

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(3):340-345; 4 March 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 一株耐受低 pH 光滑球拟酵母 RT-6 的生理特性

汪军<sup>1,2</sup>, 秦义<sup>1,2</sup>, 赵亮亮<sup>1,2</sup>, 陈坚<sup>1,2\*</sup>, 刘立明<sup>1,2\*</sup>

江南大学,<sup>1</sup> 食品科学与技术国家重点实验室,<sup>2</sup> 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:**【目的】研究一株耐受 pH 1.91 的光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) RT-6 的生理特性。【方法】在不同的 pH 条件下,对比分析原菌 CCTCC M202019 和突变株 RT-6 胞内 pH、胞内 ATP 水平、H<sup>+</sup>-ATPase 酶活、膜脂肪酸组成和聚磷酸盐含量等生理学特性的差异。【结果】与原菌比较,突变株 RT-6:(1)生物量和丙酮酸产量分别提高了 60.6% 和 85.4% (56 h);(2)在胞外 pH 5.0、4.5、4.0 时,胞内 pH 极显著高于原菌;(3)胞内 ATP、H<sup>+</sup>-ATPase 酶活和聚磷酸盐含量,在胞外 pH 5.5 条件下,分别提高了 11.8%、13.6% 和 3.5%,而胞外 pH 4.0 时,则分别提高了 61.1%、38.6% 和 30.9%;(4)膜脂肪酸不饱和度增强,膜的流动性更强。【结论】突变株 RT-6 通过促进胞内质子向胞外转运和抑制胞内质子生成,以帮助维持自身胞内 pH 稳定,适应低 pH 环境。

**关键词:** 光滑球拟酵母, 低 pH 胁迫, 生理特性

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0340-06

在利用微生物发酵生产有机酸的生产过程中,随着有机酸的积聚,发酵液中 pH 逐渐降低,导致未解离的有机酸所占的比例逐渐增大,从而通过被动扩散方式进入微生物细胞。未解离的有机酸在胞内快速释放不能被细胞膜转运的质子和携带电荷的酸根离子<sup>[1]</sup>。随着胞内质子的聚集,胞内 pH 下降,导致:(1)细胞功能的缺失。因为微生物生理功能在中性范围内(6.5-7.0)处于最佳状态,较低的胞内 pH 导致胞内蛋白质和 DNA 等发生变性,抑制代谢相关酶的活性<sup>[2]</sup>;(2)搅乱跨膜运输。胞内 pH 持续下降,改变作为质子推动力的跨膜  $\Delta$ pH,从而扰乱跨膜运输的正常进行<sup>[3]</sup>。为了维持培养液中 pH 处于工业微生物的最适 pH 范围内,通常在培养液中流加一定的中和剂,如 NaOH、CaCO<sub>3</sub> 等。但中和剂的流加一方面导致发酵液中渗透压升高,使微生物

遭遇高渗胁迫;另一方面引入的 Na<sup>+</sup> 等金属离子增加后续提取的复杂度和成本<sup>[4]</sup>。因此,如何提高工业微生物耐受低 pH 的能力,是促进微生物制造有机酸发展的关键技术之一。围绕这一关键技术问题,研究者通过 Genome shuffling<sup>[5]</sup>、传统诱变、添加外源能量辅助底物(柠檬酸、甲酸等)<sup>[6]</sup>和适应性进化<sup>[7]</sup>等基因突变或生物工程策略提高工业微生物抵御低 pH 的能力。上述方法虽有效地提高了有机酸的生产效率,但没有阐释工业微生物抵御酸胁迫的生理机制,尤其是生产有机酸的重要微生物——真核微生物。为此,作者以一株工业发酵生产丙酮酸的光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019 和源于其的耐受 pH 1.91 的突变株 RT-6 为研究菌株,通过比较两株菌在不同 pH 条件下的生理特性,详细解析了光滑球拟酵母耐受低 pH 的

**基金项目:** 国家杰出青年基金 (20625619); 国家自然科学基金重点项目 (20836003); 国家“973 项目” (2007CB714303); 全国优秀博士学位论文作者专项基金 (200962)

\* 通信作者。Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; Email: mingll@jiangnan.edu.cn (刘立明), jchen@jiangnan.edu.cn (陈坚)

**作者简介:** 汪军 (1986-), 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事微生物耐酸机理方面的研究。E-mail: wangjunjdx@163.com

**收稿日期:** 2010-08-25; **修回日期:** 2010-11-25

生理机制,为发展代谢工程改造策略改善工业微生物胁迫抗性奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019,烟酸、生物素、硫胺素和盐酸吡哆醇 4 种维生素营养缺陷型菌株,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,为本实验室保藏<sup>[8]</sup>。耐受 pH 1.91 的突变株 RT-6 由 *T. glabrata* CCTCC M202019 经适应性进化筛选所获得。

**1.1.2 种子培养基、发酵培养基以及培养条件:**参见文献 [8]。

### 1.2 胞内 pH 测定

胞质 pH 值利用对 pH 值敏感的荧光探针 5 (6)-羧基荧光素二乙酸盐琥珀酸酯 [5 (6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, cFDA-SE] 进行测定。标准曲线利用两性霉素 B (Amphotericin B, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 平衡胞内外 pH 后,在不同 pH 值的缓冲液中测定荧光变化<sup>[9]</sup>,所得数据为 3 次独立测定的平均值。

### 1.3 胞内 ATP 含量测定

取 30 mL 处于对数生长期的细胞发酵液,迅速移于液氮中以阻断微生物细胞代谢,并保存于液氮中 3 min 后,取出置于  $-80^{\circ}\text{C}$  备用。测定按照 Sato 和 Stanley 的测定方法测定<sup>[10]</sup>。蛋白质含量采用 Lowry 法测定<sup>[11]</sup>,以牛血清蛋白为标准蛋白。ATP 浓度表示为 nmol/mg 蛋白质,所得数据为 3 次独立测定的平均值。

### 1.4 膜 $\text{H}^+$ -ATPase 测定

取对数生长期的细胞发酵液 10 mL,迅速置于  $-20^{\circ}\text{C}$  下冷冻 10 min。细胞解冻后用温度为  $4^{\circ}\text{C}$ 、含有 10 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  的 pH 为 7.0 的 50 mmol/L 2-(N-morpholino)-乙基磺酸-KOH (MES-KOH) 缓冲溶液洗涤 3 次,置于冰中用超声波破碎,破碎条件:工作时间 8 min,工作 1 s,停 2 s。然后在  $4^{\circ}\text{C}$ 、14400  $\times$  g 条件下离心 10 min,去除细胞碎片和完整细胞,上清液置于含有 10 mmol/L 硫酸镁和 10% 甘油 (V/W) 的 MES-KOH 缓冲液中悬浮,使最终蛋白浓度维持在 1 mg/mL。 $\text{H}^+$ -ATPase 酶活性按 Viegas 等的方法进行<sup>[12]</sup>。1 单位的  $\text{H}^+$ -ATPase 酶活表示为 10 min 内平均每 mg 总膜蛋白每分钟内降解 ATP 而释放出的磷酸根的 nmol 数,所得数据为 3 次独立

破碎与测定的平均值。

### 1.5 膜脂肪酸

细胞膜脂肪酸样品的制备按照 Zhang 等的方法进行<sup>[13]</sup>。气相色谱分析条件:PEG 毛细管填充柱 (30 m  $\times$  0.22 mm i. d., 0.25  $\mu\text{m}$  film, Restek);载气:氦气;流速:29.6 mL/min;柱压:63.4 kPa;柱流量:0.5 mL/min;进样口温度:260 $^{\circ}\text{C}$ ;检测器温度:280 $^{\circ}\text{C}$ ;柱温升温程序:起始温度为 100 $^{\circ}\text{C}$ ,保持 1 min,随后以  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率增至 250 $^{\circ}\text{C}$  并在 250 $^{\circ}\text{C}$  保持 5 min。 $\text{C}_9$  -  $\text{C}_{20}$  的脂肪酸成分均可根据各自的保留时间和质谱范围在图库中进行查找,所得数据为 3 次独立样品制备与测定的平均值。

### 1.6 聚磷酸盐 (Polyphosphate, PolyP) 的测定

取 2 mL 稳定期细胞发酵液,  $4^{\circ}\text{C}$ 、14400  $\times$  g 离心 10 min,收集菌体,胞内 PolyP 的提取按 John 等方法进行,并略做改动。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 $^{\circ}\text{C}$  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 2 h,且每隔 30 min 振荡混匀 1 次),并于 4000 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。PolyP 的测定方案按胞内总磷的浓度减去游离磷的浓度。游离磷的浓度采用钼蓝比色法<sup>[14]</sup>;总磷浓度测定:取一定量萃取液,按 1:5 体积比加入浓 HCl 于 100 $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中水解 50 min,采用钼蓝比色法测定,每个样品重复测定 3 次。

## 2 结果

### 2.1 原菌与突变株 RT-6 耐酸性比较

考察了不同 pH 值条件对突变株 RT-6 和原菌 *T. glabrata* CCTCC M202019 生长和单位细胞产丙酮酸产量 ( $Y_{p/x}$ ) 的影响,结果如图 1 所示。细胞干重和  $Y_{p/x}$  均随着 pH 值的降低而显著下降。在 pH 值为 4.0 的条件下,原菌细胞干重仅为 3.06 g/L,远低于 pH 5.5 时的 12.42 g/L (56 h)。突变株 RT-6 由于其耐酸性的提高,在低 pH 值条件下 (pH < 5.5),有效地提高了细胞生长,与原菌相比,发酵 56 h 结束后细胞干重分别提高了 7.3% (pH 5.5)、18.4% (pH 5.0)、52.8% (pH 4.5) 和 38.2% (pH 4.0) (图 1-A)。突变株 RT-6 耐酸性提高还体现在  $Y_{p/x}$ ,与原菌比较,分别增加了 0.11 (pH 5.5)、0.23 (pH 5.0)、

0.44 (pH 4.5) 和 0.28 (pH 4.0) (图 1-B)。

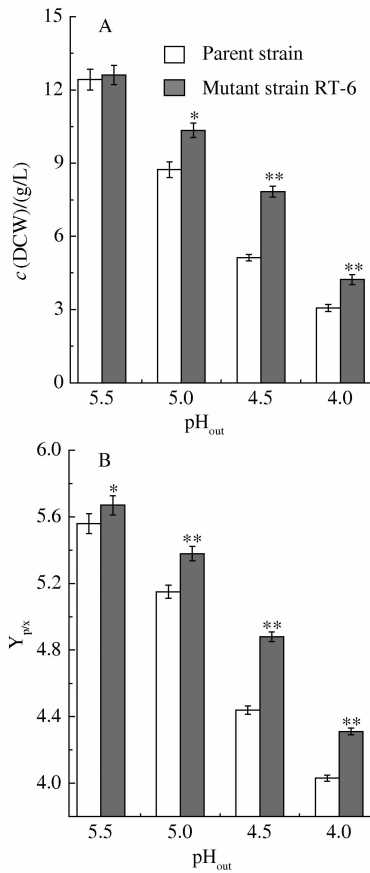


图 1 原菌 (PS) 与突变株 RT-6 的耐酸性比较

Fig. 1 Comparison of parent strain and mutant strain RT-6 for acid tolerance. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ) in comparison to the control in Student's test, and standard bars are indicated.

## 2.2 不同 pH 对 *T. glabrata* 胞内 pH 的影响

不同胞外 pH ( $\text{pH}_{\text{out}}$ ) 对突变株 RT-6 和原菌胞内 pH ( $\text{pH}_{\text{in}}$ ) 的影响如图 2 所示。无论是原菌还是突变株, 其  $\text{pH}_{\text{in}}$  值随着胞外 pH ( $\text{pH}_{\text{out}}$ ) 的降低而逐渐降低, 且  $\text{pH}_{\text{out}}$  值越低,  $\text{pH}_{\text{in}}$  变化越大。对于原菌, 当  $\text{pH}_{\text{out}}$  从 5.5 降为 4.0,  $\text{pH}_{\text{in}}$  从 7.03 降为 5.08; 而突变株 RT-6  $\text{pH}_{\text{in}}$  则从 7.11 下降为 5.37; 比较原菌和突变株在不同  $\text{pH}_{\text{out}}$  值下  $\text{pH}_{\text{in}}$  发现: 在正常  $\text{pH}_{\text{out}}$  (5.5) 条件下, 突变株 RT-6  $\text{pH}_{\text{in}}$  值与原菌 *T. glabrata* CCTCC M202019 相差仅为 0.08, 但随着  $\text{pH}_{\text{out}}$  逐渐降低, 突变株 RT-6  $\text{pH}_{\text{in}}$  值比原菌 *T. glabrata* CCTCC M202019 增加了 0.45 ( $\text{pH}_{\text{out}}$  5.0)、0.61 ( $\text{pH}_{\text{out}}$  4.5) 和 0.29 ( $\text{pH}_{\text{out}}$  4.0)。

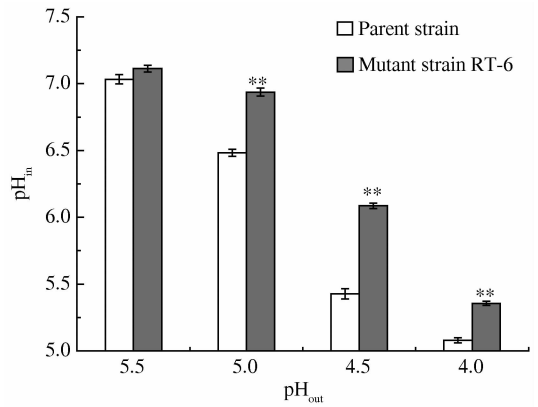


图 2 不同 pH 对原菌与突变株 RT-6 胞内 pH 值的影响

Fig. 2 Intracellular cytosolic pH ( $\text{pH}_{\text{in}}$ ) levels of parent strain and mutant strain RT-6 under different external pH conditions. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ) in comparison to the control in Student's test, and standard bars are indicated.

## 2.3 不同 pH 对 *T. glabrata* 胞内 ATP 含量和膜 $\text{H}^+$ -ATPase 活性的影响

原菌与突变株 RT-6 胞内 ATP 浓度随着  $\text{pH}_{\text{out}}$  值的下降而不断下降 (图 3-A), 其中, 原菌胞内 ATP 含量从 0.68 nmol/mg Protein ( $\text{pH}_{\text{out}}$  5.5) 下降到 0.18 nmol/mg Protein ( $\text{pH}_{\text{out}}$  4.0); 而突变 RT-6 则从 0.76 ( $\text{pH}_{\text{out}}$  5.5) 下降到 0.29 ( $\text{pH}_{\text{out}}$  4.0)。在不同  $\text{pH}_{\text{out}}$  值条件下, 突变株 RT-6 胞内 ATP 含量高于

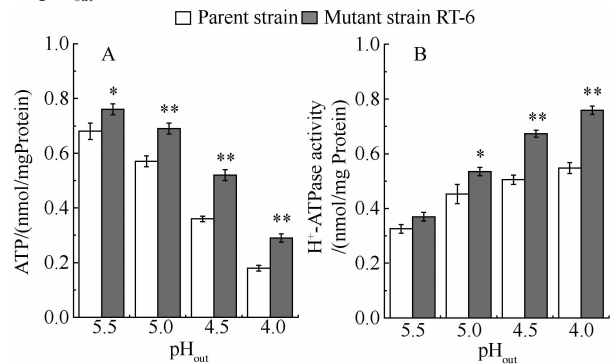


图 3 不同 pH 条件下原菌与突变株 RT-6 的胞内 ATP 浓度及膜  $\text{H}^+$ -ATPase 酶活

Fig. 3 Changes in the intracellular ATP concentration levels and specific activity of  $\text{H}^+$ -ATPase of parent strain and mutant strain RT-6 under different pH conditions. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ) in comparison to the control in Student's test, and standard bars are indicated.

同一  $\text{pH}_{\text{out}}$  时原菌中 ATP 含量。且随着  $\text{pH}_{\text{out}}$  值的降低,两菌胞内 ATP 浓度之差逐渐增大,如  $\text{pH}_{\text{out}}$  5.5 时为 11.8%,而在  $\text{pH}_{\text{out}}$  4.0 时则为 61.1%。检测不同  $\text{pH}_{\text{out}}$  值下细胞膜上  $\text{H}^+$ -ATPase 活性发现, $\text{H}^+$ -ATPase 活性随着  $\text{pH}_{\text{out}}$  值下降而逐渐提高(图 3-B)。与原菌比较,突变株 RT-6  $\text{H}^+$ -ATPase 活性分别提高了 13.6% ( $\text{pH}_{\text{out}}$  5.5)、19.2% ( $\text{pH}_{\text{out}}$  5.0)、30.1%

( $\text{pH}_{\text{out}}$  4.5) 和 38.6% ( $\text{pH}_{\text{out}}$  4.0)。

## 2.4 不同 pH 对 *T. glabrata* 细胞膜脂肪酸成分的影响

为进一步阐释突变株 RT-6 耐受低 pH 的生理机制,作者研究了不同 pH 值对原菌与突变株 RT-6 细胞膜脂肪酸成分组成的影响(表 1)。发现:(1)随着  $\text{pH}_{\text{out}}$  值的降低,不饱和脂肪酸(TUFA)含量及

表 1 不同 pH 对原菌与突变株 RT-6 细胞膜脂肪酸成分的影响

Table 1 Changes in membrane fatty acids composition of parent strain and mutant strain

RT-6 under different external pH conditions (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ).

| Fatty acids (%) | pH 5.5       |              | pH 5.0       |              | pH 4.5       |              | pH 4.0       |              |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                 | PS           | RT-6         | PS           | RT-6         | PS           | RT-6         | PS           | RT-6         |
| C14:0           | 4.73 ± 0.44  | 4.68 ± 0.56  | 4.7 ± 0.51   | 4.63 ± 0.52  | 4.51 ± 0.16  | 4.34 ± 0.74  | 4.57 ± 0.62  | 4.51 ± 0.57  |
| C14:1           | 1.68 ± 0.23  | 1.76 ± 0.34  | 1.73 ± 0.14  | 1.81 ± 0.27  | 2.12 ± 0.41  | 2.24 ± 0.47  | 2.31 ± 0.38  | 2.37 ± 0.26  |
| C16:0           | 28.17 ± 2.04 | 26.26 ± 1.81 | 25.04 ± 1.69 | 24.72 ± 1.72 | 22.25 ± 1.68 | 21.55 ± 1.71 | 20.37 ± 1.42 | 19.14 ± 1.74 |
| C16:1           | 24.82 ± 1.73 | 25.10 ± 1.61 | 25.6 ± 1.48  | 26.20 ± 1.84 | 27.36 ± 1.67 | 28.7 ± 1.43  | 28.9 ± 1.91  | 30.20 ± 1.65 |
| C18:0           | 9.44 ± 0.54  | 9.14 ± 0.36  | 9.28 ± 0.44  | 8.05 ± 0.28  | 8.54 ± 0.22  | 7.29 ± 0.17  | 7.62 ± 0.39  | 5.89 ± 0.14  |
| C18:1           | 31.16 ± 3.14 | 33.06 ± 3.27 | 32.75 ± 3.18 | 34.59 ± 3.42 | 35.22 ± 3.38 | 35.88 ± 3.54 | 36.23 ± 3.19 | 36.89 ± 3.21 |
| TUFA            | 57.66 ± 5.11 | 59.92 ± 4.67 | 60.08 ± 5.04 | 62.61 ± 5.27 | 64.74 ± 5.17 | 66.82 ± 5.32 | 67.44 ± 4.88 | 69.46 ± 4.69 |
| TSFA            | 42.34 ± 3.02 | 40.08 ± 2.84 | 39.02 ± 2.64 | 37.4 ± 2.87  | 35.26 ± 2.53 | 33.18 ± 2.14 | 32.56 ± 2.37 | 30.54 ± 2.27 |
| U/S ratio       | 1.36 ± 0.14  | 1.49 ± 0.09  | 1.54 ± 0.17  | 1.67 ± 0.11  | 1.83 ± 0.16  | 2.01 ± 0.16  | 2.07 ± 0.23  | 2.27 ± 0.19  |

Parent strain; RT-6: Mutant strain RT-6; TSFA, total saturated fatty acids; TUFA, total unsaturated fatty acids; U/S ratio, unsaturated: saturated fatty acids ratio

不饱和与饱和脂肪酸的比例(U/S)逐渐上升,而饱和脂肪酸(TSFA)则逐渐下降;(2)在同一  $\text{pH}_{\text{out}}$  值

时,突变株 RT-6 中 TUFA 含量、U/S 比例均高于原菌,但 TSFA 含量低于原菌;(3)在检测范围内,与原菌比较,突变株 RT-6 中 C14:0 和 C14:1 含量保持恒定;(4)原菌和突变株 RT-6 中饱和脂肪酸 C16:0 保持相同的变化趋势;但突变株 RT-6 中饱和脂肪酸 C18:0 却呈现出较高的增长幅度;(5)原菌和突变株 RT-6 中不饱和脂肪酸 C16:1 和 C18:1 浓度保持相同的变化趋势。上述结果表明,突变株 RT-6 细胞膜中含有更高的不饱和脂肪酸的组分,从而增强细胞膜的流动性(图 4)。

## 2.5 不同 pH 对原菌与突变株 RT-6 胞内多聚磷酸盐含量的影响

如图 5 所示,在一定的  $\text{pH}_{\text{out}}$  范围内(5.5 - 4.5),原菌和突变株 RT-6 中胞内多聚磷酸盐含量随  $\text{pH}_{\text{out}}$  降低而逐渐升高。但当  $\text{pH}_{\text{out}}$  继续降低时( $\text{pH}$  4.0)胞内多聚磷酸盐含量因合成酶活性下降反而呈下降趋势。对比分析原菌与突变株 RT-6 胞内多聚磷酸盐的含量,在相同的  $\text{pH}_{\text{out}}$  条件下,突变株 RT-6 胞内多聚磷酸盐含量高于原菌。

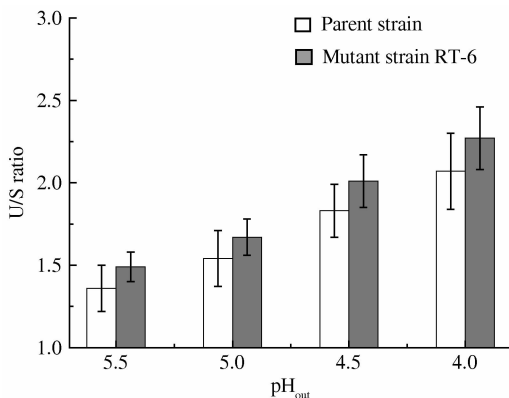


图 4 不同 pH 条件下原菌与突变株 RT-6 细胞膜不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸比值的改变

Fig. 4 Changes in the ratio of unsaturated: saturated fatty acids of parent strain and mutant strain RT-6 under different external pH conditions. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ) in comparison to the control in Student's test, and standard bars are indicated.

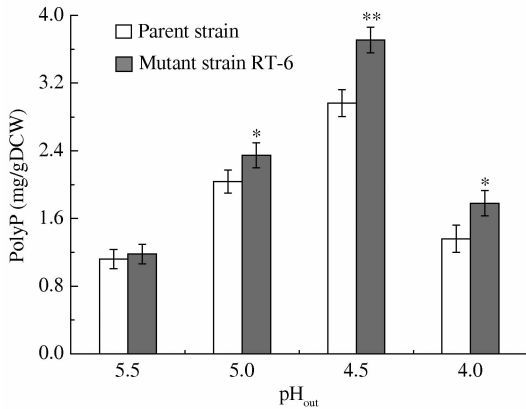


图5 不同 pH 条件下原菌与突变株 RT-6 胞内 PolyP 浓度的改变

Fig.5 Intracellular PolyP concentration levels of parent strain and mutant strain RT-6 under different pH conditions. Samples were run in triplicate, and experiments were repeated three times. Asterisks indicate the level of statistical significance (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ) in comparison to the control in Student's test, and standard bars are indicated.

### 3 讨论

本研究在筛选获得一株耐受低 pH 的光滑球拟酵母 RT-6 的基础上,通过研究不同 pH 条件下细胞生长、胞内 pH、胞内 ATP 浓度、 $H^+$ -ATPase 酶活、膜脂肪酸组成和聚磷酸盐浓度,透彻理解突变株 RT-6 耐受低 pH 的生理特性:(1)加强胞内质子转运:突变株 RT-6 通过提高胞内 ATP 含量和质膜  $H^+$ -ATPase 活性,促进胞内质子向胞外主动运输<sup>[15]</sup>;同时,通过增强细胞膜不饱和度,提高质子细胞膜通透性<sup>[16]</sup>,从而维持胞内 pH 稳定;(2)阻止胞内质子形成:通过在胞内积累聚磷酸盐消耗质子,降低胞内质子浓度,以维持胞内 pH 的稳定<sup>[17]</sup>。这一研究结果有助于加深理解光滑球拟酵母耐受低 pH 的生理机制,为采取代谢工程或生化工程策略进一步改善光滑球拟酵母酸胁迫抗性奠定了理论基础。

### 参考文献

[ 1 ] Arbat OB, Semchyshyn HM, Lushchak VI. Acid stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal*, 2008, 80(6): 19-31.  
 [ 2 ] Wach A, Ahlers J, Graber P. The  $H^+$ -ATPase of the plasma membrane from yeast. Kinetics of ATP hydrolysis in native membranes, isolated and recon-

stituted enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 1990, 189(3): 675-82.

- [ 3 ] Guerzoni ME, Lanciotti R, Cocconcelli PS. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 2001, 8(147): 2255-2264.  
 [ 4 ] Liu LM, Xu QL, Li Y, Shi ZP, Zhu Y, Du GC, Chen J. Enhancement of pyruvate osmotic-tolerant mutant production by of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(4): 825-832.  
 [ 5 ] Yu L, Pei X, Lei T, Wang Y, Feng Y. Genome shuffling enhanced L-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134(1-2): 154-9.  
 [ 6 ] Sanchez C, Neves AR, Cavalheiro J, Dos Santos MM, Garcia-Quintans N, Lopez P, Santos H. Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(4): 1136-1144.  
 [ 7 ] Peter S, Uwe S. Long -Term Continuous Evolution of Acetate Resistant *Acetobacter aceti*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 85(1): 40-44.  
 [ 8 ] Liu LM, Li Y, Li HZ, Chen J. Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(2): 199-206.  
 [ 9 ] Schmidt P, Walker J, Selway L, Stead D, Yin Z, Enjalbert B, Weig M, Brown AJP. Proteomic analysis of the pH response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Proteomics*, 2008, 8(3): 534-544.  
 [ 10 ] Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, Ohba T. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(3): 294-301.  
 [ 11 ] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275.  
 [ 12 ] Viegas CA, Sebastiao PB, Nunes AG, Sa-Correia I. Activation of plasma membrane  $H^+$ -ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1904-1909.

- [13] Zhang J, Fu RY, Hugenholtz J, Li Y, Chen J. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5268-5275.
- [14] Mcgrath JW, Quinn JP. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 4068-4073.
- [15] Warnecke T, Gill RT. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 2005(4): 25.
- [16] Grandvalet C, Assad-Garcia JS, Chu-Ky S, Tollot M, Guzzo J, Gresti J, Tourdot-Marechal R. Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells; characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology*, 2008, 154(9): 2611-2619.
- [17] Mullan A, Quinn JP, Mcgrath JW. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH conditions. *Microbial Ecology*, 2002, 44(1): 69-77.

## Physiological characteristics of a low-pH tolerant strain *Torulopsis glabrata* RT-6

Jun Wang<sup>1,2</sup>, Yi Qin<sup>1,2</sup>, Liangliang Zhao<sup>1,2</sup>, Jian Chen<sup>1,2\*</sup>, Liming Liu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, <sup>2</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** [Objective] With the aim of elucidating the physiological characteristics of a low-pH tolerant strain *Torulopsis glabrata* RT-6. [Methods] The intracellular pH, ATP level, the membrane bound H<sup>+</sup>-ATPase activity, the membrane fatty acid composition and the intracellular polyphosphate content of the parent strain CCTCC M202019 and the mutant strain RT-6 were determined and compared under different pH conditions. [Results] Compared to that of the parent strain, the cell growth and pyruvate concentration of the mutant strain RT-6 were increased by 60.6% and 85.4% (56 h), respectively. Similarly, the strain RT-6 had higher intracellular pH compared to the control strain at external pH 5.0, 4.5, and 4.0. The ATP content, the membrane bound H<sup>+</sup>-ATPase activity and the intracellular polyphosphate content of the mutant strain RT-6 were increased by 11.7%, 13.6%, and 3.5% at external pH 5.5, while at external pH 4.0, increased by 61%, 38.6%, and 30.8%, respectively. Furthermore, the mutant strain RT-6 exhibited higher content of the unsaturated fatty acids and higher membrane fluidity. [Conclusion] Discharging more intracellular H<sup>+</sup> and inhibiting the intracellular H<sup>+</sup> production contributed to the strain RT-6's higher intracellular pH, and therefore the acid tolerance.

**Keywords:** *Torulopsis glabrata*, acid stress, physiological characteristics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (20625619), by the National Natural Science Foundation of China (20836003), by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB714303) and by the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200962)

\* Corresponding authors. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: mingli@jiangnan.edu.cn, jchen@jiangnan.edu.cn

Received: 24 August 2010/ Revised: 25 November 2010