

# TCA 循环中间产物对酿酒酵母胞内代谢 关键酶活性的影响

李明达 赵睿 姜晓雷 姚峻 赵长新\*

(辽宁省发酵工程重点实验室 大连工业大学生物与食品工程学院 辽宁 大连 116034)

**摘要:** 对酿酒酵母在添加苹果酸、柠檬酸和琥珀酸的混合培养基与其在 YEPD 培养基中胞内丙酮酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、乙醇脱氢酶的酶活力差异进行了对比分析。结果表明: 添加苹果酸使胞内丙酮酸激酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、乙醇脱氢酶的酶活分别下降 34.82%、57.23%、39.15%、12.10%; 添加柠檬酸使胞内丙酮酸激酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶的酶活分别下降 50.17%、42.20%、48.40%; 添加琥珀酸使胞内丙酮酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、乙醇脱氢酶的酶活分别下降 34.16%、34.16%、50.87%、50.87%、12.37%。丙酮酸激酶、异柠檬酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶对 3 种有机酸的耐受性较差, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、乙醇脱氢酶对 3 种有机酸的耐受具有选择性。

**关键词:** 酿酒酵母, TCA 循环, 代谢酶活, 有机酸

## Effects of Adding Intermediate Material in Tricarboxylic Acid Cycle on the Activity of Key Enzymes of *Saccharomyces cerevisiae*

LI Ming-Da ZHAO Rui JIANG Xiao-Lei YAO Jun ZHAO Chang-Xin\*

(Key Laboratory of Fermentation Engineering of Liaoning Province, School of Bio & Food Technology of Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

**Abstract:** The enzyme activity of some key metabolic enzymes (pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and ethanol dehydrogenase) in *Saccharomyces cerevisiae* with YEPD medium were compared with malic acid, citric acid and succinic acid mixed medium. The result showed that after adding malic acid, enzymatic activity of pyruvate kinase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and ethanol dehydrogenase respectively declined 34.82%, 57.23%, 39.15% and 12.10%; after adding citric acid, enzymatic activity of pyruvate kinase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase respectively declined 50.17%, 42.20% and 48.40%; after adding succinic acid, enzymatic activity of pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and ethanol dehydrogenase respectively declined 34.16%, 34.16%, 50.87%, 50.87% and

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(No. 2007BAK36B01)

\*通讯作者: ✉ zhaochangxin@126.com

收稿日期: 2009-10-15; 接受日期: 2009-12-15

12.37%。Pyruvate kinase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase had bad tolerance to three kinds of organic acids, tolerance of glucose-6-phosphate dehydrogenase and ethanol dehydrogenase to three kinds of organic acids had selectivity.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, TCA cycle, Enzymatic activity, Organic acids

三羧酸循环(TCA)作为重要的能量代谢途径,对生物体的生命活动起着重要作用。它是糖、脂类和氨基酸代谢的最后共同途径<sup>[1]</sup>。判断某一代谢中间物是否参与代谢或影响细胞生理已成为代谢控制分析的主要内容<sup>[2]</sup>。TCA循环中间产物能够作为碳源来满足微生物的生长需要<sup>[3-5]</sup>。已报道产朊假丝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<sup>[6]</sup>。园球形假丝酵母(*Candida sphaerica*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)和酿酒酵母(*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<sup>[7-9]</sup>。它们都能将TCA循环中间产物加以利用,使由糖酵解产生的丙酮酸碳流与添加的TCA循环中间产物共同进入下游循环,并对原有的代谢活动产生很大影响,改变代谢途径中的碳流分布,导致其中某种代谢中间产物含量产生变化,从而达到调控其生理代谢的目的。

在啤酒酿造的实际生产中,认识和掌握反映发酵过程的有机酸参数及其对代谢酶活的影响,对于啤酒生产工艺的创新、啤酒质量的稳定和提高以及酿造菌种的改造、工程菌的构建等研究都具有重要的实践意义。

本文在YEPD培养基中添加TCA循环的中间产物有机酸(苹果酸、柠檬酸、琥珀酸),通过测定代谢途径中节点处的酶活,研究在好氧发酵条件下3种有机酸对酿酒酵母代谢过程的影响机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌种:** 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*): FCC2146, 大连工业大学菌种保藏所提供。

**1.1.2 培养基:** YEPD培养基含葡萄糖2%, 酵母膏1%, 蛋白胨1%。混合培养基中另加入苹果酸、柠檬酸、琥珀酸,使其浓度为0.01 mol/L。灭菌前pH 4.9-5.1。

**1.1.3 试剂:** 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、葡萄糖-6-磷酸(G6P)、乳酸脱氢酶(LDH)均为Sigma产品,

ADP、NAD、NADH、NADP均为进口分装生化试剂,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 摇瓶培养方法

装量为50 mL/250 mL三角瓶,接种量1%, 30°C、120 r/min于旋转式摇床培养24 h,放瓶时根据培养前后重量差补水,定时无菌操作移取发酵液分析。

### 1.3 酶液的制备

样品在10000 r/min、4°C离心10 min,收集细胞。用100 mmol/L Tris-HCl(包含20 mmol/L KCl, 5 mmol/L MnSO<sub>4</sub>, 2 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.0)缓冲液洗涤2次,然后重新悬浮在缓冲液中。低温超声破碎1 min。细胞碎片在10000 r/min、4°C下离心,上清液即为细胞裂解液。

### 1.4 分析方法

**1.4.1 菌体浓度的测定:** 浊度法,测量600 nm处OD值<sup>[10]</sup>。

**1.4.2 葡萄糖浓度的测定:** 3,5-二硝基水杨酸法。

**1.4.3 酶蛋白定量:** Bradford法测定。

**1.4.4 酶活性检测:** 丙酮酸激酶按Malcovati等<sup>[11]</sup>的方法。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶按Rossi等<sup>[12]</sup>的方法。异柠檬酸脱氢酶按Mesfin等<sup>[13]</sup>的方法。苹果酸脱氢酶按胡光星等<sup>[14]</sup>的方法。乙醇脱氢酶按Andersson等<sup>[15]</sup>的方法。所有酶活由CANY UV-765型紫外可见分光光度计测定(上海精密仪器有限公司)。酶活力单位定义为每分钟每毫克蛋白质转化1 μmol底物所需的酶为1个单位(U)。

## 2 结果与分析

**2.1 TCA循环的中间产物对酿酒酵母生理特性的影响**

**2.1.1 TCA循环的中间产物对发酵降糖速率的影响:** 不同微生物在利用不同碳源生长时,往往存在葡萄糖阻遏现象。本文以葡萄糖和有机酸(苹果酸、柠檬酸、琥珀酸)同时做碳源,通过在菌体不同生长阶段取样并测定样品的残余葡萄糖浓度,研究酿酒酵母菌在有机酸存在的情况下利用葡萄糖的规律如

图 1 所示。在延滞期(0-6 h)以 YEPD 培养的葡萄糖浓度比较高, 在存在有机酸碳源的环境中, 酵母优先利用葡萄糖为碳源, 有机酸对发酵初期的糖代谢有一定的促进作用。进入对数期(6-12 h), YEPD 中的酵母细胞浓度较大(图 2), 因此葡萄糖浓度下降速率较快。在稳定期(12-24 h), 发酵液中的葡萄糖被消耗殆尽, 4 种发酵液的葡萄糖浓度相差不大。

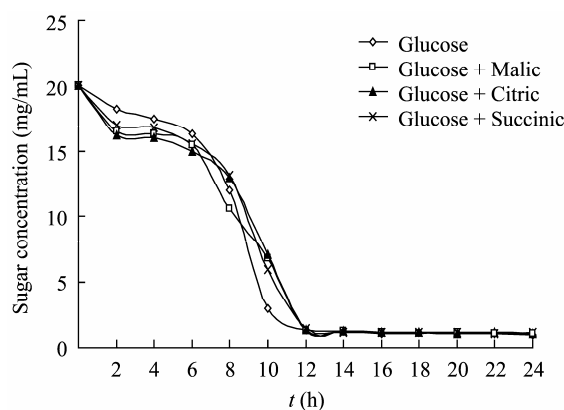


图 1 TCA 循环中的有机酸对发酵降糖速率的影响  
Fig. 1 Effects of adding organic acid in tricarboxylic acid cycle on residual sugar during fermentation

2.1.2 TCA 循环的中间产物对酵母细胞增殖的影响: 如图 2 所示, 在延滞期(0-6 h)细胞浓度相差很小, 说明在发酵初期葡萄糖含量充足, 满足了酵母正常增殖的需要; 当进入对数期(6-12 h)后, 利用 YEPD 的酵母无有机酸的抑制作用, 能量充足, 酵母细胞数多于其他 3 种培养基中的酵母细胞数; 进入稳定期(12-24 h)后, 葡萄糖已被消耗殆尽, 酵母利用部分有机酸作为碳源生长, 4 种培养基中的细胞数较接近且趋势稳定。

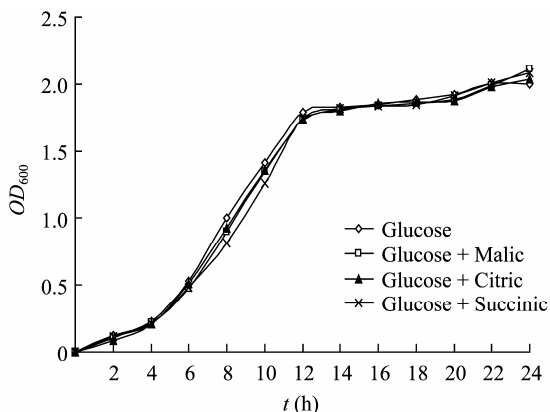


图 2 TCA 循环中的有机酸对酵母细胞增殖的影响  
Fig. 2 Effects of adding organic acid in tricarboxylic acid cycle on yeast cell growth during fermentation

## 2.2 TCA 循环的中间产物对酿酒酵母胞内代谢关键酶活性的影响

酿酒酵母的主要代谢途径包括: 糖酵解途径 (EMP)、戊糖磷酸途径 (PP)、三羧酸循环 (TCA) 和一些生物质合成的分支途径。由于酵母能够对周围环境的改变做出应答, 在不同环境下, 胞内的酶系会做出系统的调整和响应<sup>[16-18]</sup>。

2.2.1 糖酵解和戊糖磷酸途径中关键酶活性变化: 丙酮酸激酶 (PK) 是 EMP 途径中的一个重要变构调节酶, 它能够催化磷酸烯醇式丙酮酸将高能磷酸基团转移给 ADP 形成一个 ATP 和丙酮酸。ATP、乙酰-CoA、长链脂肪酸、丙氨酸都对该酶有抑制作用。如图 3 所示, 利用 YEPD 的酵母细胞内 PK 活力最高, 为 0.606 U, 添加柠檬酸培养的胞内 PK 活力最低, 为 0.302 U, 酶活降低了 50.17%; 添加苹果酸和琥珀酸培养的胞内 PK 活力为 0.395 U 和 0.399 U, 酶活分别降低了 34.82% 和 34.16%。可见 TCA 循环中的有机酸都能够使 PK 活性降低, PK 对柠檬酸的耐受性小于对苹果酸和琥珀酸的耐受性。柠檬酸含量的增加, 产生了反馈抑制作用, 从而使乙酰-CoA 得到积累, PK 的活性则受到更大抑制。PK 活性的降低导致细胞内丙酮酸含量减少, 影响酵母的能量供应。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 是 PP 途径中的一个关键酶, 它在 PP 途径的氧化阶段催化葡萄糖-6-磷酸氧化生成 6-磷酸葡萄糖酸- $\delta$ -内酯, NADP<sup>+</sup> 接受一个 H<sup>+</sup> 生成还原型辅酶 II (NADPH)。如图 3 所示, 在添加柠檬酸的培养基中, G6PDH 活力最高, 为 0.196 U, 而添加琥珀酸的培养基中酵母胞内 G6PDH 活力最低, 为 0.117 U, 酶活降低了 40.31%; 利用 YEPD 和葡萄糖苹果酸混合培养基的酵母胞内 G6PDH 活力分别为 0.186 U 和 0.170 U, 酶活变化不明显。结果表明, 琥珀酸能使 G6PDH 活力大幅降低, 抑制 PP 途径的氧化阶段, 该途径是 NADPH 的重要来源, 表明此时生物质合成所需的 NADPH 可能主要由其他途径提供。由于 G6PDH 活性的降低使酵母细胞合成的原料不足, 所以酵母在葡萄糖琥珀酸混合培养基中有较小的细胞浓度。

2.2.2 TCA 循环中的关键酶活性的变化: 异柠檬酸脱氢酶 (ICDH) 是 TCA 循环中的重要限速酶, 它催化异柠檬酸氧化生成  $\alpha$ -酮戊二酸, 其活性变化对整个 TCA 循环的活跃程度产生很大影响。实验结果表明: 3 种有机酸都能降低 ICDH 活性; 利用 YEPD 的酵母

细胞内 ICDH 活力最高, 为 0.173 U; 添加苹果酸、柠檬酸、琥珀酸, ICDH 活力为 0.074、0.1、0.085 U, 分别下降了 57.23%、42.20%、50.87%。柠檬酸是良好的经济性碳底物, 容易被酵母回归利用<sup>[19]</sup>。所以作为该反应上游物质的柠檬酸对 ICDH 的抑制作用比较小。

苹果酸脱氢酶(MDH)能够催化苹果酸脱氢形成草酰乙酸, 这是 TCA 循环的最后一个步骤。由图 4 可知, 3 种有机酸均使 MDH 活力降低; 利用 YEPD 的酵母细胞内 MDH 活力最高, 为 0.779 U; 添加苹果酸、柠檬酸、琥珀酸, MDH 活力为 0.474、0.402、0.427 U, 分别下降了 39.15%、48.40%、45.19%。苹果酸是该反应的底物, 所以利用葡萄糖苹果酸混合培养基的酵母 MDH 活力略高。柠檬酸含量的增加能够积累草酰乙酸, 进而反馈抑制 MDH 活性。

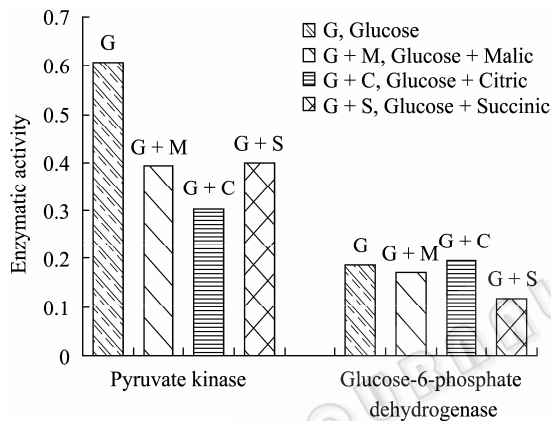


图 3 不同培养条件下丙酮酸激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活力对比

Fig. 3 Comparison of specific activity of pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase under different culture conditions

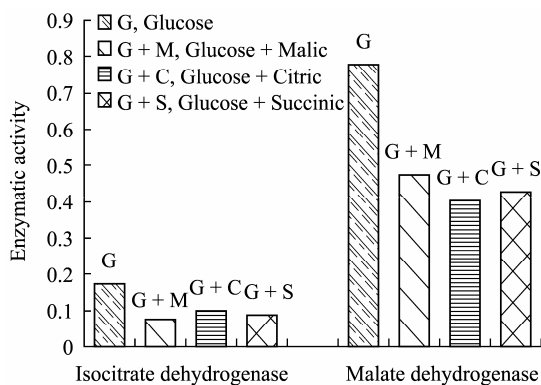


图 4 不同培养条件下苹果酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶活力对比

Fig. 4 Comparison of specific activity of isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase under different culture conditions

2.2.3 乙醇脱氢酶活性的变化: 乙醇脱氢酶(YADH)在酵母细胞内催化乙醛还原成乙醇, 其活性大小影响着乙醇的转化率。由图 5 可见, 利用 YEPD 的酵母细胞内 YADH 活力为 3.693 U, 利用葡萄糖柠檬酸混合培养基的 YADH 活力为 3.713 U, 柠檬酸对 YADH 活性无显著影响; 添加苹果酸和琥珀酸的培养基中胞内 YADH 活力为 3.246 和 3.236 U, 分别下降了 12.1%和 12.37%。柠檬酸含量的增加使乙酰-CoA 得到积累, 减小了丙酮酸进入 TCA 循环的通量, 促进丙酮酸向乙醇支路的转化。苹果酸和琥珀酸能够抑制乙醇脱氢酶活性, 减少乙醇产生。所以在工业酒精生产中一定要注意控制发酵液中苹果酸和琥珀酸的含量。

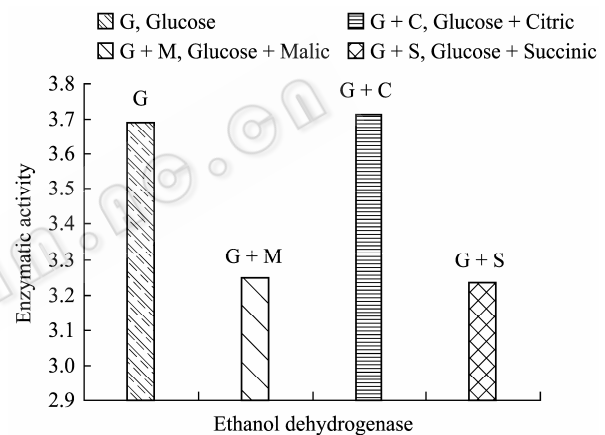


图 5 不同培养条件下乙醇脱氢酶活性对比

Fig. 5 Comparison of specific activity of ethanol dehydrogenase under different culture conditions

### 3 结论

研究结果表明: 酵母利用有机酸与葡萄糖联合代谢, 胞内代谢关键酶的活性均呈现一定变化。苹果酸能够抑制丙酮酸激酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和乙醇脱氢酶的活性, 影响 EMP 途径、TCA 循环和乙醇生成, 但对 PP 途径影响甚微, 可以推断在苹果酸含量较高的条件下 PP 途径代谢较为旺盛, 为酵母提供所需的物质和能量; 柠檬酸能够抑制丙酮酸激酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶的活性, 影响 EMP 途径和 TCA 循环, 所以在柠檬酸含量较高的条件下酿酒酵母获得物质和能量的方式也同样依赖于 PP 途径; 琥珀酸能够抑制丙酮酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬

酸脱氢酶和乙醇脱氢酶的活性,影响 EMP 途径、PP 途径、TCA 循环和乙醇生成,可见琥珀酸含量的增加对酿酒酵母的整个生理代谢产生很大影响,酿酒酵母获得物质及能量的途径还有待进行更深层次的研究。在实际生产中要根据发酵产物生成的需求控制好相应有机酸的含量,保证代谢酶活,增大产出途径通量,进而增加酿酒酵母的代谢能力,对产品质量控制和产率的提高有着重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(下). 北京: 高等教育出版社, 2002: 93-113.
- [2] Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J. Metabolic Engineering. Inc San Diego, Calif: Academic Press, 1998.
- [3] Xu DB, Madrid CP, Rohr M, *et al.* Influence of type and concentration of the carbon source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989(30): 553-558.
- [4] Green LS, Emerich DW. Bradyrhizobium japonicum does not require  $\alpha$ -etoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *Bacteriol*, 1997(179): 194-201.
- [5] Antoun H, Bordeleau LM, Sauvageau R. Utilization of tricarboxylic acid cycle intermediates and symbiotic efficiency in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil*, 1984(77): 29-38.
- [6] 高卫卫, 杜金华, 韩伟, 等. 产朊假丝酵母利用有机酸的研究. *食品与发酵工业*, 2008, 34(12): 117-121.
- [7] Manuela CR, C Leao, N van Uden. Transport of l-malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica*. *Appl Environ Microbiol*, 1989(31): 551-555.
- [8] 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.
- [9] Aliverdieva DA, Mamaev DV, Bondarenko DI. Plasmalemma dicarboxylate transporter of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in citrate and succinate influx and is modulated by pH and cations. *Biochemistry Supplemental Series A: Membrane and Cell Biology*, 1990, 2(4): 354-364.
- [10] 张杰, 张晓东, 许海朋, 等. *Cryptococcus curvatus* O3 酵母菌培养及产油脂特性. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 41-45.
- [11] Malcovati M, Valentini G. AMP-and fructose 1, 6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 1982(90): 170-179.
- [12] Rossi FG, Ribeiro MZ, Converti A, *et al.* Kinetic and thermodynamic aspects of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003(32): 107-113.
- [13] Mesfin T, Stephen JT, Deborah LA, *et al.* Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol*, 2001(127): 1836-1844.
- [14] 胡光星, 郭美锦, 储炬, 等. 重组 *Pichia* 酵母(Muts)发酵过渡阶段关键酶活分析. *华东理工大学学报*, 2004, 30(4): 392-396.
- [15] Andersson L, Joinvall H, Akeson AK. Separation of isozymes of horse liver alcohol dehydrogenase and purification of the enzyme by affinity chromatography on an immobilized AMP-Analogue. *Biochim Biophys Acta*, 2001(364): 1-9.
- [16] Alexeeva S, Kort B, Sawers G, *et al.* Effect of limited aeration and of the arcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000(182): 4934-4940.
- [17] Oh MK, Rohlin L, Kao K, *et al.* Global expression profiling of acetate-grown *E. coli*. *J Biol Chem*, 2002(277): 13175-13183.
- [18] Encinas MV, Fernando D, Alfonso, *et al.* Urea-induced unfolding studies of free and ligand-bound tetrameric ATP-dependent *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase: Influence of quaternary structure on protein conformational stability. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2002(34): 645-656.
- [19] 孙付保, 任洪艳, 赵长新. 啤酒酵母发酵产有机酸的生理代谢机制. *食品工业科技*, 2005(5): 70-72.