

## 乳酸钠促进法夫酵母虾青素合成代谢流作用分析

沈宁燕<sup>1</sup> 肖安风<sup>1,2</sup> 蔡慧农<sup>1,2</sup> 杨秋明<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学 食品与生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室 福建 厦门 361021)

(3. 厦门市食品生物工程技术研究中心 福建 厦门 361021)

**摘要:**【目的】研究乳酸钠(一种糖代谢产物)的加入对法夫酵母 JMU-VDL668 发酵过程中细胞生长和虾青素合成的影响。【方法】分别在摇瓶和 7 L 发酵罐实验基础上,采用代谢通量分析的方法分析添加乳酸钠对法夫酵母菌株 JMU-VDL668 合成虾青素代谢流的影响。【结果】在 7 L 发酵罐实验中添加乳酸钠,虾青素产量最高可达 17.70 mg/L,与对照组相比提高 26%。代谢通量分析表明,乳酸钠可以调节丙酮酸、乙酰辅酶 A 节点处的代谢通量分布,乳酸在乳酸脱氢酶的作用下可以直接进入代谢网络的后半程,乙酰辅酶 A 的通量和进入 TCA 循环的通量得到了显著加强。【结论】乳酸钠的加入提供了更多的乙酰辅酶 A 等前体物质和能量供给,因此促进了虾青素的合成。

**关键词:** 法夫酵母, 虾青素, 乳酸钠, 代谢通量分析

## Metabolic flux regulation of sodium lactate on astaxanthin synthesis during *Phaffia rhodozyma* fermentation

SHEN Ning-Yan<sup>1</sup> XIAO An-Feng<sup>1,2</sup> CAI Hui-Nong<sup>1,2</sup> YANG Qiu-Ming<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen, Fujian 361021, China)

(3. Food Bio-Engineering Research Center of Xiamen, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** [Objective] To interpret the effect of sodium lactate (a carbohydrate metabolite) on cell growth and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation, based on the metabolic regulation mechanism of astaxanthin synthesis. [Methods] The astaxanthin producing strain *Phaffia rhodozyma* JMU-VDL668 was cultured in shake flasks and 7 L bioreactor respectively. The effect of sodium lactate on the synthetic metabolic flow of astaxanthin was studied with the method of metabolic flux analysis. [Results] It was found that adding sodium lactate into 7 L bioreactor increased astaxanthin accumulation significantly, and the production of astaxanthin reached 17.70 mg/L, which was 26% higher than the production of the control group. The regulation mechanism of sodium lactate on astaxanthin synthesis was studied by means of metabolic flux analysis, and it was shown that

基金项目: 福建省产学研重大专项项目(No. 2010N5009); 福建省自然科学基金项目(No. 2011J01224, 2012J01137); 福建省发改委产业技术开发专项项目(No. 201307140002)

\*通讯作者: ✉: yangqm@jmu.edu.cn

收稿日期: 2014-07-24; 接受日期: 2014-10-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-03

sodium lactate could adjust metabolic flux distribution at the nodes of pyruvate and acetyl-CoA. Lactate was catalyzed by dehydrogenase and directly into later half of the metabolic network. Thus the flux of acetyl-CoA and the flux down to TCA cycle were significantly increased. **[Conclusion]** Adding sodium lactate during fermentation could provide more precursors (acetyl-CoA etc.) and energy, and so improved astaxanthin synthesis.

**Keywords:** *Phaffia rhodozyma*, Astaxanthin, Sodium lactate, Metabolic flux analysis

虾青素是一种备受关注的含氧类胡萝卜素, 它具备显著的着色效果, 并有提高存活率、饲料转化率等作用, 因此被广泛应用于饲料和水产养殖行业<sup>[1]</sup>。其很强的清除自由基和抗氧化的能力, 可有效地保护细胞组织、DNA 等免受氧的损伤<sup>[2]</sup>, 此外虾青素用于延缓衰老和治疗由老龄化引发的某些疾病, 能增加机体免疫力、抑制肿瘤发生, 近期研究证实了它具有抗幽门螺旋杆菌<sup>[3]</sup>、抗动脉硬化、降糖及预防糖尿病肾病的作用<sup>[4-5]</sup>。因此在食品、医药等方面也有广阔的应用前景<sup>[6-7]</sup>。

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)是生产虾青素的生物来源之一, 因其在培养过程中不需光照、可异氧代谢、能利用大多数糖、生长快、可高密度培养等优点而成为当前研究的重点<sup>[8]</sup>, 但因法夫酵母产虾青素成本较高, 虾青素含量低从而使工业化的生产受到一定的限制。目前, 国内外学者对法夫酵母高产菌株选育、发酵工艺优化等方面进行了许多工作, 法夫酵母虾青素的产量已达到 60 mg/L<sup>[9]</sup>。根据相关报道, 在培养基中添加某些化学物质或是虾青素合成的前体物质, 有利于增加法夫酵母虾青素的含量和产量: Johnson 等<sup>[10]</sup>在培养液中加入番茄汁, 令虾青素的单位产量提高到 814 mg/kg 干细胞。Gu 等<sup>[11]</sup>在培养基中加入 0.2% 的乙醇, 虾青素的单位产率得到了一定程度的提高, 其中乙醇的作用机制与增强 HMG-CoA 还原酶的活性有关。Meyer 等<sup>[9]</sup>在法夫酵母分批发酵培养过程中滴加乙酸, 虾青素含量达到 1 430 mg/kg 干细胞。Yamane 等<sup>[12]</sup>在法夫酵母两步式分批发酵过程的中后期流加乙醇, 令虾青素的产率得到显著提高。Flores-Cotera 等<sup>[13]</sup>发现培养基中添加柠檬酸盐可以显著提高法夫酵母的色素产量, 但对虾青素的合成影响不大。林舒

乐等<sup>[14]</sup>添加 0.2% 乳酸钠培养法夫酵母, 虾青素含量达到 647 mg/kg 干细胞, 比对照组高出 46.2%。

代谢通量分析(MFA)基于质量守恒和代谢中间产物拟稳态假设, 对细胞组成、底物和产物浓度的变化速率的测定, 通过细胞内代谢网络的模型化推导和代谢中间产物的质量平衡, 计算出各代谢途径的通量。得到的代谢通量图可反应不同培养条件下, 不同发酵阶段细胞内的碳流向, 可确定细胞代谢途径中分支点的性质(刚性、柔刚性或柔性), 识别替代途径, 计算胞内的未知通量, 计算最大理论转化率等<sup>[15]</sup>。本研究利用 MFA 的方法, 对比分析用葡萄糖作为碳源和添加乳酸钠进行发酵培养的代谢通量分布情况, 从细胞生理代谢的角度对乳酸钠促进法夫酵母产虾青素进行阐释。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*Phaffia rhodozyma* JMU-VDL668 菌株: 以 *Phaffia rhodozyma* Pst-1 菌株(德国柏林工业大学 Stahl 教授赠送)为出发菌株, 经紫外诱变, 用薄层色谱法筛选得到该菌株虾青素占总类胡萝卜素的 95%。

### 1.2 培养基

斜面培养基: 4°麦汁添加 2.5% 琼脂。

无碳源组合培养基(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5; 金属离子、维生素和微量元素成分(mg/L): CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10.00, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.67, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.80, KI 0.27, MnCl<sub>2</sub> 2.67, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.07, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 12.00, CoCl<sub>2</sub> 0.80, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.00, 泛酸钙 2.67, 生物素 0.13, 肌醇 66.67, 烟酸 2.67, 对氨基苯甲酸(PABA) 0.53,

盐酸吡哆醇 2.67, 盐酸硫酸 2.67。

### 1.3 种子培养

取 2 °C 保藏的斜面菌种一环至 4°麦汁平板, 划线分离, 22 °C 培养 5 d, 挑取单菌落保存至斜面培养基。从斜面上挑一环菌接种于 30 mL 无碳源组合培养基(添加 20 g/L 葡萄糖)于 250 mL 三角瓶中, 22 °C、90 r/min 振荡培养 48 h。

### 1.4 发酵

分批发酵: 以无碳源组合培养基, 加入 18 g/L 葡萄糖和 2 g/L 乳酸钠作为碳源, 进行发酵培养, 与加入 20 g/L 葡萄糖的培养基进行发酵作为对照。按 10%的接种量接入培养好的种子液, 22 °C、90 r/min 振荡培养 120 h。分别在 12、14、72 和 74 h 取样测定其生物量、虾青素产量、残糖、丙酮酸和乳酸。

分批补料发酵: 以无碳源组合培养基, 加入 30 g/L 葡萄糖作为初始碳源进行分批补料发酵。按 10%的接种量接入装有 4 L 培养基的 7 L 发酵罐内, 发酵至 24 h 在实验组中加入乳酸钠, 对照组中加入同体积的无菌水。此后, 实验组以 27%葡萄糖和 3%乳酸钠的混合溶液进行补料, 对照组以 30%葡萄糖溶液进行补料, 控制发酵液中的糖浓度在 15–25 g/L 之间。发酵过程保持相对溶氧在 30%左右, 通过流加氨水控制 pH 4.0 左右。

### 1.5 生物量的测定

取 5 mL 发酵液于 3 500 r/min 离心 10 min 后, 用蒸馏水洗涤离心 2 次, 于 105 °C 烘干至恒重称重。

### 1.6 虾青素含量测定

采用二甲亚砜(DMSO)法: 取 5 mL 发酵液, 离心后用去离子水洗涤离心 2 次, 加 2 mL 75 °C 的 DMSO 破壁, 最后用乙醇提取并定容, 在 474 nm 下测其 OD 值, 用 2 mL DMSO 和 8 mL 乙醇混匀调零。以 Sigma 公司的虾青素标准品作标准曲线, 回归得到线性标准曲线方程。

### 1.7 发酵液残糖测定

采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)<sup>[16-17]</sup>。

## 1.8 有机酸测定方法

采用 HPLC 测定, 色谱条件: 色谱仪: Waters 公司 1525 型高效液相色谱仪; 色谱柱: Atlantis T3 5.0  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm; 流动相: 20 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液, pH 2.7; 检测波长: 210 nm; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 30 °C。

## 1.9 法夫酵母生物合成虾青素的代谢网络

根据 An 等<sup>[18]</sup>对细胞组成参考测定并报道的相关数据文献建立法夫酵母生物合成虾青素的简化代谢网络, 并做出如下简化和假设: 法夫酵母对葡萄糖的代谢主要是通过 EMP 途径和 TCA 循环, 也有少量通过 PP 途径进行代谢; 假设细胞生长过程的各个阶段细胞组分基本一致, 这是因为一般菌体组分中的 RNA、DNA 和主要氨基酸的含量相差不大, 而且即使有变化, 对模型的通量分布的影响也不大。细胞生长对各种前体物质的需求系数参考孙乃震等<sup>[19]</sup>相关研究结果; 为简化代谢网络, 把直线反应合并为一个反应, 设定乙酰辅酶 A 合成虾青素为线性反应; 在两个取样点之间的时间段内, 设定细胞内环境处于拟稳态, 代谢网络中间的代谢产物变化速率为 0。基于上述假设, 法夫酵母代谢网络如图 1 所示。

## 2 结果与分析

### 2.1 有机酸的测定

HPLC 测定图谱如图 2–5 所示。其中图 2、3 分别为丙酮酸和乳酸的标准品。图 4、5 为发酵液的测定图谱。

通过 HPLC 对发酵液的分析, 可知在实验所采用的培养条件下, 细胞分泌至发酵液中的有机酸主要为丙酮酸, 其他副产物的量相对而言非常小, 可以忽略不计。

### 2.2 法夫酵母代谢通量平衡模型<sup>[19]</sup>

法夫酵母生长的前体需求系数  $\beta_i$  如表 1 所示。将图 1 中的各代谢反应列出, 如表 2 所示, 则可以根据反应平衡, 结合细胞生长对各前体物质的需求系数, 得到代谢通量的平衡方程式, 见表 3。

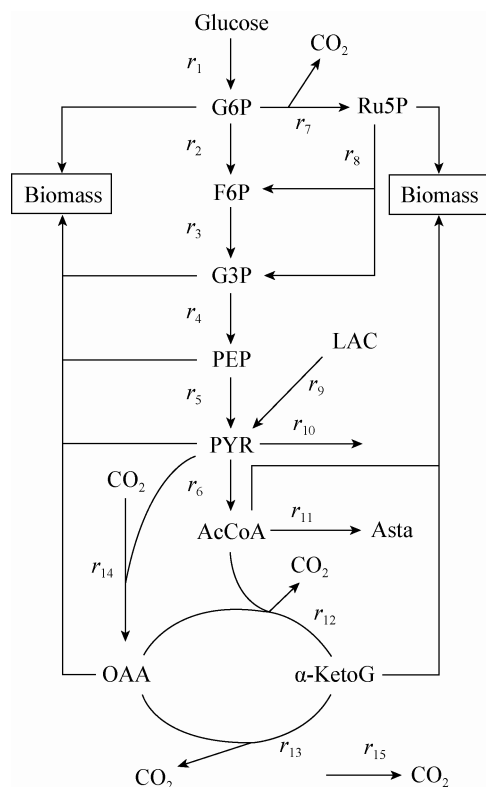


图1 法夫酵母代谢网络

Figure 1 The metabolic reaction network of *Phaffia rhodozyma*

注: G6P: 6-磷酸葡萄糖; Ru5P: 5-磷酸核酮糖; F6P: 6-磷酸果糖; G3P: 3-磷酸甘油醛; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; PYR: 丙酮酸; LAC: 乳酸; AcCoA: 乙酰辅酶A; OAA: 草酰乙酸;  $\alpha$ -KetoG: 酮戊二酸; Asta: 虾青素。

Note: G6P: Glucose 6-phosphate; Ru5P: 5-Phosphate ribulose; F6P: Fructose 6-phosphate; G3P: Glyceraldehyde 3-phosphate; PEP: Phosphoric acid enol pyruvic acid; PYR: Pyruvic acid; LAC: Lactic acid; AcCoA: Acetyl coenzyme A; OAA: Oxaloacetic acid;  $\alpha$ -KetoG: Ketoglutaric acids; Asta: Astaxanthin.

由表1-3可以建立 $\text{CO}_2$ 的平衡方程式,并通过碳平衡计算其产生速率。此时,法夫酵母代谢通量模型中的反应速率为16个,平衡方程为10个,系统自由度为6。而实验中可以测定的值有葡萄糖的消耗速率、乳酸钠的消耗(或分泌)速率、丙酮酸消耗(或分泌)速率、细胞比生长速率、虾青素合成比速率。因此,通量方程可以得到唯一解。

### 2.3 分批发酵培养条件下法夫酵母代谢通量分析

在以20 g/L葡萄糖和2 g/L乳酸钠、18 g/L葡萄糖混合液作为碳源的两组摇瓶培养基中,分别以相同的接种量接入法夫酵母JMU-VDL668菌株进行培养,每隔24 h从两组摇瓶中各取3个平行,测定法夫酵母JMU-VDL668菌株生物量、虾青素产量、发酵液残糖含量的变化。其中添加乳酸钠和对照组的生物量和虾青素产量的变化情况如图6所示。

对照图6得到的法夫酵母发酵曲线,分别在12-14 h和72-74 h两个时间段取样进行分析,测定的发酵参数见表4。

由表4可知,乳酸钠的添加提高了法夫酵母对葡萄糖的消耗速率,发酵过程中添加乳酸钠的实验组比对照组发酵液pH下降更快,Hu等<sup>[20]</sup>研究表明,低pH更有利于虾青素的积累。可能由于发酵pH值能改变菌体细胞原生质膜的电荷,同时还会对菌体胞内酶活和菌体对底物的利用率造成一定的影

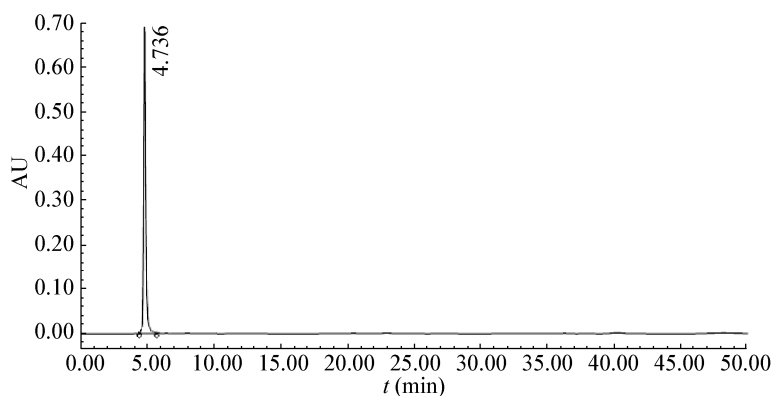


图2 丙酮酸的高效液相色谱图

Figure 2 HPLC spectra of standard pyruvate

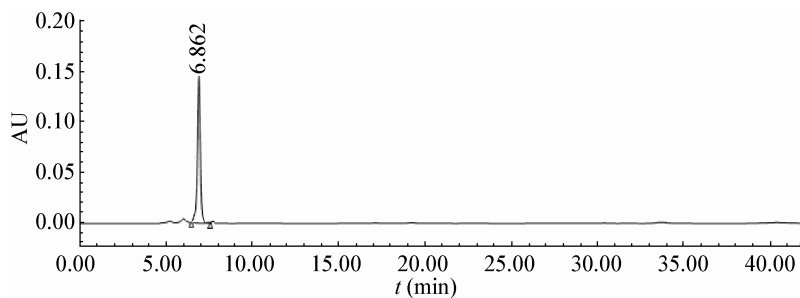


图3 乳酸的高效液相色谱图  
Figure 3 HPLC spectra of standard lactic acid

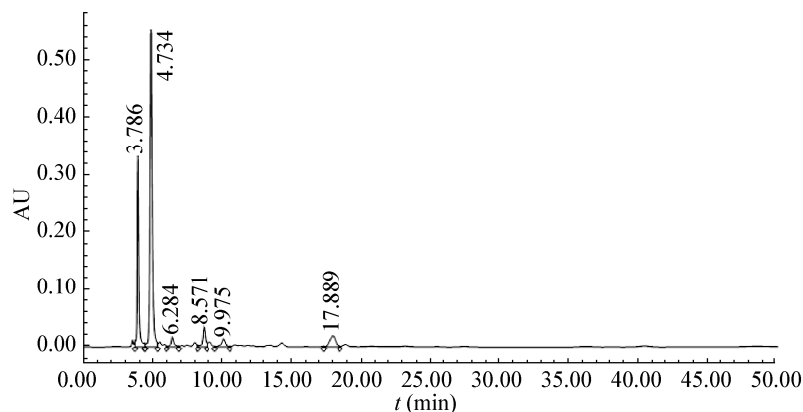


图4 对照组(不添加乳酸钠)培养36h时发酵液的高效液相色谱图  
Figure 4 HPLC spectra from fermentation without sodium lactate at 36th hour

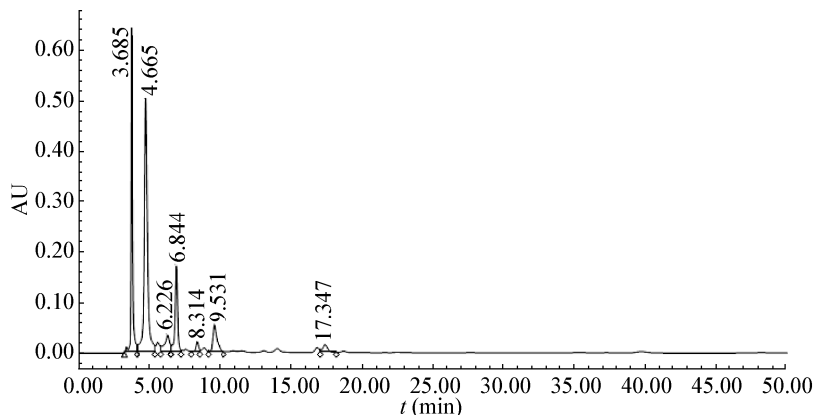


图5 实验组(添加乳酸钠)培养36h时发酵液的高效液相色谱图  
Figure 5 HPLC spectra from fermentation with sodium lactate at 36th hour

表1 法夫酵母生长的前体需求系数

Table 1 Precursor requirement coefficients for *Phaffia rhodozyma*

前体 Precursor	G6P	Ru5P	G3P	PEP	PYR	AcCoA	$\alpha$ -KetoG	OAA
需求系数 $\beta_i$ Coefficient $\beta_i$ (mmol/g DCW)	2.490	0.467	0.437	0.248	0.780	5.764	0.597	0.598

表 2 法夫酵母代谢通量平衡方程  
Table 2 The metabolic flux balance equation of *Phaffia rhodozyma*

比速率 Specific rate	反应式 Equation
$r_1$	Glucose=G6P
$r_2$	G6P=F6P
$r_3$	F6P=2G3P
$r_4$	G3P=PEP
$r_5$	PEP=PYR
$r_6$	PYR=AcCoA+CO <sub>2</sub>
$r_7$	G6P=Ru5P+CO <sub>2</sub>
$r_8$	Ru5P=(2/3)F6P+(1/3)G3P
$r_9$	LAC=PYR
$r_{10}$	PYR=PYR (分泌)
$r_{11}$	24 AcCoA=Astaxanthin
$r_{12}$	OAA+AcCoA= $\alpha$ -KetoG+CO <sub>2</sub>
$r_{13}$	$\alpha$ -KetoG=OAA+CO <sub>2</sub>
$r_{14}$	PYR+CO <sub>2</sub> =OAA
$r_{15}$	CO <sub>2</sub> =CO <sub>2</sub> (释放)
$r_x$	$\beta_1$ G6P+ $\beta_2$ Ru5P+ $\beta_3$ G3P+ $\beta_4$ PEP+ $\beta_5$ PYR+ $\beta_6$ AcCoA+ $\beta_7$ $\alpha$ -KetoG+ $\beta_8$ OAA=Biomass

表 3 法夫酵母代谢通量模型方程  
Table 3 Metabolic flux model equation of *Phaffia rhodozyma*

序号 No.	代谢物 Metabolite	通量方程式 Flux equation
1	Glucose	$x_1=r_1=\Delta C\text{Glucose}/\Delta t/X$
2	G6P	$x_2=(r_1-r_2)-(r_7-\beta_1r_x)$
3	F6P	$x_3=r_2+(2/3)r_8-r_3$
4	G3P	$x_4=2r_3+(1/3)r_8-r_4-\beta_3r_x$
5	PEP	$x_5=r_4-r_5-\beta_4r_x$
6	PYR (胞外)	$x_6=r_5+r_9-r_6-r_{14}-r_{10}-\beta_5r_x$
7	Ru5P	$x_7=r_7-r_8-\beta_2r_x$
8	AcCoA	$x_8=r_6-r_{11}-r_{12}-\beta_6r_x$
9	$\alpha$ -KetoG	$x_9=r_{12}-r_{13}-\beta_7r_x$
10	OAA	$x_{10}=r_{13}+r_{14}-r_{12}-\beta_8r_x$
11	LAC	$x_{11}=r_9=\Delta C\text{LAC}/\Delta t/X$
12	PYR (胞外)	$x_{12}=r_{10}=\Delta C\text{PYR}/\Delta t/X$
13	Astaxanthin	$x_{13}=(1/24)r_{11}=\Delta C\text{Asta}/\Delta t/X$
14	CO <sub>2</sub>	$x_{14}=r_7+r_{12}+r_{13}-r_{14}=r_{15}$

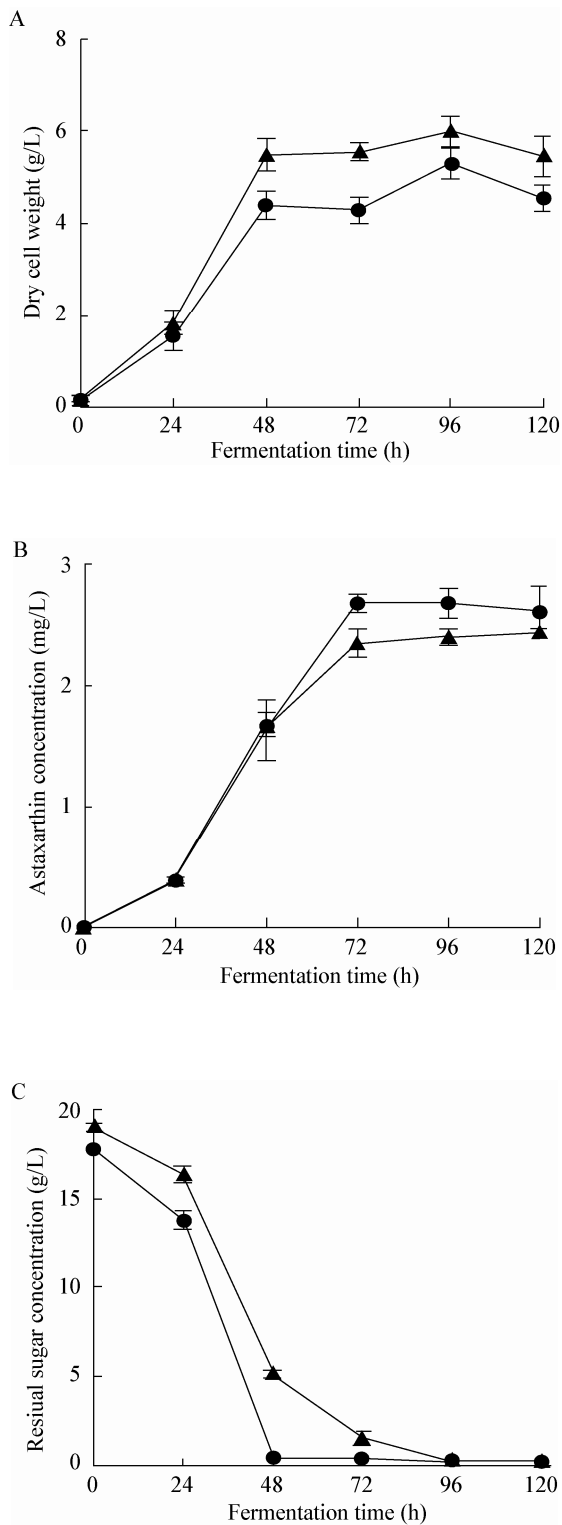


图6 法夫酵母分批发酵曲线

Figure 6 The time course of *Phaffia rhodozyma* in batch culture

Note: ▲: Contrast; ●: Add sodium lactate.

响,从而影响了菌体的生长代谢和产物合成。而在发酵后期(72–74 h),添加乳酸钠的实验组发酵液 pH 为 3.5,此时生物量合成缓慢,葡萄糖的消耗主要用于虾青素的合成,乳酸钠的加入提高了丙酮酸和乙酰 CoA 的流量,加快了虾青素的合成,从而消耗更多的葡萄糖。实验组中加入 2 g/L 乳酸钠,发酵至 48 h 基本消耗完。由图 6B 可知,发酵至 48 h 以后,实验组虾青素产量与对照组相比明显提高,乳酸钠的加入促进了虾青素的合成。

根据上述建立的法夫酵母生物合成虾青素的代谢网络,进行代谢通量分布计算,并以葡萄糖的消耗速率为 100,对通量分布图进行归一化,得到图 7。法夫酵母代谢网络中图 7A 数据来自对照组通量值,图 7B 数据为培养基中添加乳酸钠的实验组通量值。

发酵 12–14 h 阶段,在乳酸钠的作用下,细胞比生长速率为 0.137 2,略高于对照组,但此时葡萄糖的消耗速率低于对照组。在培养基中加入乳酸钠后,法夫酵母细胞中的 EMP 途径减弱,而 PP 途径和 TCA 循环的通量均大于对照组。这可能是因为在乳酸脱氢酶的作用下,乳酸被转化为丙酮酸进入代谢网络,而丙酮酸作为丙酮酸激酶的别构抑制剂,当丙酮酸节点处的通量突然增大时,EMP 途径受其反馈抑制。由于发酵初期细胞合成旺盛,对 EMP 途径中的各种中间代谢物需求较大,当 EMP 途径被抑制时,细胞生长将会受到限制。从图 7A 可以看出,在加入乳酸钠后,流向细胞合成的通量均明显低于对照组,合成细胞物质的通量仅占葡萄糖分解通量的 2.0%。与对照组相比,添加乳酸钠后,随着丙酮酸节点处的通量突然增大,乙酰辅酶 A 的通量也随之增大,随之进入 TCA 循环转化为 CO<sub>2</sub>。添加乳酸钠对虾青素合成途径的通量影响较小,与对照组相比并没有显著的变化。

与发酵 12–14 h 阶段相比,72–74 h 阶段对葡萄糖的消耗非常少,此时培养基中的葡萄糖和乳酸钠都基本消耗完,从通量分布来看,在发酵初期加入的乳酸钠可能逐渐改变了法夫酵母代谢网络中某

表 4 分批发酵 12–14 h 期间和 72–74 h 期间反应速率  
Table 4 Specific rates of *Phaffia rhodozyma* in batch culture (12–14 h and 72–74 h)

发酵时间 Fermentation time		$X$ (g/L)	$M$ (mmol/ (g DCW·h))	$q_{\text{Astaxanthin}}$ (mmol/ (g DCW·h))	$q_{\text{Glucose}}$ (mmol/ (g DCW·h))	$q_{\text{Pyruvate}}$ (mmol/ (g DCW·h))	$q_{\text{Lactate}}$ (mmol/ (g DCW·h))	$q_{\text{CO}_2}$ (mmol/ (g DCW·h))
12–14 h	Contrast	0.486 4	0.127 6	$7.0 \times 10^{-5}$	3.950 3	0.026 8	0.000 0	12.482 9
	Add sodium lactate	0.458 7	0.137 2	$1.1 \times 10^{-4}$	6.712 4	0.119 6	6.851 2	37.450 3
72–74 h	Contrast	3.884 7	0.018 0	$1.8 \times 10^{-6}$	0.019 8	0.000 0	0.000 0	12.482 9
	Add sodium lactate	2.943 3	0.006 1	$1.3 \times 10^{-6}$	0.012 5	0.000 0	0.000 0	17.450 3

注:  $X$ : 细胞干重;  $q$ : 各物质的比生长速率。

Note:  $X$ : Dry cell weight;  $q$ : The material specific growth rate.

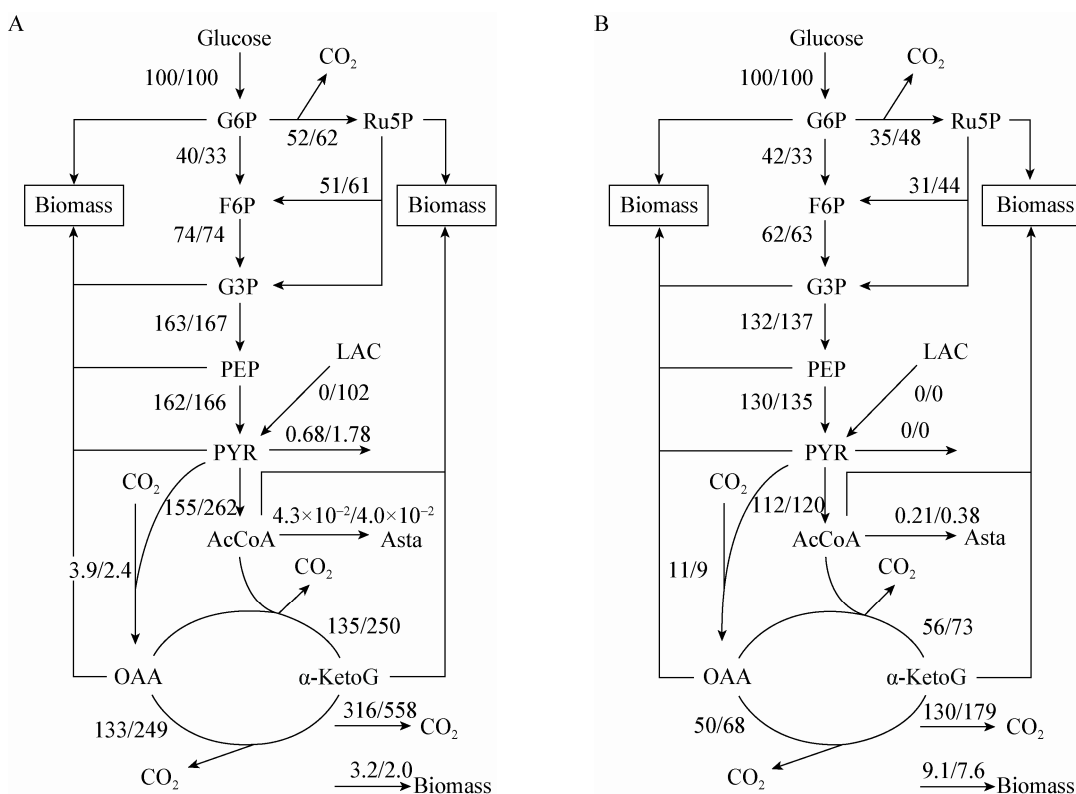


图 7 分批发酵的代谢通量分布图

Figure 7 Metabolic flux distribution in batch culture

Note: A: 12–14 h; B: 72–75h.

些节点的酶活力, 因此虾青素合成支路的通量大于对照组。但由于此时培养基中匮乏碳源, 虾青素的合成速率反而低于对照。而受到 EMP 途径的弱化, 实验组中细胞物质的合成依然低于对照。

在发酵过程添加乳酸钠, 减弱了对代谢网络上游的需求, 在一定程度上抑制了 EMP 途径的代谢

通量, 并可以直接增强代谢网络的下游通量, 使进入乙酰辅酶 A 节点继而进入 TCA 循环的通量增加。

## 2.4 分批补料发酵培养条件下法夫酵母代谢通量分析

在对分批发酵实验进行通量分析发现, 在法夫酵母发酵前期(12–14 h), 细胞内与菌体生长相关的



各种酶的活性都比较高,而乳酸钠可以被迅速转化为丙酮酸进入代谢网络,由于丙酮酸对 EMP 途径产生了反馈抑制,限制了菌体生长所需的各种中间代谢物的供给,从而导致细胞合成的速率降低。由于虾青素的合成与细胞生长属于部分偶联的关系,此时胞内的虾青素合成作用还比较弱,细胞浓度也较低,因此碳代谢流进入 TCA 循环的通量虽然较多,产生的能量却可能有很大比例是以热能的形式损失了。而在分批发酵过程中,前期对葡萄糖的消耗过大也会导致发酵中后期碳源不足。因此,对发酵方式进行改变,当法夫酵母进入指数期积累了较高浓度的菌体以后,在虾青素开始积累的阶段加入乳酸钠,促进细胞为虾青素的合成提供更多的前体物质和能量。因此,采用 7 L 发酵罐进行下一步的实验,以 30 g/L 葡萄糖为初始碳源进行发酵,培养 24 h 后,加入适量乳酸钠,并且通过流加含有 3% 乳酸钠的葡萄糖溶液进行分批补料培养。分批补料发酵曲线如图 8 所示。

选取 28–32 h、60–68 h 以及 84–92 h,分别对以葡萄糖为碳源的对照组和在培养基中加入乳酸钠的实验组取样,测定相关发酵参数,配合发酵过程中的补料情况,计算葡萄糖的消耗速率、乳酸钠和丙酮酸的消耗或分泌速率、细胞的比生成速率、虾青素合成比速率等数据,结果见表 5。

根据表 5 得到的反应数据,分别计算 28–32 h、60–68 h 以及 84–92 h 3 个时间段的代谢通量分布,如图 9 所示。法夫酵母代谢网络中图 9A 的数据来自对照组通量值,图 9B 为培养基中添加乳酸钠的实验组通量值。

从图 9A 可以看出,添加乳酸钠后,各中间产物流向细胞合成的速率均明显低于对照组,合成细胞物质的通量仅占葡萄糖分解通量的 1.4%,不及对照组的 1/3,且通过 EMP 途径、PP 途径和 TCA 循环的通量均大于对照组。在乳酸脱氢酶的作用下,乳酸被转化为丙酮酸进入代谢网络。有报道称,在此节点处,由于丙酮酸脱氢酶的效率较低,会有部分丙酮酸无法被及时分解,被细胞分泌至发酵液

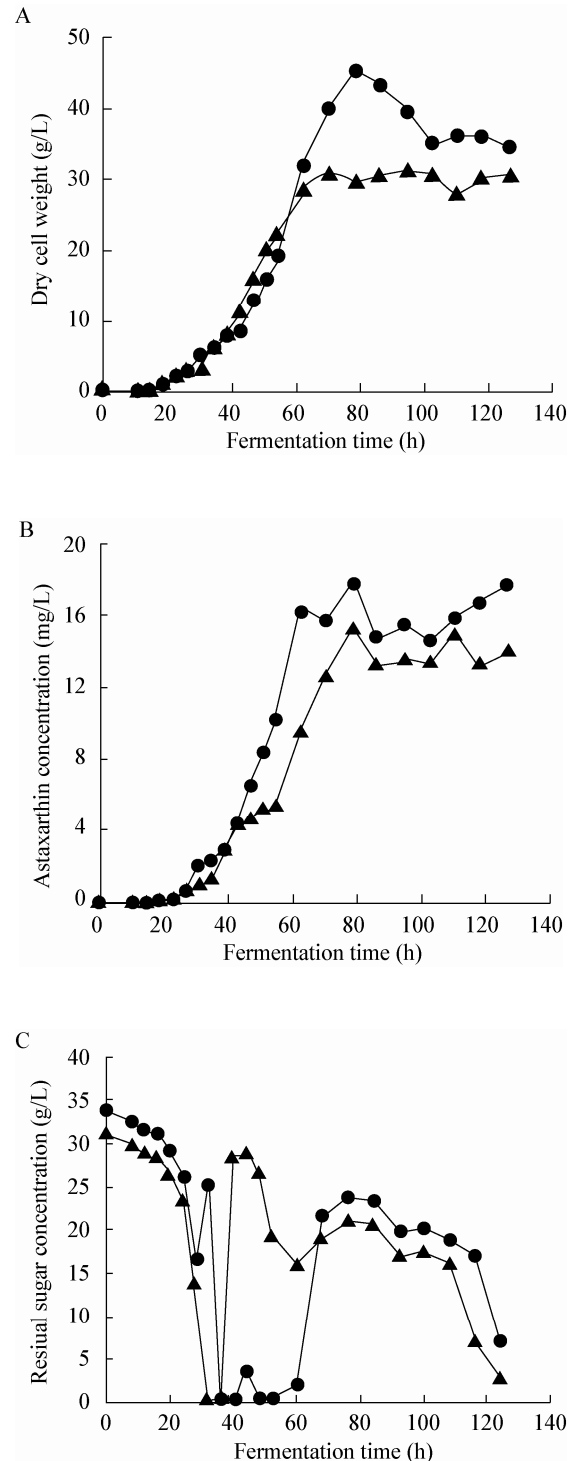


图 8 法夫酵母分批补料发酵曲线

Figure 8 The time course of *Phaffia rhodozyma* in fed-batch culture

Note: ▲: Contrast; ●: Add sodium lactate.

表 5 分批发酵 28–32 h、60–68 h 和 84–92 h 期间反应速率  
Table 5 Specific rates of *Phaffia rhodozyma* in batch culture (28–32 h, 60–68 h and 84–92 h)

发酵时间 Fermentation time	$X$ (g/L)	$\mu$ (mmol/(g DCW·h))	$q_{\text{Astaxanthin}}$ (mmol/(g DCW·h))	$q_{\text{Glucose}}$ (mmol/(g DCW·h))	$q_{\text{Pyruvate}}$ (mmol/(g DCW·h))	$q_{\text{Lactate}}$ (mmol/(g DCW·h))	$q_{\text{CO}_2}$ (mmol/(g DCW·h))
28–32 h Contrast	6.933 3	0.129 8	$5.9 \times 10^{-6}$	2.714 8	0.095 7	0.000 0	7.708 6
Add sodium lactate	6.133 3	0.035 3	$1.8 \times 10^{-5}$	2.519 6	0.065 2	0.216 3	9.826 0
60–68 h Contrast	28.466 7	0.015 2	$2.5 \times 10^{-6}$	2.497 7	-0.018 1	0.000 0	10.039 5
Add sodium lactate	39.933 3	0.025 3	$1.7 \times 10^{-5}$	5.314 2	0.004 7	0.251 1	22.157 4
84–92 h Contrast	31.266 7	0.002 4	$3.8 \times 10^{-6}$	0.708 0	0.008 3	0.000 0	2.877 5
Add sodium lactate	39.533 3	0.000 0	$1.2 \times 10^{-6}$	0.223 8	-0.004 3	0.219 4	1.393 2

注:  $X$ : 细胞干重;  $\mu$ : 比生长速率;  $q$ : 各物质的比生长速率。

Note:  $X$ : Dry cell weight;  $\mu$ : Specific growth rate;  $q$ : The material specific growth rate.

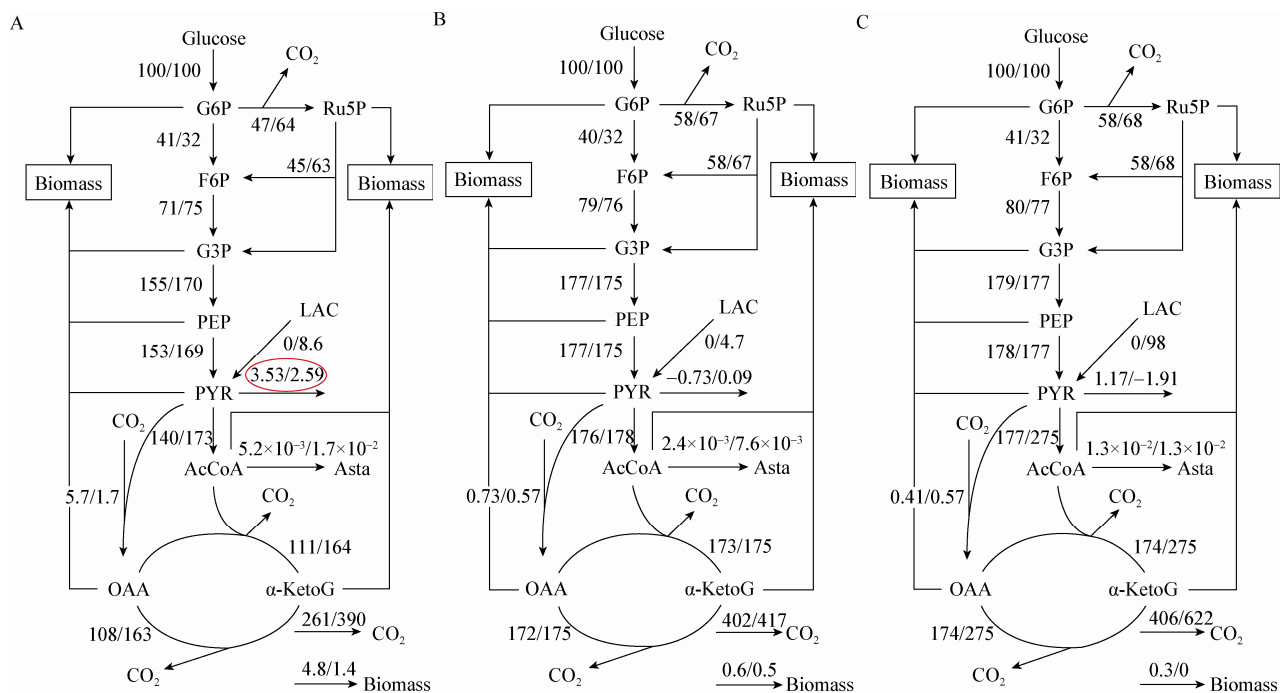


图 9 分批补料发酵的代谢通量分布图

Figure 9 Metabolic flux distribution in fed-batch culture

Note: A: 28–32 h; B: 60–68 h; C: 84–92 h.

中,但在图 9A 中,可以看到,随着乳酸钠的加入,丙酮酸的分泌通量由 3.53 降低至 2.59,降幅达到 36.3%,丙酮酸在代谢网络中进入下一级通量增大,这表明丙酮酸脱氢酶的活性有所增强,推测这可能是由于环境中的乳酸诱导细胞内开始合成代谢乳酸的相关酶系,从而在一定程度上增强了丙酮酸脱

氢酶的活性。

随着丙酮酸节点的通量增大,流向乙酰辅酶 A 的通量也得到了加强。作为虾青素合成的重要前体物质,乙酰辅酶 A 的通量越大,越有利于虾青素的合成。由图 9A 可知,在乳酸钠的作用下,实验组中虾青素合成途径的通量达到对照组的 264%。由

图 9B 和图 9C 可以看出,与对照组相比,法夫酵母代谢网络中进入 TCA 循环的通量进一步增加,这主要是由于虾青素的合成需要大量能量,而 TCA 循环可以提供足够的能量。

比较图 9B 代谢网络的通量变化,加入乳酸钠后同样抑制了 EMP 途径的通量,而增加了 HMP 途径的通量。细胞物质合成减少的结果,提供了更多的前体物质和能量供给虾青素合成。进入稳定期后,细胞基本不再生长,比较 84–92 h 时间段对照组与实验组的代谢通量变化,可发现对照组中仅有 0.3%左右的碳物质流向细胞物质,其绝大多数碳通量都向下经过丙酮酸流入 TCA 循环产能。而在实验组中,细胞中的碳物质同样以流入 TCA 循环为主,与之前时间段相比,此阶段对乳酸的利用比速率变化不大,但乳酸代谢生成丙酮酸的通量增加了一个数量级,同时,乳酸经过脱氢酶的作用进入代谢网络的下游,令合成乙酰辅酶 A 的通量增加了将近一半。在乙酰辅酶 A 至虾青素的反应途径中,对照组和实验组的通量值基本相等。

在法夫酵母产虾青素的代谢通量网络中,有两个相当关键的节点,即丙酮酸和乙酰辅酶 A。乳酸钠通过乳酸脱氢酶的作用进入代谢网络,有利于增强丙酮酸在丙酮酸脱氢酶系的作用下经氧化脱羧反应形成乙酰辅酶 A 的通量。并且乳酸钠游离于发酵液中而不是积累于细胞内,因此不容易出现丙酮酸过度转化大量积累,丙酮酸脱氢酶系活性偏小导致丙酮酸被分泌至胞外的情况。

### 3 结论

在 7 L 发酵罐和摇瓶发酵水平上,通过代谢通量的方法,分析了乳酸钠对法夫酵母 JMU-VDL668 发酵过程中细胞生长和虾青素合成的影响。实验结果表明,乳酸钠促进法夫酵母 JMU-VDL668 生产虾青素的机理为:乳酸钠在乳酸脱氢酶的作用下直接进入代谢网络的中部,绕开了上游的 PP 途径和 EMP 途径,并直接增强代谢网络的下游通量,使进入乙酰辅酶 A 节点继而进入 TCA 循环的通量增加。

由于提供了更多的乙酰辅酶 A 等前体物质和能量供给,因此促进了虾青素的合成。

### 参考文献

- [1] Sandmann G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 385(1): 4-12
- [2] Andrewes AG, Phaff HJ, Starr MP. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast[J]. Phytochemistry, 1976, 15(6): 1003-1007
- [3] Wang X, Willen R, Wadstrom T. Astaxanthin-rich algal meal and vitamin C inhibit *Helicobacter pylori* infection in BALB/cA mice[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(9): 2452-2457
- [4] Chan KC, Pen PJ, Yin MC. Anticoagulatory and antiinflammatory effects of astaxanthin in diabetic rats[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(2): 76-80
- [5] Naito Y, Uchiyama K, Aoi W. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice[J]. Biofactors, 2004, 20(1): 49-59
- [6] Yamashita E. Astaxanthin as a medical food[J]. Functional Foods in Health and Disease, 2013, 3(7): 254-258
- [7] Dhankhar J, Kadian SS, Sharma A. Astaxanthin: a potential carotenoid[J]. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2012, 3: 1246-1259
- [8] Xiao AF, Hong QL, Cai HN, et al. Effects of assembly adding metabolic regulation agents on cell growth and astaxanthin prouction of *Phaffia Rhodozyma*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 57-65 (in Chinese)  
肖安风, 洪清林, 蔡慧农, 等. 代谢调控剂对法夫酵母产虾青素组合的调控效果[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 57-65
- [9] Meyer P, Preez DU. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*[J]. Biotechnology Letters, 1993, 15(9): 919-924
- [10] Johnson EA, Lewis MJ. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of General Microbiogogy, 1979, 115: 173-183
- [11] Gu WL, An GH, Johnson EA. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1997, 19(2): 114-117
- [12] Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, et al. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding[J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(11): 1109-1111
- [13] Flores-Cotera LB, Martín R, Sánchez S. Citrate, a possible precurs or of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(3): 341-347
- [14] Lin SL, Ni H, Xiao AF, et al. Effect of sodium lactate on production of astaxanthin of *Phaffia rhodozyma*[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(8): 106-111 (in Chinese)  
林舒乐, 倪辉, 肖安风, 等. 乳酸钠对法夫酵母产虾青素的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(8): 106-111
- [15] Gregory NS, Aristos AA, Jens N. Metabolic Engineering-

- Principles and Methodologies[M]. Translated by Zhao XM, Bai DM, et al. Beijing: Chemical Industry Press, 2003 (in Chinese)
- 格雷戈里 NS, 阿里斯顿 AA, 延斯 N. 代谢工程——原理与方法[M]. 赵学明, 白冬梅, 等译. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [16] Wang JL, Nie GX, Li SZ, et al. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010, 4(4): 115-118 (in Chinese)
- 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010, 4(4): 115-118
- [17] Zhang LX, Zhang TF, Li LY, et al. Biochemistry Experiment Method and Technology[M]. 2nd Edition. Beijing: Higher Education Press, 1997, 1-3 (in Chinese)
- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1997, 1-3
- [18] An GH, Cho MH, Johnson EA. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*)[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88: 189-193
- [19] Sun NX, Dong QL, Zhao XM. Breeding of astaxanthin-overproducing mutants of *Affia rhodozyma* and metabolic flux analysis[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2006, 2(4): 54-60 (in Chinese)
- 孙乃霞, 董庆霖, 赵学明. 高产虾青素法夫酵母的选育及代谢通量分析[J]. 生物加工过程, 2006, 2(4): 54-60
- [20] Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, et al. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4): 586-590

(上接 p.633)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>