

添加 TCA 循环中间产物加速光滑球拟酵母积累丙酮酸

刘立明^{1,2} 李 寅^{1,2} 堵国成² 陈 坚^{1,2}

¹(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

²(江南大学生物工程学院环境生物技术室,无锡 214036)

摘 要 在维生素限制的条件下,研究了添加 TCA 循环中间产物对光滑球拟酵母多重维生素营养缺陷型菌株 CCTCC M202019 生长和积累丙酮酸的影响。该菌株能以 TCA 循环中间产物为唯一碳源进行生长,且在以葡萄糖、乙酸和 TCA 循环中间产物为复合碳源的平板上菌落数高于分别以葡萄糖和乙酸或 TCA 循环中间产物为唯一碳源时的菌落数。与其它 TCA 循环中间产物相比,草酰乙酸更能促进细胞的生长、提高丙酮酸产量和对葡萄糖的得率。草酰乙酸能够促进细胞生长,是因为 *T. glabrata* CCTCC M202019 菌株能够利用乙酸作为乙酰辅酶 A 供体。在含有 100 g/L 葡萄糖和 6 g/L 乙酸钠的培养基中再添加 10 g/L 草酰乙酸进行分批发酵实验,可使菌体浓度从 11.8 g/L 提高到 13.6 g/L,增长幅度为 15%,丙酮酸对葡萄糖的得率(0.66 g/g)以及生产强度(1.19 g·L⁻¹·h⁻¹)分别高出 6% 和 24%,使发酵结束时间提前 8~12h。

关键词 光滑球拟酵母,丙酮酸,发酵,TCA 循环中间产物,草酰乙酸

中图分类号 TQ920.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0115-05

丙酮酸是糖酵解的终产物,位于呼吸和发酵的关键代谢节点。对于光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)多重维生素营养缺陷型菌株 CCTCC M202019,当培养基中维生素浓度处于亚适量水平时,由丙酮酸进入 TCA 循环的碳流量减小,且 TCA 循环流动不顺畅(因为酮戊二酸脱氢酶(图 1,酶 VII)活性受 B₁ 浓度限制),故细胞生长受到抑制,代谢活性也被削弱^[1,2]。虽然丙酮酸对葡萄糖得率较高,但丙酮酸积累速度较慢^[3]。由于产生这一现象的核心原因是细胞生长被削弱,导致细胞不能高速积累丙酮酸,为此作者考虑:有没有可能在维生素限制的情况下让细胞继续生长,以保持合成丙酮酸的能力?一个简单的思路就是添加 TCA 循环中间产物补充细胞生长,以期提高丙酮酸的生产强度。

TCA 循环中间产物能够作为碳源来满足 TCA 循环受限制的突变株的生长需要^[4-6]。已报道许多酵母能够利用苹果酸等 TCA 循环中间产物作为唯一碳源或能源物质^[7,8]。*Candida sphaerica*、*Candida utilis* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 等都存在将 TCA 循环中间产物通过质膜转运进入细胞的质子转运系

统^[9-13]。*T. glabrata* 在分类学上原属 *Candida*,据此作者推测 *T. glabrata* 菌株也能够利用 TCA 循环中间产物进行生长。如果这一推测能被实验证实,那么,即使由丙酮酸代谢进入 TCA 循环的碳流被完全阻断,细胞也能利用补加的 TCA 循环中间产物进行生长,并将葡萄糖转化为丙酮酸,这样就有可能提高丙酮酸对葡萄糖的得率和生产强度(图 2)。从这一研究思路出发,在维生素限量的条件下,研究了 TCA 循环中间产物对 *T. glabrata* CCTCC M202019 细胞生长和丙酮酸生产的影响,并证实培养基中添加草酰乙酸能够提高丙酮酸的生产强度和对葡萄糖的得率。

1 材料与方法

1.1 菌种

光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019,烟酸、生物素、硫胺素、盐酸吡哆醇四种维生素营养缺陷型,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,为本研究室选育菌株^[14],现保藏于武汉中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。

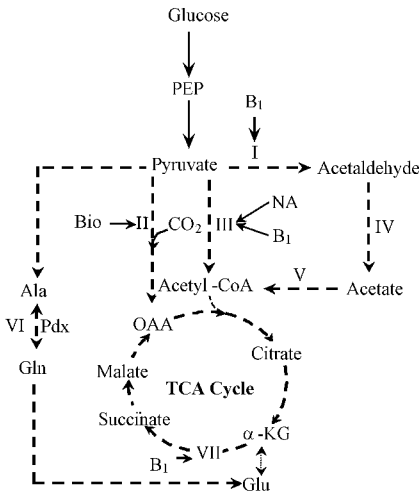


图 1 *T. glabrata* CCTCC M202019 丙酮酸代谢途径
Fig.1 Metabolic pathway of pyruvic acid
in *T. glabrata* CCTCC M202019

I :pyruvate decarboxylase ;II :pyruvate carboxylase ;
III :pyruvate dehydrogenase complex ;IV :aldehyde
dehydrogenase ;V :acetyl-CoA synthase ;
VI :transaminase ;VII :ketoglutarate dehydrogenase
B₁ :thiamin ;NA :nicotinic acid ;Bio :biotin ;
Pdx :pyridoxine ;OAA :oxaloacetate
--->compromised metabolic pathway
->normal metabolic pathway

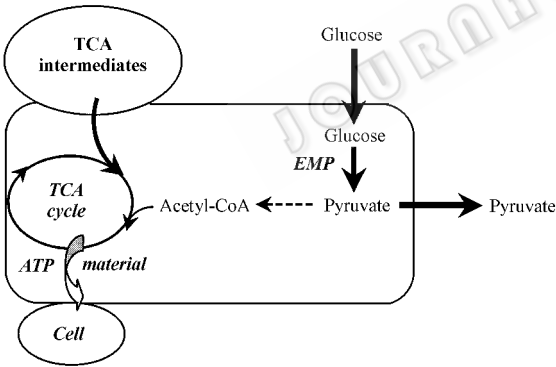


图 2 *T. glabrata* 葡萄糖和 TCA 循环中间
产物代谢概念图
Fig.2 Glucose and TCA-cycle intermediates
in *T. glabrata*

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 培养基 种子培养基见文献 [14]。

1.2.2 发酵培养基(1L):葡萄糖 100g;乙酸钠 6g;氯化铵 7g;KH₂PO₄ 5g;MgSO₄·7H₂O 0.8g;KCl 5g;盐酸硫胺素 20μg;生物素 10μg;烟酸 4mg;盐酸吡哆醇 100μg;CaCO₃ 40g(摇瓶时添加);微量元素液 5mL;苹果酸、琥珀酸、草酰乙酸、α-酮戊二酸等添加量视实验而定。初始 pH 5.0,自来水配制。

微量元素液 :CaCl₂·2H₂O , 2 g ;FeSO₄·7H₂O , 2 g ;ZnCl₂ , 0.5 g ;MnCl₂·4H₂O , 0.2 g ;CuSO₄·5H₂O , 0.05 g ;2 mol/L HCl 溶解后定容至 1 L。

1.2.3 平板培养 :从斜面挑取一环菌接入种子培养基 ,经 24 h 培养后 ,取 4 mL 培养液离心 ,细胞用无菌蒸馏水洗涤 3 次后 ,用无菌 pH 7.5 磷酸缓冲液悬浮 ,作 10⁻¹、10⁻²……10⁻⁷ 梯度稀释 ,取最后 2 个梯度的稀释液涂布含不同碳源的平板上 ,每一种碳源做 3 个平行样。

1.2.4 摇瓶与发酵罐培养 :见文献 [14]。

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(50 mL/500 mL 锥形瓶) ,于 30℃、200 r/min 下摇瓶培养 24 h 后 ,以 10% 接种量(体积分数)接入发酵培养基。

摇瓶发酵 :500 mL 锥形瓶中发酵培养基为 30 mL ,温度为 30℃ ,转速 200 r/min ,发酵时间为 48 h。

发酵罐发酵 :7 L 发酵罐中发酵培养基体积为 4 L ,温度为 30℃、通气量 3 L/(L·min) ,搅拌转速为 400 r/min ,用 8 mol/L NaOH 控制 pH 恒定在 5.0 左右。

1.3 分析方法

将含有 4 mL 发酵液的塑料离心管置于台式高速离心机(TGL-16G)中 ,于 10 000 r/min 下离心 5 min ,取上清液进行分析测定。

1.3.1 丙酮酸质量浓度 :见文献 [14]。

1.3.2 葡萄糖浓度 :见文献 [14]。

1.3.3 细胞干重 :见文献 [14]。

2 结果与讨论

2.1 添加 TCA 循环中间产物对细胞生长的影响

维持培养基中其他营养成分不变 ,分别以葡萄糖与乙酸钠的复合物或 TCA 中间产物为碳源 ,研究了不同碳源对 *T. glabrata* CCTCC M202019 生长的影响。培养基中碳源浓度分别为 :葡萄糖 10 g/L 和乙酸 6 g/L、苹果酸 10 g/L、琥珀酸 20 g/L、草酰乙酸 10 g/L、α-酮戊二酸 15 g/L。

研究发现 ,在含乙酸为唯一碳源的平板上只有 8 个菌落出现(图 3) ;在以 TCA 循环中间产物为唯一碳源的平板上出现了一定数量的菌落 ,但少于以葡萄糖和乙酸为复合碳源时的菌落数 ,表明该菌株能利用 TCA 循环的中间产物为唯一碳源物质进行生长 ,但效果不及葡萄糖与乙酸为复合碳源 ;在葡萄糖与乙酸复合碳源上添加 TCA 循环中间产物 ,此时平板上的菌落数多于任何一种单一(复合)碳源 ,表明 TCA 循环中间产物能够促进细胞生长。

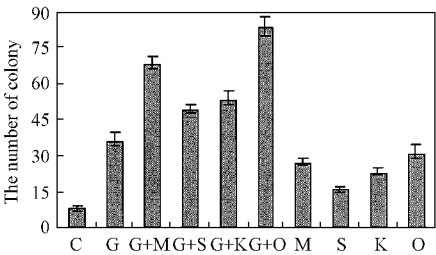


图 3 TCA 循环中间产物对 *T. glabrata* CCTCC M202019 生长的影响

Fig.3 Effects of TCA cycle intermediates on the growth of *T. glabrata* CCTCC M202019

C :acetate ;G :glucose and acetate ;M :malate ;
S :succinate ;K : α -ketoglutarate ;O :oxaloacetate

2.2 添加 TCA 循环中间产物对丙酮酸生产的影响

添加 TCA 循环中间产物对细胞生长、葡萄糖消耗和丙酮酸生产的影响分别如图 4A、B、C 所示。细胞对葡萄糖得率($Y_{x/s}$)及丙酮酸对葡萄糖得率($Y_{p/s}$)的影响列于表 1。

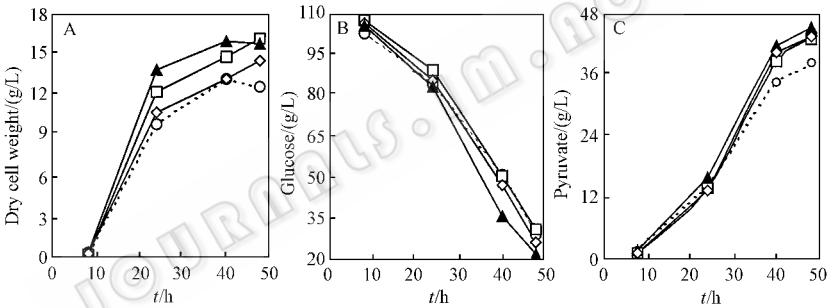


图 4 添加 TCA 循环中间产物对分批发酵生产丙酮酸的影响

Fig.4 Effects of TCA cycle intermediates on pyruvate batch fermentation

○ Glucose and acetate ◇ Glucose , cetate and ketoglutarate ▲ Glucose , acetate and oxaloacetate □ Glucose , acetate and malate
Dashed line : glucose only ; Solid line : glucose and TCA cycle intermediates

分析图 4 和表 1 可知 ,在所实验的 TCA 循环中间产物中 ,草酰乙酸 (OAA) 对细胞生长、葡萄糖消耗和丙酮酸生产的促进作用最为明显。这种优势是由该菌株自身的生理和代谢特性决定的。在前期研究中已发现^[15] ,当培养基中存在大量 Ca^{2+} 时 ,即使生物素 (Bio) 限量 ,该菌株中的丙酮酸羧化途径也被激活 (生成 OAA) 。在此条件下 ,细胞产生了较高浓度的 α -酮戊二酸 (6g/L 左右) 。由于丙酮酸羧化反应存在于细胞质中 ,而 α -酮戊二酸的生成则发生于线粒体内 , α -酮戊二酸在胞外积累表明该菌株胞内具有完整的 OAA 转运系统 ,能够有效地将 OAA 从细胞质运输到线粒体内 ,并与来源于乙酸和丙酮酸的乙酰辅酶 A (AcCoA) 结合形成柠檬酸 ,以补充 TCA 循环的流量^[16] 。若在发酵刚开始时在培养基中加

表 1 TCA 循环中间产物对 $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ 的影响

Table 1 The effects of TCA cycle intermediates on $Y_{x/s}$ and $Y_{p/s}$

	G	G + K	G + O	G + M
$Y_{x/s}$	0.46 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.66 ± 0.03	0.64 ± 0.01
$Y_{p/s}$	0.57 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.67 ± 0	0.62 ± 0.01

G :glucose ;M :malate ;K : α -ketoglutarate ;O :oxaloacetate

添加 TCA 循环中间产物显著促进了细胞生长 (图 4A) ,使葡萄糖消耗速度加快 (图 4B) ,且 48 h 时的丙酮酸产量提高了 17.7 % (图 4C) 。这表明添加 TCA 循环中间产物实现了补充细胞生长、加速葡萄糖消耗并提高丙酮酸产量的思想。由于添加 TCA 循环中间产物后 ,用于细胞生长的葡萄糖比例下降 ,故而细胞对葡萄糖得率($Y_{x/s}$)显著提高 ,而丙酮酸产量的增加和葡萄糖消耗的减少 ,也使得丙酮酸对葡萄糖得率($Y_{p/s}$)有所改善 (表 1) 。

入 OAA ,推测该物质可以被迅速转运到 *T. glabrata* 的细胞质中^[17] 。细胞质中 OAA 浓度的升高 ,使细胞对丙酮酸羧化反应的需求降低 ,这样可减少丙酮酸进入 TCA 循环的流量 ,但细胞质中 OAA 浓度的升高促进了 TCA 循环的流动 ,细胞浓度提高 ,葡萄糖消耗速度也随之加快。这样就在少消耗丙酮酸的基础上达到了促进细胞生长、加速葡萄糖消耗的目标。

2.3 硫胺素与 TCA 循环中间产物对丙酮酸生产的影响

虽然在实验中观察到添加 OAA 能够促进细胞生长 ,但 OAA 要进入 TCA 循环一定要有 AcCoA 的参与^[18] 。在 B_1 限制的情况下 ,AcCoA 的产生如何满足 OAA 浓度增加的需要 ?

T. glabrata 内 AcCoA 的形成途径有两条 (图

1):一是线粒体内的丙酮酸直接氧化脱羧途径,由PDH将丙酮酸氧化为AcCoA;二是细胞质内的丙酮酸脱羧支路,在PDC、乙醛脱氢酶和AcCoA合成酶的联合作用下将丙酮酸转化为AcCoA。由于B₁是PDH和PDC的辅因子,当培养基中没有B₁时,PDH和PDC活性几乎为零,AcCoA的缺乏导致细胞生长很弱(图5B),即使添加OAA也不能促进细胞生长(图5I)。但*T. glabrata* CCTCC M202019是乙酸渗漏型突变株,对乙酸的利用能力明显强于出发菌株^[14]。当葡萄糖培养基中缺乏B₁但添加6 g/L的乙酸钠时,乙酸能够作为AcCoA的供体实现部分生长(图5C),如在此基础上再加入10 g/L OAA,则其生长量与C相比提高了1.2倍(图5D)。在含有B₁的葡萄糖培养基中(图5A),如果不加入乙酸,观察不到OAA对细胞生长和丙酮酸生产的促进作用(图5H)。添加乙酸可以促进细胞的生长(图5G),在此基础上添加OAA细胞的生长量进一步提高(图5F)。此外,菌株以乙酸为唯一碳源时,生长极弱(图5E);但若在此培养基中添加OAA,细胞量提高了9.5倍(图5J)。由以上三方面可以说明,在本研究中OAA能够促进细胞生长,是建立在*T. glabrata* CCTCC M202019菌株能够利用乙酸作为AcCoA供体的基础之上的。

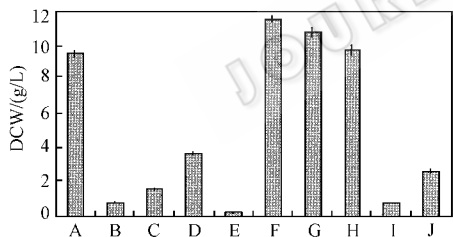


图5 *T. glabrata* 在不同培养基上生长情况

Fig.5 Growth of *T. glabrata* on different media

A: control medium (contains glucose, B₁, Bio, NA, and Pdx);

B: medium A without B₁;

C: medium A supplemented with acetate without B₁;

D: medium A supplemented with OAA and acetate, without B₁;

E: medium A without glucose, supplemented with acetate;

F: medium A supplemented with acetate and OAA;

G: medium A supplemented with acetate;

H: medium A supplemented with OAA;

I: medium A without B₁ but supplemented with OAA;

J: medium contains acetate and OAA, no vitamins.

The concentration of acetate and OAA are

6 g/L and 10 g/L, respectively

2.4 分批发酵验证实验

图6为*T. glabrata* CCTCC M202019在复合碳

源或单一碳源上进行分批发酵的过程曲线。添加10 g/L OAA后,细胞生长速度加快,最终菌体浓度(13.6 g/L)比不添加OAA时提高了15%(图6A);发酵56 h后葡萄糖基本消耗完毕,此时丙酮酸产量、Y_{p/s}及丙酮酸生产强度分别达到66.7 g/L、0.66 g/g及1.19 g·L⁻¹·h⁻¹。发酵前期葡萄糖消耗速度很慢(图6C),但Y_{p/s}最高达到0.94 g/g(图6D),这表明菌株有可能优先利用OAA生长,从而使大部分葡萄糖能够转化为丙酮酸。如若不添加OAA,发酵结束时(68 h)丙酮酸产量、Y_{p/s}及丙酮酸生产强度分别为65.3 g/L、0.63 g/g(发酵56 h时为0.625 g/g)及0.96 g·L⁻¹·h⁻¹。由此可以看出,添加10 g/L OAA作为补充碳源,可使Y_{p/s}提高5%、丙酮酸生产强度提高24%,发酵时间缩短8~12 h。

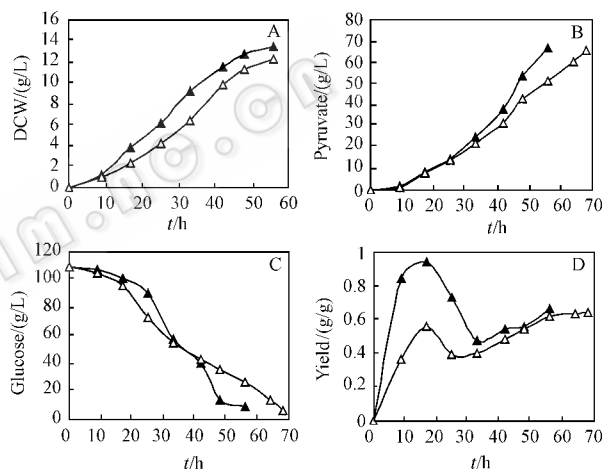


图6 *T. glabrata* CCTCC M2020使用复合碳源和单一碳源的发酵过程曲线

Fig.6 Effects of oxaloacetate on the pyruvate production in the 7-1 fermentor

▲ Medium contains OAA △ Medium without OAA

致谢 本校生物工程学院2002届本科生王明星参加部分实验研究工作,特此致谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Li Y, Chen J, Lun S. Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 471-479
- [2] Liu LM(刘立明), Li Y(李寅), Du GC(堵国成) et al. Progress in biotechnological production of pyruvic acid. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2002, **18**(6): 651-655
- [3] Li Y, Chen J, Lun SY 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

- tion of the carbon source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **30**: 553 – 558
- [5] Green LS, Emerich DW. *Bradyrhizobium japonicum* does not require α -ketoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 194 – 201
- [6] Antoun H, Bordeleau LM, Sauvageau R. Utilization of tricarboxylic acid cycle intermediates and symbiotic efficiency in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil*, 1984, **77**: 29 – 38
- [7] Barnett JA, Kornberg HL. Utilization by yeast of acids of the tricarboxylic acid cycle. *J Gen Microbiol*, 1960, **23**: 65 – 82
- [8] Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeast characteristics and identification. University Press Cambridge. 1990
- [9] Corte RM, Leao C, Van UN. Transport of L(-) malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **31**: 551 – 555
- [10] Corte RM, Leao C. Transport of L(-) malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **56**: 1109 – 1113
- [11] Cassio F, Leao C. A comparative study on the transport of L(-) malic acid and other short chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*. Evidence for a general organic acid permease. *Yeast*, 1993, **9**: 743 – 752
- [12] Rodriguez S, Thornton RJ. Factors Influencing the utilisation of L-malate by yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **72**: 17 – 22
- [13] Salmon JM. L-malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Acta*, 1987, **901**: 30 – 40
- [14] Liu LM(刘立明), Li Y(李寅), Du GC(堵国成) *et al.* Breeding of high-pyruvate-producing *Torulopsis glabrata* with acetate as supplement carbon source. *Chinese Industrial Microbiology(工业微生物)*, 2002, **32**(3): 10 – 14
- [15] Liu LM(刘立明), Li Y(李寅), Du GC(堵国成) *et al.* CaCO_3 enhanced the accumulation of α -ketoglutarate in the fermentative production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2003, **19**(6): 745 – 749
- [16] Levente K, Christian PK. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**: 189 – 196
- [17] Palmieri L, Vozza A, Agrimi G *et al.* Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. *J Biol Chem*, **74**(32): 22184 – 22190
- [18] Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B *et al.* Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J Bacteriol*, 2001, **183**(4): 1441 – 1451

Addition of TCA Cycle Intermediates Enhances Pyruvate Production

LIU Li-Ming^{1,2} LI Yin^{1,2} DU Guo-Cheng¹ CHEN Jian^{1,2*}

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

²(Environmental Biotechnology laboratory, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract The capability of utilizing the intermediates of TCA-cycle as the sole carbon source by the multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 under the conditions of vitamins limitation was demonstrated. Furthermore, the colony numbers grown on medium supplemented with glucose, acetate and one of the intermediates of TCA-cycle was higher than that of medium used glucose and acetate or medium used one of the intermediates of TCA-cycle carbon source. Among the intermediates of TCA-cycle used in this study, oxaloacetate was the best carbon source for the yeast and it was found that its presence stimulated the conversion of acetate to acetyl-CoA. In batch fermentation with glucose medium, the addition of 10 g/L of oxaloacetate improved the dry cell weight from 11.8 g/L to 13.6 g/L, and the productivity of pyruvate from $0.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ to $1.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a 24% increase after 56 h growth. The yield of pyruvate on glucose was also improved as well, from 0.63 g/g to 0.66 g/g.

Key words *Torulopsis glabrata*, pyruvate, fermentation, intermediates of TCA-cycle, oxaloacetate

Received: 07-14-2003

This work was supported by Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2002072) and the Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province during the 9th Five-Year Plan Period (No. BG98015-3).

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

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>