚基的基因(*rpoA*, *-B*, *-C*, and *-E*)的表达被抑制。由于在减速期和碳缺乏阶段细胞中 RNA 的转录量减少和 RNA 浓度的降低, 蛋白质的翻译速率也随之降低, 47%的转录装置基因(translation apparatus genes)的表达受到抑制。在减速期和碳缺乏阶段, 核酸的合成也同样减少, 与核酸代谢有关的基因的表达下调。与之相似, 绝大部分与细胞膜和细胞壁代谢有关的基因和细胞分裂有关的基因的表达同样是下调的。然而, 核酸的复制似乎没有受到大的影响, 因为除 10 个基因的表达下调外, 有 7 个基因的表达持续时间或长或短都是上调的^[8]。

这种全局性基因表达降低的现象, 包括转录、翻译、核酸合成、细胞膜和细胞壁代谢及细胞分裂等典型的与生长有关的基因的表达下调, 在大肠杆

菌(*Escherichia coli*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)当氨基酸缺乏^[9-11]或金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[12]和枯草芽孢杆菌^[13]当碳缺乏时均有报道。

(2) 葡萄糖缺乏的特异性反应

当碳缺乏时, 细胞能够启动一系列相应的特异性反应, 包括绝大部分编码合成与中心代谢有关的酶的mRNA 量从减速期即开始减少。然而, 酶活力测定结果表明, 在整个发酵过程中, 葡萄糖分解酶和丙酮酸利用酶的浓度则没有变化。比较合理的解释是, 当碳缺乏时细胞内对中心代谢的调节可能是在酶活性水平上通过酶构象控制, 而不是在基因水平上通过转录控制^[8]。

和培养其他乳酸菌一样, 培养乳酸乳杆菌 IL-1403 时也需要在培养基中添加多种氨基酸, 在减速期乳酸乳杆菌 IL-1403 利用氨基酸的能力降低, 氨基酸生物合成的基因的表达受到抑制, 同时编码氨基酸转运蛋白的基因(11 个基因)的表达也同样受到抑制^[8]。

(3) 其他反应

当碳缺乏时, 乳酸乳杆菌 IL-1403 与转化途径有关的 13 个基因中有 5 个感受态基因(*radA*, *comEA*, *comGA*, *comGB*以及 σ -*comX* 中的一种)的表达则明显上调。乳酸菌一般认为是无感受态微生物, 这种自然感受态在转录水平上的诱导还没有报道过^[8]。枯草芽孢杆菌在N缺乏时可诱导感受态^[14], 而在碳缺乏时没有发现有此现象^[13]。因此, 不同的微生物其感受态的诱导可能需要某种特异的营养物质的缺乏。

在葡萄糖浓度降低到耗尽过程中, 还可观察到乳酸乳杆菌 IL-1403 的 48 个与噬菌体和原噬菌体有关的功能基因的诱导表达, 但并没有引起细胞的裂解。这些基因的表达是否是噬菌体感染所必需的还有待研究^[8]。

5 几点建议

从以上可以看出, 减速期细胞的生长、代谢和基因表达与其他生长时期有明显的不同。减速期细胞的生物学特性可能对研究自然生境或培养系统包括分批培养、补料分批培养和连续培养规律有重要指导意义。因此, 对今后的教学工作提出以下几点建议:

1) 在教材编写和授课时, 应将单细胞生物分批培养生长曲线分为 6 个时期, 而不是简单地分为 4

个时期, 并对减速期细胞的生物学特性与其它时期加以深入比较;

2) 引导学生进一步探究减速期微生物的生物学特性, 以培养学生学习微生物学的兴趣, 应用微生物学知识探索生命的奥秘并学以致用造福人类。

参 考 文 献

- [1] 周德庆. 微生物学教程. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2002, p.153.
- [2] Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principle of Fermentation Technology (2nd Edition), Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995, p.15.
- [3] BU'Lock JD, Hamilton D, Hulme MA, *et al.* Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. *Can J Microbiol*, 1965, **11**: 765-778.
- [4] Monod J. Recherches sur les Croissances des Cultures Bacteriennes (2nd edition). Paris: Hermann and Cie, 1942, p.210.
- [5] 叶 勤, 陶坚铭, 张 宏, 等. 基因工程人 α -心钠素发酵研究. *生物工程学报*, 1994, **10**(4): 312-317.
- [6] Amrane A. Lactic acid production during the associated and the deceleration growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated in various conditions and media. *Lait*, 2001, **81**(1): 91-103.
- [7] 邱立友. 细菌藻酸盐研究进展. *微生物学通报*, 1994, **21**(6): 360-363.
- [8] Redon E, Loubiere P, Coccagn-Bousquet M. Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *J Bacteriol*, 2005, **187**(10): 3589-3592.
- [9] Chatterji D, Ojha AK. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**(2): 160-165.
- [10] Eymann C, Homuth G, Scharf C, *et al.* *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J Bacteriol*, 2002, **184**(9): 2500-2520.
- [11] Vogel U, Sorensen M, Pedersen S, *et al.* Decreasing transcription elongation rate in *Escherichia coli* exposed to amino acid starvation. *Mol Microbiol*, 1992, **6**(15): 2191-2200.
- [12] Crosse AM, Greenway DL, England RR. Accumulation of ppGpp and ppGp in *Staphylococcus aureus* 8325-4 following nutrient starvation. *Lett Appl Microbiol*, 2000, **31**(4): 332-337.
- [13] Bernhardt J, Weibezahn J, Scharf C, *et al.* *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome Res*, 2003, **13**(2): 224-237.
- [14] Jarmer H, Berka R, Knudsen S, *et al.* Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **206**(2): 197-200.