

热带假丝酵母细胞内 pH 的测定及其与生长代谢活性的关系

刘树臣^{1,2*} 谢澜漪³ 李春¹ 曹竹安¹

¹(清华大学化工系生物化工研究所,北京 100084)

²(抚顺石油化工研究院,抚顺 113001)

³(沈阳大学生物与环境工程学院,沈阳 110044)

摘要 应用荧光探针 5(6)-双醋酸羧基荧光素(Carboxyfluorescein diacetate)测定了产长链二元酸热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)细胞内 pH(pH_i)值,确定了该探针载入 *C. tropicalis* 细胞的适宜条件。用摇瓶培养 *C. tropicalis* 细胞,考察了细胞外 pH 和生长碳源对 pH_i 的影响,实验结果表明,细胞外 pH 对 pH_i 略有影响,而生长碳源对 pH_i 的影响略为明显。利用 5 L 发酵罐进一步研究了细胞生长代谢活性与 pH_i 的关系,结果表明,细胞比生长速率、 CO_2 比生产速率和葡萄糖比消耗速率与 pH_i 变化密切相关, pH_i 的增加伴随着细胞生长活力的增加,反之亦然。在 pH 6.0 条件下用葡萄糖和醋酸钠共作碳源培养 *C. tropicalis* 细胞时,测得的 pH_i 值维持在 5.72~6.15 范围内。

关键词 细胞内 pH,生长代谢活性,热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0279-05

细胞内 pH(pH_i)对细胞代谢活性或生理活动如蛋白质合成^[1]、物质跨膜运输^[2]、酶活性^[3]和细胞内代谢物质分泌^[4]等过程有重要影响。测量 pH_i 的方法很多,主要包括弱酸平衡法^[5]、核磁共振法^[6]和荧光探针法^[7]。弱酸平衡法需要较长的平衡时间,不适于快速测量,核磁共振法需要昂贵的仪器,而且需要高密度细胞,测量中细胞内代谢情况变化较大。荧光探针法可用于真核细胞和原核细胞的 pH_i 测量,其特点是方法简单、速度快、结果可靠,而且对细胞代谢没有副作用,是目前常用的测量 pH_i 的方法。许多细胞生长状况与营养物质跨膜运输以及相关一些代谢途径的关键酶的活性有关,例如 pH_i 对酵母细胞内一些关键酶如糖酵解途径中的磷酸果糖激酶有调控作用^[8]。有许多关于测量酵母细胞的 pH_i 的报道^[7,9-12],但目前还没有关于产长链二元酸 *C. tropicalis* 细胞的 pH_i 研究报道。在发酵法生产长链二元酸中,*C. tropicalis* 酵母细胞生长状况对产酸水平有直接影响,优化的培养工艺对提高种子质量至关重要。本文报道了利用荧光探针技术测量 *C. tropicalis* 细胞的 pH_i ,研究了细胞外 pH 和生长碳源对 pH_i 的影响以及细胞生长代谢活性与 pH_i 的关系。

1 材料和方法

1.1 菌种

Candida tropicalis 突变株 CGMCC 356。

1.2 培养基

斜面培养基:10 Brix 麦芽汁,1.5%~2.0% 琼脂。种子和发酵培养基(g/L):葡萄糖,30;酵母膏,1;玉米浆,1;尿素,1; KH_2PO_4 , 2; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 6; NaCl, 1; NaAc \cdot 3H $_2$ O, 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1; $in-C_{13}$, 5%(V/V)。

1.3 培养方法

取 1 接种环斜面菌种,接种至含有 100 mL 种子培养基(已灭菌)的 1000 mL 三角瓶内(带挡板),共 3 瓶。于 30℃、180 r/min 条件下摇床培养 40 h。将上述培养的种子液 300 mL 接入含有 3.2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐内。培养条件:温度 30℃,pH 6.0,搅拌转速 800 r/min,通气量 3.5 L/min。

1.4 方法

1.4.1 菌体浓度的测量:采用干重法测量。

1.4.2 发酵液中葡萄糖和醋酸含量的测定:用高效液相色谱分析。Waters 510 泵、410 示差折光检测器和 2010 色谱管理系统。色谱条件:Amixex-87H 色谱柱,流动相为 0.005 mol/L 的 H_2SO_4 水溶液,流速为 0.5 mL/min,柱温为 60℃。

1.4.3 尾气中 CO_2 的分析:用 LKM2000-3 O_2/CO_2 (Lokas Automation Corp, Taejeon, Korea) 气体分析器检测。

1.4.4 pH_i 的测量:取细胞培养液 3 mL,5000 r/min 离心 10 min,用 4℃ 去离子水洗细胞,将洗涤过的细胞悬浮在 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 4.0)中, OD_{620nm} 值为 0.8。然后,加入双醋酸羧基荧光素[5(6)-carboxyfluorescein diacetate,

cFDA, Sigma 产品]至 10 μmol/L, 细胞在 35℃ 下培养 60 min, 用 2 倍体积的缓冲液通过 0.22 μm 滤膜洗涤细胞, 再将细胞悬浮在等体积的 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液中(给定 pH 值, 如同于培养液的 pH 值), 取 2 mL 悬浮液放入 3 mL 石英比色皿中, 用 Hitachi 850 型荧光分光光度计在激发波长 400 nm ~ 500 nm 范围内检测荧光强度(发射波长 520 nm, 狭缝 10 nm)。检测后立即用 0.22 μm 滤膜过滤得滤液, 用同样方法检测荧光强度, 以消除背景信号对测量结果的影响。根据 490 nm 和 435 nm 处的荧光强度 I 的比值 ($R = [(I_{490})_{total} - (I_{490})_{filtrate}] / [(I_{435})_{total} - (I_{435})_{filtrate}]$) 的对数值, 由 pH 标准曲线计算 pH 值。测量值为同一样品的三个测量数据平均值。

1.4.5 pH 标准曲线: 取指数生长期细胞, 用 5 μmol/L 两性霉素 B (Amphotericin B, ICN Biomedicals 公司产品) 于 30℃ 下对细胞做渗透处理 60 min, 具体方法见文献[11]。将洗涤后的细胞悬浮在不同 pH 值的 67 mmol/L 磷酸盐缓冲液中 (pH 范围为 4.8 ~ 8.3), 羧基荧光素 [5(6)-carboxyfluorescein, cF] 浓度为 10 μmol/L, 检测荧光强度, 以 Log (R_0) 值 ($R_0 = I_{490} / I_{435}$) 对 pH 值作标准曲线, 选取线性部分进行计算。

实验所用的磷酸盐缓冲液和去离子水皆经过过滤除菌处理, 并于 4℃ 保存。

2 结果与讨论

2.1 载入荧光探针 cFDA 条件的确定

本实验主要考察了探针浓度、处理时间和处理温度对荧光强度的影响, 结果见图 1、2 和 3。实验结果表明: 当 cFDA 浓度大于 5 μmol/L 后, 荧光强度比值基本恒定, 即增加 cFDA 浓度, 荧光强度基本不再增加, 适宜的 cFDA 浓度为 10 μmol/L; 处理时间在 30 ~ 60 min、温度为 35℃ 时, 荧光强度较高且稳定。可见, 载入 cFDA 探针的适宜条件为: cFDA 浓度 10 μmol/L、处理时间 60 min、温度为 35℃。

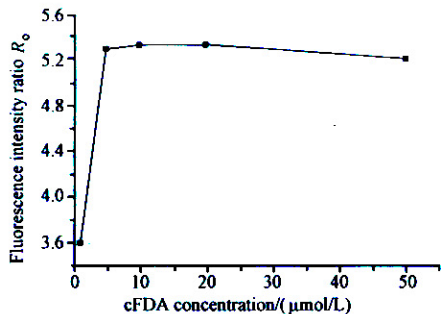


图 1 cFDA 浓度对荧光强度比值的影响

Fig.1 Effect of cFDA concentration on fluorescence intensity ratio
The experiments were performed at 35℃ for 30 min

另外, 用落射荧光显微镜观察载入荧光探针的细胞, 结果见图 4A 和图 4B。与对照组图片(未显示荧光)分析可知, 几乎所有的培养 22 h 的细胞都能发出荧光(图 4A), 证明都是活细胞, 而培养 95 h 的细胞只有部分能发出荧光(图 4B), 这说明在培养后期部分细胞质膜功能可能存在缺陷, 因为只有具备完整细胞膜的活细胞才能保留荧光探针。

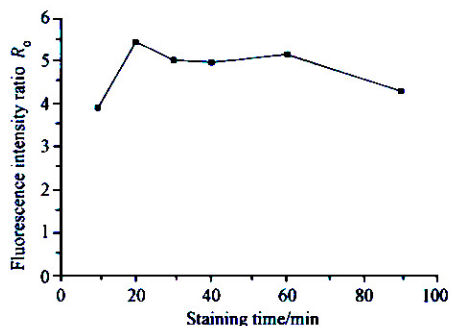


图 2 染色时间对荧光强度比值的影响

Fig.2 Effect of staining time on fluorescence intensity ratio
The experiments were performed with 10 μmol/L cFDA at 35℃

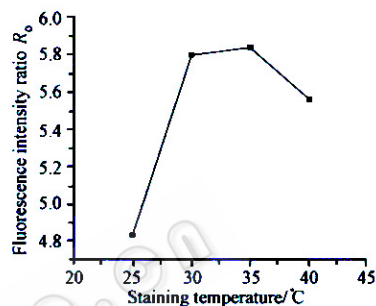


图 3 染色温度对荧光比值的影响

Fig.3 Effect of staining temperature on fluorescence ratio
The experiments were performed with 10 μmol/L cFDA for 60 min

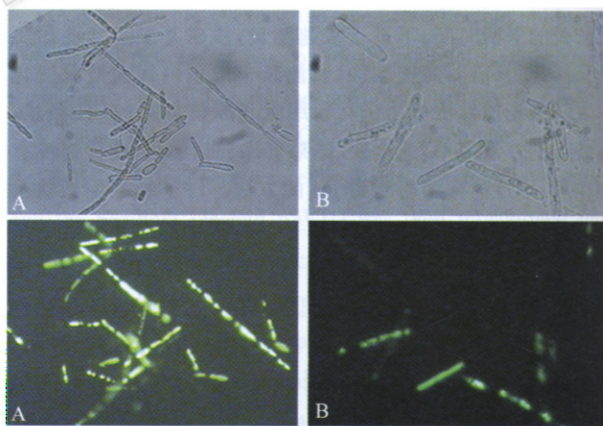


图 4 培养 22 h(A)和培养 95 h(B)细胞荧光观察结果

Fig.4 Fluorescent staining of *C. tropicalis* cells grown for 22 h (A) and for 95 h (B)

The top images were taken with a visible wavelength

2.2 细胞外 pH 对 pH_i 的影响

取摇瓶培养 22 h 的 *C. tropicalis* 细胞, 载入 cFDA 探针后立即悬浮在不同 pH 值的磷酸盐缓冲液中 (pH 5.0 ~ 7.3) 测量其 pH_i , 结果见图 5。在本实验条件下细胞外 pH 对 pH_i 有一定影响, pH_i 随细胞外 pH 的增加略有增加, 但基本维持在一个稳定的生理 pH 范围内, 即在 6.0 ~ 6.3 之间。

2.3 碳源对 pH_i 的影响

考察了葡萄糖、蔗糖、醋酸和十三烷作生长碳源时对细胞 pH_i 的影响, 结果见表 1。当以葡萄糖或蔗糖培养细胞时,

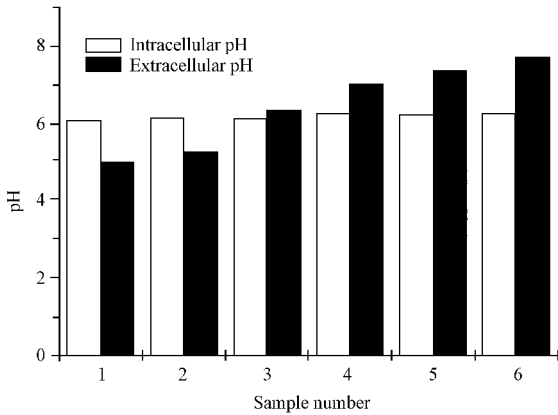


图 5 细胞外 pH 对热带假丝酵母细胞 pH_i 的影响

Fig.5 Effect of extracellular pH on pH_i in the cells of *C. tropicalis*

The cell sampled at the exponential phase

of 22 h was used to measure pH_i

测得的细胞 pH_i 变化规律几乎一样,培养初始时 pH_i 为 6.0, 生长期间 pH_i 最大值 6.15 左右,培养 24 h 降至 6.1,当以醋酸为碳源时,培养初始时 pH_i 为 5.7,生长期间 pH_i 最大值为 6.0,培养 24 h 时 pH_i 为 5.95,测得的 pH_i 水平较低,可能与醋酸进入细胞内释放出 H^+ 导致 pH 下降有关;当以十三烷为碳源时,培养初始时 pH_i 为 5.97,生长期间 pH_i 最大值为 6.05,培养 24 h 时 pH_i 为 5.6,在培养后期测得的 pH_i 过低,可能与细胞氧化烷烃产生的二元酸在细胞内积累有关。可见,生长碳源对细胞 pH_i 有一定影响。

表 1 碳源对 *C. tropicalis* 细胞内 pH 的影响

Table 1 Effects of carbon source for growth on the intracellular pH in *C. tropicalis*

Carbon source	Measured pH_i at cultivation time		Maximum pH_i
	0h	24h	
Glucose	6.0	6.1	6.17
Sucrose	6.0	6.1	6.15
Sodium acetate	5.7	5.9	6.00
<i>n</i> -Tridecane	5.97	5.6	6.05

Medium pH was regulated at 6.0

由于细胞内 pH 随培养时间变化较大,可能与细胞代谢活性有关。为了证明细胞生长代谢活性与 pH_i 的关系,在 5 L 发酵罐中于 pH 6.0 条件下培养细胞,并分析一些能表征细胞生长代谢活性的发酵参数与 pH_i 或 pH 跨膜梯度 ΔpH ($\Delta pH = pH_i - pH$) 之间的关系。

2.4 细胞生长代谢活性与 pH_i 关系

由于细胞比生长速率 (μ)、葡萄糖比消耗速率 (q_s) 和 CO_2 比生成速率 (q_c) 与活细胞量有关,它们的大小反映了细胞活力的高低,因此,本文分析了这些参数在生长期的变化规律,并按方程(1)~(3)计算。

$$\mu = \frac{1}{2C_{x_i}} \left\{ (C_{x_i} - C_{x_{i-1}}) / \Delta t_{i-1,i} + (C_{x_{i+1}} - C_{x_i}) / \Delta t_{i,i+1} \right\} \quad (1)$$

$$q_s = \frac{1}{2C_{x_i}} \left\{ (C_{s_i} - C_{s_{i-1}}) / \Delta t_{i-1,i} + (C_{s_{i+1}} - C_{s_i}) / \Delta t_{i,i+1} \right\} \quad (2)$$

$$q_c = 106.2 \left(\frac{V_{air}}{C_x V} C_{CO_2} \right)_i \quad (3)$$

其中 Δt 为两个取样点的时间间隔; C_x 和 C_s 分别为干细胞、葡萄糖质量浓度 (g/L); C_{CO_2} 为尾气中 CO_2 体积百分含量 (%); V_{air} 和 V 分别为通气量 (L/min) 和培养液体积 (L)。当 $\Delta t = 2$ h 时,由方程(1)和(2)得到方程(4)和(5):

$$\mu = \frac{1}{4C_{x_i}} (C_{x_{i+1}} - C_{x_{i-1}}) \quad (4)$$

$$q_s = \frac{1}{4C_{x_i}} (C_{s_{i+1}} - C_{s_{i-1}}) \quad (5)$$

葡萄糖和醋酸共作碳源时的菌体生长动力学见图 6。从图 6 中可以看出,在培养初期 6 h 之内,葡萄糖消耗非常缓慢,而醋酸含量逐渐下降,至 6 h 时几乎消耗殆尽,可以判断菌体在这段生长期间主要利用醋酸作生长碳源,说明 *C. tropicalis* 酵母优先利用醋酸作生长碳源,可能醋酸较葡萄糖更易跨过质膜进入细胞;培养 8 h 后葡萄糖含量明显下降,表明细胞开始快速利用葡萄糖生长。虽然细胞有选择性地代谢碳源,但是 pH_i 始终处于逐渐上升趋势,当培养至 12 h 时 pH_i 达到最大值 6.15,而 CO_2 释放量和溶解氧 (DO) 在培养 14 h 时分别达到最大值和最小值,之后 DO 水平回升, CO_2 释放量下降, pH_i 也略有下降,在培养期间 pH_i 变化范围在 5.72 ~ 6.15,这些现象说明细胞生长代谢活性与 pH_i 密切相关。

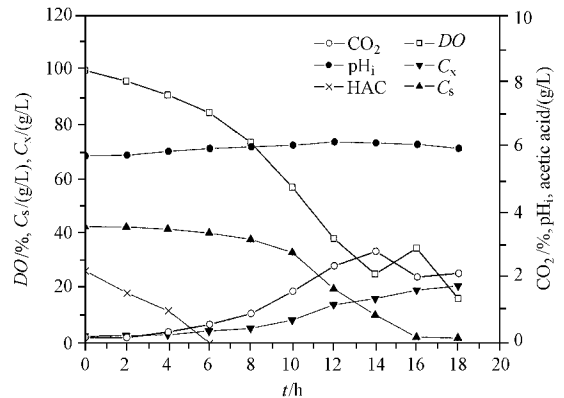


图 6 热带假丝酵母细胞生长动力学 (细胞外 pH = 6.0, 30°C)

Fig.6 Kinetics of the cell growth of *C. tropicalis*

μ 、 q_s 、 q_c 与 ΔpH 的关系见图 7。菌体生长的延迟期约为 2 h,菌体几乎不繁殖,而在培养期 4 ~ 10 h, ΔpH 随着培养时间增长而逐渐增大, μ 、 q_s 和 q_c 也随之增加,说明菌体生长活力随 pH_i 的增加而逐渐提高。培养至 10 h 时 μ 、 q_s 和 q_c 同时达到最大值,分别为 0.2 h^{-1} 、 0.258 h^{-1} 和 0.546 h^{-1} ,此时菌体生长活力最强, ΔpH 增至 0.05,表明在细胞质膜两侧形成了内向氢离子浓度梯度,可能对与 H^+ 协同运输的营养物质的摄取有促进作用。 ΔpH 在培养至 12 h 时达到最大值 0.15 (pH_i 6.15) 较前者达到最大值时间延迟了 2 h,可能是菌体自身调节的一个迟缓过程。培养 12 h 后, ΔpH 开始减小,同

时 3 个比速率参数值也迅速下降。这些结果说明菌体生长活性与 ΔpH 或 pH_i 存在对应关系 ΔpH 或 pH_i 的增加对应着菌体代谢活性增加 pH_i 在 6.1 ± 0.05 范围内时细胞生长代谢活性最高。

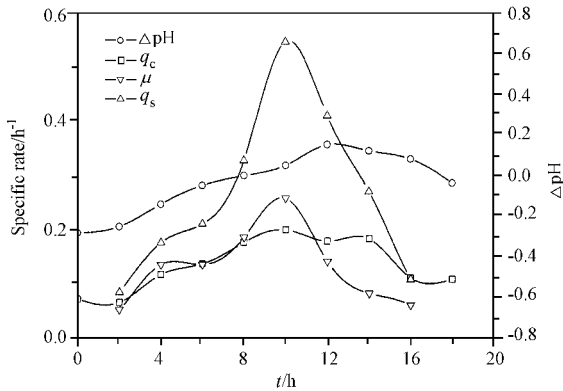


图 7 热带假丝酵母细胞比生长速率、 CO_2 比生产速率和葡萄糖比消耗速率及 ΔpH 随时间的变化 细胞外 $\text{pH}=6.0$ 30°C

Fig.7 The time course of specific rates of *C. tropicalis* cell growth, CO_2 production, glucose consumption and ΔpH

3 结论

采用荧光探针技术测量了产长链二元酸 *C. tropicalis* 细胞内 pH 值。载入荧光探针 cFDA 的适宜条件为 cFDA 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 处理时间 30 min、温度为 35°C 。在磷酸盐缓冲液 $\text{pH} 5.0 \sim 7.5$ 范围内, 测量的 pH_i 在 $6.0 \sim 6.3$ 细胞外 pH 对 pH_i 影响较小, 醋酸和烷烃对细胞 pH_i 影响略为明显, 这与醋酸解离性质和烷烃代谢产物形成有关, 而葡萄糖和蔗糖有类似的影响。在发酵罐中恒定 $\text{pH} 6.0$ 培养细胞, 证明细胞生长代谢活性与 pH_i 密切相关。通过对细胞内 pH 的分析, 可以为进一步研究提高细胞生长速率和长链二元酸跨膜运输机理提供理论依据。

Measurement of Intracellular pH in Long-chain Dicarboxylic Acid-producing Yeast *Candida tropicalis* and Its Growth Activity

LIU Shu-Chen^{1, 2*} XIE Lan-Yi³ LI Chun¹ CAO Zhu-An¹

¹(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

²(Fushun Research Institute of Petroleum and Petrochemicals, Fushun 113001, China)

³(Institute of Biological and Environmental Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract Intracellular pH (pH_i) has an important influence on the metabolic activity of cells or cellular processes. The intracellular pH (pH_i) of long-chain α , ω -dicarboxylic acid-producing *Candida tropicalis* was determined by fluorescence

Received : 08-28-2003

This work was supported by Grants from the National Science Foundation of China (No.29976032) and the Laboratory Funds of Tsinghua University Analysis Center.

* Corresponding author. Tel : 86-413-6389412 ; Fax : 86-413-6429551 ; E-mail: liushuchen@im.ac.cn

REFERENCES (参考文献)

- [1] Madshus IH. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J*, 1988, **250** :1 - 8
- [2] Eddy AA. Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Adv Microbial Physiol*, 1982, **23** :1 - 78
- [3] Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*, 1984, **246** :409 - 438
- [4] Leyval D, Debay F, Engasser JM *et al.* Flow cytometry for the intracellular pH measurement of glutamate producing *Corynebacterium glutamicum*. *J Microbiol Meth*, 1997, **29** :121 - 127
- [5] Henriques M, Quinas C, Loureiro-Dias MC. Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology*, 1997, **143** :1877 - 1883
- [6] Rabaste F, Sancelme M, Delort A *et al.* Intracellular pH of *Candida albicans* blastospores as measured by laser microspectrofluorimetry and ³¹P-NMR. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1268** :41 - 49
- [7] Slavik J. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett*, 1982, **140** :22 - 26
- [8] Francois JE, Schaftingen EV, Hers HG. Effect of benzoate on the metabolism of fructose 2, 6-bisphosphate in yeast. *Euro J Biochem*, 1986, **154** :141 - 145
- [9] Imai T, Ohno T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** :3604 - 3608
- [10] Guldfeldt LU, Arneborg N. Measurement of the effects of acetic and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** :530 - 534
- [11] Bracey D, Holyoak CD, Nebe-von Caron G *et al.* Determination of the intracellular pH (pH_i) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H^+ -ATPase. *J Microbiol Meth*, 1998, **31** :113 - 125
- [12] Viegas C A, Almeida P F, Cavaco M *et al.* The H^+ -ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** :779 - 783

technique using a pH-sensitive fluorescent probe $\text{X} (6)$ -carboxyfluorescein diacetate. Optimal loading conditions of the fluorescent probe into the cells were experimentally determined. Effects of extracellular pH and carbon sources for growth on pH_i in the cell grown in a flask were studied; the results indicated that extracellular pH has a slight influence on pH_i , whereas carbon sources such as sucrose, glucose, acetic acid, and n-tridecane showed moderate influences. Further work on the relationship between the cell growth activity and pH_i was carried out in a 5 L bioreactor. The time course of specific rates of the cell growth, glucose consumption, CO_2 production, and pH gradients across cell plasma membrane were plotted, where the cell growth was improved by the higher pH_i at 8 ~ 12 h. The measured pH_i values were varied from 5.72 to 6.15 at medium pH 6.0 in which glucose and sodium acetate were used together as carbon source. The investigation of pH_i can be helpful for understanding its effects on the kinetics of the metabolic steps involved in the synthesis rate of α, ω -dicarboxylic acid and α, ω -dicarboxylic acid transport across plasma membranes.

Key words intracellular pH, growth activity, *Candida tropicalis*