

# 氨基酸强化 *Torulopsis glabrata* 发酵生产丙酮酸

许庆龙, 许晓鹏, 刘立明, 史仲平, 堵国成, 陈坚

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 在维生素限量添加的条件下, 研究了添加氨基酸对丙酮酸发酵的影响. 在发酵初始添加 0.8 g/L 谷氨酸、0.6 g/L 酪氨酸和 0.2 g/L 甲硫氨酸使丙酮酸产量分别提高 23.5%, 16.4% 和 11.8%. 动力学分析表明, 添加以上 3 种原料提高丙酮酸生产性能的原因在于用于细胞生长的葡萄糖下降, 显著提高了细胞对葡萄糖的产率系数( $Y_{x/s}$ )和丙酮酸对葡萄糖的产率系数( $Y_{p/s}$ ). 添加氨基酸导致胞内 NADH/NAD<sup>+</sup> 比下降, 增加了胞内 NAD<sup>+</sup> 可用度, 加强了糖酵解速度, 从而提高了丙酮酸生产强度.

**关键词:** 光滑球拟酵母; 氨基酸; 丙酮酸; 发酵

**中图分类号:** TQ921 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2008)06-1200-04

## 1 前言

在利用光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)多重维生素营养缺陷型菌株 CCTCC M202019 发酵生产丙酮酸的过程中, 培养基中亚适量的维生素导致由丙酮酸节点进入氨基酸代谢及三羧酸循环(TCA 循环)的碳流量减少, 最终使细胞生长受到抑制而代谢活性减弱(图 1)<sup>[1]</sup>. 为此考虑在维生素限量时保证一定丙酮酸浓度的情况下, 添加氨基酸或 TCA 循环的中间代谢产物促进细胞生长, 以期提高丙酮酸生产强度.

已有研究<sup>[2-4]</sup>表明, 添加一定的外源氨基酸和 TCA 循环中间产物能维持细胞生长和代谢产物的合成. 另一方面, 提高丙酮酸生产强度的最适条件是胞内 NADH 含量较低<sup>[5]</sup>, 在培养基中添加一定浓度的氨基酸能减少细胞合成氨基酸而产生的大量 NADH, 从而降低胞内 NADH 含量<sup>[6]</sup>. 从这一思路出发, 本工作在维生素限量的条件下, 研究了氨基酸对 *T. glabrata* 细胞生长、NADH 代谢和丙酮酸生产强度的影响.

## 2 材料与方法

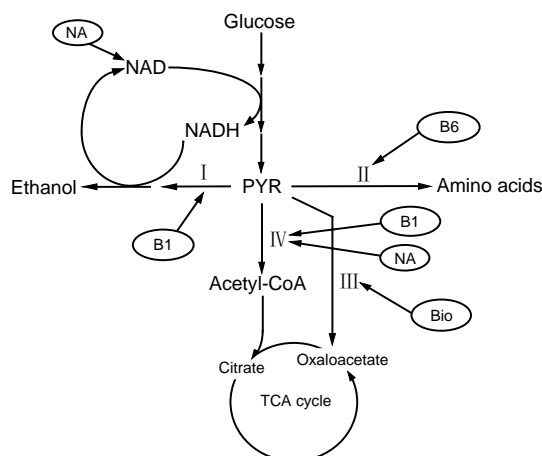
### 2.1 菌种

光滑球拟酵母 *T. glabrata* CCTCC M202019, NA, Bio, B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> 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<sup>[5]</sup>.

### 2.2 培养基

斜面 and 种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 蛋白胨 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, 琼脂 20 (斜面添加), pH 5.5.

发酵培养基: 参见文献[5].



I. Pyruvate decarboxylase II. Transaminase  
III. Pyruvate carboxylase IV. Pyruvate dehydrogenase complex

图 1 *T. glabrata* CCTCC M202019 中丙酮酸的代谢途径<sup>[1]</sup>  
Fig.1 Metabolism pathway of pyruvate in *T. glabrata* CCTCC M202019<sup>[1]</sup>

### 2.3 培养方法和分析方法

参见文献[5].

## 3 结果与讨论

### 3.1 常见氨基酸对丙酮酸发酵的影响

1 g/L 各种氨基酸对 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的影响如表 1 所示. 依据丙酮酸产量提高的程度, 将各种氨基酸的作用分为以下 3 类: (1) 谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸能显著提高丙酮酸的产量(10%)和葡萄糖产率; (2) 天冬氨酸和天冬酰胺能使丙酮酸产量提高 5%~10%; (3) 丝氨酸、色氨酸、胱氨酸和组氨酸则对丙酮酸合成没有明显的促进作用, 甚至对细胞生长和丙

收稿日期: 2008-05-07, 修回日期: 2008-07-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30670066, 20706025); 国家杰出青年基金资助项目(编号: 20625619); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2007CB71403); 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2006AA02Z201)

作者简介: 许庆龙(1983-), 男, 湖北省十堰市人, 硕士研究生, 发酵工程专业; 刘立明, 通讯联系人, E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn.

酮酸的合成表现出一定的抑制作用。

表1 常见氨基酸对 *T. glabrata* 发酵生产丙酮酸的影响

Table 1 Effect of amino acids on the cell growth and pyruvate production by *T. glabrata*

Amino acid	Dry weight of cell (g/L)	Pyruvate (g/L)
Control	10.4	40.1
Methionine	12.5	47.2
Proline	11.2	40.2
Cysteine	9.0	29.4
Glycine	10.1	31.4
Glutamic acid	12.1	45.4
Tyrosine	12.1	46.6
Arginine	11.3	39.9
Serine	11.4	35.2
Lysine	10.9	40.1
Aspartic acid	12.9	40.6
Histidine	9.0	32.6
Phenylalanine	9.6	40.2
Glutamine	10.9	41.3
Leucine	9.4	35.6
Alanine	11.9	37.4
Threonine	8.6	31.7
Asparagine	11.7	44.6
Isoleucine	10.7	39.9
Valine	10.6	40.8
Tryptophan	12.6	35.5

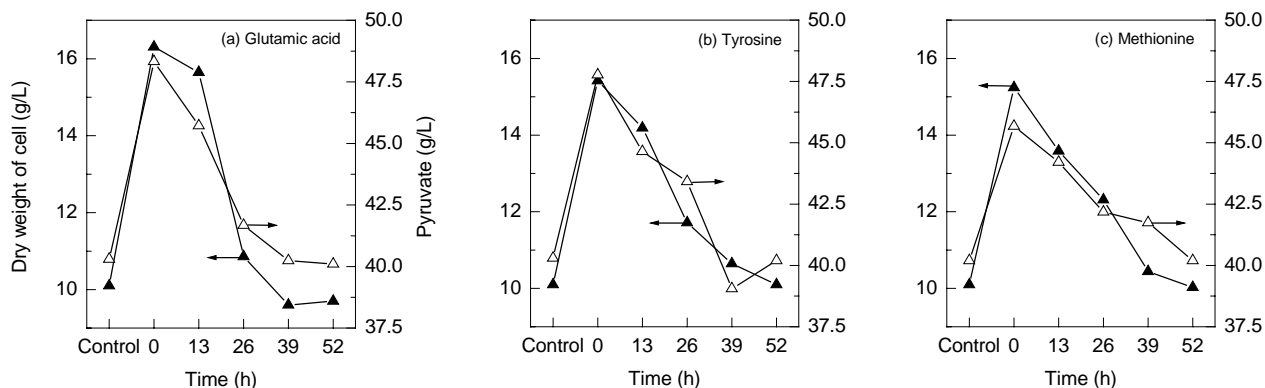


图2 氨基酸添加时机对细胞生长和丙酮酸合成的影响

Fig.2 Effect of adding time of glutamic acid, tyrosine and methionine on pyruvate fermentation

### 3.4 适宜条件下添加外源氨基酸的丙酮酸发酵过程

在最佳添加时间和最适添加浓度下,谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸对 *T. glabrata* 丙酮酸生产过程的影响如图4,相关发酵参数列于表2.图4表明,添加谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸明显促进了细胞生长[图4(a)]和葡萄糖消耗[图4(b)].发酵60h时丙酮酸产量比对照分别提高了23.5%,16.4%和11.8%[图4(c)].表明添加谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸实现了促进细胞生长、加速葡萄糖消耗并提高丙酮酸产量.添加谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸使用于细胞生长的葡萄糖下降,因此细胞对葡萄糖产率系数( $Y_{x/s}$ )和丙酮酸对葡萄糖产率系数( $Y_{p/s}$ )显著提高(表2).

### 3.5 添加外源氨基酸促进丙酮酸发酵的机理

*T. glabrata* 并不能以氨基酸为唯一氮源进行生长.

### 3.2 氨基酸添加时间对丙酮酸合成的影响

谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸的添加时间对丙酮酸发酵的影响如图2所示.添加时间分别为发酵初始(0h)、对数生长期早期(13h)、对数生长期晚期(26h)、稳定期(39h)和发酵结束(52h).由图2可知,在发酵初始时添加1g/L谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸使丙酮酸产量分别提高17.5%,12.6%和11.3%.

### 3.3 氨基酸浓度对丙酮酸发酵的影响

发酵初始时谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸添加浓度对丙酮酸发酵的影响如图3(a)~3(c)所示.在一定氨基酸浓度范围内(0~1g/L),细胞浓度和丙酮酸产量随着氨基酸添加浓度的增加而不断提高;而继续提高氨基酸的浓度( $\geq 1$ g/L),细胞浓度和丙酮酸产量则不断降低;当氨基酸浓度大于4g/L时,细胞生长和丙酮酸的合成则受到一定程度的抑制.在0~1g/L范围内,培养基中谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸浓度对细胞生长和丙酮酸的影响如图3(d)~3(f)所示,其相应的最佳浓度为0.8,0.6和0.2g/L.

添加氨基酸促进丙酮酸积累的原因是,丙酮酸进入氨基酸代谢库的流量由培养基中维生素 $B_6$ 调控,在培养基中亚适量的维生素 $B_6$ 浓度(0.4mg/L)下,细胞生长较微弱,这是因为亚适量的维生素 $B_6$ 使丙酮酸转氨酶活性下降导致氨基酸合成受阻,但有效地提高了丙酮酸对葡萄糖的得率.将维生素 $B_6$ 浓度提高到1mg/L,发现细胞浓度增加11.8%,而丙酮酸产量下降了26.3%(图5).这是因为随着培养基中 $B_6$ 浓度的增加,丙酮酸转氨途径被激活<sup>[7]</sup>,导致丙酮酸节点导向氨基酸合成的碳流明显增大,细胞生长速度加快,而丙酮酸产量和产率明显下降<sup>[8,9]</sup>.在培养基中添加一定浓度的氨基酸既促进了细胞生长,又提高了丙酮酸对葡萄糖的产率系数( $Y_{p/s}$ )(如表2).

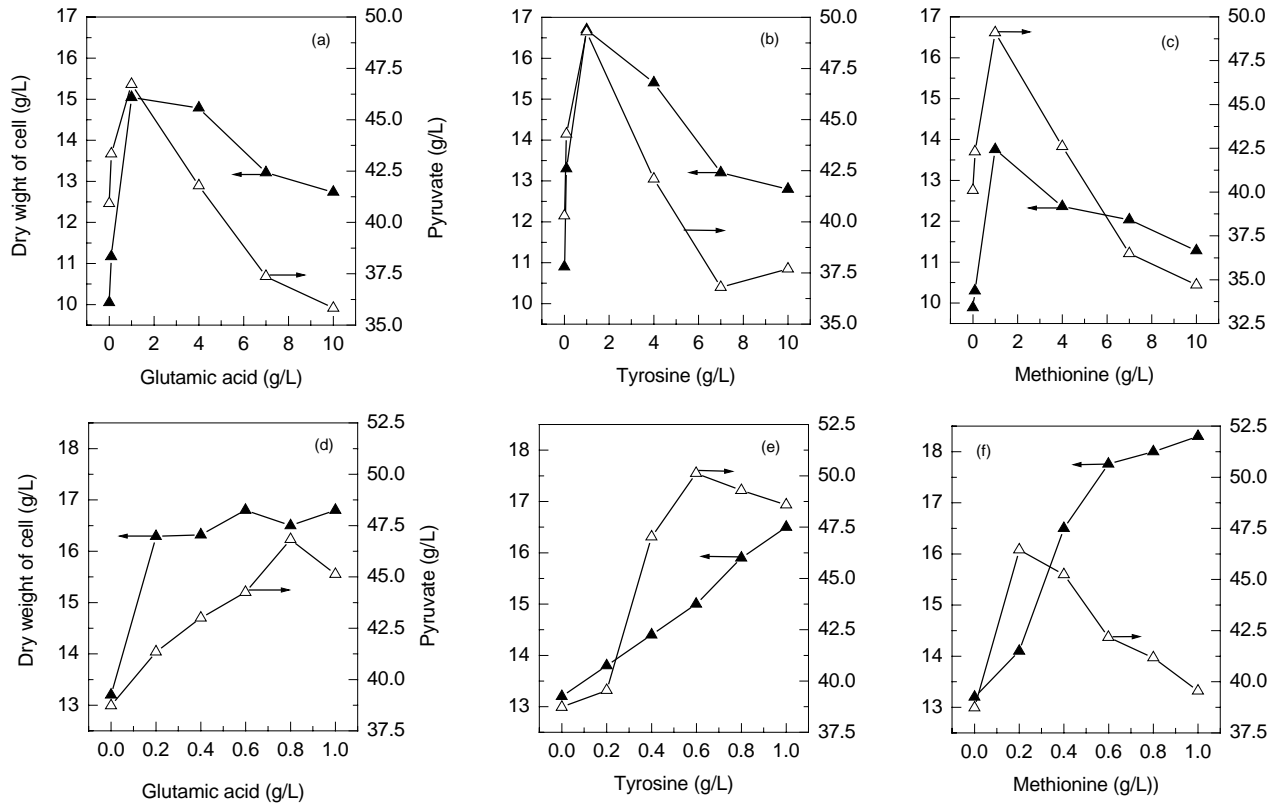


图 3 氨基酸添加浓度对细胞生长和丙酮酸合成的影响

Fig.3 Effect of added concentration of amino acids on pyruvate fermentation

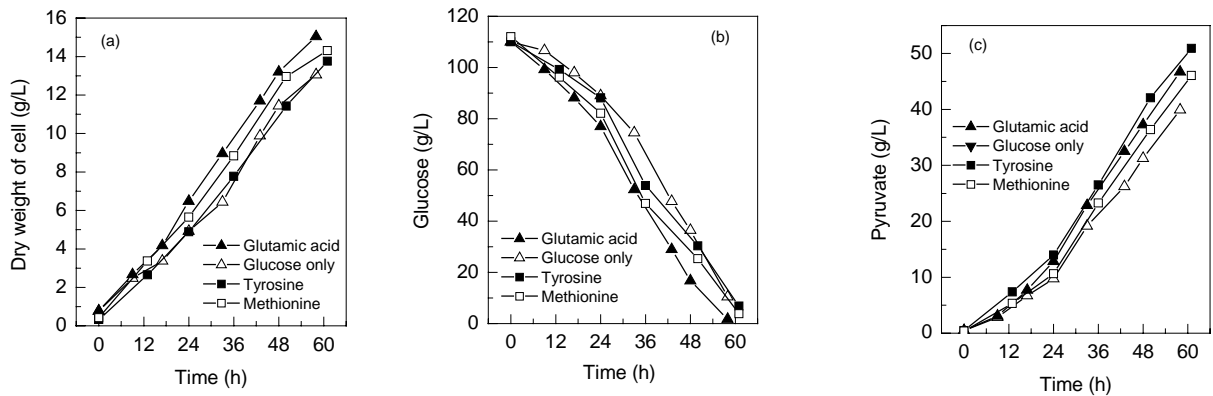


图 4 添加氨基酸对细胞生长和丙酮酸合成过程的影响

Fig.4 Effect of amino acids addition on cell growth, glucose consumption and pyruvate production

表 2 外源添加氨基酸对  $Y_{x/s}$  和  $Y_{p/s}$  的影响

Table 2 Effect of amino acids addition on the yield of cell on glucose ( $Y_{x/s}$ ) and yield of pyruvate on glucose ( $Y_{p/s}$ )

Parameter	Control	Glutamic acid	Tyrosine	Methionine
$Y_{x/s}$	0.13	0.15	0.14	0.15
$Y_{p/s}$	0.36	0.48	0.49	0.46

添加谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸一定程度降低了胞内 NADH/NAD<sup>+</sup>比(图 6), 原因在于添加外源氨基酸弱化了细胞合成氨基酸的功能<sup>[10,11]</sup>, 从而降低胞内 NADH/NAD<sup>+</sup>水平, 强化丙酮酸合成效率(图 4). 这与 *S. cerevisiae* 添加谷氨酸或氨基酸混合液厌氧发酵, 细胞可直接吸收外源游离氨基酸满足蛋白质等物质的生物合成、导致胞内 NADH 水平很低的结果<sup>[6]</sup>相似.

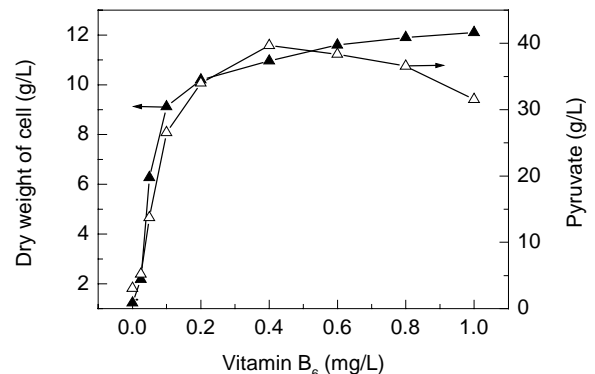


图 5 维生素 B<sub>6</sub> 对细胞生长和丙酮酸合成的影响

Fig.5 Effect of vitamin B<sub>6</sub> on cell growth and pyruvate fermentation

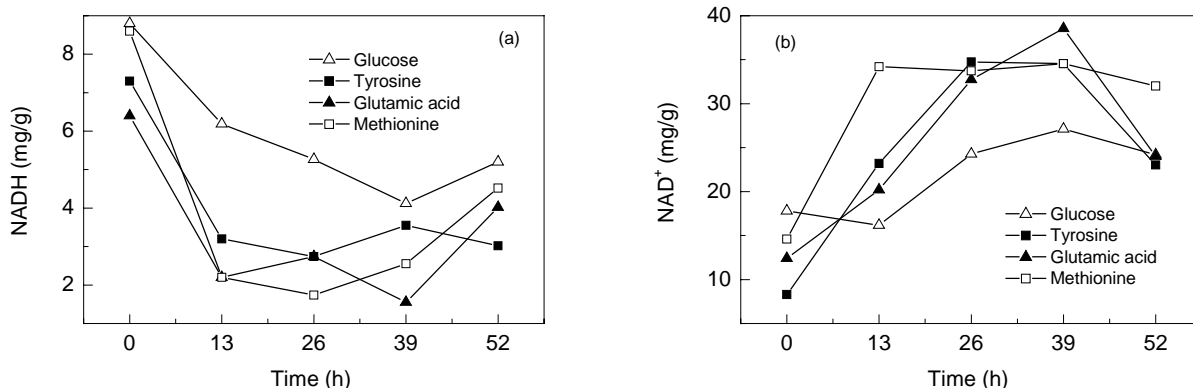


图6 添加氨基酸对胞内 NADH 和 NAD<sup>+</sup>含量变化的影响  
Fig. 6 Effect of amino acids addition on intracellular NADH and NAD<sup>+</sup> concentration

## 4 结论

(1) 在含亚适量维生素 B<sub>6</sub> 的培养基中于 *T. glabrata* 发酵起始时添加适量谷氨酸(0.8 g/L)、酪氨酸(0.6 g/L)和甲硫氨酸(0.2 g/L)可使丙酮酸产量分别提高 23.5%、16.4%和 11.8%。

(2) 添加谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸提高 *T. glabrata* 的丙酮酸生产性能的原因在于添加的氨基酸促进了细胞的生长,显著提高了细胞对葡萄糖的产率系数( $Y_{x/s}$ )和丙酮酸对葡萄糖的产率系数( $Y_{p/s}$ ),同时降低了胞内的 NADH 水平,增加了糖酵解流量,提高了丙酮酸生产强度。

### 参考文献:

- [1] Li Y, Chen J, Lun S Y. Biotechnological Production of Pyruvic Acid [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 57(4): 451–459.
- [2] 谢涛, 方慧英, 诸葛健. 一些氨基酸对产甘油假丝酵母甘油生产的促进作用 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(1): 138–143.
- [3] Dawson L, Mayne C S. The Effect of Intraruminal Infusions of Amines and Gamma Amino Butyric Acid on Rumen Fermentation Parameters and Food Intake of Steers Offered Grass Silage [J]. Anim. Feed Sci. Technol., 1996, 63(1/4): 35–49.
- [4] Chen P F, Harcum S W. Effects of Amino Acid Additions on

- Ammonium Stressed CHO Cells [J]. J. Biotechnol., 2005, 117: 277–286.
- [5] Liu L M, Li Y, Li H Z, et al. Significant Increase of Glycolytic Flux in *Torulopsis glabrata* by Inhibition of Oxidative Phosphorylation [J]. FEMS Yeast Res., 2006, 6(8): 1117–1129.
- [6] Albers E, Larsson C, Liden G, et al. Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 3187–3195.
- [7] Hua Q, Yang C, Shimizu K. Metabolic Flux Analysis for Efficient Pyruvate Fermentation Using Vitamin-auxotrophic Yeast of *Torulopsis glabrata* [J]. J. Biosci. Bioeng., 1999, 87(2): 206–213.
- [8] Li Y, Chen J, Lun S Y, et al. Efficient Pyruvate Production by a Multi-vitamin Auxotroph of *Torulopsis glabrata*: Key Role and Optimization of Vitamin Levels [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55(6): 680–685.
- [9] Miyata R, Yonehara T. Improvement of Fermentative Production of Pyruvate from Glucose by *Torulopsis glabrata* IFO 0005 [J]. J. Ferment. Bioeng., 1996, 82(5): 475–479.
- [10] Bernard J K, Chandler P T, West J W, et al. Effect of Supplemental L-Lysine-HCL and Corn Source on Rumen Fermentation and Amino Acid Flow to the Small Intestine [J]. J. Dairy Sci., 2004, 87(2): 399–405.
- [11] Hernandez-Orte P, Ibarz M J, Cacho J, et al. Addition of Amino Acids to Grape Juice of the Merlot Variety: Effect on Amino Acid Uptake and Aroma Generation during Alcoholic Fermentation [J]. Food Chem., 2006, 98(2): 300–310.

## Enhancement of Pyruvate Production with Amino Acid Addition in *Torulopsis glabrata* Induced Fermentation

XU Qing-long, XU Xiao-peng, LIU Li-ming, SHI Zhong-ping, DU Guo-cheng, CHEN Jian

(Key Lab. Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** The effect of amino acid on production of pyruvate by *T. glabrata* CCTCC M202019 was investigated. The pyruvate production was increased 23.5%, 16.4% and 11.8%, respectively, with 0.8 g/L glutamic acid, 0.6 g/L tyrosine and 0.2 g/L methionine fed to the fermentation medium at the initial fermentation. The principle of amino acids to enhance pyruvate production is that the amount of glucose used for cell growth was reduced, but the yields of cell and pyruvate on glucose ( $Y_{x/s}$  and  $Y_{p/s}$ ) were increased. On the other hand, the concentration of intracellular NADH was decreased by amino acid addition, which resulted in higher glycolic flux and pyruvate production.

**Key words:** *Torulopsis glabrata*; amino acid; pyruvate; fermentation