

胞内海藻糖在 CP02 菌降解对苯二甲酸中的作用

陈 鹏, 肖 琳, 史小丽, 杨柳燕

(南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘 要:采用室内培养测定方法, 研究了对苯二甲酸降解菌 *Candida* CP02 胞内海藻糖的抗渗透压冲击作用, 同时分析了 CP02 在降解不同浓度对苯二甲酸时, 胞内海藻糖含量的变化以及海藻糖酶和海藻糖 – 6 – 磷酸合成酶活性的差异。结果表明, 随着对苯二甲酸浓度的增加, 海藻糖合成酶的酶活也相应升高, 胞内海藻糖含量迅速提高, 有利于细胞的存活和对苯二甲酸的降解。

关键词:海藻糖; 海藻糖合成酶; 对苯二甲酸; 降解

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1672 – 2043(2004)05 – 0977 – 04

Function of Intracellular Trehalose for *Candida* CP02 in Degradation of Terephthalic Acid

CHEN Peng, XIAO Lin, SHI Xiao-li, YANG Liu-yan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environmental, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: We have found that high concentration of intracellular trehalose was able to resist high load, which prevent microbes from harm and indicated that *Candida* strain CP02 isolated in our laboratory had a great degradative capability of terephthalic acid (TA). The effects of intracellular trehalose concentration in CP02 on high osmosis tolerance were studied and exhibited that: with addition of 5% NaCl into medium, trehalose content was nearly 3 times more than that in culture medium without containing NaCl. It demonstrated the concentration of trehalose increased along with osmosis tolerance. We also measured the contents of trehalose accumulated, trehalose and trehalose – 6p synthase activity during the degradation of different original TA. In the whole process (0 ~ 120 h) trehalose content was capable of achieving two fastigiums, which were induced by TA concentration and scarcity of nutrition, respectively. Trehalose content was up to 5% in 1 000 mg · L⁻¹ TA solution after cultivating 36 h, however, trehalose content in 0 mg · L⁻¹ TA solution was only 2% at the same time. Trehalose – 6 – p synthase activity in 1 000 mg · L⁻¹ TA solution was six times more than that in blank TA solution. These date showed that trehalose – 6 – p synthase activity and the intracellular trehalose concentration increased in response to the increase of TA concentration, which may protect cell viability of TA. The correlation study between intracellular trehalose metabolism of CP02 and TA degradation was found to be in favor of TA removal rate.

Keywords: trehalose; trehalose – 6p synthase; terephthalic acid; degradation

海藻糖 (Trehalose) 是一种由两个葡萄糖分子通过 α, α – 半缩醛羟基结合而成的非还原性二糖, 因最初在海藻中发现而命名。大量研究表明海藻糖在酵母等真菌中含量很高, 某些物种对外界恶劣环境所表现出的抗逆耐受力 and 它们体内的海藻糖含量相关。当细胞处于饥饿、干燥、高温、高渗透压及有毒试剂等胁迫环境时, 胞内海藻糖含量迅速上升。海藻糖具有在

逆境条件下稳定细胞膜和蛋白质结构的功能^[1、2], 目前对海藻糖的研究多集中在医药、食品、化妆品、发酵等方面, 主要是利用海藻糖在生物制品活性保存方面的特性^[3]。

本实验利用酵母 CP02 降解对苯二甲酸废水, 将对海藻糖的研究应用到废水处理中, 主要研究了酵母细胞内海藻糖含量与 TA 降解的关系, 特别研究了不同 TA 浓度下海藻糖代谢酶活性的变化, 以探索海藻糖在对苯二甲酸降解中对酵母细胞的应激保护作用。这对于研究细胞耐受不利环境的生理机制以及解决工业废水处理中进水水质水量波动大对菌体的冲

收稿日期: 2004 – 03 – 16

基金项目: 南京市科技发展项目(20022035)

作者简介: 陈 鹏 (1980—), 女, 湖南常德人, 南京大学环境学院在读硕士研究生。

击问题有一定的启示。

1 材料和方法

1.1 菌株

本实验室分离保存的一株高效 TA 降解菌 *Candida* CP02。

1.2 培养条件

无机盐培养基: KH_2PO_4 0.17%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 柠檬酸三钠 0.05%, 加入对苯二甲酸溶液至所需浓度, NaCl 含量由实验需要而定。PDA 培养基见参考文献[4]。

采用二级培养法, 培养 8 h 的种子液以 7% 接种量接种于 30/150 mL 发酵瓶中, $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 培养。定时取样分析。

1.3 胞内海藻糖的提取及测定

取适量菌液离心处理, 所得菌体用去离子水洗涤 3 次, 然后用 10% 三氯乙酸常温抽提 3 次, 合并 3 次的抽提液, 用硫酸蒽酮法测定其中的海藻糖量^[5], 海藻糖的含量用所测海藻糖量与细胞干重的百分比表示。

1.4 细胞存活率的测定

细胞经适当稀释后, 涂布在 PDA 平板上, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 48 h 后计数菌落数, 计算细胞的存活率。

1.5 细胞干重的测定

将样品放入已称重的离心管中, $6\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清液, 菌体用蒸馏水洗涤 3 次, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干至恒重, 称量细胞干重。

1.6 酶活力的测定

分别测定了不同浓度 TA 溶液中海藻糖分解酶和海藻糖合成酶的酶活力大小。

1.6.1 海藻糖分解酶 (trehalase, EC. 3. 2. 1. 28) 活力测定

在 2 mL 的 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 海藻糖 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸钠缓冲液 (pH5.6) 溶液中, 加入 0.5 mLCP02 的无细胞抽提液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 30 min。然后在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 5 min 使反应终止后, 测定反应体系中葡萄糖的含量^[6]。一个海藻糖酶活力单位表示为在 1 min 生成 $2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的酶量。

1.6.2 海藻糖-6-磷酸合成酶活力的测定

海藻糖合成酶 (trehalose-6p synthase) 活力是通过测定由海藻糖磷酸解后形成的葡萄糖和 α -葡萄糖-6-磷酸来测定的。产生的 α -葡萄糖-6-磷酸的量通过 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) 来检测。

G6PDH 从上海生工公司购得。海藻糖合成酶通过 340 nm 光吸收的变化来检测, 产生的 NADPH 的量与海藻糖合成酶的酶活成正比。

反应体系为海藻糖 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、磷酸钾缓冲液 (pH7.0) $40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、谷胱甘肽 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、EDTA $0.16\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NADP^+ $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1.3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1, 6 二磷酸葡萄糖 $0.067\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.75\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 加入 1 mL^{-1} CP02 的无细胞抽提液, 总体积为 4 mL。在温育过程中, 记录 340 nm 吸光值的变化^[7]。在此反应条件下, 一个酶活力单位为每分钟催化形成 $1\text{ }\mu\text{mol}$ α -葡萄糖-6-磷酸的酶量。

2 结果和讨论

2.1 胞内海藻糖对抗渗透压冲击的作用

海藻糖作为保护剂, 可以起到保护细胞抗冲击的作用。如表 1 所示, 在普通培养基中呈对数生长的 *Canadia* CP02 转移到含 20% NaCl 的培养基后, 细胞存活率急剧下降, 20% 的 NaCl 能够完全抑制其生长。但将细胞在含有 5% 的 NaCl 的培养基中预培养一定时间后再转入含 20% NaCl 的培养基中, 能够耐受高渗透压冲击的细胞数量有明显上升。

对细胞内的海藻糖分析发现, 在普通培养基中, 酵母菌 CP02 胞内的海藻糖含量较低, 经过 5% NaCl 的预培养后, 细胞内积累了大量的海藻糖, 达到 5.66%, 含量提高了 419.3%。海藻糖的含量越高, 在冲击中细胞存活率就越高, 存活率的不同可以用胞内海藻糖含量的不同来解释。该结论说明胞内海藻糖含量与酵母在高渗条件下的抗逆耐受力呈正相关关系, 表明海藻糖可以在 CP02 中作为抗冲击保护剂。

表 1 海藻糖对 NaCl 的耐受作用

Table 1 Tolerance endurance of intracellular trehalose on NaCl		
培养条件	存活率/%	海藻糖/%
1	12	5.66
2	1	1.09

注: 1. 在转移到含 20% NaCl 培养基前在含 5% NaCl 的培养基上进行预培养。2. 在转移到含 20% NaCl 培养基前在普通培养基上进行预培养。

2.2 在 TA 培养基中胞内海藻糖含量对细胞生长和 TA 去除率的影响

在研究 TA 降解的过程中, 发现 TA 浓度变化对降解率几乎没有影响, 并且 CP02 对高浓度的 TA 也有很强的耐受性。为了考察海藻糖在 TA 降解中的作

用,进行了在不同 TA 含量 (0、500、1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的无机盐培养基中细胞生长、TA 降解和海藻糖含量关系的试验(如图 1~3 所示)。

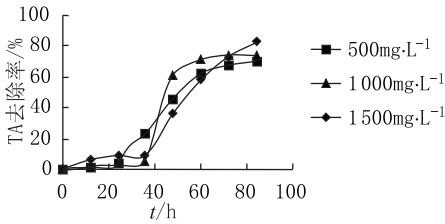


图 1 起始 TA 浓度对降解率的影响
Figure 1 Effects of initial TA concentrations on degradation rates

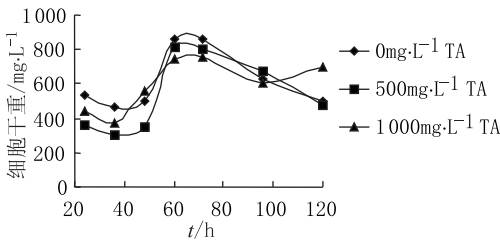


图 2 酵母细胞生长曲线
Figure 2 Growth curve of the cell growth of Candida CP02

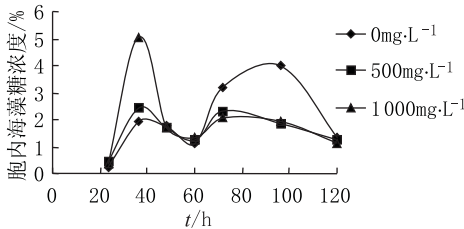


图 3 细胞内海藻糖的积累
Figure 3 The accumulation of intracellular trehalose

从图 1 可以看到,TA 起始浓度对其降解率基本没有影响,TA 仅对降解起始时间稍有影响,在 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA 的培养液中,24 h 后开始降解;而在 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA 的培养液中,降解从 36 h 后才开始。但是,最终的降解率基本相同,没有显著差异。图 2 为酵母细胞的生长曲线,TA 浓度对细胞的生长影响不大,培养 40 h 后细胞进入对数生长期,60~80 h 是细胞生长稳定期,随后进入衰亡期。

分析不同 TA 浓度时胞内的海藻糖含量(图 3),在 36 h 时,不含 TA 的培养基中,胞内的海藻糖浓度接近 2%;在含 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA 培养基中,海藻糖含量在 36 h 时达到 2.5%;而在 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA 的培养基中,胞内海藻糖浓度在 36 h 可以达到 5%。当细胞在不同浓度的 TA 培养基中生长时,虽然胞内海藻糖含量在 36 h 内都有升高,但升高的程度不同,胞内

海藻糖含量随起始 TA 浓度升高而增加。

从图 3 还可以看出,所有的海藻糖变化曲线都出现了两个峰,第一个峰出现在刚接入新鲜培养基中后(36 h),随即有所下降(36~60 h),最终在 96 h 时又达到一个高峰。海藻糖浓度达到峰值时,细胞处于生长初期和衰亡期,结合 TA 去除率曲线,TA 的降解在 24~36 h 后才开始,在开始降解前,细胞可能处于适应新环境和合成 TA 降解酶的阶段。此时,细胞内的海藻糖含量也因环境条件的变化而不同。TA 浓度越高,相应海藻糖的含量也越高,36 h 时 TA 浓度从 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,海藻糖含量的比增长率分别为 26.5% 和 102.0%,TA 浓度对海藻糖含量的影响是成指数增长的。在高浓度的 TA 中海藻糖含量较高,可以对细胞活性和 TA 降解酶活性起到保护作用。在随后 TA 的降解中,海藻糖可能被用于在降解过程中提供能源。在 60 h 后,又出现一个海藻糖含量的高峰。由图 1 可以看到在 60 h 后,TA 的降解基本达到稳定,海藻糖含量的升高可能是因为营养缺乏引起的。同时从图 3 可以看出,在不含 TA 的培养基中,第二个阶段的海藻糖含量最高,而在这种培养基中,碳源的含量最低,这说明了营养物缺乏是促使海藻糖含量第二个高峰产生的主要原因。

2.3 酶活力分析

对海藻糖合成酶活力和海藻糖分解酶活力测定结果(表 2)表明,在 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TA 中 T-6p 合成酶的酶活比空白对照(0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA)中提高了接近 6 倍,因而达到第一个高峰时(36 h)1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA 中海藻糖含量要远远高于其它处理,这说明海藻糖是一种典型的应激代谢物,高浓度的 TA 可以促进它的合成。J. C. Arguelles 曾报道热冲击可以提高 *Candida albicans* 胞内的海藻糖合成酶的酶活以适应不利的环境^[8]。*Saccharomyces cerevisiae* 可以通过海藻糖合成酶和外源吸收海藻糖能力的调节来提高胞内的海藻糖浓度^[9],当胞内海藻糖浓度达到 1.5% 时,就可以起到对饥饿、热冲击等的保护作用。Woo Hong Joo 等人发现,*Pseudononas* sp. BCNU 171 在 10% (V/

表 2 TA 浓度对酶活的影响

Table 2 The influence of TA concentration to enzymatic activity		
项目	TA 浓度	酶活
海藻糖合成酶	对照	5.2
	1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	36
海藻糖	对照	1.5
	1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.2

V) 的甲苯中通过提高海藻糖合成酶活力迅速积累海藻糖以提高菌体对甲苯的耐受力^[10]。比较 20 h 时对照($0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA)和 $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TA 中海藻糖分解酶酶活,发现 TA 对海藻糖分解酶的激活作用并不显著,有无 TA 压力的存在海藻糖分解酶酶活没有明显差别。

本试验表明高浓度 TA 也可以作为压力诱导海藻糖-6-磷酸合成酶的表达或激活其活性,胞内的海藻糖的含量在此情况下会迅速升高,对细胞和 TA 降解酶系起到保护作用,以提高细胞对高浓度 TA 的耐受力并保证降解的顺利进行。

3 结论

细胞内高含量的海藻糖能保护生物分子抵御伤害,增强生存能力,还能抵御冲击负荷,保护细胞活性和降解酶活性。高浓度的 TA 能提高海藻糖-6-磷酸合成酶活性,使细胞迅速积累海藻糖,提高菌体对 TA 的耐受能力并保护 TA 降解酶的活性,保证 TA 降解的进行。CP02 降解 TA 过程中胞内海藻糖代谢与 TA 的降解关系的研究对进一步提高降解率和缩短降解时间有着重要意义。在工业废水处理中进水的水质水量常波动较大,对菌体的耐冲击负荷性能要求较高,菌体调节细胞中海藻糖的含量可以提高自身抗高冲击负荷的能力,将有利于满足废水处理的技术要求。

参考文献:

[1] Rudolph A S, Crowe J H. Membrane stabilization during freezing: the

- role of two natural cryoprotectants, trehalose and praline[J]. *Cryobiology*, 1985, 22: 367 – 377.
- [2] Carpenter J F, Crowe J H. Modes of stabilization of a protein by organic solutes during desiccation[J]. *Cryobiology*, 1998, 25: 459 – 470.
- [3] 刘传斌,谢 健,苗蔚荣. 海藻糖的性质及其广阔应用前景[J]. 中国微生物学杂志, 1996, 10(6) : 377 – 379.
- [4] 沈 萍,范秀容,李广武,等. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999. 214 – 220.
- [5] Lillie S M, Pringle J R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to nutrient limitation[J]. *J Bacteriol*, 1980, 143: 1384 – 1394.
- [6] Suresh, Chander, Sharma. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152: 11 – 15.
- [7] Saito K, Yamazaki H, Ohnishi Y, et al. Production of trehalose synthase from a basidiomycete, *Grifola frondosa* in *Escherichia coli*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 193 – 198.
- [8] Arguelles J C. Thermotolerance and trehalose accumulation induced by heat shock in yeast cells of *Candida albicans*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 146: 65 – 71.
- [9] Plourde – Owobi L, Durner S, Goma G, et al. Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55: 33 – 40.
- [10] Woo Hong Joo, Yong Seung Shin, Yeon Lee, et al. Intracellular changes of trehalose content in toluene tolerant *Pseudomonas* sp. BCNU 171 after exposure to toluene[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 1021 – 1024.