

葡萄糖酸钠对光滑球拟酵母 CCTCC M202019 能量代谢和丙酮酸积累的影响*

周景文 董志姚 刘立明 堵国成 陈 坚**

江南大学食品科学与技术国家重点实验室/工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要 在好氧条件下,光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) CCTCC M202019 能够利用葡萄糖酸钠为唯一碳源生长并积累少量丙酮酸。在含有 90 g/L 葡萄糖的培养基中,16 h 时添加 10 g/L 葡萄糖酸钠,与 100 g/L 葡萄糖作为唯一碳源的对照组相比,细胞质量浓度、葡萄糖消耗速率、丙酮酸生产强度分别提高 7.96%、13.04% 和 32.81%;其原因在于葡萄糖酸钠的添加,使胞内 NAD^+ 浓度提高了 29.73%, NADH/NAD^+ 比值和 ATP 含量分别下降 26.89% 和 8.50%,此变化显著缓解了 NADH 和 ATP 对于糖酵解途径的抑制作用,从而显著加快糖酵解速率。

关键词 光滑球拟酵母; 丙酮酸积累; NADH; ATP

中图分类号 Q 754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0527-06

一些单糖的衍生物,如山梨醇和葡萄糖酸,具有与葡萄糖类似的结构,但氧化还原态不同。微生物可以利用这些单糖衍生物作为碳源和能源生长,参与氧化还原代谢过程所产生的 NADH 的量与葡萄糖不相同,导致胞内 NADH/NAD^+ 比例发生变化,迫使微生物改变依赖于 NADH、 NAD^+ 以及 ATP 代谢途径的通量分布,以维持细胞内的氧化还原平衡^[1]。与葡萄糖相比,还原态较高的底物,如山梨醇等,可以产生更多 NADH;而氧化态较高的底物,如葡萄糖酸盐等,会降低胞内 NADH 含量^[2]。NADH 是氧化磷酸化的重要原料,是好氧微生物合成 ATP 的主要能量来源^[3]。NADH 和 ATP 水平的提高均对中心代谢途径,特别是糖酵解途径具有显著的抑制作用。调控底物的氧化还原状态,可以有效释放 NADH 和 ATP 对中心代谢途径的抑制,加速糖酵解途径,促进产物的快速积累^[4]。

San 等^[5]在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的好氧发酵中,分别使用葡萄糖、山梨醇和葡萄糖酸作为碳源调节胞内 NADH/NAD^+ 比例,并研究 NADH/

NAD^+ 的比例变化对 *E. coli* 氧化还原代谢及其副产物形成的影响。与葡萄糖为底物的糖酵解过程相比,以山梨醇作为底物时,每分子山梨醇会生成多一个分子的 NADH,并进一步产生更多的还原态产物;而当以葡萄糖酸作为碳源时,因为葡萄糖酸有一半直接转化为丙酮酸,产生的 NADH 的量比以葡萄糖为底物时少。因此,通过改变培养基中碳源的类型来调控微生物胞内 NADH/NAD^+ 的比例,从而对 ATP 进行调控,可以实现对碳代谢流的速度、流向及通量大小的调控。

假丝酵母是重要的真核微生物,在农业和食品行业中有广泛的应用^[6]。在本研究中,通过在发酵培养基中添加与葡萄糖结构类似,但氧化态较高的葡萄糖酸钠作为辅助碳源,调控光滑球拟酵母 *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 胞内 NADH/NAD^+ 比例和 ATP 水平,改变 *T. glabrata* 的胞内代谢,提高丙酮酸生产强度;通过研究氧化还原状态对胞内辅因子代谢水平的调控机制,为真核微生物培养基优化过程评估底物的氧化还原状态对发酵过程的影响提供参考。

收稿日期:2009-09-10; 修回日期:2010-01-20

* 国家“863”高技术研究计划(2006AA02Z201)和国家自然科学基金(30670066,20706025)资助

** 通讯作者。E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

周景文,男,1982年生,博士。研究方向:工业微生物。E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

1) 菌株。光滑球拟酵母(*T. glabrata*) CCTCC M202019, 烟酸、生物素、硫胺素、盐酸吡哆醇 4 重维生素营养缺陷型, 丙酮酸脱羧酶活性组成型降低, 为笔者所在实验室保藏, 主要用于发酵生产丙酮酸^[7]。

2) 斜面 and 种子培养基(g/L)。葡萄糖 30, 蛋白胨 10, KH_2PO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 20 (斜面用); pH 5.5。

3) 发酵培养基(g/L)。葡萄糖 100, 氯化铵 7, KH_2PO_4 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8, CaCO_3 40 (摇瓶时添加); 微量元素母液 10 mL, 维生素母液 10 mL, pH 5.0, 重蒸水定容。依据试验要求, 将葡萄糖替换成不同质量浓度的葡萄糖酸钠作为发酵培养基, 以 100 g/L 葡萄糖为碳源的培养液为对照, 每组进行 3 组平行实验。

4) 微量元素母液。 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, ZnCl_2 0.5 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 12 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 2 mol/L HCl 溶解后定容至 1 L。

5) 维生素母液。烟酸 80 mg, 硫胺素 0.15 mg, 吡哆醇 40 mg, 生物素 4 mg, 核黄素 10 mg, 重蒸水定容至 1 L^[7]。

1.2 培养方法

1) 种子培养。将培养好的新鲜斜面种子接种至装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中培养, 摇床转速 200 r/min, 温度 30 °C, 培养时间 24 h。

2) 摇瓶发酵。发酵培养基装液量为 50 mL, 以 10% (V/V) 接种量接种, 温度为 30 °C, 转速 200 r/min, 发酵时间为 60 h, 每隔 12 h 取样进行 1 次检测分析。

1.3 葡萄糖、细胞质量浓度和有机酸的测定

细胞质量浓度(DCW)采用吸光度法测定, 葡萄糖的测定按参考文献^[7]进行。有机酸采用 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪进行测定, 色谱条件为: 色谱柱, Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm × 4.6 mm); 流动相, 1% 乙腈/99% Na_2HPO_4 缓冲液 (20 mmol/L), pH 值 2; 进样体积, 5 μL ; 流速, 1 mL/min; 柱温, 35 °C; 检测波长, 210 nm^[8]。

1.4 比生长速率计算

由 $\ln \frac{X_t}{X_0} = \mu t$ 得到比生长速率 $\mu = \frac{\ln \frac{X_t}{X_0}}{t}$, 其中

X_0 为接种后 0 h 时的细胞质量浓度, X_t 为发酵 t h 的细胞质量浓度。

1.5 NADH、NAD⁺ 和 ATP 测定

取 10 mL 发酵液, 于 4 °C 下, 10 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 菌体放入液氮中处理 1 min, 使其代谢瞬间停止, -80 °C 保存于冰箱用于 NADH、NAD⁺ 和 ATP 的测定。

1) NADH 和 ATP 测定。向菌体中加入 20 mL 预冷的含有 50 mmol/L KOH, 30% (V/V) 乙醇和 22 mmol/L 硼酸 (pH 10) 溶液。冰浴 30 min 后, 剧烈搅拌, 用 3 mol/L 的 HCl 调节 pH 值到 9.0 ~ 9.4。10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 迅速测定上清。

2) NAD⁺ 测定。菌体中加入 20 mL 预冷的含有 70% (V/V) 乙醇的 10 mmol/L pH 值为 6.5 的 K_2HPO_4 缓冲液, 室温放置 30 min。此过程中, 用 0.5 mol/L 的 HCl 调节 pH 值低于 7.0; 10 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 迅速测定上清。

3) 色谱分析条件。色谱柱 Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm × 4.6 mm), 磷酸盐缓冲液 (10.93 g NaH_2PO_4 和 3.04 g Na_2HPO_4 溶于纯水中, 加入四丁基溴化铵 3.22 g, 调节 pH 值为 6.5, 真空抽滤后定容至 1 L) 和乙腈配比为 86 : 14, 流速 1 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。所有样品和标准品均用 0.22 μm 滤膜过滤后进样 10 μL 分析^[9]。ATP、NAD⁺、NADH 在 20 min 内可以得到分离。胞内 ATP、NADH 和 NAD⁺ 浓度至少是 3 次独立提取过程的平均值。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖酸钠为唯一碳源对 *T. glabrata* 生长和发酵生产丙酮酸的影响

T. glabrata 利用葡萄糖酸钠 (10、20 和 30 g/L) 为唯一碳源生长和积累丙酮酸的情况如图 1 所示。*T. glabrata* 以 30 g/L 葡萄糖酸钠作为唯一碳源进行菌体生长时, 细胞质量浓度为 3.5 g/L (图 1A) 是对照组 (30 g/L 葡萄糖, 细胞质量浓度为 8.3 g/L) 的 42.20%, 丙酮酸产量 (1.2 g/L) 是对照组的 13.60% (图 1B)。继续提高葡萄糖酸钠的质量浓度

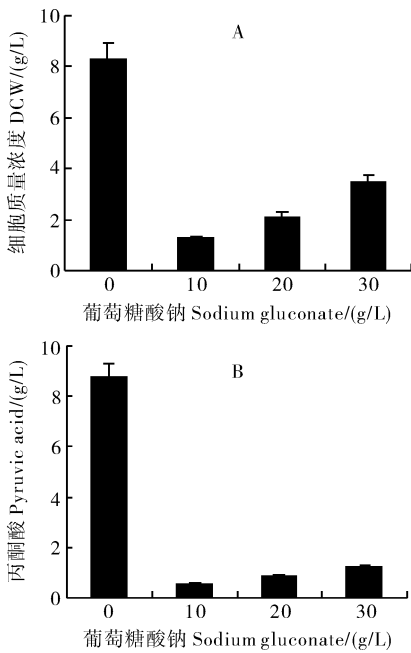
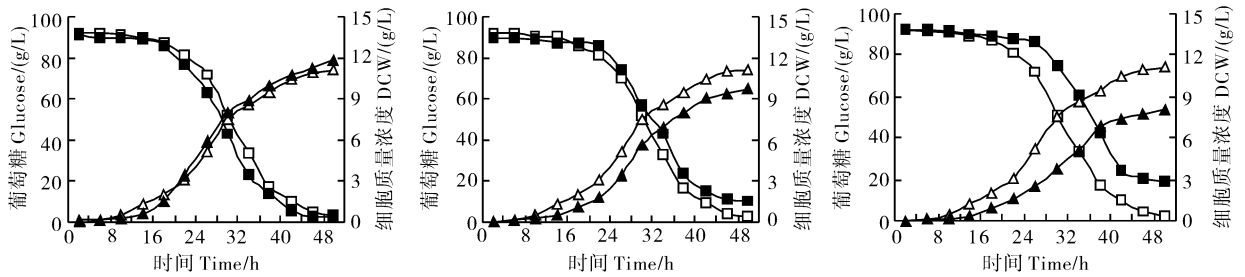


图 1 *T. glabrata* 利用葡萄糖酸钠进行细胞生长(A)和丙酮酸生产(B)

Fig. 1 The growth(A) and pyruvate production(B) of *T. glabrata* with sodium gluconate



△未添加葡萄糖酸钠时的细胞质量浓度 DCW without gluconate; ▲添加葡萄糖酸钠时的细胞质量浓度 DCW with gluconate; □未添加葡萄糖酸钠时的碳源消耗 Carbon source consumption without gluconate; ■添加葡萄糖酸钠时的碳源消耗 Carbon source consumption with gluconate.

图 2 不同质量浓度混合碳源(A. 10 g/L, B. 20 g/L, C. 30 g/L 葡萄糖酸钠)对 *T. glabrata* 的细胞生长和碳源消耗的影响

Fig. 2 The growth and glucose consumption by *T. glabrata* with 10 g/L (A), 20 g/L (B), 30 g/L (C) sodium gluconate as supplement carbon source

葡萄糖酸钠使 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的周期从 48 h 降为 44 h; 丙酮酸产量 (32.47 g/L, 10 g/L 葡萄糖酸钠) 比对照组提高了 7.37%, 丙酮酸的生产强度比对照组提高了 17.14%。

2.3 葡萄糖酸钠添加时间对丙酮酸生产的影响

前期研究发现, 利用 90 g/L 葡萄糖和 10 g/L 葡萄糖酸钠组成混合碳源能有效地提高细胞质量浓度, 加快葡萄糖消耗速率, 提高丙酮酸产量。然而, 在发酵初始阶段添加葡萄糖酸钠会抑制细胞生长,

并不能有效地增加细胞质量浓度和丙酮酸积累量, 此结果表明, *T. glabrata* 能利用葡萄糖酸钠进行生长并积累少量丙酮酸。

2.2 混合碳源对 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的影响

以 100 g/L 葡萄糖为单一碳源作对照, 在含有 90 g 葡萄糖的培养基 (1 L) 中添加 10 g 葡萄糖酸钠, 在含有 80 g 葡萄糖的培养基 (1 L) 中添加 20 g 葡萄糖酸钠, 在含有 70 g 葡萄糖的培养基 (1 L) 中添加 30 g 葡萄糖酸钠, 作为混合碳源, *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的结果如图 2 和图 3 所示。利用 90 g/L 葡萄糖和 10 g/L 葡萄糖酸钠作为混合碳源, 能有效地促进细胞生长, 提高丙酮酸积累速度 (图 2A)。葡萄糖酸钠质量浓度增加到 10 g/L 以上时, 随着质量浓度增加, 细胞生长的延滞期越长, 如添加 30 g/L 葡萄糖酸钠, 细胞生长的延滞期由 8 h 延长到 12 h。当菌体生长进入对数生长期后, 添加 10 g/L 葡萄糖酸钠的混合碳源能明显加快耗糖速率, 发酵进行到 44 h 时碳源消耗完毕, 此时, 对照组培养液中碳源剩余为 4.2 g/L。添加 10 g/L 葡

菌体生长的延滞期延长。为此, 研究了葡萄糖酸钠 (10 g/L) 添加时间 (0、12、16、20 h) 对细胞生长和丙酮酸积累的影响, 结果如图 4 所示, 相关发酵参数比较列于表 1 中。发酵进行到 16 h 时添加葡萄糖酸钠, 菌体生长迅速, 与未添加葡萄糖酸钠的对照组相比, 菌体比生长速率提高了 59.6%。16 h 添加葡萄糖酸钠使发酵周期从 48 h 降为 40 h, 随着葡萄糖酸钠的添加, 菌体耗糖速率明显加快, 16 h 添加葡萄糖酸钠, 与对照组相比较, 菌体耗糖速率提高了

13.64%；16 h 添加葡萄糖酸钠，发酵 40 h 丙酮酸产量为 34.29 g/L，比对照组发酵 48 h 的丙酮酸产量高 10.05%；16 h 添加葡萄糖酸钠，丙酮酸生产强度提高了 32.81%。

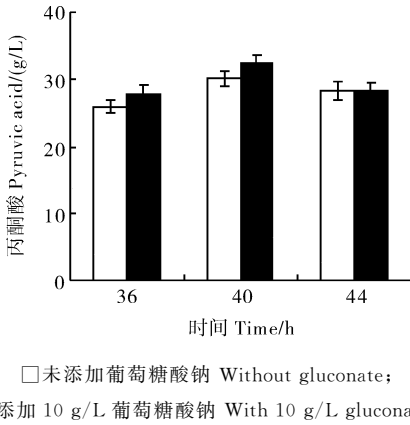
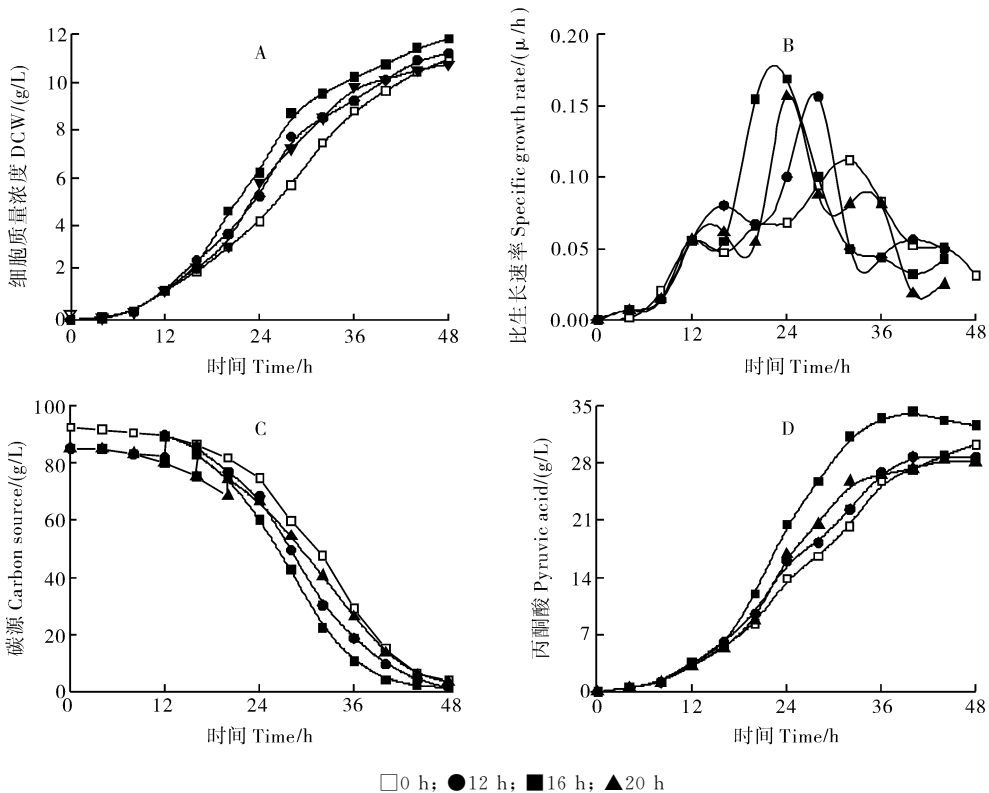


图 3 混合碳源对 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的影响
Fig. 3 The pyruvate production of *T. glabrata* on mixed carbon source

2.4 添加葡萄糖酸钠对 *T. glabrata* NADH 代谢的影响

与葡萄糖为唯一碳源的对照组相比较，在发酵进行到 16 h 添加 10 g/L 葡萄糖酸钠能有效提高细胞质量浓度和丙酮酸生产强度，加快葡萄糖消耗和缩短发酵周期。取对数生长中期细胞，测定胞内 NADH、NAD⁺、ATP 含量，结果如表 2 所示。添加 10 g/L 葡萄糖酸钠，使 *T. glabrata* 胞内 NADH 含量降低 5.14%（与未添加葡萄糖酸钠的对照组比较）。与葡萄糖比较，葡萄糖酸钠有更强的氧化能力，微生物利用葡萄糖酸钠，使得胞内 NAD⁺ 含量比对照组提高了 29.73%，NADH/NAD⁺ 比例降低 26.89%；同时由于 NADH 含量的降低，并使得 ATP 含量下降 8.50%。总之，葡萄糖酸钠的添加，降低了胞内 NADH/NAD⁺ 比例，引起代谢流的变化，缩短了丙酮酸的生产周期，提高了丙酮酸产量。



A. 细胞质量浓度 Dry cell weight; B. 比生长速率 Specific growth rate; C. 碳源(葡萄糖/葡萄糖酸钠)消耗 Carbon source consumption; D. 丙酮酸积累 Pyruvic acid production.

图 4 不同葡萄糖酸钠添加时间对发酵过程的影响

Fig. 4 Effects of adding time on pyruvate fermentation of *T. glabrata*

表1 不同葡萄糖酸钠添加时间的 *T. glabrata* 发酵参数
Table 1 Effects of adding time on fermentation patterns of *T. glabrata*

参数 Patterns	0 h (A)	12 h (B)	16 h (C)	20 h (D)	变化 Change/% (C/A-1)×100
发酵时间 Fermentation time /h	48	48	44	48	-8.33
最大细胞质量浓度 Maximum DCW/(g/L)	10.93	11.20	11.80	10.74	7.96
总碳源消耗 Total consumed carbon source/(g/L)	88.39	91.11	91.50	87.60	3.52
最大丙酮酸质量浓度 Maximum pyruvate concentration/(g/L)	30.83	28.83	34.27	28.41	11.16
碳源转化率 The pyruvate yield on carbon/%	34.88	31.64	37.45	32.43	7.37
碳源消耗速率 The carbon consumption rate/(g/(L·h))	1.84	1.90	2.08	1.83	13.04
丙酮酸产率 Pyruvate productivity/(g/(L·h))	0.64	0.60	0.85	0.592	32.81

表2 胞内 NADH、NAD⁺ 和 ATP 浓度

Table 2 The intracellular concentration of NADH, NAD⁺ and ATP

参数 Parameters	对照 (A) Control (A)	葡萄糖酸 (B) Gluconate (B)	变化率 Change/% (B/A-1)×100
NADH/μmol	12.83	12.17	-5.14
NAD ⁺ /μmol	1.48	1.92	29.73
NADH/NAD ⁺	8.67	6.34	-26.89
ATP/mmol	0.647	0.592	-8.50

3 讨论

通过调控 NADH 代谢过程,实现对 ATP 水平的调控,从而改变中心代谢途径的代谢通量,一直以来都是生物工程领域的一个研究热点^[10-11]。本研究通过在发酵过程中的适当阶段,添加适量的氧化态底物,调控胞质中的辅因子代谢,显著提高了 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸过程的生产强度。在真核微生物,如酵母中,利用底物的氧化还原状态对糖酵解途径进行调控并实现发酵过程优化的目标,目前还尚未见报道^[12]。

本研究的结果表明,在不同时间添加葡萄糖酸钠,对于 *T. glabrata* 丙酮酸发酵的影响不同,原因主要在于:12 h 时添加,由于处于生长初期,细胞质量浓度较低,添加葡萄糖酸钠对菌体生长有一定影响,因此添加后菌体生长速率提高不大,耗糖速率也稍有加快;20 h 时添加,菌体浓度过高,添加葡萄糖酸钠后,能快速促进菌体生长与耗糖速率,但同时葡萄糖酸钠被菌体迅速利用;发酵到 32 h 后添加,调节效果减弱;16 h 添加时,菌体生长浓度比较适合,添加葡萄糖酸钠后,既能迅速促进菌体生长和葡萄糖的消耗,加速丙酮酸的生产,又具有较好的持续调节能力。

在发酵培养基中添加与葡萄糖结构相似但氧化还原状态不同的葡萄糖酸钠作为混合碳源进行丙酮酸发酵,可以有效降低微生物体内 NADH/NAD⁺ 比例和 ATP 水平,有效加速糖酵解途径,进而提高丙酮酸产量。通过添加不同氧化还原状态碳源,改变胞内辅助因子的浓度和比例,从而提高葡萄糖代谢速率的策略,对进一步提高目标代谢产品的生产速度具有一定的借鉴作用。本研究中利用到的葡萄糖酸钠可能会增加丙酮酸的发酵成本,在不同阶段添加葡萄糖酸钠也会增加发酵工艺的复杂性,但通过改变培养基的氧化还原水平,改变真核微生物胞内氧化还原状态这一原理,为后续的代谢工程改造提供了坚实的理论基础。

参考文献

- [1] ALAM K Y, CLARK D P. Anaerobic fermentation balance of *Escherichia coli* as observed by *in vivo* nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. J Bacteriol, 1989, 171(11): 6213-6217.
- [2] BERRIOS-RIVERA S J, SANCHEZ A M, BENNETT G N, et al. Effect of different levels of NADH availability on metabolite distribution in *Escherichia coli* fermentation in minimal and complex media[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 65 (4): 426-432.
- [3] ZHOU J W, LIU L M, SHI Z P, et al. ATP in current biotechnology: regulation, applications and perspectives[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(1): 94-101.
- [4] LIU L M, LI Y, SHI Z P, et al. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata*: increase of NAD⁺ availability[J]. J Biotechnol, 2006, 126(2): 173-185.
- [5] SAN K Y, BENNETT G N, BERRIOS-RIVERA S J, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*[J]. Metab Eng, 2002, 4(2): 182-192.

- [6] 王泽举,刘延琳,刘爱国,等. 新疆葡萄酒自然发酵过程酵母菌的种类和动态变化[J]. 华中农业大学学报,2008,27(5):664-667.
- [7] LIU L M, LI Y, LI H Z, et al. Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production[J]. Lett Appl Microbiol, 2004, 39(2):199-206.
- [8] 李德华,向春雷,姜益泉,等. 低磷胁迫下不同水稻品种根系生理特性的研究[J]. 华中农业大学学报,2006,6(25):626-629.
- [9] SATO K, YOSHIDA Y, HIRAHARA T, et al. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing[J]. J Biosci Bioeng, 2000, 90(3):294-301.
- [10] VEMURI G N, EITEMAN M A, ALTMAN E. Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted *ArcaA* regulatory protein[J]. Biotechnol Bioeng, 2006, 94(3):538-542.
- [11] VEMURI G N, EITEMAN M A, MCEWEN J E, et al. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proc Natl Acad Sci UA, 2007, 104(7):2402-2407.
- [12] VAN-DER-WERF M J, OVERKAMP K M, MUILWIJK B, et al. Comprehensive analysis of the metabolome of *Pseudomonas putida* S12 grown on different carbon sources[J]. Mol Biosyst, 2008, 4(4):315-327.

Effect of Sodium Gluconate on Pyruvate Accumulation by *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019

ZHOU Jing-wen DONG Zhi-yao LIU Li-ming DU Guo-cheng CHEN Jian

State Key Laboratory of Food Science and Technology/Key Laboratory of Industrial
Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, 214122

Abstract The dry cell weight of *T. glabrata* reached to 3.5 g/L when 30 g/L of gluconate was presented in the culture medium. When 10 g/L of gluconate was supplemented to the culture broth with 90 g/L of glucose at 16 h, the dry cell weight, the rate of glucose consumption and the pyruvate production were increased by 7.96%, 13.04% and 32.81%, respectively. The enhancement of glucose consumption and pyruvate production rate were due to the fact that the concentration of NAD⁺ increased by 29.73% while the concentration of ATP and the ratio of NADH/NAD⁺ decreased 26.89% and 8.50%, respectively. The decrease in the intracellular NADH and ATP level decreased the inhibition effect of NADH and ATP, thus significantly increased the glycolytic ratio.

Key words *Torulopsis glabrata*; pyruvic acid production; NADH; ATP

(责任编辑:陆文昌)