

产甘油假丝酵母稳定期酸胁迫耐受性研究*

谢涛¹,方慧英²,诸葛斌²,诸葛健²

1(湖南工程学院化学化工系,湖南湘潭,411104)

2(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏无锡,214036)

摘要 研究了产甘油假丝酵母稳定期的酸胁迫耐受性。结果表明,在一定的酸性 pH 值范围内,pH 值降低而酸胁迫压力增加,可以促进产甘油假丝酵母胞内聚磷酸盐积累,从而保证细胞免受酸胁迫的过度影响,维持较高甘油生产水平所需的活细胞数;但过高的酸性环境会严重损伤细胞,降低细胞合成聚磷酸盐的能力,从而使细胞存活率和甘油产量下降。产甘油假丝酵母胞内积累聚磷酸盐,可以增强其对营养饥饿和强酸胁迫等的抵抗力,从而提高其在生长稳定期的存活率。

关键词 产甘油假丝酵母,酸胁迫耐受性,甘油合成,聚磷酸盐,存活率

耐高渗透酵母 *Candida glycerinogenes* 发酵生产甘油具有高产量、高得率和高回收率等优点,在我国得到了较好的工业化应用^[1-3]。在以往的研究中发现,当产甘油假丝酵母发酵进入细胞生长稳定期后,发酵液 pH 值下降至 3.0 左右甚至更低,而甘油生产仍能维持在较高水平^[1-2,4]。那么,是什么原因维持细胞在如此强的酸性环境中依然具有足够的甘油合成能力呢? Mcgrath 等^[5]曾研究了 *C. humicola* G-1 对酸性 pH 值的反应,结果发现因胞内聚磷酸盐(PolyP)的积累而使其细胞存活率维持在较高水平,但没有提及对其产量性状的影响。为此,本研究使用含 NaCl 30 g/L、KH₂PO₄ 1.6 g/L 的合成培养基在 7 L 发酵罐中发酵,考察生长稳定期 pH 值对产甘油假丝酵母胞内聚磷酸盐(PolyP)积累、细胞存活率与甘油合成的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

产甘油假丝酵母(*Candida glycerinogenes*) CN1082608,由江南大学发酵甘油研究设计中心提供。

1.2 培养基

种子培养基(g/L):葡萄糖 100,尿素 2,玉米浆 8,自然 pH 值。

合成发酵培养基(g/L):葡萄糖 180,尿素 2, KH₂PO₄ 1.6 g/L, NaCl 30, MgSO₄ · 7H₂O 0.5, CaCl₂

0.1,微量元素溶液 1 mL/L,pH 值不调。

培养基灭菌条件:各种培养基于 1.08 MPa 下灭菌 15 min 备用。

1.3 发酵方法

从刚转接培养好的新鲜斜面种子上挑取 1 环菌株,接入 500 mL 摇瓶中(种子培养基装液量为 50 mL),于往复式摇床上 110 次/min,30 °C 振荡培养 19 h。按 5% (v/v) 的接种量将种子培养液接入装有 5 L 合成发酵培养基的 7 L 发酵罐(美国 BIOFLO 110)中进行发酵,发酵条件为温度 32 °C、搅拌转速 550 r/min、通风量 1 vvm,从发酵第 24 h(细胞生长稳定期)开始控制恒定 pH 值。

1.4 甘油测定

采用高碘酸钠-变色酸法^[1]。

1.5 细胞生物量与细胞存活率测定

细胞生物量采用干重法,以菌体干重(DCW)表示^[4]。细胞存活率采用血球计数板法,存活率以活细胞数与总细胞数之比表示。

1.6 胞内甘油与 PolyP 含量测定

1.6.1 胞内 PolyP 与甘油的提取

按 Mcgrath 等^[5]和 Shi 等^[6]的方法,并略做改动。取一定量的发酵液离心,菌体用去离子水反复洗涤、离心 2 次,湿菌体与 0.15% (活性氯浓度)的次氯酸钠溶液按 1:5 (g:L) 的比例混合均匀,于 25 °C 下反应 45 min 后离心,菌体用去离子水反复洗涤、离心 2 次;然后,用适量去离子水萃取 2 次(每次的萃取时间为 2h,且每隔 30 min 振荡混匀 1 次),并于 4 000 r/min 离心 5 min,萃取液合并入 50 mL 容量瓶中,用去离子水定容摇匀;取萃取液 10 mL 用于测定胞内甘油

第一作者:工学博士,副教授。

*湖南省自然科学基金(07JJ6031),湖南省应用化学重点建设学科基金(2008ZJXK102)

收稿日期:2009-01-13,改回日期:2009-02-20

含量。

1.6.2 游离磷(Pi)的测定

采用钼蓝比色法^[7]。

1.6.3 PolyP的测定

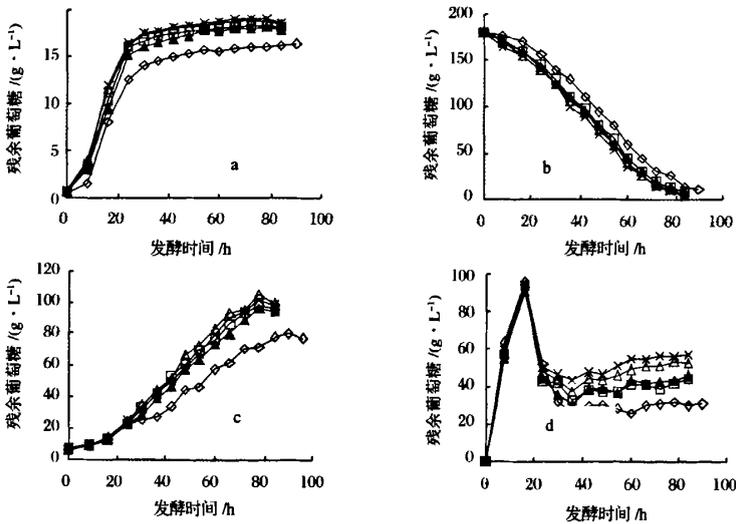
取一定量上述胞内萃取液,按1:5体积比加入浓HCl于100℃水浴锅中水解50 min,再测定总磷的含量,总磷含量减去游离磷含量即得PolyP含量^[6]。

2 结果与分析

2.1 稳定期 pH 值对产甘油发酵过程的影响

当 *C. glycerinogenes* 发酵进入稳定期后控制恒定的 pH 值,其发酵过程见图 1。由图 1(a、b、c)可看出,在稳定期 pH 值 3.0、4.0、5.0 及不调时,细胞生长、甘油合成和葡萄糖消耗过程以及发酵周期基本一致,发酵终止时细胞生物量、甘油产量及其转化率与生产能力相当接近。而当稳定期控制 pH 2.0 时,发

酵周期较之前述 4 种情况延长了 12 h,细胞生长迟缓,葡萄糖消耗速率与甘油合成能力明显降低;与 pH 值不受控制相比,细胞生物量减少了 18.1%,胞外甘油产量、转化率与生产能力分别下降了 19.7%、21.8%、27.1%。从图 1(d)不难看出,稳定期不同 pH 条件下,*C. glycerinogenes* 胞内积累的甘油含量在对数生长期(第 16 h 时)出现一个峰值,这是因为处于对数生长期的细胞,其胞内合成代谢旺盛,但此时细胞数量较少而所受渗透压胁迫很大,需要在胞内积累较多的相容性物质以增强其抵抗高渗的能力。在进入稳定期中期后,胞内甘油含量停止下降且保持平稳,但酸性胁迫压力越高胞内积累的甘油却减少,特别 pH 2.0 时从第 36 h 开始胞内甘油含量已下降至 30.0 mg/g(DCW)左右。这一现象说明,在稳定期中后期,*C. glycerinogenes* 胞内积累的甘油在抵抗强酸性胁迫中发挥的作用显著弱化。

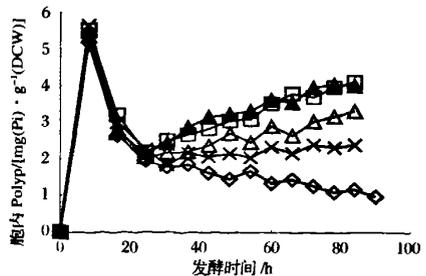


◇—pH2.0; □—pH3.0; △—pH4.0; ×—pH5.0; *—pH 不调

图 1 稳定期控制不同 pH 值时的产甘油发酵过程

2.2 稳定期 pH 值对胞内聚磷酸盐积累的影响

图 2 表示在稳定期控制 pH 值的发酵过程中 *C. glycerinogenes* 胞内 PolyP 积累的变化。从图 2 可看出,在第 16 h 时胞内 PolyP 的积累出现峰值,但随着发酵过程的延续呈下降趋势,直到发酵进入细胞生长稳定期后胞内 PolyP 的积累量呈现出或快速增加(pH 3.0 和 pH 不调)、或缓慢增加(pH 4.0)或保持平衡(pH 5.0)、或减少(pH 2.0)的变化趋势。至发酵终止时,稳定期控制 pH 2.0、pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0 和 pH 值不调等条件下胞内 PolyP 的积累量依次为



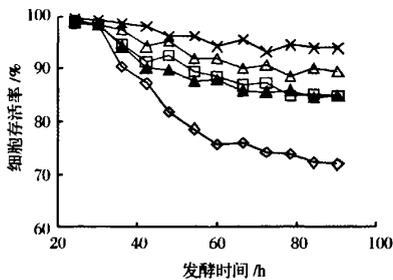
◇—pH 2.0; □—pH 3.0; △—pH 4.0; ×—pH 5.0; *—pH 不调

图 2 稳定期 pH 值对胞内聚磷酸盐积累的影响

1.27、3.97、3.17、2.32、4.05 mg (Pi)/g (DCW)。这些现象和数据表明,随着稳定期控制的 pH 值降低,细胞所受酸性胁迫增加,胞内积累 PolyP 的能力逐渐增强,在 pH 3.0 时达到最大;而至 pH 2.0 时由于细胞受强酸性的损伤增大,导致细胞 PolyP 积累能力急剧下降。另外,当稳定期控制 pH 3.0、pH 4.0 或 pH 不调时,*C. glycerinogenes* 在对数生长早期胞内 PolyP 开始大量合成,在葡萄糖快速消耗阶段,随着细胞生物量急剧增加,糖酵解已不足以维持胞内 ATP 供应,胞内 PolyP 急剧减少,其中贮藏的能量得以释放和利用;而当细胞生长进入稳定期时,富磷环境又促使其胞内 PolyP 的积累重新增加。PolyP 这一变化与文献^[6, 8-10]报道一致。

2.3 稳定期 pH 值对细胞存活率的影响

在稳定期控制 pH 值的发酵过程中,细胞存活率的变化趋势见图 3。从图 3 可知,当稳定期 pH 值由 5.0 下降至 2.0 时,*C. glycerinogenes* 细胞存活率依次降低,发酵终止时的存活率分别为 94.5%、88.6%、84.9% 和 72.5%。当稳定期控制 pH 2.0 时,由于菌体所受强酸胁迫压力过大,细胞存活率和生物量较低,从而导致生长速度、葡萄糖消耗速率、甘油合成能力和 PolyP 积累能力的显著下降。由此可见,*C. glycerinogenes* 在稳定期胞内重新积累的 PolyP,可以增强其对营养饥饿和强酸胁迫等不良环境的抵抗力,从而提高其在生长稳定期的存活率,维持较高的甘油合成能力。



—◇—pH2.0; —□—pH3.0; —△—pH4.0; —×—pH5.0; —▲—pH 不调
图 3 稳定期 pH 值对细胞存活率的影响

3 结论

(1) 生长稳定期控制的 pH 值越低,细胞遭受酸性胁迫的压力越强,细胞存活率越低;特别是当 pH 控制在 2.0 时,发酵周期延长,细胞生物量和存活率显著降低,因此甘油合成量急剧减少。

(2) 当生长稳定期 pH 控制在 4.0 和 5.0 时,发

酵周期相同,细胞合成甘油的能力也十分接近;而 pH 控制在 3.0 时,尽管发酵周期不变,但细胞合成甘油的能力有所削弱。

(3) 当 pH 控制在 5.0 时,细胞遭受酸性胁迫的影响较小,因而胞内 PolyP 的积累量基本没有发生变化;而随着控制的 pH 值降低,酸性胁迫压力增加,胞内 PolyP 积累逐渐加剧,但降低至 pH 2.0 时,细胞合成 PolyP 的能力却急剧下降。

(4) 当不控制稳定期 pH 值时,甘油合成、PolyP 积累和细胞存活率的变化规律非常接近于控制 pH 3.0 时的情况,这是因为不控制 pH 值时稳定期的 pH 变化过程与控制 pH 3.0 时差别较小。

(5) 在一定 pH 值范围内,酸性胁迫压力增加,可以促进胞内 PolyP 积累,从而保证细胞免受酸性胁迫的过度影响,维持较高甘油生产水平所需的活细胞数。但是,过高的酸性环境会严重损伤细胞,降低细胞合成 PolyP 的能力,从而使细胞存活率和甘油产量下降。

参 考 文 献

- [1] Zhuge Jian, Fang Huiying, Wang Zhengxiang. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55: 686-692.
- [2] Jin Hairong, Fang Huiying, Zhuge Jian. By-product formation by a novel glycerol-producing Yeast, *Candida glycerinogenes*, with different O₂ supplies [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25: 311-314.
- [3] Wang Zhengxiang, Zhuge Jian, Prior BA. Glycerol producing by microbial fermentation: a review [J]. Biotechnology Advance, 2001, 19: 210-223.
- [4] 谢涛, 方慧英, 诸葛斌, 等. 溶氧对 *Candida glycerinogenes* 产甘油发酵过程的影响 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28 (5): 65-70.
- [5] Mcgrath J W, Quinn J P. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH [J]. Applied Environment and Microbiology, 2000, 66 (9): 4 068-4 073.
- [6] Shi Xiaoli, Yang Liuyan, Niu Xiaojun, et al. Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness [J]. Microbiology Research, 2003, 158: 345-351.
- [7] Nikata T, Natsui M, Sato K, et al. Photometric estimation of intracellular polyphosphate content by staining with basic dye [J]. Analytical Sciences, 2001, 17: 11 675-11

- 678.
- [8] Kulaev I S, Vagabov V M, Kulakovskaya TV, et al. The development of A. N. Belozersky's ideas in polyphosphate biochemistry [J]. *Biochemistry*, 2000, 65 (3): 271 - 278.
- [9] Kulaev I S, Kulakovskaya T V. Polyphosphate and phosphate pump [J]. *Annal Review Microbiology*, 2000, 54: 709 - 734.
- [10] Trilisenko L V, Andreeva N A, Kulakovskaya T V. Effect of inhibitors on polyphosphate metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hypercompensation conditions [J]. *Biochemistry*, 2003, 68 (5): 577 - 581.

Acidic Stress Tolerance of *Candida glycerinogenes* in Stationary Phase

Xie Tao¹, Fang Huiying², Zhuge Bin², Zhuge Jian²

1 (Department of Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China)

2 (Key Lab of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT Acidic stress tolerance of *Candida glycerinogenes* was studied by controlling pH value in the stationary stage. The results demonstrated that, in certain range of acidic pH value, intracellular polyphosphate (PolyP) accumulation by *C. glycerinogenes* can be promoted by the increase of acidic stress. PolyP accumulation can keep cells from greatly influenced by acidic stress and maintain enough live cells to achieve the higher level of glycerol production. However, too high acidic stress can greatly destroy yeast cells, thus largely decreasing PolyP accumulation, cells survival and glycerol production. The conclusion that intracellular PolyP accumulation by *C. glycerinogenes* can strengthen cells resistance for nutrition-deficiency and high acidic stress and increase cells survival in the stationary stage could be made.

Key words *Candida glycerinogenes*, acidic stress tolerance, glycerol production, polyphosphate (PolyP), survival

行业动态

新型 PET 瓶理瓶机加快饮料行业发展

中国的饮料工业每年都以 20% 以上的增长速度高速发展,很多饮料生产企业新上马的生产线定位在 24 000 - 36 000 瓶/h 的中高速饮料灌装生产线。目前国内几家著名饮料包装机械生产企业已经能够提供 36 000 瓶/h 的高速灌装机,以往 18 000 瓶/h 以上的旋转式吹瓶机完全依赖进口,进口的高速吹瓶机价格高昂,使国内众多饮料生产企业望而却步。PET 瓶理瓶机作为中高速饮料灌装生产线的必备设备,随着中国饮料工业高速增长的需求正得到快速发展。近几年吹瓶机通过风送道与灌装机连接的方式大行其道,许多国内知名饮料生产企业近年新上马的生产线均采用了此种方式,如农夫山泉的饮用水和果汁生产线,乐百氏西安和丰润工厂的饮用水生产线等。虽然采用吹瓶机通过风送道与灌装机连接的方式有很多优点,但是对于中高速饮料灌装生产线而言,理瓶机成为不二之选。随着高速饮料灌装生产线需求的快速增长,国内对高速 PET 瓶理瓶机的研发也加快了步伐。国内一家企业就推出了 36000 瓶/h 的高速 PET 瓶理瓶机,该机采用了全新的工作原理,具有体积小、适用范围广的特点。推升式排瓶机构是江苏新美星的专利机构,早期的推升机构每升降一次仅能托起一个空瓶,新的推升机构每升降 1 次可以同时托起 2 个空瓶,提高了出瓶效率,减少了推升机构数量。同时,该机可满足瓶高 360mm 的 2.5L PET 瓶的整理排列,而原 3/0000 瓶/h 的理瓶机最大仅可满足瓶高 320mm 的 1.5L PET 瓶的整理排列。

除此之外,该机还具有如下特点:

1. 筒身采用封闭结构,并保持轻微正压,防止灰尘侵入。筒身顶部设有 2 个气缸驱动的活动盖,方便维修和清洁。
2. 设有破损瓶、变形瓶剔除机构,通常情况下不需停机进行人工清理。如果大批变形、尺寸异常瓶造成落瓶槽堵塞,此时设在机内的检测开关将发出报警信号,并使机器停止运转。操作人员可根据人机界面上的故障指示进行疏通。
3. 特殊设计的落瓶槽能适应尺寸相差不太大的瓶子,而不必更换落瓶槽,仅需对落瓶槽作适当调节即可实现,节省投资。
4. 设有完善的安全防护措施,当维修门和模具更换门打开时,机器不能启动,此时可使用手动操作器控制机器。
5. 理瓶机出瓶拨轮设有卡瓶检测器,能有效保护机器安全。反瓶将在出瓶拨轮与风送道连接处被剔除。
6. 气路系统设有压力开关和合闸阀,压缩空气不接通或气压低于设定值时则机器不能启动。合闸阀与机器启停联动,节省气耗。
7. 风送道进瓶端设有卡瓶排除机构,该机构由气缸驱动。当风送道进瓶端出现卡瓶堵塞时,该机构自动排除堵塞的瓶子,防止由于挤瓶造成理瓶机机件损坏。