

文章编号: 1001-7453(1999)03-0001-06

# 产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油 脱氢酶在甘油形成中的作用

陈 珺, 王正祥, 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

**摘要:** 为了研究胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(ctGPD, EC 1.1.1.8) 在产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis* Zhuge) 甘油合成机制中的作用, 考察了发酵实验过程中 ctGPD 的活力水平以及高渗环境对该酶酶活水平和甘油形成的影响. 结果表明, 该菌种中, ctGPD 的表达在相对低渗的发酵过程中处于一个较高的水平, 并在 36 h 和 60 h 处分别出现两次峰值; 高渗环境可使 ctGPD 酶活增加, 但幅度不大. 发酵试验表明, 随着高渗溶质浓度增大, 可在一定程度上恢复细胞产甘油能力, 但总水平下降.

**关键词:** 甘油; 产甘油假丝酵母; 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶

中图分类号: TQ223.163 文献标识码: A

以产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis* Zhuge) 为基础的甘油发酵生产<sup>[1]</sup>, 经无锡轻工大学科技工作者历时 30 年的不懈努力, 于七五期间实现了工业化<sup>[2,3]</sup>. 甘油合成途径包括两步反应: 1) 磷酸二羟丙酮(DHAP) 在依赖还原型辅酶(NADH) 的胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶(cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, ctGPD) 催化下还原为 3-磷酸甘油; 2) 3-磷酸甘油在特异性的 3-磷酸甘油酯酶催化下脱去磷酸根转化为甘油. 前人的研究表明, 酿酒酵母中的 ctGPD 的主要部分为诱导酶, 在高渗诱导下酶活大幅提高, 并伴随有甘油产率的提高<sup>[4-8]</sup>. 但对产甘油假丝酵母中该酶在甘油过量合成中的作用目前尚未见报道, 作者对此进行了初步的探讨.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

*C. glycerolgenesis* WL2002-5 无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心保藏及提供.

### 1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 葡萄糖 100 g/L, 尿素 2 g/L, 玉米浆 10 mL/L.

收稿日期: 1999-01-09; 修订日期: 1999-06-21

基金项目: 国家九五科技基金资助(96-c03-03-03)

作者简介: 陈 珺(1974 年 5 月生), 女, 江苏无锡人, 硕士研究生.

1.2.2 发酵培养基(FM) 葡萄糖 250 g/L, 尿素 2 g/L, 玉米浆 5 mL/L.

1.2.3 基本培养基(MM) 酵母氮基 (Difco) 6.7 g/L, 葡萄糖 20 g/L.

### 1.3 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶活性的测定

按文献 [5] 提供的方法进行. NADH 的摩尔消光系数为  $6.2 \times 10^3 (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$ , 酶活单位定义为: 1 min 消耗  $1 \mu\text{mol}$  的 NADH 所需要的酶量为 1 个单位. 蛋白质浓度测定用考马斯蓝 R-250 法进行<sup>[9]</sup>.

### 1.4 甘油浓度测定

按文献 [10], 用变色酸法进行.

### 1.5 残糖测定

用蒽酮法进行.

### 1.6 其它测定

pH 值测定, 用精密 pH 试纸测定; 菌体量测定, 640 nm 下测定吸光值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 ctGPD 酶活在甘油发酵过程中的动态变化

将培养 18 h 的种子以 5% 的接种量接入发酵培养基, 从 12 h 起每隔 12 h 取样, 分别测定 pH、菌体量、残糖含量和甘油含量, 收集菌体测定胞浆 ctGPD 酶活. 结果如图 1 所示.

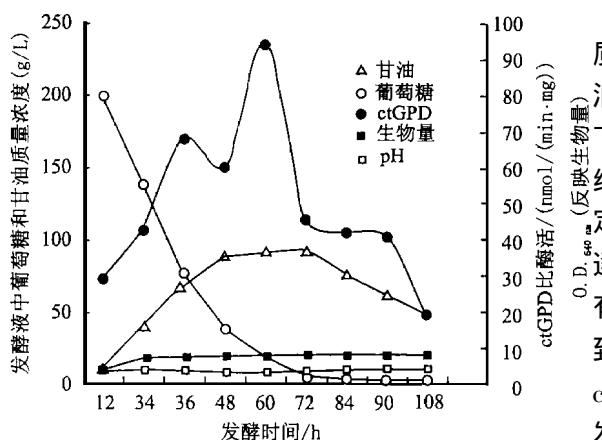


图 1 甘油发酵过程参数动态变化

由图 1 可见, 随着时间的增加, 残糖质量分数逐步下降, 72 h 已低于 1%; 甘油含量逐步上升, 72 h 达到峰值后开始下降, 此时甘油取代葡萄糖成为碳源, 被细胞利用; 菌体量和 pH 值则基本保持稳定. ctGPD 的比酶活在 12 h 处最低, 以后逐步上升, 36 h 处出现第一峰值, 随后略有降低, 60 h 处达到第二峰值, 随后下降到  $50 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ . 从中可以发现, ctGPD 的表达有以下几个特征: 首先, 在发酵过程中酶表达出现两次高峰, 在 36 h 处 ctGPD 的第一峰值与甘油的最大生成速率是一致的, 这意味着第一次表

达峰值水平直接影响甘油合成和积累水平; 至于第二个峰值的出现, 推测可能是在发酵中后期, 葡萄糖已下降到相当低的浓度, 甘油的合成已经非常缓慢, 胞浆 ctGPD 对于甘油合成的作用已不再显著, 胞浆 ctGPD 高表达有可能使得 3-磷酸甘油积累, 3-磷酸甘油进入线粒体内, 经线粒体内膜上的 ctGPD 脱氢形成 DHAP, 获得能量, 形成的 DHAP 再排出线粒体, 再氧化胞内还原力 NADH, 也有可能 3-磷酸甘油是用于合成甘油三酯, 以进一步合成脂肪. 其次, 250 g/L 的初始糖质量浓度并不是一个较高的渗透压环境, 但胞浆 ctGPD 的表达水平较高, 且经历两次高峰以后, 酶活稳定在一个较高的水平. 在大部分 *S. cerevisiae* 中, 发现其 ctGPD 比酶活一般都较低<sup>[5, 7, 8]</sup>, 一般在  $10 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  左右, 不大于  $100 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ . 而在耐高渗酵母 *D. hansenii* 和 *Zygosaccharomyces rouxii* 中, 在普通培养基中的酶活

可超过  $100 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ <sup>[11]</sup>。据文献报道<sup>[12,13]</sup>，在 *S. cerevisiae* 中，编码胞浆 ctGPD 的基因有两个，分别为 GPD1 和 GPD2，前者受高渗诱导，后者受氧化还原电势诱导，GPD1 和 GPD2 的基因产物可以互相取代；在普通代谢过程中，GPD2 编码的基因产物酶活很低，甚至测不出，但已足以满足细胞生长的要求。产甘油假丝酵母不需高渗环境，即可表达较高的 ctGPD，这可能是本菌种高产甘油的一个重要前提，同时也预示着在本菌种中不受渗透压诱导的酶活表达可能是比较强的。

## 2.2 高渗溶质对 ctGPD 表达的影响

选取高渗溶质 NaCl、KCl 和甘露醇，分别考察它们在不同浓度下对 ctGPD 表达的影响。以 MM 培养种子，分别将不少于 0.3 g 的菌体接入含有不同浓度的高渗溶质的 MM 培养基，在  $31^\circ\text{C}$ ， $110 \text{ r}/\text{min}$  的条件下振荡培养，分别在 1, 3 h 时取样。将 1 h 处未添加高渗溶质样品的酶活 ( $S_t$ ) 作为其基准酶活，不同高渗溶质处理不同时间，测得的酶活设为  $S_a$ ，以  $S_a$  与  $S_t$  的比值来反应 ctGPD 编码基因在高渗胁迫下其表达产物的活力变化。结果如图 2~4 所示。

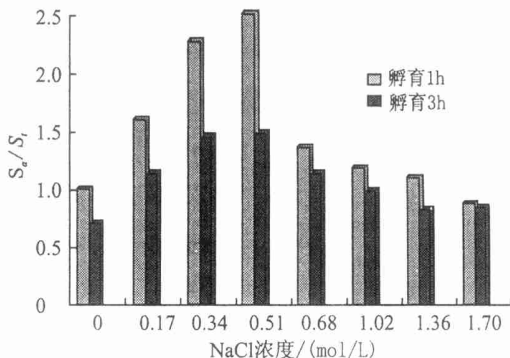


图 2 NaCl 对 ctGPD 酶活的影响

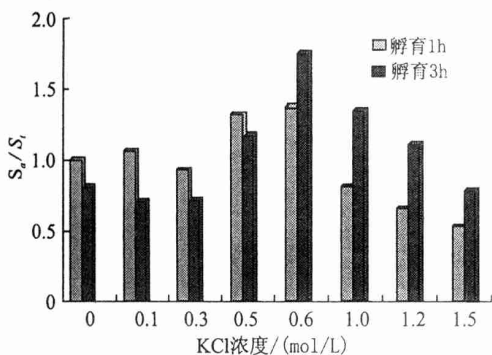


图 3 KCl 对 ctGPD 酶活的影响

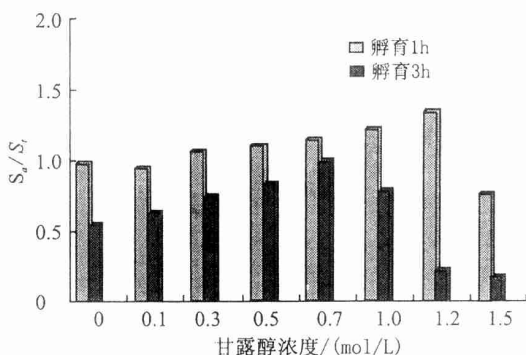


图 4 甘露醇对 ctGPD 酶活的影响

由图 2 可见，1 h 和 3 h 时，随着 NaCl 浓度的增大， $S_a/S_t$  比值增大，即该酶的比酶活增大，分别在  $0.51 \text{ mol}/\text{L}$  处达到峰值，孵育 1 h 时  $S_a/S_t$  达到 2.5，3 h 后为 1.5 左右，随后逐渐下降。这说明与对照相比，任何浓度的 NaCl 均对该酶有一定程度的诱导作用，且对应于最大诱导存在着一个最适的 NaCl 浓度。由图 3 可见，KCl 与 NaCl 对酶的诱导是相似的，但是与 NaCl 相比，同浓度下的 KCl 对 ctGPD 的诱导作用显然要小一些。由图 4 可见，甘露醇与 KCl 对 ctGPD 的诱导相比，其幅度更小。在研究酵母细胞耐高渗压的机理时，主要是以 *S. cerevisiae* 为研究对象。大量的研究已揭示，处于渗透压胁迫下的酵母细胞会增加甘油的合成和胞内甘油的积累。同样，甘油合成的关键酶——胞浆 ctGPD 的活力水平显著提高，增幅达 3~6 倍，甚至 10 倍以上，最高的可达 30~40 倍<sup>[4-8]</sup>。在对耐盐酵母 *Debaryomyces hansenii* 的研究中发现<sup>[11]</sup>，*D. hansenii* 在普通培养基中的胞浆 ctGPD 酶活为  $144 \pm 7.0 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ，通过在含  $70 \text{ g}/\text{L}$  的 NaCl 培养基中培养后，其胞浆 ctGPD 酶活提高到

256 ± 5.6 nmol/(min · mg), 酶活仅提高 0.7 倍; 同样, 在对另一耐盐酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 的研究中发现<sup>[12]</sup>, 经 1 mol/L NaCl 诱导后, 其胞浆 ctGPD 酶活仅提高 0.5 倍. 另有研究表明, 耐高渗酵母 *S. rouxii* 中, ctGPD 比酶活基本不变, 且仅为 *S. cerevisiae* 中的 1/20 ~ 1/400<sup>[4]</sup>. 本研究中, 产甘油假丝酵母在 MM 基本培养基中的胞浆 ctGPD 酶活超过 100 nmol/(min · mg), 最高可达 200 nmol/(min · mg) 左右, 比已有广泛研究的不耐高渗的 *S. cerevisiae* 和耐高渗的 *D. hansenii* 以及 *Z. rouxii* 都要高, 而高渗环境的胁迫对产甘油假丝酵母胞浆 ctGPD 酶活的影响则与 *D. hansenii* 和 *Z. rouxii* 相似. 可以推测, 在产甘油假丝酵母中, 胞浆 ctGPD 的酶活稳定在一个较高的水平, 形成一个发达的产甘油代谢流, 这是该菌种高产甘油的重要前提条件.

### 2.3 高渗溶质对甘油发酵的影响

以上实验说明, 高渗环境对 ctGPD 的酶活有一定程度的影响, 为了进一步考察高渗环境下, 表达增强的 ctGPD 对于甘油合成的作用, 将培养好的种子以 5% 的接种量接入含不同浓度 NaCl、KCl 和甘露醇的发酵培养基, 浓度梯度为 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mol/L, 在 31 ℃, 110 r/min 的条件下振荡培养 72 h. 测定其菌浓, pH, 甘油含量, 残糖含量, 并计算甘油产率, 即单位细胞产甘油能力 = 甘油含量/菌浓. 结果见表 1.

表 1 添加高渗溶质对产甘油的影响

高渗溶质浓度/ (mol/L)	菌 浓	pH	残糖质量浓度/ (g/L)	甘油质量浓度/ (g/L)	单位菌体 甘油产率
对照	8.245	3.0	18.45	128.40	1.557
NaCl					
0.3	7.665	3.0	33.45	86.8	1.132
0.5	7.375	3.0	91.40	78.98	1.071
0.7	6.400	3.5	112.00	71.35	1.115
1.0	6.350	3.5	121.96	64.17	1.011
KCl					
0.3	8.030	3.25	33.70	78.18	0.974
0.5	7.705	3.25	42.80	79.71	1.035
0.7	7.950	3.25	84.18	84.49	1.063
1.0	7.280	3.25	91.68	84.12	1.155
甘露醇					
0.3	7.765	3.5	1.33	95.94	1.236
0.5	7.570	3.75	6.99	97.89	1.293
0.7	6.405	3.75	24.09	106.50	1.663
1.0	6.352	3.75	25.06	106.17	1.671

由表 1 可观察到以下几个现象:

首先, 不同的高渗溶质对菌体的生长有相似的抑制作用, 且随浓度的增高抑制作用加大; 而 pH 值除随浓度增高而增高外, 不同的高渗溶质影响也不同, 添加 NaCl 的变化不大, 添加 KCl 的比对照略高, 添加甘露醇的则偏离正常的发酵终了 pH 值 0.5 ~ 1 个单位. 这些都说明高渗环境对该菌种的生理性能产生了一定影响.

其次, 该菌种为高产甘油菌株, 在正常发酵情况下, 所产甘油质量浓度超过 100 g/L. 与对照相比不难发现, 在 NaCl、KCl 和甘露醇高渗培养基中, 随溶质浓度增高, 残糖增高, 甘油产量逐渐下降; NaCl 高渗培养基中甘油比生成速率较稳定, 而 KCl 和甘露醇高渗培养基中甘油比生成速率随溶质浓度的增加而增加, 但只有在 0.7 和 1.0 mol/L 的甘露醇高渗培养

基中才高于对照.在对 *Z. rouxii* 和 *S. cerevisiae* 的研究中发现,高渗环境中的细胞量均比对照低,这与积累的甘油浓度有关.在 *S. cerevisiae* 中,受高渗诱导,单位时间的甘油比生成速率增长为 2.2 倍,甘油合成速率为 3 倍,而耐高渗酵母 *D. hansenii* 单位时间的甘油比生成速率从未超过  $1 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$ .高效表达 GPD1 的 *S. cerevisiae* 在经受 3 h 的高渗胁迫后,胞外甘油浓度比水活度降低前更低<sup>[13]</sup>.另外,高渗环境中耐高渗酵母 *D. hansenii* 胞内的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  比值要比胞外低得多,且要比 *S. cerevisiae* 中的比值低<sup>[11]</sup>.可以想象,细胞对高渗胁迫的应答可能要分为两个方面,一是细胞在高渗环境中对胞内外渗透压溶质的调节,包括离子的流入流出,以达到体内外平衡,尽量减轻由此引起的对细胞的毒害作用;二是细胞的渗透压应答,这需要额外的高渗调节机制合成相容溶质,使得胞内外的渗透压差平衡.对于本菌种而言,由菌浓、pH 参数变化可推测,细胞此时已处于一个对自身生存不利的环境.而添加高渗溶质后,随着高渗溶质浓度的增加,胞外甘油产率的稳定和增大,说明在受到高渗胁迫时,ctGPD 的酶活增长,增加了甘油的合成,可以弥补部分由于高渗溶质的毒害作用而丧失的甘油合成,以利于细胞的生存.另一方面,虽然甘油合成关键酶 ctGPD 的酶活受渗透压胁迫而增长,但酶活随时间推移而降低,3 h 处已比 1 h 处酶活下降;并且,为了抗衡外界降低的水活度,细胞可能更趋于将大量甘油保留在胞内平衡渗透压,保护胞内物质,从而改变了甘油在胞内外分配的比例,使得甘油对胞外的分泌减少,因而受渗透压胁迫细胞的胞外甘油产率普遍比对照要低.这也许与专一的甘油运输蛋白有关,已有报道在 *Z. rouxii* 和 *D. hansenii* 中存在着一种活跃的甘油运输途径,在 *S. cerevisiae* 中也已分离了一个编码跨膜蛋白的基因,其产物是甘油促进扩散载体的同系物<sup>[12]</sup>.

引起作者注意的是,添加甘露醇的发酵实验与前两者有显著的不同.在发酵终了,残糖较低,且甘油产量比它们略高,甘油产率随浓度增加而增加直至高于对照.这说明盐类和糖醇类对细胞的生理有不同的影响.公认的结论是,  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  离子对细胞具有不可忽略的毒害作用,尤其是  $\text{Na}^+$ .它们可以改变细胞的通透性和 ATP 酶的活性,如 *S. rouxii* 在 18 g/dL 的 NaCl 培养基中,几乎所有胞内的  $\text{K}^+$  都可用无菌水洗去,而在 50 g/dL 的葡萄糖培养基中,其通透性变化几乎没有<sup>[14]</sup>.另有文献报道,当  $\text{Na}^+/\text{K}^+ > 0.5$  时,  $\text{Na}^+$  对细胞造成毒性,必须通过积累  $\text{K}^+$  来消除<sup>[15]</sup>.其次,可能因为甘露醇对培养基水活度的改变程度与它们不同,甘露醇和前两者对于水活度的影响在同一浓度下是不同的.另外,本菌种不利用甘露醇<sup>[1]</sup>,甘露醇本身可如葡萄糖一样,渗入细胞内部作为相容溶质,这在一定程度上缓冲并抵消了渗透压的改变,为细胞的生存赢得了时间,使得合成的甘油有可能更多地分泌到胞外.

## 参考文献:

- [1] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. 耐高渗压高产甘油的一个假丝酵母新种——产甘油假丝酵母[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 68 ~ 74
- [2] 诸葛健, 方慧英. 好氧发酵法生产甘油新菌株的获得方法[P]. 中国专利: CN 1082608A, 1994.
- [3] 诸葛健, 方慧英. 好氧发酵法生产甘油[P]. 中国专利: CN 1110321A, 1995.
- [4] DEGLEY M, BROWN A D. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*[J]. Gen Microbiol, 1983, 129: 3453 ~ 3463
- [5] BLOMBERG A, ADLER L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase( $\text{NAD}^+$ ) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bacteriol, 1989, 171(2): 1087 ~ 1092

- [ 6 ] NEVOIGT E, STAHI U. Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase[ $\text{NAD}^+$ ] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*[ J]. *Yeast*, 1996, 12: 1331 ~ 1337
- [ 7 ] 罗玉萍,李桃生,陈士怡. 酿酒酵母  $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶变异株的鉴定及其高渗透感性状的遗传分析 [J]. *实验生物学报*, 1994, 24(4): 377 ~ 384
- [ 8 ] LARSSON K, ANSELL R, ERIKSSON P, et al. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase( $\text{NAD}^+$ ) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*[ J]. *Mol Microbiol*, 1993, 10(5): 1101 ~ 1111
- [ 9 ] 李建武. *生物化学实验原理和方法*[ M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [ 10 ] LAMBERT M, NEISH A C. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions[J]. *Can J Research*, 1950, 28: 83 ~ 89
- [ 11 ] ADLER L, BLOMBERG A, NILSSON A. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerance yeast *Debaryomyces hansenii*[J]. *Bacteriol*, 1985, 162: 300 ~ 306
- [ 12 ] OHSHIRO K, YAGI T. Regulation of intracellular osmotic pressure and some factors that influence the promotion of glycerol synthesis in a respiration-deficient mutant of the salt-tolerance yeast *Zygosaccharomyces rouxii* during salt stress[J]. *Gen Appl Microbiol*, 1996, 42: 201 ~ 212
- [ 13 ] ALBERTYN J, HOHMANN S, JOHAN M. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 4135 ~ 4144
- [ 14 ] MAGER W H, VARELA J C S. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces* [J]. *Mol Microbiol*, 1993, 10(2): 253 ~ 258
- [ 15 ] ANSELL R, GRANATH K, HOHMANN S, et al. The two isoenzymes for yeast  $\text{NAD}^+$ -dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation[J]. *EMBO J*, 1996, 16(9): 2179 ~ 2187

## The Role of Cytoplasmic Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase of *Candida* Glycerogenesis on its Glycerol Over-Producing

CHEN Jun, WANG Zheng-xiang, ZHUGE Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

**Abstract:** *Candida* glycerogenesis Zhuge is characterized by its osmotolerance and over-production of glycerol. A 120 hours' fermentation was processed and ctGPD was found to maintain at a quite high and steady level. Two peaks of activity appeared at the moments of 36 hours and 60 hours. The ctGPD could be induced by NaCl, KCl and mannitol but the specific activity didn't increase remarkably. The fermentation results indicated that the yield of glycerol decreased and the capacity of producing glycerol per cell increased with the solutes concentration but is still less than that of the contrast.

**Key words:** Glycerol; *Candida* glycerogenesis; Cytoplasmic glycerol-3-phosphate dehydrogenase