

低水势胁迫对粉状毕赤酵母 3-磷酸甘油脱氢酶活力的影响*

邓运涛 程 华 李 钢 牛冬云 伍明俊 王小行

(四川川大光耀生物工程有限公司,成都,610000)

摘 要 一定浓度的盐或山梨醇胁迫可促使粉状毕赤酵母(*Pichia farinosa*)过量表达 3-磷酸甘油脱氢酶(Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase),从而合成出大量甘油抵御胁迫。研究中发现,在 5% 盐胁迫下,粉状毕赤酵母粗酶液 3-磷酸甘油脱氢酶活力提高 30%,在 6% 盐胁迫下,甘油产量提高了 9 倍。在 1.5 mol/L 的山梨醇胁迫下,3-磷酸甘油脱氢酶活力提高了 14%。

关键词 粉状毕赤酵母, 3-磷酸甘油脱氢酶, 胁迫

利用发酵法生产甘油具有投资少,见效快,产品中有害物质少等优点,适合中小规模的企业生产^[1]。由于甘油在细胞渗透压调节中的重要作用,近几年来,甘油的合成代谢途径和分解代谢途径以及其在胞内积累机理等受到越来越多的重视。3-磷酸甘油脱氢酶是甘油代谢和磷脂合成中的一个关键酶,目前已从不同的微生物如细菌^[2]、藻类^[3]和酵母^[4]中提纯了该酶。

研究结果表明^[5],提高甘油合成的最直接的办法就是过量表达编码 3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)的同工酶 Gpd1p 的基因 GPD1。过量表达另一同工酶 Gpd2p 的编码基因 GPD2 对甘油合成具有相同的功能。与此相反,过量表达 3-磷酸甘油酯酶 Gpp1p 的编码基因 Gpp1 并不能提高甘油的合成。进一步研究表明,同时过量表达 GPD1 和 GPP1 的菌株并不能比仅仅过量表达 GPD1 的菌株生产更多的甘油。Edgley 和 Blomberg^[6,7]等报道了通过改变培养基渗透压来间接诱导细胞产生高活性酶的方法,这是由于在高渗环境条件下,细胞内的甘油水平提高,以抵抗细胞外环境的压力的缘故。Edgley 和 Brown^[8]报道了在与 1.7 mol/L NaCl 孵育后,ct GPD 活性增高 30 倍。蔡敬民^[9]报道在 YEPD 培养基中添加 NaCl,可以诱导酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞内 3-磷酸甘油脱氢酶的形成,当 NaCl 浓度达 5% 时,酶比活可达 0.05 U/mg;若再限制培养基中葡萄糖浓度在 100 mg/L 以下,酶比活可达到 0.89 U/mg。

近 10 年来,用于发酵法生产甘油的菌种研究的最多的是粉状毕赤酵母(*Pichia farinosa*)。文中研究了盐胁迫及高渗对粉状毕赤酵母 3-磷酸甘油脱氢酶

酶活力及甘油产量的影响,并比较了川大光耀生物公司构建的转盐藻基因 GPDH 粉状毕赤酵母工程菌与野生型菌的 3-磷酸甘油脱氢酶活力,为发酵生产甘油提供实验基础。

1 试 剂

DHAP 40 mmol/L; NADH 20 mmol/L; PMSF 100 mmol/L; TDG 缓冲液: 100 mmol/L Tris、1 mmol/L DTT、2.5% Glycerol(V/V);酶活测定缓冲液: 33 mmol/L Hepes、34 mmol/L Tricine、33 mmol/L Mes pH 6.9;甘油三酯试剂盒(中生北控生物技术股份有限公司)。

2 方 法

酶活测定,采用 Gancedo^[10]等人的比色法。NADH 在 365 nm 处有较强的吸光值,并且吸光度与 NADH 的浓度成正比变化,通过对反应过程中 NADH 的变化量可以判断出 3-磷酸甘油脱氢酶的催化脱氢的活力。NADH 的吸光系数为 $6.22 \times 10^3 / \text{M} \cdot \text{cm}$,酶活力单位定义为 1 min 消耗 $1 \mu \text{mol}$ 底物 DHAP 所需的粗酶量。酶活力(W)计算公式为 (U/mL) : $W = 10^6 \times (A_{0S} - A_{90S}) / (1.5 \text{ min} \times 0.05 \text{ mL}) \times 6.22 \times 10^3$ 。反应条件: pH 6.9, 温度 25℃, DHAP 0.03 mL, NADH 0.03 mL, 酶活测定缓冲液 2.89 mL, 粗酶液 0.05 mL。

挑单菌落接种于 3 mL YPD 液体培养基中,30℃ 过夜培养;第 2 天早上,取 0.5 mL 菌液接种于 200 mL 不同的培养基中,培养至 OD_{600} 为 1.2;取 1.5 mL 菌液煮沸 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至干净的 Ep 管,用于甘油含量测定(测定方法参照甘油三酯试剂盒);剩余的菌液于 3 500 r/min 离心收集细胞,然后用 30 mL TDG buffer 重悬;

第一作者:硕士(王小行为通讯联系人)。

* 国家高技术的发展计划(863 计划)(No. 2002. AA212021)

收稿时间:2004-12-01,改回时间:2005-01-17

加入 PMSF 0.3 mL,加入融菌酶至终浓度为 1 mg/mL;超声破碎细胞 20 min(功率 40%,工作 3 s,间歇 2 s);取 1.5 mL 破碎菌液,12 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀,上清液即为粗酶液,保存于 4℃。

按比例混合好酶反应液,立即放入石英比色杯中,延迟时间为 10 s,监测 90 s,每 30 s 读 1 次吸光度,波长 365 nm。计算每分钟吸光度的平均下降速率,求出粗酶液中 GPDH 酶活力。

3 结果与讨论

3.1 不同盐浓度对 *Pichia farinosa* 产 GPDH 酶活

表 1 不同盐浓度对 P.F 菌 GPDH 酶活力的影响以及甘油产量的影响

盐浓度/%	0	1	2	3	4	5	6	8	10	12
A_{0s}	0.080	0.080	0.085	0.085	0.087	0.090	0.092	0.087	0.087	0.092
A_{30s}	0.056	0.050	0.055	0.056	0.055	0.056	0.073	0.074	0.087	0.090
A_{60s}	0.034	0.034	0.037	0.037	0.032	0.035	0.057	0.062	0.086	0.090
A_{90s}	0.027	0.024	0.025	0.022	0.021	0.021	0.046	0.050	0.087	0.090
酶活力/ $U \cdot mL^{-1}$	114	120	128	136	142	148	98	80	-	-
甘油含量/ $g \cdot L^{-1}$	2.52	5.12	6.82	7.33	10.6	17.6	26.4	17.5	8.88	2.55

表 2 高渗对 *Pichia farinosa* 菌 GPDH 酶活的影响

培养基	YPD	YPD(1.5 mol/L 山梨醇)
A_{0s}	0.080	0.083
A_{30s}	0.056	0.047
A_{60s}	0.034	0.033
A_{90s}	0.027	0.022
酶活力/ $U \cdot mL^{-1}$	114	130

由表 2 可见,在培养基里添加 1.5 mol/L 的山梨醇,GPDH 酶活高于不加山梨醇的培养基。可以推测,在一定浓度范围内,随着山梨醇浓度的升高,酶活力也随之升高。

3.3 野生型与基因工程 *Pichia farinosa* 菌的 GPDH 酶活比较

表 3 野生型与基因工程 *Pichia farinosa* 菌的 GPDH 酶活比较

菌种	野生型	基因工程菌
A_{0s}	0.080	0.085
A_{30s}	0.056	0.059
A_{60s}	0.034	0.037
A_{90s}	0.027	0.030
酶活力/ $U \cdot mL^{-1}$	114	118

由表 3 可见,基因工程 *Pichia farinosa* 菌(转盐藻 GPDH 基因)的酶活力略高于野生型菌,但差异不显著。

4 讨论

生长于低水分活度环境下的微生物细胞通过促

力的影响以及甘油产量的影响

由表 1 可见,随着盐浓度的升高,*Pichia farinosa* 产 GPDH 酶活力也随之升高,到 5% 盐浓度时,活力达到最大,为 148 U/mL ;随着盐浓度的进一步增大,酶活力不增反降。盐浓度达到 12% 时,菌体不再生长。甘油产量的变化情况也大致如此,随着盐浓度的升高而提高,在盐浓度为 6% 时,甘油产量达到最大(26.4 g/L),进一步增加盐浓度,甘油产量下降。

3.2 高渗透压对 *Pichia farinosa* 菌的 GPDH 酶活的影响

进一种或多种特定溶质(相溶性溶质)在细胞内积累来抵御胞内水分子外流。这些相溶性溶质可以以较高的浓度在细胞内累积而对细胞酶系不出现抑制或灭活。甘油则是酿酒酵母以及其他多种酵母的最主要相溶性溶质。在盐胁迫及高渗胁迫下,粉状毕赤酵母通过过量表达编码 3-磷酸甘油脱氢酶 GPDH,提高甘油合成来抵御胁迫。一定浓度的盐或山梨醇对于 3-磷酸甘油脱氢酶的表达起诱导作用,可积累大量的甘油,但高浓度的盐会抑制菌的生长。通过遗传改造,向酵母菌转入高效外源 GPDH 基因,有望提高甘油产量,是发酵生产甘油的新途径。

参考文献

- 1 诸葛健,方慧英,诸葛斌. 发酵法生产丙三醇的过去和现在[J]. 工业微生物学报,1997, 27(3): 34~36
- 2 Kistler WS, Lin ECC. Purification and properties of the flavine-stimulated anaerobic L-glycerophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1972,112(1):539~547
- 3 Haus M, Wegmann K. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8) from *Dunaliella tertiolecta*. I. Purification and kinetic properties[J]. Physiol Plant, 1984, 60:283~288
- 4 Albertyn J, Van Tonder A, Prior B A. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEBS,1992, 11413: 130~132

- 5 Michnick S, Roustan J L, Remize F, Barre P & Dequim S. Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for GPD1 Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase[J]. Yeast, 1997, 13: 783~793
- 6 Edgley M, Brown A D. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*[J]. J Gen Microbiol, 1983, 129: 3 453~3 463
- 7 Blomberg A, Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Bacteriol, 1989, 171: 1 087~1 092
- 8 Brown A D. Compatible solutes and extreme water stress in eucaryotic micro-organisms[J]. Adv Microb Physiol, 1987, 17: 181~242
- 9 蔡敬民. 酿酒酵母 3-磷酸脱氢酶的诱导, 提纯和性质[J]. 真菌学报, 1996, 15(2): 121~128
- 10 Gancedo C, Gancedo J M, Sols A. Glycerol metabolism in yeasts: Pathways of utilization and production[J]. Eur J Biochem, 1968, 5(2): 165~172

The Influence of Stress on Activity of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in *Pichia farinose* in Low Water Potential

Deng Yuntao Cheng Hua Li Gang Niu Dongyun

Wu Mingjun Wang Xiaoxing

(Sichuan Chuanda Guangyao Bio-tec. Engineering Ltd. Co., Chengdu, 610000, China)

ABSTRACT *Pichia farinose* would express superfluous Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase and synthesize lots of glycerol against stress in salt and D. sorbitol. We have found that activity of Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase in *Pichia farinose* in 5% salt is 30% higher than that with no salt and glycerol-output of *Pichia farinose* in 6% salt is 9 time higher than control. Activity of Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase in 1.5mol/L D. sorbitol is 14% higher than without adding D. sorbitol.

Key words *Pichia farinose*, Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase, stress

市场动态

美国减肥糖果销售市场看好

据美国“全国糖果生产厂商协会(NCA)”透露,美国糖果业中的减肥糖果在 2004 年销量猛增。虽然这一行业在整个糖果市场的份额微不足道,但由于人们对健康产品的选择增加,使之稳步增长。

在美国芝加哥举行的 2004 年全球糖果博览会上,NCA 总裁 Larry Graham 说,糖果行业中的减肥糖果适应了消费者减肥的需要,包括低碳、低糖和无糖产品,在美国 2004 年销售增长了 90%,虽然减肥糖果这种产品仅占美国全部糖果销售的 3%。据市场分析公司 ACNielsen 统计,截止到 2004 年 3 月,在 72 亿美元的美国糖果总销量中,减肥糖果的销售额为 2 775 亿美元。

在吸引了全世界 500 多家糖果制造商参加的全球糖果博览会上,“低碳”糖果及其产品是今后糖果市场发展趋势之一,低碳食品市场不仅吸引了美国糖果生产厂商,而且还有一些其他国家的新的糖果生产厂商。美国的主要巧克力生产厂家 Hershey 食品公司已在其 BetterFeryou 系列中推出了 Sugar Free 和 Ig Sugar Carb 巧克力排,针对目前消费者饮食中对降低碳水化合物含量的新要求,已在 2004 年 8 月推出一种新的 Carb Aeternatives 系列产品。这家巧克力生产厂家还计划为其受欢迎的 Kisses 巧克力推出一种新的“低碳”形式。

随着“低碳”食品趋热,糖果生产厂家越来越重视推出降低碳水化合物含量的糖果产品。英国路透社的一项研究结果显示,“低碳”食品不能再被认为是消费者一时的爱好,今后“低碳”食品市场前景将会十分广阔。上述这份调查了美国和欧洲 500 家食品和饮料生产厂家的研究结果发现,有 95% 的食品公司承认“低碳”食品销售趋势较热。因此,目前世界上的许多食品企业正在开发“低碳”新产品。

与此同时,食用方便的糖果产品包装也正在引起一些糖果企业的兴趣。在芝加哥举行的行业展览会上,其展品显示出越来越多的糖果包装已使用可再封的包装形式,这使得消费者能将一次吃不完的糖果留待下一次食用,或者方便在各种路途中使用。在糖果的销售中,小包装系列品种不断增加。Hershey's 公司说,他们在减肥糖果市场方面将推出小型的糖果包装。

另外,美国的口香糖市场也较好。据美国 NCA 提交的 2003 年的“糖果工业状况”报告显示,美国糖果市场 2003 年的销售额共计 248 亿美元,其中巧克力占 135 亿美元,非巧克力糖果为 76 亿美元。如果按种类划分,口香糖行业销售增长最快,达到 5.5%,而口气清香糖表现最差,比 2002 年下滑 10.6%,仅占非巧克力糖果市场的 3%。巧克力行业销售比 2002 年仅增长了 1.7%。