

一种基于途径分析提高丙酮酸产量的育种策略

刘立明 李 寅 陈 坚*

(江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘 要: 为进一步提高光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的水平,在途径分析的基础上提出了一种组成型降低丙酮酸脱羧酶、但增强乙酰辅酶 A 合成酶活性的育种策略。通过亚硝基胍诱变,获得 1 株乙酸需求型突变株 CCTCC M202019,在外加乙酸的培养基中表现出高于出发株 21% 的丙酮酸生产能力和良好的遗传稳定性。检测突变株 CCTCC M202019 中丙酮酸代谢相关酶的活性发现 (1) 丙酮酸脱羧酶活性降低了 40% (2) 外加乙酸与否的条件下,乙酰辅酶 A 合成酶的活性分别提高了 103.5% 和 57.4% (3) 添加乙酸和突变对丙酮酸羧化酶、丙酮酸脱氢酶系、乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶的活性没有显著影响。在含有乙酸的培养基中突变株细胞干重比出发株高 21.7%,可能是由于乙酰辅酶 A 合成酶活性的提高,补充了因丙酮酸脱羧酶活性降低而引起的胞质乙酰辅酶 A 短缺。在 7L 罐中含有 6g/L 乙酸钠的培养基中发酵 62h,丙酮酸产量达到 68.7g/L,对葡萄糖的产率为 0.651g/g。

关键词: 光滑球拟酵母 丙酮酸 丙酮酸脱羧酶 乙酰辅酶 A 合成酶 育种策略

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)01-0077-04

在光滑球拟酵母多重维生素营养缺陷型菌株发酵生产丙酮酸过程中,硫胺素(B_1)作为丙酮酸脱氢酶系(PDH)和丙酮酸脱羧酶(PDC)的辅因子,通过影响乙酰辅酶 A($AcCoA$)的合成而对积累高水平丙酮酸起着关键作用^[1~4]。已有研究表明,组成型降低 PDC 活性能够提高丙酮酸产量和对葡萄糖的产率,如 Miyata 等^[5]获得了 PDC 活性降低 54% 左右的突变株 *T. glabrata* ACII-3,在以乙酸为补充碳源的培养基上丙酮酸产量较出发株提高了 15%,但突变株在以葡萄糖为惟一碳源的培养基上生长减弱,是因为 PDC 活性降低,使得用于合成细胞物质的胞质 $AcCoA$ 不足的缘故。在酿酒酵母中,PDC、乙醛脱氢酶(ALDH)和 $AcCoA$ 合成酶(ACS)组成 PDH 旁路用以合成维持细胞生长的胞质 $AcCoA$ ^[6~9]。以葡萄糖为惟一碳源时,突变株 *T. glabrata* ACII-3^[5]和 *S. cerevisiae* 的 PDC 缺失突变株^[9]的生长特性相似,表明这两株菌中 PDC 的生理作用是相近的。为维持一定的细胞浓度,希望能提高 ACS 的活性,增强对乙酸的利用能力,使 PDC 活性下降导致的胞质 $AcCoA$ 短缺能够通过 ACS 途径得到补充。根据这一思路,作者选育了 PDC 活性组成型降低而 ACS 活性增强的突变株,进一步提高了丙酮酸产量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 出发株为光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) WSH-IP303,为烟酸(NA)、硫胺素(B_1)、吡哆醇(B_6)和生物素(Bio)的营养缺陷型^[1]。

1.1.2 培养基: 斜面、种子和发酵培养基:见文献[10]。基本培养基(MM):葡萄糖 100g, NH_4Cl 3g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,微量元素液 5mL,维生素浓度同发酵培养基,自来水定容至 1L, pH 5.0。在 MM 中加入 6g 乙酸钠即为完全培养基(CM)。配制固体平板培养基时添加 2% 琼脂。微量元素液: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g, $ZnCl_2$ 0.5g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.2g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05g, 2mol/L HCl 溶解后定容至 1L。

1.2 摇瓶和发酵罐培养

从新鲜斜面上接 1 环菌入种子培养基(50mL/500mL 锥形瓶),于 30℃、200r/min 下摇瓶培养 24h,以 10% 接种量(V/V)接入发酵培养基。摇瓶发酵:500mL 锥形瓶中发酵培养基为 50mL, 30℃、200r/min 下发酵 48h。发酵罐发酵:7L 发酵罐中发酵培养基体积为 4L,温度为 30℃、通气量 3L/(L·min),搅拌转

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2002072),江苏省高等学校研究生创新计划

* 通讯作者。Tel 86-510-5885727 Fax 86-510-5888301 E-mail jchen@sytu.edu.cn

作者简介:刘立明(1976-)男,安徽宿松人,博士研究生,从事生化工程研究。E-mail limingli@sytu.edu.cn

收稿日期 2004-05-10,修回日期 2004-07-26

速为 400r/min ,用 8mol/L NaOH 控制 pH 为 5.0。

1.3 分析方法

4mL 发酵液 10000r/min 下离心 5min ,取上清液进行分析测定。

1.3.1 底物和代谢产物的测定 :葡萄糖采用 3,5-二硝基水杨酸法测定 ,丙酮酸采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定 ,色谱条件 :StableBond C18 反相柱 ,柱温 28℃ ,检测器 :UV 210nm ,流动相 :0.1% (V/V) H_3PO_4 ,流速 :1.0mL/min ,进样体积 :10 μ L。乙酸采用 HPLC 测定 ,色谱条件为 :StableBond C18 反相柱 ,柱温 45℃ ,检测器 :UV 400nm ,流动相 :乙腈 :水 = 1 : 3 ,流速 :1.0mL/min ,进样体积 :10 μ L。乙醇采用乙醇在线分析仪检测^[12]。

1.3.2 丙酮酸代谢关键酶活性的测定 :将在 30℃ 下培养了 24h 的细胞用无菌生理盐水离心洗涤 3 次 ,然后悬浮在 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 中 ,用玻璃珠于 4℃ 下振荡 5min ,使细胞在悬浮液中混合均匀 ,于 4℃ 超声波破碎 2min ,工作强度为 30% ,工作 1s 间隔 0.5s ;随后在 4℃、10000r/min 下离心 3min 除去细胞碎片 ,取上清液测定丙酮酸羧化酶 (PC) 、PDH、ACS、乙醇脱氢酶 (ADH) 、ALDH 和丙酮酸脱羧酶 (PDC) 等酶的活性^[5,13~15]。

1.3.3 细胞干重 (DCW) 和蛋白质含量的测定 :测定方法分别参照文献 3 和文献 16]。

2 结果和讨论

2.1 乙酸需求型突变株 *T. glabrata* CCTCC M202019 的选育

出发株 *T. glabrata* WSH-IP303 在 MM 和 CM 上均生长良好。对其进行 NTG 诱变处理后 ,有 45 株菌株在 MM 平板上生长微弱 ,而在 CM 平板上菌落大于出发株。在以乙酸为补充碳源的 CM 培养基中 ,26 株突变株的丙酮酸生产能力高于出发株 ,其中 14 株菌株丙酮酸产量超过 43g/L ,PDC 活性下降了 11% ~ 41%。对这 14 株菌进行维生素营养缺陷型验证 ,发现它们仍为 NA、B₁、B₆ 和 Bio 四种维生素的营养缺陷型。对这些突变株进行传代实验 ,突变株 WSH-LQ307 和 WSH-LQ303 表现出较强的丙酮酸生产能力和良好的遗传稳定性 ,由于 WSH-LQ307 积累丙酮酸能力略强于 WSH-LQ303 ,故选取 WSH-LQ307 留作后续研究用 ,并保存于中国典型培养物保藏中心 (编号 CCTCC M202019)^[4]。

2.2 突变株与出发株的生长特性比较

突变株 CCTCC M202019 以乙酸钠为惟一碳源

生长时的细胞干重为 2.34g/L ,是出发株 WSH-IP303 (0.28g/L) 的 8.4 倍 ,表明突变株利用乙酸钠为惟一碳源的能力明显强于出发株。当两株菌同在 MM 中生长时 ,突变株的细胞干重比出发株低 28% ;但在添加了 6g/L 乙酸钠的 MM (即 CM) 中 ,突变株的细胞干重却比出发株高出 21.7% (图 1) ,表明乙酸作为补充碳源可促进突变株的生长。在酵母细胞中 ,胞质 AcCoA 含量是决定细胞生长的最直接因素。其主要合成途径有 (1) 线粒体中 PDH 催化的丙酮酸直接氧化脱羧 (2) 由 PDC、ALDH 和 ACS 等组成的 PDH 旁路的丙酮酸间接氧化脱羧^[5]。当酵母以葡萄糖为惟一碳源进行生长时 ,合成细胞生长所需 AcCoA 的碳流大部分来源于 PDH ,仅有小部分来源于 PDH 旁路。图 1 表明 PDC 活性对维持 *T. glabrata* 中胞质 AcCoA 含量起着重要作用 ,由线粒体 PDH 直接氧化途径所提供的胞质 AcCoA 难以满足突变株生长的需求 ,但可以通过同化乙酸得到补充。

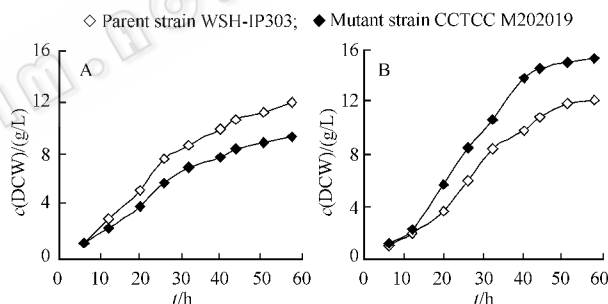


图 1 乙酸钠对突变株与出发株生长的影响

Fig.1 Effect of acetate on cell growth of the mutant and the parent strain

Panel A : MM ; Panel B : CM.

2.3 突变株与出发株的丙酮酸代谢相关酶的活性比较

与出发株相比 ,为何突变株 CCTCC M202019 在 MM 上生长较弱但在 CM 培养基上却生长良好 ? 为确定原因 ,作者比较了突变株 CCTCC M202019 与出发株 WSH-IP303 在不同培养基上 (MM 和 CM) 与丙酮酸代谢相关酶 (PDH、PDC、ALDH、ACS、ADH 和 PC) 活性的变化情况。如表 1 所示 ,与出发株相比 ,突变株中 PDH 旁路酶活性发生了明显的变化 (1) PDC 活性下降了 40% (CM 或 MM) (2) ACS 活性在含有乙酸的 CM 培养基上提高了 103.5% ,而在无乙酸的 MM 培养基上提高了 57.4%。添加乙酸和突变对 PDH、PC、ALDH 和 ADH 等酶的活性没有明显影响。这一结果表明 ,尽管突变株的 PDC 活性下降了

40% ,但在含有乙酸的培养基中的细胞干重比出发株仍高出 21.7% 的原因在于 :ACS 活性的提高补充了因 PDC 活性降低而引起的胞质 AcCoA 短缺。而

胞质中的 AcCoA 可通过肉碱-乙酰转移酶穿梭系统进入线粒体 TCA 循环中供细胞正常生理代谢^[17]。

表 1 突变株和出发株中 PDH , PDC , ALDH , ACS , ADH 和 PC 活性的比较

	Parent strain IP 303		Mutant CCTCC M202019	
	CM	MM	CM	MM
PDH ^b	9.86 ± 0.12	9.74 ± 0.1	9.79 ± 0.2	9.81 ± 0.1
PDC ^b	15.24 ± 0.2	15.04 ± 0.1	9.07 ± 0.3	9.13 ± 0.2
ALDH ^b	7.12 ± 0.1	8.04 ± 0.07	7.92 ± 0.2	8.12 ± 0.1
ACS ^b	3.69 ± 0.1	3.64 ± 0.2	7.51 ± 0.15	5.73 ± 0.10
ADH ^c	1.41 ± 0.05	1.36 ± 0.04	1.38 ± 0.08	1.41 ± 0.04
PC ^c	9.52 ± 0.1	9.83 ± 0.1	9.34 ± 0.06	9.86 ± 0.07

^a Mean ± standard deviations (n = 3) ; ^b The unit of the specific activity of PDH , PDC , ALDH , and ACS is 10⁻² (mol / (min / mg / protein)) ; ^c The unit for the specific activity of ADH and PC is 10⁻¹ μmol / (min / mg / protein) .

2.4 乙酸钠浓度对突变株的生长和积累丙酮酸的影响

在培养基中添加一定浓度的乙酸钠可促进突变株 CCTCC M202019 生长和丙酮酸产量。乙酸钠对突变株 CCTCC M202019 生长和积累丙酮酸的影响如图 2 所示 (1 g 乙酸钠中碳摩尔数相当于 0.7g 葡萄糖碳摩尔数) 。细胞干重随培养基中乙酸钠浓度的增加而呈线性增加 ,当 MM 培养基中乙酸钠浓度为 6g/L 时 ,丙酮酸对葡萄糖产率和丙酮酸产量均达到最大值 ,分别为 0.586g/g 和 46.8g/L。随着培养基中乙酸钠浓度的进一步提高 ,丙酮酸产量和丙酮酸对葡萄糖产率则逐渐下降。故在后续研究中 ,发酵培养基中乙酸钠添加量为 6g/L。

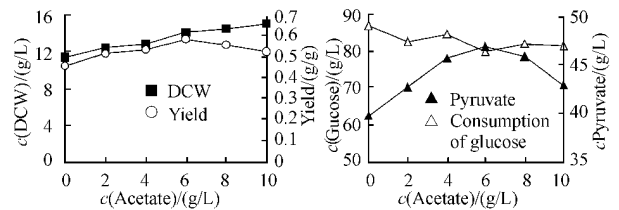


图 2 乙酸钠浓度对突变株 CCTCC M202019 积累丙酮酸的影响

Fig. 2 Effect of acetate concentration on the production of pyruvate by mutant CCTCC M202019

2.5 T. glabrata CCTCC M202019 菌株 7L 发酵罐实验

在含有 6g/L 乙酸钠的发酵培养基中 ,突变株 T. glabrata CCTCC M202019 在 7L 发酵罐中培养 62h 丙酮酸产量为 68.7g/L ,对葡萄糖产率为 0.651g/g ,发酵液中副产物乙醇浓度 (0.8g/L) 比出发株乙醇浓度 (5.9g/L) 降低了 86% (图 3) 。

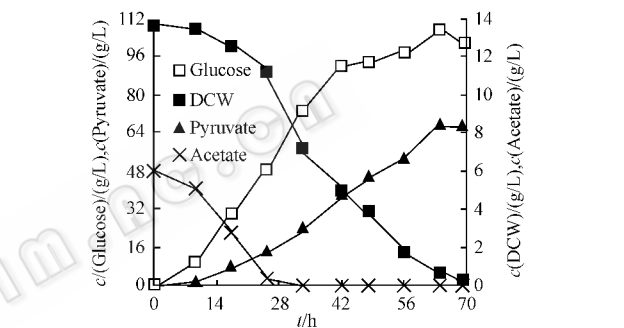


图 3 突变株 CCTCC M202019 发酵过程曲线

Fig.3 Time-course of pyruvate production by mutant CCTCC M202019

本文基于对光滑球拟酵母中丙酮酸节点主要代谢途径的分析 ,提出选育 PDC 活性组成型降低而 ACS 活性增强的突变株的育种策略 ,以期提高丙酮酸的产量 ,并降低对维生素 B₁ 的依赖性。由于该突变株中丙酮酸经 PDC 途径的降解被进一步抑制 ,且对乙酸的利用能力加强 ,7L 发酵罐中丙酮酸的产量和产率与前期研究相比又有了进一步的提高^[10]。此外 ,本研究表明 ,提高 T. glabrata PDH 旁路中 ACS 活性可以增强对乙酸的同化能力 ,为酵母细胞提供额外的胞质 AcCoA。这不仅有利于细胞生长 ,也为生产其它与 AcCoA 代谢相关的物质提供了可能性。

参 考 文 献

[1] Li Y , Chen J , Lun S Y. Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2001 , **57** : 451 - 459.

[2] Hua Q , Araki M , Koide Y , et al. Effects of glucose , vitamins , and DO concentrations on pyruvate fermentation using *Torulopsis glabrata* IFO 0005 with metabolic flux analysis. *Biotechnology Progress* , 2001 , **17** : 62 - 68.

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

- [3] 刘立明,李寅,陈坚.添加 TCA 循环中间产物加速光滑球拟酵母积累丙酮酸.生物工程学报 2004,20(1):115-119.
- [4] 刘立明,李寅,堵国成,等.乙酸渗漏型丙酮酸高产菌的选育.工业微生物 2002,32(3):10-14.
- [5] Miyata R, Yonehara T. Breeding of high-pyruvate-producing *Torulopsis glabrata* with acquired reduced pyruvate decarboxylase. *J Biosci Bioeng*, 1999, **88**:173-178.
- [6] Pronk J T, Yde Steensma H, van Dijken J P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1996, **12**:1607-1633.
- [7] Pronk J T, Wenzel T J, Luttik M A, et al. Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 1994, **140**:601-610.
- [8] Holzer H, Goedde W. Zwei Wegen von pyruvate zu acetyl-coenzyme A in Hefe. *Biochemistry* 1957, **329**:175-191.
- [9] Flikweert M T, van der Zanden L, Janssen W M, et al. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth on glucose. *Yeast*, 1996, **12**:247-257.
- [10] 李寅,陈坚,伦世仪,等.维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用.微生物学报 2000,40(5):528-534.
- [11] Miwa H, Hiyama C, Yamamoto M. High-performance liquid chromatography of short-and long-chain fatty acids as 2-nitrophenylhydrazides. *J Chromatogr*, 1985, **321**:165-174.
- [12] Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, et al. Effect of methanol concentration on the production of human-glycoprotein domain by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, **86**:482-487.
- [13] Dunn M F, Encarnacion S, Araiza G, et al. Pyruvate carboxylase from *Rhizobium etli*: mutant characterization, nucleotide sequence, and physiological role. *J Bacteriol*, 1996, **178**:5960-5970.
- [14] Hinman L M, Blass J P. An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates. *J Biol Chem*, 1981, **256**:6583-6586.
- [15] van den Berg M, de Jong-Gubbels P, Kortland C, et al. The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 1996, **271**:28953-28959.
- [16] 宁正祥.食品成分分析手册.北京:中国轻工业出版社,1998.
- [17] Chase J F, Pearson D J, Tibbs P K. The preparation of crystalline carnitine acetyltransferase. *Biochim Biophys Acta*, 1965, **96**:162-165.

Application of a metabolic-pathway-analysis based breeding strategy enhances the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*

LIU Li-ming LI Yin CHEN Jian*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: To further enhance the pyruvate productivity by multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata*, a breeding strategy aiming at decreasing the activity of pyruvate decarboxylase but increasing the activity of acetyl-CoA synthetase was developed based on analysis of pyruvate-related metabolic pathways. Nitrosoguanidine mutagenized cells of *T. glabrata* WSH-IP303 were screened for mutants that require acetate for complete growth on glucose minimum medium. A mutant, *T. glabrata* CCTCC M202019, produced pyruvate 21% higher than that of the parent strain and was genetically stable in flask cultures, was selected as a working strain. To elucidate the metabolic changes that led to the increase of pyruvate production, the activities of enzymes that involved in pyruvate-related metabolic pathways of the mutant and the parent strain were determined. Enzymatic analysis revealed that, compared with the parent strain WSH-IP303, the activity of pyruvate decarboxylase of the mutant strain CCTCC M202019 decreased by roughly 40%, while the activity of acetyl-CoA synthetase of the latter increased by 103.5% or 57.4%, respectively, in the presence or absence of acetate. When 6g/L sodium acetate was added to the medium, pyruvate production by the mutant strain CCTCC M202019 reached 68.7g/L at 62h (yield on glucose, 0.651g/g) in fermentations performed in a 7-L jar fermentor, indicating the shortage of cytosolic acetyl-CoA resulted from the disruption of pyruvate decarboxylase was properly compensated by the increase of the activity of acetyl-CoA synthetase.

Key words: *Torulopsis glabrata*, Pyruvate production, Pyruvate decarboxylase, Acetyl-CoA synthetase, Pathway analysis, Breeding strategy

Foundation item: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2002072); The Postgraduate Innovation Program of Jiangsu Province

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

Received date: 05-10-2004