

生物技术法生产丙酮酸的研究进展

刘立明<sup>1 2</sup> 李 寅<sup>1 2</sup> 堵国成<sup>2</sup> 陈 坚<sup>1 2 \*</sup>

<sup>1</sup>(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

<sup>2</sup>(江南大学生物工程学院环境生物技术研究室,无锡 214036)

**摘 要** 丙酮酸是一种重要的有机酸,广泛应用于制药、日化、农用化学品和食品等工业中。相对于化工法生产的丙酮酸而言,生物技术法生产的丙酮酸具有低成本、高质量等优势。生物技术法生产丙酮酸主要包括发酵法和酶法,前者又包括直接发酵法和休止细胞法。在对比各种生产方法的基础上,考虑到球拟酵母属的多重维生素营养缺陷型菌株是目前最具竞争力的丙酮酸生产菌,因此重点介绍了发酵法生产丙酮酸在菌种、发酵条件优化等方面的研究进展,并给出了生物技术法将来可能的发展方向。

**关键词** 丙酮酸,球拟酵母,发酵生产,酶法转化  
**中图分类号** Q81 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2002)06-0651-05

丙酮酸,又称 2-氧代丙酸(2-oxopropanic acid)、 $\alpha$ -酮基丙酸( $\alpha$ -ketopropionic acid)或乙酰基甲酸(acetylformic acid),为无色至淡黄色液体,呈醋酸香气和愉快酸味,是最重要的  $\alpha$ -氧代羧酸之一<sup>[1]</sup>。丙酮酸不仅在生物能量代谢中具有十分重

要的作用,而且是合成多种有用化合物的前体,因此,它在制药、日用化工、农用化学品等工业及科学研究中有着广泛的用途,如表 1 所示。

表 1 丙酮酸(盐)及其衍生物的主要用途  
Table 1 Application of pyruvate and its derivatives

用途	示 例
制药工业	用于酶法合成 L-色氨酸、L-酪氨酸、L-多巴,合成 L-胱氨酸、L-亮氨酸、V <sub>B6</sub> 、V <sub>B12</sub> ;合成血管紧张肽 II 抗药、系列酶蛋白抑制剂、镇静剂、辛可芬、异烟肼丙酮酸钙、2-苯基喹啉-4-羧酸、恩波吡维胺、磷酸烯醇丙酮酸、4-甲唑甲酸、噻咪等。丙酮酸钙可用作减肥保健药品
日化工业	丙酮酸乙酯可抑制表皮中的酪氨酸酶的形成,美白肌肤,可用作化妆品的防腐剂和抗氧化剂,用作空气清新剂
农用化学品	是合成乙烯系聚合物、氯化阿托酸、谷物保护剂、成熟剂等多种农药的起始原料 <sup>[2]</sup>
食品、饲料工业	GB2760-1996 规定为酸味添加剂,作为添加剂具有防腐保鲜功能
细胞培养	与乳酸组成抗氧化剂,降低对细胞的伤害,是动物细胞培养的重要底物
生化试剂	用于伯醇及仲醇的检定,转氨酶的测定,是脂肪族胺的显色剂
传感器与电子材料	与乳酸、锂构成人工胰脏,作为体外传感器测定葡萄糖的含量,丙酮酸酯类产品作为特种溶剂用于电子材料方面

随着丙酮酸应用范围的不断扩大,丙酮酸的市场需求也在不断的增长。目前,丙酮酸的工业生产仍主要采用 Howard 和 Fraser 等<sup>[3]</sup>开发的酒石酸脱水脱羧法。该法虽然操作简单易行,但存在底物转化率低(0.29~0.30 g/g),成本高、环境污染严重等缺点,因而限制了丙酮酸的推广应用。因此需要开发更经济、更具竞争力的丙酮酸生产技术。采用酶法转化或微生物发酵生产丙酮酸(盐)就是一种潜在的更有效的方法,其主要优点是成本低廉、产品质量高、对环境友好等。事实上,早在 20 世纪 50 年代,就有学者开始对生物合成丙酮酸进行了研究,并取得了一系列的研究成果。

1989 年日本的 Miyata 和 Yonehara<sup>[4]</sup>选育出了一系列丙酮酸产量超过 50 g/L 的球拟酵母(*Torulopsis*)菌株。Yotoka 等<sup>[5]</sup>选育出的 *E. coli* W1485lip2 的菌株具有较高的转化率(0.6 g 丙酮酸/g 葡萄糖),但丙酮酸的产量比较低。日本在 1992 年已经实现了发酵法生产丙酮酸的工业化<sup>[6]</sup>,目前的发酵罐规模已经放大到 50 m<sup>3</sup>。在我国,虽然生物合成丙酮酸的技术研究起步比较晚,但发展非常迅速,其中采用微生物发酵法生产丙酮酸的技术已走到了世界的前列,目前正在积极实施工业化生产。

收稿日期 2002-05-13,修回日期 2002-09-07。  
基金项目 江苏省“九五”工业重大科技攻关项目(BG98015-3)。  
\* 通讯作者。 Tel 86-510-5885727, Fax 86-510-5888301, E-mail jchen@sytu.edu.cn

1 生物技术法生产丙酮酸

比较丙酮酸的各种生产方法可以发现,生物技术法生产丙酮酸无疑是扩大丙酮酸应用领域的根本途径(见表2)。用生物技术法生产丙酮酸的方法包括发酵法和酶法。而发酵法又包括直接利用微生物中的一系列酶(如EMP途径酶系)完成由底物(如葡萄糖)积累丙酮酸的直接发酵法(Fermentative method)和利用微生物中某一种特定功能的酶完成由底物向丙酮酸的转化(即微生物先生长,再转化底物为丙酮酸)的休止细胞法(Resting cell method)<sup>[1]</sup>。发酵法是生物技术法生产丙酮酸中开展得最早的、也是研究得最多最深入的生产方法(表3)。但发酵法生产丙酮酸的问题是转化率比较低,

这是因为丙酮酸作为糖酵解途径的最终产物,处于代谢途径中的关键代谢支点,在细胞中很容易代谢为其它产物,难以积累。只有切断或弱化丙酮酸的进一步代谢,才能达到使其在细胞中积累并分泌到胞外的目的。为此,研究者选育了一系列的高产率或高产量的研究菌株,其中最突出的是多重维生素营养缺陷型菌株光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)。采用休止细胞法生产丙酮酸的主要优点是可缩短发酵时间。如 *Acinetobacter sp* 从 96 h 缩短到 24 h<sup>[17]</sup>,*Debaryomyces coudertii* 则从 48 h 缩短到 10 h<sup>[18]</sup>,但丙酮酸产量略低于直接发酵法,且操作繁琐,容易染菌,因此不太可能在工业生产中得到应用。

表 2 丙酮酸的制备方法  
Table 2 Manufacturing methods of pyruvic acid

方    法	描    述	特    点
化学合成法	在液相或气相中将乳酸酯(或酒石酸)氧化为丙酮酸酯,水解成丙酮酸	污染严重、成本高、已实现了工业化生产
酶转化	利用微生物细胞中的酶系将乳酸等脱氢氧化为丙酮酸	转化率高、但底物成本高,没有实现工业化生产
发酵法	微生物直接发酵糖质原料或其他碳源生成丙酮酸	成本低廉、产品纯度高、反应条件温和,环境污染较小

表 3 国内外发酵法生产丙酮酸的研究水平  
Table 3 Progress in the fermentative production of pyruvate

菌    种	原    料	丙酮酸的生产特性			参考文献
		产酸 (g/L)	生产率 [g(L/h)]	转化率 /wt%	
细菌					
<i>Enterobacter aerogenes</i>	葡萄糖	17	0.47	34	[ 7 ]
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	葡萄糖酸	16	0.22	32	[ 8 ]
<i>Escherichia coli</i>	葡萄糖	30	1.25	60	[ 9 ]
放线菌					
<i>Agaricus campestris</i>	葡萄糖	27	0.38	54	[ 10 ]
<i>Schizophyllum commune</i>	葡萄糖	19	0.16	38	[ 11 ]
酵母					
<i>Candida lipolytica</i>	葡萄糖	44	0.61	44	[ 12 ]
<i>Torulopsis glabrata</i>	葡萄糖	57	0.97	57	[ 13 ]
<i>Torulopsis glabrata</i>	葡萄糖	67.8	1.08	49.4	[ 14 ]
<i>Torulopsis glabrata</i>	葡萄糖	63	1.15		[ 15 ]
<i>Torulopsis glabrata</i>	葡萄糖	77.8	1.21	65.1	[ 16 ]

酶法合成丙酮酸由于具有反应混合物组成简单、高底物转化率、产品纯度高、后续分离提取费用低廉和操作简单等优点而成为生物技术法生产丙酮酸研究中的另一个热点。如 Eisenberg 等利用 *Hansenula polymorpha* 中的乙醇酸氧化酶和 *Pichia pastoris* 中的内源过氧化氢酶催化氧化 L-乳酸成丙酮酸,此法具有高转化率和提取率等优点<sup>[19]</sup>。Shimizu 等<sup>[20]</sup>用 *Candida*、*Mycobacterium* 等能利用亚胺类物质的菌株或菌属转化富马酸为丙酮酸。一般来讲,酶法生产所涉及到的酶都是与丙酮酸代谢有关的酶,如:酒石酸脱水酶<sup>[21]</sup>、甲醛脱氢酶<sup>[22]</sup>、过氧化酶和乙醇酸氧化酶<sup>[23-24]</sup>、乳酸氧化酶<sup>[25]</sup>、乳酸脱氢酶<sup>[25]</sup>等。可用于酶法生产丙酮酸的底物有乳酸、酒石酸、富马酸、1,2-丙二醇等。固定化酶法也是近几年来研究

的热点。如 Eisenberg 等<sup>[19]</sup>将乳酸氧化酶固定在海藻酸钠中,以乳酸作为底物来生产丙酮酸取得了较好的结果。酶法虽然具有较高的转化率,但底物成本比较高、来源较窄,限制了其进一步推广应用。

2 发酵法生产丙酮酸菌种的选育

发酵法生产丙酮酸的机理是在保证细胞正常生长的前提下切断或减弱丙酮酸的进一步代谢,使其在细胞中得以积累并分泌到胞外。迄今发现的能积累或转化底物为丙酮酸的菌株涉及 15 个属的许多种,但作为生产菌株应该具备:①能大量积累丙酮酸并分泌到胞外;②生长迅速;③较强的廉价碳源利用能力和较高的转化率;④对人畜安全等基本性

能。能够以糖质原料发酵生产丙酮酸的微生物包括细菌、放线菌和酵母(表3)。在酵母中研究的菌株有假丝酵母(*Candida*)<sup>[26-27]</sup>、球拟酵母(*Torulopsis*)<sup>[28]</sup>、德巴利酵母(*Debaryomyces*)<sup>[29-30]</sup>和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[31]</sup>。*T. glabrata* 是研究得最多的、也是目前工业化生产上所用的菌株。从耐高渗环境中筛选出来的 *T. glabrata* 在一般培养条件下,对葡萄糖的丙酮酸产率比较低(0.41 g/g)<sup>[32]</sup>。对该菌株进行诱变,增加一系列遗传标记(如 L-缬氨酸和 L-异亮氨酸营养缺陷型<sup>[33-34]</sup>、丙酮酸脱羧酶活性降低菌株等<sup>[35-36]</sup>) ,丙酮酸产率提高到了 0.54 g/g。除了 *T. glabrata* 之外, *Candida lipolytica* (43.6 g/L)<sup>[37-38]</sup>、*Debaryomyces hansenii* (42 g/L)<sup>[28]</sup>和 *Saccharomyces cerevisiae* (36.9 g/L)<sup>[31]</sup> 积累丙酮酸的能力也不弱,其产率(0.37~0.44 g/g)虽然不及 *T. glabrata* ,但这些酵母能以无机铵盐为唯一氮源,这点是大多数 *T. glabrata* 不具备的。

在已有的文献报道中,酵母积累丙酮酸一般都以葡萄糖为底物。相对而言,细菌积累丙酮酸时所能利用的底物种类相对更多一些(如葡萄糖、葡萄糖醛酸、丙二醇和丙酸)。这些细菌生产丙酮酸的产率虽然不是很低,但产量不高<sup>[28]</sup>。采用与 *T. glabrata* 过量积累丙酮酸相同的原理,Yokota 等<sup>[5]</sup> 选育出硫辛酸营养缺陷型的菌株 *E. coli* W1485lip2。这株菌在培养 32 h 丙酮酸产率达 0.51 g/g,而以该菌株为出发菌株构建的缺失  $F_1$ -ATP 酶活性的 *E. coli* TBLa-1 培养 24 h 丙酮酸产率就达到了 0.6 g/g。细菌发酵生产丙酮酸具有菌种遗传标记简单、底物广泛等优点,但遗憾的是,其丙酮酸产量都不是很高,难以工业化生产。

### 3 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的研究进展

发酵法生产丙酮酸真正取得突破是 1989 年日本的研究人员选育出一系列丙酮酸产量超过 50 g/L 的球拟酵母菌株。特别是烟酸、硫胺素、吡哆醇和生物素 4 种维生素的营养缺陷型 *T. glabrata* CCTCC M202019,是发酵法生产丙酮酸的首选菌株。其生理学依据如图 1 所示。烟酸和硫胺素是丙酮酸脱氢酶系的辅因子,生物素是丙酮酸羧化酶的辅因子,吡哆醇是转氨酶的辅因子,硫胺素是丙酮酸脱羧酶的辅因子。由于营养缺陷型菌株自身不能合成这些维生素,当培养基中这些维生素的浓度处于亚适量水平时,负责丙酮酸降解或转化的 4 种酶的活性均较低,于是丙酮酸得以积累。

对于任何一种发酵产品,肯定存在影响该物质高效生产的重要因素。如果从生理学角度研究这些因素对发酵过程的影响规律,进而提出相应的控制方法或策略,可望实现产品的高产率、高产量和高生产强度的相对统一。Miyata 等的研究重点在于选育丙酮酸的高产菌株,对如何发挥这些菌株高产丙酮酸的潜力研究较少。本研究室等采用发酵过程优化原理,对多重营养缺陷型菌株 *T. glabrata* 生产丙酮酸的发酵过程进行了大量优化研究工作。

#### 3.1 营养条件对 *T. glabrata* 生产丙酮酸的影响

研究发现,碳、氮源浓度及其比例对 *T. glabrata* 生产丙酮酸有重要作用。首先考察了不同氮源及其浓度对 *T. gla-*

*brata* WSH-IP12 积累丙酮酸的影响,发现当培养基中含有 15 g/L 蛋白胨能大量积累丙酮酸<sup>[39]</sup>。该菌株能利用无机氮源生长,但产酸效果不及蛋白胨。为简化培养基组成研究维生素的影响,通过诱变获得了 1 株能以铵盐为唯一氮源大量积累丙酮酸的突变株 *T. glabrata* WSH-IP303,在氮质量浓度相同的前提下,该菌株的丙酮酸产量高于以蛋白胨为氮源时的产量<sup>[40]</sup>。较高的葡萄糖浓度会抑制丙酮酸生产,采用分批补糖可以减轻这种抑制<sup>[41]</sup>。培养基中合适的 C/N(25:1)促进了细胞生长、葡萄糖消耗和丙酮酸的积累速度及产量<sup>[42]</sup>。

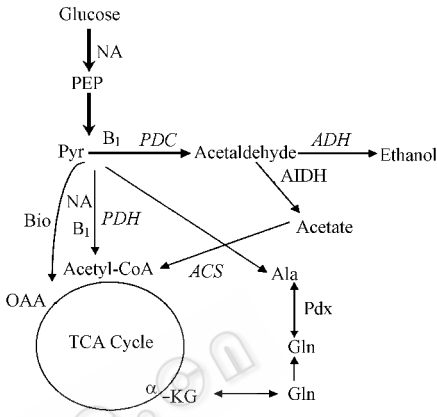


图 1 *T. glabrata* CCTCC M202019 中丙酮酸的代谢途径<sup>[1]</sup>

Fig.1 Metabolism pathway of pyruvic acid in *T. glabrata* CCTCC M202019

PDC: 丙酮酸脱羧酶; ADH: 乙醇脱氢酶; ACS: 乙酰辅酶 A 合成酶; AIDH: 乙醛脱氢酶; PDH: 丙酮酸脱氢酶系; B<sub>1</sub>: 硫胺素; NA: 烟酸; Bio: 生物素; Pdx: 吡哆醇

#### 3.2 维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用

多重维生素营养缺陷型菌株 *T. glabrata* 中负责丙酮酸降解的(酶系)活性是受培养基中维生素的水平控制的,阐明其相互作用关系并优化其质量浓度,对实现丙酮酸发酵高产率与高生产强度的统一非常重要。但 Yonehara 等<sup>[43]</sup>在以蛋白胨为氮源的培养基用单因素实验很难阐明 *T. glabrata* 对维生素的迫切需要。本研究室等<sup>[44-45]</sup>利用菌株 *T. glabrata* WSH-IP303 在完全合成培养基的基础上通过单因素和正交实验考察了 4 种维生素的作用,发现 B<sub>1</sub> 是影响丙酮酸积累最重要的因素,并得到的维生素质量浓度优化组合是: NA 8 mg/L, B<sub>1</sub> 0.015 mg/L, B<sub>6</sub> 0.4 mg/L, Bio 0.04 g/L, B<sub>2</sub> 0.1 mg/L。以此优化组合后的浓度进行分批发酵实验,发酵 56 h 丙酮酸产量达到 69.4 g/L。初步实现了丙酮酸发酵高产率、高产率和高生产强度的统一。

#### 3.3 供氧对丙酮酸发酵的影响

*T. glabrata* 的维生素营养缺陷型以葡萄糖为底物积累丙酮酸时,溶氧是一个很重要的影响因素。Miyata 等<sup>[46]</sup>发现溶氧不足会造成该菌株丙酮酸产量下降,乙醇产量显著增加,Hua<sup>[47]</sup>等报道了不同溶氧水平下该菌株胞内的代谢流分配。较高的溶氧有利于丙酮酸的积累,但溶氧具体高到什么程度,如何控制溶氧没有文献报道过,本研究室通过分析不

同体积传氧系数下的分批发酵的动力学特征 根据发酵过程主要动力学参数和碳流分配的变化特性提出了 0~16 h 控制  $K_L a$  为  $450 \text{ h}^{-1}$ 、16 h 后控制  $K_L a$  为  $200 \text{ h}^{-1}$  的分阶段供氧控制模式,实现了高产量( $69.4 \text{ g/L}$ )、高产率( $0.636 \text{ g/g}$ )和高葡萄糖消耗速度( $1.95 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ )的相对统一<sup>[1]</sup>。

### 3.4 *T. glabrata* 生产丙酮酸的中试研究

根据在实验室 2.5 L 和 5 L 发酵罐中研究确定的丙酮酸分批发酵的较优培养条件和传氧效率一致的原则,放大到 30 L 发酵罐。在 30 L 发酵罐中进一步研究了不同初始葡萄糖质量浓度下的丙酮酸分批发酵特征。在此基础上,考察了分批补糖和连续补糖对丙酮酸发酵的影响,发现采用连续补糖方式时获得了较高的丙酮酸产量( $63.3 \text{ g/L}$ )和产率( $0.58 \text{ g/g}$ )<sup>[41]</sup>。再根据 30 L 发酵罐的研究结果和传氧效率一致的原则,在 300 L 发酵罐上进行了发酵法生产的中试,发酵 68 h 丙酮酸产量达到  $55 \text{ g/L}$ ,产率  $0.53 \text{ g/g}$ <sup>[40]</sup>。

### 3.5 丙酮酸脱羧酶活性降低的突变株

在国内,作者等<sup>[16]</sup>对 *T. glabrata* WSH-IP303 进行亚硝基胍 (NTG) 诱变,挑选以乙酸为补充碳源的平板上透明圈较大的菌落,经初筛和复筛,发现菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 生产丙酮酸能力强且稳定。在此基础上,考察培养基中乙酸浓度对菌种生长和丙酮酸发酵的影响。在培养基中补充  $6 \text{ g/L}$  的乙酸钠时摇瓶培养 48 h,丙酮酸产量( $46.2 \text{ g/L}$ )比出发菌株( $38.3 \text{ g/L}$ )提高了 21%。采用该菌株在 5 L 发酵罐上进行分批发酵实验,丙酮酸产量在 64 h 可达  $77.8 \text{ g/L}$ ,对葡萄糖的转化率为  $0.651 \text{ g/g}$ 。

对 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的工业化在发酵部分还需做如下工作:①进一步改善丙酮酸生产菌的产酸能力和遗传稳定性,提高糖酸转化率,缩短发酵时间;②提高生产菌对高浓度丙酮酸的耐受性,以期进一步提高丙酮酸浓度,便于下游处理;③目前原料成本中葡萄糖的费用占了很大的比例,因此,要提高生产菌株对廉价底物(如糖蜜、淀粉糖)等的利用能力。

## 4 小结与展望

分析现有的研究报道,作者认为,尽管已对丙酮酸生产菌的选育与改良、发酵过程的优化控制等进行了广泛的研究,为了提高发酵法生产丙酮酸的竞争力,今后的研究工作应集中在(1)在保证细胞正常代谢的前提下,尽可能减少丙酮酸的降解或转化,这是获得丙酮酸高产量和高产率的必要条件;(2)加快从葡萄糖到丙酮酸的代谢速度,以确保获得丙酮酸的高生产强度;(3)*T. glabrata* 的多种维生素营养缺陷型具有大量积累丙酮酸的潜力,学术界对该菌株在过量合成丙酮酸的生理生化特征和如何防止产物进一步被转化还应该进行进一步的研究。

## REFERENCES(参考文献)

[1] LI Y(李寅). Microbial over-production of pyruvic acid and metabolic analysis. Ph.D Thesis of Wuxi University of Light Industry(无锡轻工大学博士论文), 2000, 6

[2] SHAO Z(邵泽川), JIA W(贾伟), TIAN X(田耕) et al. Production and application of pyruvate calcium. Food Science(食品科学), 2000, 21(3): 9~10

[3] Howard JW, Fraser WA. Preparation of pyruvic acid. Org Synth Coll, 1932, 1: 475~480

[4] Miyata R, Tsutsui H, Yonehara T. Manufacture of pyruvic acid with *Torulopsis species*. Japanese Patent, JP 0,155,185, 1989

[5] Yokota A, Shimizu H, Terasawa Y et al. Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of *Escherichia coli* W1485. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41: 638~643

[6] Yonehara T, Miyata R, Matsuno H et al. Development of fermentative production of pyruvate by metabolic control-Monograph. Seibutsu Kagaku Kaishi (in Japanese) 2000, 78: 56~62

[7] Yokota A, Iota S, Takao S. Tryptophan production by a lipoic acid auxotroph *Enterobacter aerogenes* having both pyruvic acid productivity and high tryptophanase activity. Agric Biol Chem, 1989, 53: 2037~2044

[8] Yanse H, Mori N, Masuda M et al. Pyruvate production by *Enterococcus casseliflavus* A-12 from gluconate in an alkaline medium. J Ferment Bioeng, 1992, 73: 287~291

[9] Yokota A, Terasawa Y, Takaota N et al. Pyruvate production by an  $F_1$ -ATPase-defective mutant of *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58: 2164~2167

[10] Besnainou B, Giani D, Sahut C. Process for the production of pyruvic acid by fermentation. European Patent, No EP 312,453, 1989

[11] Takao S, Tanida M. Pyruvic acid production by *Schizophyllum commune*. J Ferment Technol, 1982, 60: 277~280

[12] Uchio R, Kikuchi K, Hirose Y. Process for producing pyruvic acid by fermentation. US Patent, No.3,993,543, 1976

[13] Yonehara T, Miyata R. Fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata*. J Ferment Bioeng, 1994, 78: 155~159

[14] Miyata R, Yonehara T. Improvement of fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata* IFO0005. J Ferment Bioeng, 1996, 82: 475~479

[15] Miyata R, Yonehara T. Fermentative manufacture of pyruvic acid and its salts. Japanese Patent, JP 09,047,292, 1997

[16] LIU L M(刘立明), LI X(李寅), DU G(堵国成) et al. Breeding of high-pyruvate-producing *Torulopsis glabrata* with acetate as supplement carbon source. Industrial Microbiology(工业微生物), 2002, 32(3): 21~26

[17] Izumi Y, Matsumura Y, Tani Y et al. Pyruvic acid production from 1,2-propanediol by thiamine-requiring *Acinetobacter* sp 80-M. Agric Biol Chem. 1982, 46: 2673~2679

[18] Moriguchi M, Shuto K, Hashimoto T. Production of pyruvic acid from saccharified citrus peel extract by dried cells of *Debaryomyces hansenii*. J Ferment Technol, 1984, 62: 243~248

[19] Eisenberg A, Seip J E, Gavagan J E et al. Pyruvic acid production using methylotrophic yeast transformants as catalyst. J Molecular Catalysis B-Enzymatic, 1997, 2: 223~232

[20] Shimizu A, Ogawa O. Manufacturing method for pyruvic acid. Japanese Patent, JP 11,243,979, 1999

[21] Miyata R, Yonehara T, Yomoto K. Manufacture of pyruvic acid from L-tartaric acid with *Pseudomonas putida*. Japanese Patent, JP 61,216,695, 1986

[22] Tarama S, Sogabe Y, Mitsuhide N. Manufacture of pyruvic acid with enzymes or bacteria. Japanese Patent, JP 63,133,990, 1988

[23] Anton D L, DiCosimo R, Witterholt V G. Process for the preparation of pyruvic acid. WO patent 9,500,656, 1995

[24] Anton D L, Dicosimo R, Witterholt V G. Production of pyruvic acid using permeabilized transformants of *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* which express glycolate oxidase and catalase. US Patent, No 5,538,875, 1996

[25] GU J X(谷经松), XU R(许平), LI T L(李铁林). Preparation of

- pyruvate form lactate by lactate oxidase. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* (应用与环境生物学报), 2001, **7**(6): 616 ~ 620
- [ 26 ] Uchio R, Maeyashiki I, Okada H. Fermentative production of pyruvic acid. Japanese Patent, JP 74,102,894, 1974
- [ 27 ] Uchio R, Hirose Y. Fermentative production of pyruvic acid. Japanese Patent, JP 7,582,284, 1975
- [ 28 ] Li Y, Chen J, Lun S Y. Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**:451 ~ 459
- [ 29 ] Moriguchi M. Fermentative production of pyruvic acid from citrus peel extract by *Debaryomyces hansenii*. *Agric Biol Chem*, 1982, **46**:955 ~ 961
- [ 30 ] Yanai T, Tsunekawa H, Okamura K. Manufacture of pyruvic acid *Debaryomyces*. Japanese Patent, JP 0,600,091, 1994
- [ 31 ] Yonehara T, Yomoto K. Microbial production of pyruvic acid and its enhancement by thiamine. Japanese Patent, JP 62,201,589, 1987
- [ 32 ] Yonehara T, Yomoto K. Pyruvic acid manufacture by *Torulopsis*. Japanese Patent, JP 62,275,688, 1987
- [ 33 ] Miyata R, Yonehara T, Yomoto K. Manufacture of pyruvic acid with *Torulopsis species*. Japanese Patent, JP 63,258,587, 1988
- [ 34 ] Miyata R, Yonehara T, Yotsumoto K *et al.* Preparing pyruvic acid by fermentation with *Torulopsis species*. WO patent 8,901,523, 1989
- [ 35 ] Miyata R, Yonehara T. Breeding of high-pyruvate-production *Torulopsis glabrata* with reduced pyruvate decarboxylase. *J Biosci Bioeng*, 1999, **88**:173 ~ 178
- [ 36 ] Miyata R, Yonehara T. Breeding of high-pyruvate-production *Torulopsis glabrata* and amino acid auxotrophic mutants. *J Biosci Bioeng*, 2001, **90**:137 ~ 141
- [ 37 ] Uchio R, Kikuchi K, Enei H. Fermentative production of pyruvic acid. Japanese Patent, JP 7,609,785, 1976
- [ 38 ] Uchio R, Kikuchi K, Enei H. Process for producing pyruvic acid by fermentation. US Patent, No 3,993,543, 1976
- [ 39 ] Li Y, Chen J, Liang D F *et al.* Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*. *J Biotechnol*, 2000, **81**:27 ~ 34
- [ 40 ] LI Y (李寅), CHEN J (陈坚), CHEN Y (陈燕) *et al.* Breeding of pyruvate overproducing strain and pilot-scale fermentative production. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 2001, **31**(2):10 ~ 13
- [ 41 ] CHEN Y (陈燕), LI Y (李寅), CHEN J (陈坚). Effect of glucose on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*. *Journal of Wuxi University of Light Industry* (无锡轻工大学学报), 2001, **20**(2):137 ~ 141
- [ 42 ] LI Y (李寅), CHEN J (陈坚), LIANG D F (梁大芳) *et al.* Effect of nutritional conditions on the fermentative production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(2):225 ~ 228
- [ 43 ] Yonehara T, Miyata R. Fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata*. *J Ferment Bioeng*, 1994, **78**:155 ~ 159
- [ 44 ] Li Y, Chen J, Lun S Y *et al.* Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**:680 ~ 685
- [ 45 ] LI Y (李寅), CHEN J (陈坚), LUN S Y (伦世仪). The Important role of vitamins in the over-production of pyruvic acid. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2000, **40**(5):528 ~ 534
- [ 46 ] Miyata R, Yonehara T. Improvement of fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata* IFO 0005. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82**:475 ~ 479
- [ 47 ] Hua Q, Shimizu K. Effect of dissolved oxygen concentration on the intracellular flux distribution for pyruvate fermentation. *J Biotechnol*, 1999, **68**:135 ~ 147

## Progress in Biotechnological Production of Pyruvic Acid

LIU Li-Ming<sup>1, 2</sup> LI Yin<sup>1, 2</sup> DU Guo-Cheng<sup>2</sup> CHEN Jian<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

<sup>2</sup>(Environmental Biotechnology laboratory, School of Biotechnology, Southern Yangtze University Wuxi 214036, China)

**Abstract** Pyruvate, an important organic acid, is widely used in the industries of pharmaceuticals, chemicals, agrochemicals, food additives and so on. Compared with the chemical method, biotechnological production of pyruvic acid is an alternative approach because of the low cost and high product quality. In this article, biosynthesis of pyruvate, including direct fermentative production and resting cell method as well as enzymatic method, was discussed. Furthermore, a comparison of these different methods was proposed. Since, a multi-vitamin auxotrophic strain of *Torulopsis glabrata* is the most competitive strain for industrial production of pyruvate, emphasis was therefore placed on the development of strains screening and fermentation optimization. Finally, some suggestions were put forward to improve the research in this field in the near future.

**Key words** pyruvate, *Torulopsis glabrata*, fermentative production, enzyme conversion

Received: 05-13-2002

This work was supported by Grant from Jiangsu province 9th five-year project (No BG98015-3).

\* Corresponding author. Tel 86-510-5885727; Fax 86-510-5888301; E-mail jchen@sytu.edu.cn