

克鲁氏假丝酵母在高渗环境中海藻糖和胞内甘油积累的研究

张 岩¹ 梁 萌² 刘德华^{2*}

¹(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

²(清华大学化学工程系应用化学研究所 北京 100084)

关键词 海藻糖 胞内甘油 高渗透压 克鲁氏假丝酵母

中图分类号 TQ923 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0332-04

Brown^[1]在 1976 年提出了相容溶质(Compatible solutes)的概念,尽管有关它们功能的确切机制尚不是非常清楚,但是通常它们被认为是具有渗透调节作用和对细胞中生物活性物质具保护功能的物质。海藻糖和甘油在这方面所表现出的特殊功能已被国内外广泛关注^[2]。Brown^[3]和 Crowe^[4]还分别报道了甘油和海藻糖在保护胞内可溶性酶和细胞膜稳定性方面的功能。Crowe^[5]在研究几种不同碳水化合物对动物肌细胞的保护功能时发现,海藻糖和甘油都在不同程度上表现出这种特性。关于酵母细胞在加盐培养基中的生长代谢情况 Kuniho Nakata^[6]和 Sukesli^[7]分别进行了报道,发现酵母细胞内有海藻糖的积累,并且海藻糖的量与细胞对外界不利环境的耐受性有密切关系。我们以前的工作表明,热冲击(Heat-shock)^[8]和高渗透压^[9]的环境能够在很大程度上提高耐高渗克鲁氏假丝酵母(*Candida krusei*)发酵产生甘油的能力。目前,国内外主要是以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为研究对象考察海藻糖和甘油的积累代谢情况,对于极端微生物的报道却很少。本文主要报道耐高渗克鲁氏假丝酵母细胞在抵御高渗透压环境时海藻糖和胞内甘油的代谢情况,这对研究细胞耐受不利环境的生理机制有重要的启示作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 耐高渗克鲁氏假丝酵母菌 ICM-Y-05(*Candida krusei*)

1.1.2 培养基 种子培养基组成为:葡萄糖 10%,玉米浆 0.3%,尿素 0.3%;发酵培养基组成为:葡萄糖 15%,玉米浆 0.25%,尿素 0.25%,NaCl 和 KCl 含量由实验需要而定。初始 pH 均为 4.0~4.5。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 摇瓶种子活化 24h 后按 10%接种量接到发酵培养基中(装液量为 100mL/500mL 三角瓶),培养温度为

35°C,转速为 140r/min。在培养过程中取样进行分析测定。

1.2.2 样品的预处理:取样所得细胞在 15 000r/min 离心 10min,用蒸馏水洗涤 3 次,第一次离心所得上清用来测定其中的胞外甘油和葡萄糖,细胞用来提取胞内海藻糖和甘油。

1.2.3 胞内甘油的提取和测定:1mL 离心洗涤所得到的酵母细胞用微波破碎法^[10]进行细胞破碎,使用功率为 700W 家用微波炉,破碎时间为 60s。用 1mL 蒸馏水常温下提取胞内甘油,提取时间为 30min, HPLC 测定其含量。胞内甘油的百分含量是所测甘油含量与细胞干重的百分比。

1.2.4 胞内海藻糖的提取及测定:经离心洗涤后的菌体用 0.5mol/L 三氯乙酸(TCA)常温下提取 3 次,每次 20min。收集 3 次提取液稀释后用硫酸蒽酮法^[11]测定其中的海藻糖。海藻糖百分含量是指测定的海藻糖的量与细胞干重的百分比。

1.2.5 菌体干重的测定:将样品放入已称重的离心管中,15 000r/min 离心 10min,用蒸馏水洗涤 2 次,将得到的菌体在 80°C 烘箱中烘至恒重,称量细胞干重。

1.2.6 葡萄糖和甘油分析:用菲林试剂测定葡萄糖浓度,用高碘酸氧化法分析甘油浓度。测定数据均取自 3 组平行实验平均值。

2 结果和讨论

2.1 不同渗透压对酵母细胞海藻糖和甘油产生的影响

为改变不同的渗透压,我们在基本发酵培养基中加入不同浓度的 NaCl 和 KCl,在发酵过程中间隔一定时间取样进行分析测定,加入 NaCl 的发酵结果如图 1 所示。

由图 1 中结果可以看出,细胞的生长趋势都是相同的,无论所加盐浓度如何,达到稳定期的时间都很接近。盐的加入对细胞的生长有明显抑制作用,加盐浓度越高细胞浓度越低。与不加盐的对照样相比,所有加盐培养基中甘油浓度均有所提高,其中 1.0mol/L NaCl 培养液中胞外甘油产量最高。我们以前的工作也表明^[9]加盐有利于耐高渗酵母细胞发酵

产生甘油。

酵母在不同渗透压环境下生长时,胞内海藻糖的积累呈现明显的规律性:在 8h 内迅速达到最高峰,而后逐渐减少,随着细胞达到快速生长的指数期,海藻糖的量逐渐下降,在此之前积累的海藻糖作为一种胞内的储存性碳源被消耗。当细胞的生长达到稳定期时海藻糖已经降到了很低的程度。对比海藻糖和甘油的发酵规律可以看到,在海藻糖降低到一定程度时,胞外甘油已经积累到一定的浓度,这是否可以表明胞外甘油对酵母在高渗环境中可以起到更为长期的保护作用或者此时细胞内又产生其他具有保护性的物质还有待于进一步的研究。

克鲁氏假丝酵母细胞在加入不同浓度 KCl 培养基中的代谢情况与相同浓度 NaCl 的发酵结果有类似的规律,在此

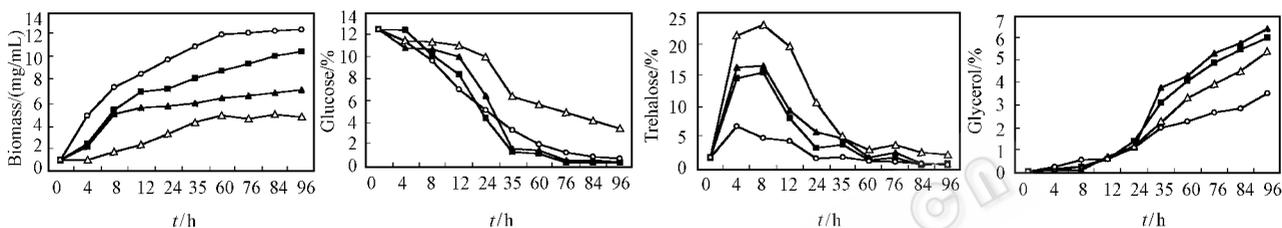


图 1 NaCl 造成的高渗透压环境对发酵情况的影响

Fig. 1 The effect of high osmotic media containing NaCl on the fermentation of yeast cells

■ 0.5mol/L NaCl ; ▲ 1.0mol/L NaCl ; △ 1.5mol/L NaCl ; ○ Control

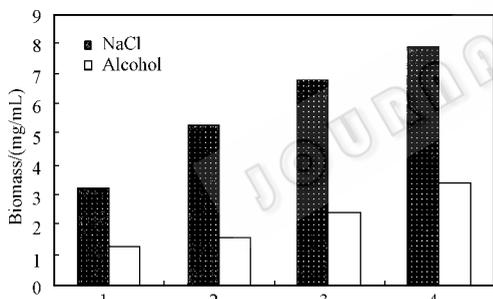


图 2 转移到更高浓度 NaCl 和乙醇后酵母细胞的生长情况

Fig. 2 The growth of yeast cells after being transferred to the higher NaCl concentration and alcohol media

1. The sample coming from the culture without NaCl
2. The sample coming from the culture with 0.5mol/L NaCl
3. The sample coming from the culture with 1.0mol/L NaCl
4. The sample coming from the culture with 1.5mol/L NaCl

2.2 不同渗透压下胞内甘油的积累

国内外对于海藻糖和甘油作为胁迫环境下细胞生物活性物质的保护剂的研究主要是集中到它们各自特性的考察。由 2.1 的研究结果可以看出对于耐高渗克鲁氏假丝酵母细胞中海藻糖和甘油保护机制的研究,单独考虑其中之一或仅考虑胞外甘油都是不充分的,因此我们对含有 1.0mol/L、1.5mol/L NaCl 和 KCl 培养基中生长的细胞胞内甘油和海藻糖的积累情况进行了实验研究。关于这方面的研究尚未见到相关报道。实验结果如图 3 所示。

没有列出。

Sukesht^[7]在对 *Saccharomyces cerevisiae* 对高渗透压的耐受性的研究中发现由 NaCl 造成的高渗透压环境中生长的酵母细胞被转移到高浓度乙醇的培养基时其耐受力有所提高,认为酵母细胞对渗透压的耐受和对乙醇的耐受机制有着密切的关系。我们也进行了类似的实验研究,实验操作为将上面不同渗透压下发酵结束的酵母细胞收集,离心,在生理盐水中洗涤 2 次,稀释到相同的浓度,分别接入到含有 1.8 mol/L NaCl 和 16%(V/V)的乙醇的发酵培养基中培养,如果如图 2 所示,其中 1、2、3、4 分别表示原来培养的对照样和 0.5mol/L、1.0mol/L 和 1.5mol/L NaCl 培养转移后的细胞生长情况。试验结果发现细胞原来所处的环境渗透压越高,在转到 1.8mol/L NaCl 和 16%(V/V)乙醇时的存活率越高。

从图中可以看出,酵母细胞在两种不同盐的高渗培养环境下胞内甘油同海藻糖类似也会很快地积累然后又被细胞消耗,而且盐浓度越高,所产的胞内甘油也越多。而 NaCl 和 KCl 影响程度又有所不同,在含 KCl 培养基中酵母细胞中胞内甘油增长速度比在相同浓度的 NaCl 培养基中要快,但是含量要稍微低一些。对于海藻糖含量也是 KCl 比 NaCl 中的低。我们认为这是由于细胞对这两种盐的运输情况不同,这样就使最初培养基中的 K^+ 被较多地运输到胞内,细胞内的浓度要高,从而对于添加相同浓度两种盐的培养基中由 K^+ 实际造成的细胞内外的渗透压比 Na^+ 要低,致使胞内甘油和海藻糖的含量有差别,从中也可以看出,胞内甘油和海藻糖有保护细胞抵御胞外渗透压压力的作用。结合胞内外甘油和海藻糖的代谢情况可以看出,在高渗透压环境中,耐高渗克鲁氏假丝酵母细胞会迅速积累胞内甘油和海藻糖,并且它们的含量和胞外的渗透压成正相关。但是随着细胞的生长海藻糖可能作为胞内的一种储存性碳源被消耗,而甘油则源源不断的运输到胞外,从而胞内的浓度逐渐降到很低。当酵母细胞培养到 30h 左右时,胞内的海藻糖和甘油的浓度都已经比较低,此时胞外已经具有一定浓度的甘油,对于仍然存在的胞外渗透压是否胞外甘油替代胞内物质来完成这个保护作用还要进行更深入的研究。图中甘油对干重的最高百分含量超出 100%,对于这一现象我们又对烘干的样品采用同样的方法测定其中的胞内甘油,发现经过烘干的细胞中几乎没有甘油的存在,估计这是导致这一现象的主要原因。

为了研究不同培养时期的酵母细胞对高渗透压环境的反应,我们分别在 0h、8h 和 36h 向培养基中加入 1.0mol/L 的 NaCl。酵母细胞在 8h 时处于指数生长的初期,36h 时处于稳定期。发酵结果如图 4 所示。对于海藻糖的产生而言,一旦面临高渗透压的环境,胞内海藻糖的量即呈现快速增长的趋

势,同时也会在较短的时间内被消耗。不同培养时期的细胞对高渗透压的反应有所不同。在 0h 和 36h 加盐的培养条件下细胞产生的海藻糖较多。总体而言,由于 NaCl 造成的高渗透压的环境可以引起耐高渗透压克鲁氏假丝酵母细胞内海藻糖的迅速积累。

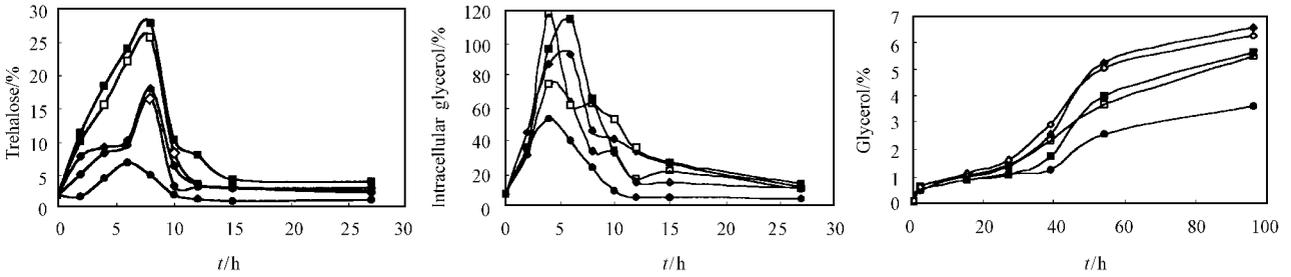


图 3 在含 NaCl 和 KCl 的高渗培养基中酵母细胞中海藻糖和胞内甘油的积累

Fig.3 The accumulation of trehalose and intracellular glycerol in response to the high osmotic media containing NaCl and KCl in *Candida krusei*

◆1.0mol/L NaCl ; ◇1.0mol/L KCl ; ■1.5mol/L NaCl ; □1.5mol/L KCl ; ●Control

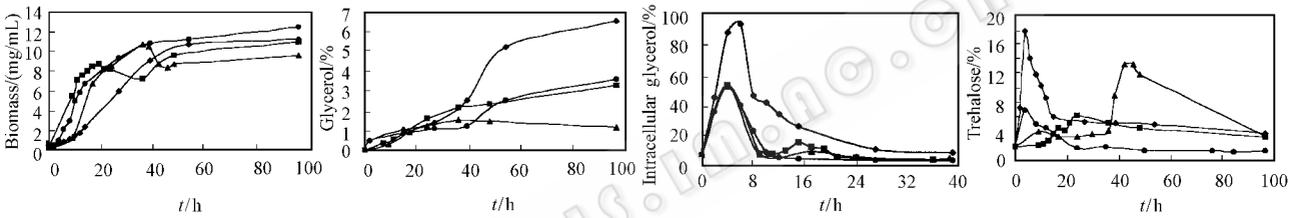


图 4 高渗环境对不同培养时期酵母细胞发酵结果的影响

Fig.4 The fermentation of yeast cells at different culture stages responding to the high osmotic conditions

◆0h ; ■8h ; ▲36h ; ●Control

对于胞内甘油的积累研究发现,对照样品中就有甘油的积累,在 0h 加盐会促进这种生理反应,但是对于在细胞指数生长初期和稳定期加盐的结果来看,此时的胞内甘油几乎没有有什么变化,这个时期细胞内海藻糖比甘油所起的作用大。

综合胞内海藻糖和甘油积累的情况,对于生长环境特殊的耐高渗透压酵母而言,两者在保护功能上既有重叠的一面,即在细胞直接转入高渗透压培养基时两者都在细胞内迅速积累,同时他们似乎又有各自不同的职能,在指数生长初期或稳定期的细胞中海藻糖所起的作用比胞内甘油要明显。我们还研究了细胞在 1.5mol/L 的 NaCl 和 1.0mol/L、1.5mol/L KCl 中的代谢情况,结果与 1.0mol/L NaCl 类似。

3 结 论

通过对耐高渗透压克鲁氏假丝酵母在高渗透压环境下的甘油和海藻糖积累情况的研究发现,高渗透压会诱导细胞迅速产生大量的海藻糖和胞内甘油,培养基中的渗透压越高,胞内海藻糖和甘油也越高。随着发酵过程的进行海藻糖作为一种储存性碳源被很快消耗,同时胞内产生的甘油被不断运输到胞外使其浓度下降。不同渗透压培养的酵母细胞被转移到含有更高浓度的 NaCl 和乙醇培养基中,细胞的生存能力与原来所处的环境呈正相关。不同培养时期的酵母细胞

对高渗透压的反应不同,直接转接到高渗培养基的细胞会在胞内迅速积累海藻糖和甘油,但对于指数生长初期和稳定期的细胞胞内只有海藻糖浓度会出现短时间的升高。此时培养基中已经积累了一定浓度的甘油。胞内甘油和海藻糖在保护机制方面既有类似之处又有各自不同的表现形式,其中的原因我们正在进一步的研究之中。

REFERENCES (参考文献)

[1] Brown A D. Microbial water stress. *Bacteriol Rev*, 1976, **40** :803 ~ 846
 [2] Kushner D J. Life in high salt and solute concentrations -Halophilic bacteria. *Microbial Life in Extreme Environments*, 1976, pp. 317 ~ 368, New York :Academic Press.
 [3] Brown A D. Compatible solutes and extreme water stressing eukaryotic micro-organisms. *Advances in Microbiol Physiology*, 1978, **17** :181 ~ 242
 [4] Crowe J H, Whittam M A, Dennis Chapman *et al*. Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **769** :151 ~ 159
 [5] Crowe L M, Robert Mouradian, Crowe J H *et al*. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim Bio-*

- [6] Kuniho Nakata, Junko Hasegawa, Kazuhiko Okamura. Accumulation and role of trehalose in *Torulopsis delbrueckii* No. 3110. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(6) 986 ~ 989
- [7] Suresh, Chander, Sharma, A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **152**: 11 ~ 15
- [8] XIE D M (谢东明), LIU D H (刘德华), ZHANG Y (张岩) *et al.* enhancement of fermentation glycerol yield with heat shock treatment. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(3): 383 ~ 386
- [9] YANG Y (杨燕鸥). The optimization of the glycerol fermentation by an osmotolerant yeast : Studies on the osmosis regulation and the Fed-batch process, *graduate thesis of the institute of chemical metallurgy, Chinese Academy of Sciences* (中科院化工冶金研究所硕士学位论文), 1999
- [10] LIU C H (刘传斌), FENG P (冯朴荪), SU ZH (苏志国) *et al.* *Analytical Chemistry* (分析化学), 1999, **27**(1): 24 ~ 28
- [11] Lillie S M, Pringle J R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* : Responses to nutrient limitation. *J Bacteriol*, 1980, **143**: 1384 ~ 1394

The Metabolism of Trehalose and Intracellular Glycerol in *Candida krusei* Responding to High Osmosis

ZHANG Yan¹ LIANG Meng² LIU De-Hua^{2*}

¹(State Key Lab of Biochemical Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

²(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract The trehalose and intracellular glycerol contents of osmotolerant yeast *Candida krusei* cells rapidly increased in response to the medium containing NaCl. Addition of NaCl at early exponential phase or steady phase increased trehalose content only but the content of extracellular glycerol increased gradually. Development of resistance was accompanied by accumulation of trehalose and was apparently unrelated to intracellular glycerol content which was always low under these conditions. There seems to be an overlap function between trehalose and glycerol in *Candida krusei* cells in response to the osmotic conditions.

Key words trehalose, intracellular glycerol, high osmosis, *Candida krusei*

Received: November 13 2000

This work was supported by Grant from the National the Ninth Five-Year Key Project Foundation (96-C03-03-03A).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62782654; Fax: 86-10-62785475; E-mail: dlhliu@tsinghua.edu.cn

安捷伦和 Caliper 联手推出 DNA 1000 芯片实验室(LabChip)试剂盒 快速准确地测定 DNA 片段的大小和含量

安捷伦科技和 Caliper 公司日前宣布 推出 DNA 1000 芯片实验室(LabChip)试剂盒,用于 DNA 片段的自动分析,测定片段大小及浓度。作为芯片实验室(LabChip)系列试剂盒中的新成员,可以让分子生物学研究人员使用 Caliper 科技公司开发的独特的芯片实验室技术,快速精确地分析 PCR 产物和小片段限制性酶解产物。

快速、简便、洁净

DNA 1000 芯片实验室(LabChip)试剂盒不仅是有 DNA 500 芯片实验室(LabChip)试剂盒的分辨率,而且片段大小范围也适合于大多数 PCR 片段(25 到 1000 个碱基对),是不断出现的芯片实验室解决方案中另一有应用价值的成员。DNA 1000 芯片实验室(LabChip)试剂盒具有定量准确和宽线性动态范围的特点,对于竞争性 PCR, RT-PCR 或者优化 PCR 反应条件,它都是实验室中不可缺少的工具。与其它芯片实验室试剂盒一样, DNA 1000 芯片实验室试剂盒采用内标和外标,自动地计算样品中每个分离的 DNA 片段的大小(碱基对)和浓度(ng/mL),——无须凝胶染色或扫描。

仅仅需要 0.5ng 的样品,就可以自动地分离、检测和分析,然后进行数据处理归档。到目前为止,这是分子生物学研究人员分析 DNA 最为快速、简便、洁净的方法。

关于 Caliper 科技

Caliper 科技公司是芯片实验室技术的领导者。Caliper 设计、制造及推动 LabChip 设备和系统的商品化。通过芯片实验室技术,科学家可以在一个小芯片上进行试验,而这在过去则要求使用全套实验室设备和人员才能完成。这个芯片非常小,可以放在一个小孩的手掌中,它包含一个由许多用显微镜才能看见的通道构成的网络,液体和化学物质通过这些通道流动,以完成实验。LabChip 系统简化和加快了实验室试验过程,可望应用于非常广泛的行业中,包括制药、农业、化工和诊断。Caliper 已经建立了多个战略和商业联盟,在微型流体技术中拥有领先的知识产权。