

碳酸钙促进丙酮酸发酵过程中 α -酮戊二酸的形成

刘立明^{1,2} 李 寅^{1,2} 堵国成² 陈 坚^{1,2*}

(¹ 江南大学工业生物技术教育部重点实验室; ² 生物工程学院环境生物技术室, 无锡 214036)

摘 要 在多重维生素营养缺陷型菌株光滑球拟酵母 CCTCC M202019 发酵生产丙酮酸的摇瓶和发酵罐实验中发现, CaCO_3 的添加对发酵液中 α -酮戊二酸(α -KG)的积累有重要影响。在维生素浓度不变且供氧充分的前提下, 延迟 CaCO_3 添加时间可明显抑制 α -KG 的产生, 并提高丙酮酸与 α -KG 的碳摩尔比($C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$), 而增加培养基中的 CaCO_3 浓度会导致 α -KG 积累的增加。用不同物质调节发酵液中 pH 的实验证实: 在丙酮酸发酵过程中, Ca^{2+} 对 α -KG 的积累起主要作用, CO_3^{2-} 起辅助作用, 两者对 α -KG 的积累具有协同效应。维持培养基中 CaCO_3 浓度不变, 改变培养基中硫胺素的浓度, 对 α -KG 的积累, 特别是对 $C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$ 值没有影响, 而增加培养基中生物素的浓度, 则导致 α -KG 的浓度不断上升且 $C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$ 值不断下降。当有 Ca^{2+} 存在时, 胞内丙酮酸羧化酶的活性最高可提高 40%, 而丙酮酸脱氢酶系的活性没有明显变化。结果表明, 丙酮酸发酵过程中 α -KG 的形成是由于 CaCO_3 促进了丙酮酸羧化反应, 其中 Ca^{2+} 可显著提高丙酮酸羧化酶的活性, 而 CO_3^{2-} 则有可能作为丙酮酸羧化反应的底物。

关键词 光滑球拟酵母 α -酮戊二酸 碳酸钙 丙酮酸羧化酶 丙酮酸 发酵

中图分类号 TQ921 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)06-0745-05

利用光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)的多重维生素营养缺陷型菌株发酵生产丙酮酸时, 观察到摇瓶发酵中的丙酮酸产量总是低于小型发酵罐的产量^[1-2]。进一步研究发现, 摇瓶培养时发酵液中 α -酮戊二酸(α -KG)的浓度较高, 但在发酵罐培养中 α -KG 却几乎不积累或很少积累。摇瓶培养时产生高浓度的 α -KG 意味着三羧酸(TCA)循环通量较高, 但 *T. glabrata* 中丙酮酸进入 TCA 循环的主要途径有两条(1)由丙酮酸脱氢酶系(PDH, 以硫胺素为辅因子)控制的丙酮酸氧化脱羧途径(2)由丙酮酸羧化酶(PC, 以生物素为辅因子)控制的丙酮酸羧化途径。由于 PDH 和 PC 的活性分别受培养基中硫胺素和生物素浓度控制, 当培养基中维生素的浓度不变时, 这两条途径的活性应当不会因为所采用反应器的不同而改变。既然如此, 为什么摇瓶培养时菌株会产生较高浓度的 α -KG?

为了回答这一问题, 作者在摇瓶条件下, 研究了不同硫胺素、生物素和碳酸钙浓度对 *T. glabrata* CCTCC M202019 积累 α -KG 的影响。进而利用完全

相同的培养基, 在发酵罐中考察不同调节 pH 的物质对 α -KG 的产生及丙酮酸羧化酶和丙酮酸脱氢酶系活性的影响, 初步揭示了 α -KG 的形成机制。由于在多种有机酸发酵中都存在摇瓶产量低于发酵罐产量的现象, 本研究结果有可能为解释这一现象提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 菌种

光滑球拟酵母(*T. glabrata*) CCTCC M202019, 烟酸、生物素、硫胺素、盐酸吡哆醇 4 种维生素营养缺陷型菌株, 且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低, 为本研究室选育菌株^[3]。

1.2 培养基和培养方法

参见文献[3]。

1.3 分析方法

1.3.1 葡萄糖的测定 3,5-二硝基水杨酸法^[4]。

1.3.2 丙酮酸和 α -酮戊二酸的测定: 采用高压液相色谱(HPLC)测定^[3,5]。

色谱条件为 :StableBondC₁₈ 反相柱 ,柱温 :28℃ ,
检测器 :UV 210 nm ,流动相 0.1% H₃PO₄ ,流速 :1.0
mL/min ,进样体积 :10 μL。

1.3.3 丙酮酸羧化酶和丙酮酸脱氢酶活性的测定 :
根据文献 [6,7] 进行。将在 30℃ 下培养了 24 h 的细
胞用无菌水离心洗涤 3 次 ,然后悬浮在 pH 为 7.5 的
0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液中 ,用玻璃珠于 4℃ 下振
荡 5 min ,使细胞在悬浮液中混合均匀 ,于 4℃ 超声
波破碎 2 min ,工作强度为 30% ,工作 1 s 间隔 0.5 s ;
随后在 4℃、10000 r/min 下离心 3 min ,除去细胞碎
片 ,取上清液测定。

丙酮酸羧化酶(PC)活性的测定 :反应混合物中
含有 :pH 7.8 的 PBS 缓冲液 0.56 mL、蒸馏水 1.7
mL、0.5 mol/L NaHCO₃ 溶液 0.4 mL、0.1 mol/L MgCl₂
溶液 0.2 mL、1.0 mmol/L 的乙酰辅酶 A 溶液 0.4
mL、0.1 mol/L 5,5-二硫代二苯基安息香酸的乙醇溶
液 0.1 mL、1000 u/mL 的柠檬酸合成酶 0.02 mL、0.1
mol/L 的 ATP 溶液 0.2 mL、细胞抽提物 0.2 mL ,将上
述混合液于 30℃ 下保温 10 min。添加 0.2 mL 0.1
mol/L 的丙酮酸启动反应 ,反应 60 s 后添加 0.3 mL
的 1 mol/L 的 KOH 终止反应 ,然后用分光光度计在
415 nm 下检测草酰乙酸的生成量。根据标准曲线
计算出丙酮酸羧化酶的活性。1 个酶活单位表示为
1 min 内该酶催化产物生成的微摩尔数。

丙酮酸脱氢酶系(PDH)活性的测定 :反应混合
物中含有 :pH 7.8 磷酸钾缓冲液 1.0 mL、2.5 mmol/
L、NAD 0.2 mL、0.2 mmol/L 焦磷酸硫酸素 0.2 mL、
0.1 mmol/L 乙酰辅酶 A 0.4 mL、0.3 mmol/L 二硫苏

糖醇 0.1 mL、1 mmol/L 氯化镁 0.2 mL、1 mg/mL 牛血
清蛋白 0.1 mL、6 mmol/L 2-碘苯基-3-硝基苯氯化四
唑(INT)0.4 mL、0.1 mg/L 硫辛酰胺脱氢酶 0.1 mL、
细胞抽提物 0.5 mL。将上述混合液于 30℃ 保温 10
min 后添加 0.2 mL 5 mmol/L 丙酮酸启动反应 ,反应
60 s 后加入 0.5 mL 的 1 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液终止反
应 ,然后于 30℃ 下用分光光度计在 500 nm 下检测
INT 的减少量。1 个酶活单位表示为在 1 min 内该
酶催化底物减少的微摩尔数。

1.3.4 细胞干重(DCW)和蛋白质含量的测定 :分别
参见文献 [3] 和文献 [8]。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶与发酵罐生产丙酮酸的对比实验
在发酵罐中对培养基进行灭菌 ,接种混匀后 ,将
30 mL 已接种的培养基无菌转移至已灭菌的 500 mL
三角瓶中进行摇瓶培养 ,以考察培养基组成完全相
同的情况下发酵罐和摇瓶培养的差异。如表 1 所
示 ,当摇瓶和发酵罐中不调节 pH 时 ,细胞生长微
弱 ,丙酮酸积累也很少。在摇瓶中用 CaCO₃ 作为缓
冲剂时 ,细胞正常生长 ,丙酮酸大量积累 ,但同时也
产生了较高浓度(6.8 g/L)的 α-KG。在发酵罐培养
中 ,如果用 NaOH 调节 pH ,发酵液中 α-KG 浓度很
低。但如果改用 CaCO₃ 调节 pH ,发酵液中 α-KG 的
浓度则比用 NaOH 调节 pH 时增加了 8 倍。在发酵
罐和摇瓶培养中 ,用 CaCO₃ 调节 pH 时的 C_{PYR}/C_{KG}
值相近 ,表明 CaCO₃ 的添加对发酵液中 α-KG 的积累
有重要影响。

表 1 摇瓶和发酵罐上发酵的对照					
Table 1 Fermentation of pyruvate and α-KG and C _{PYR} /C _{KG} in fermentor and flask cultures					
	DCW(g/L)	Consumption of glucose(g/L)	Formation of pyruvate(g/L)	Formation of α-KG(g/L)	C _{PYR} /C _{KG} ^a
Flask (No CaCO ₃)	2.8	5.6	2.3	0	∞
Flask (CaCO ₃)	10.9	84.8	37.8	6.8	6.96
Fermentor (pH not controlled)	4.9	14.3	5.1	0	∞
Fermentor (pH controlled by NaOH)	14.8	90.7	69.4	1.3	67.2
Fermentor (pH controlled by CaCO ₃)	16.7	89.7	62.3	11.5	6.84

a : C_{PYR}/C_{KG} represents the ratio of carbon molecules in pyruvate and α-ketoglutarate.

2.2 CaCO₃ 添加时间和浓度对 α-KG 产生的影响
为了说明 CaCO₃ 的添加是否是导致 α-KG 产生
的主要因素 ,研究了 CaCO₃ 添加时间和浓度对 α-KG
产生的影响。在维生素浓度不变的前提下 ,延迟

CaCO₃ 添加时间可明显抑制 α-KG 的产生并提高
C_{PYR}/C_{KG} 值(图 1) ,而增加培养基中的 CaCO₃ 浓度会
导致 α-KG 的积累增加(表 2)。这些结果表明 CaCO₃
有可能以某种方式(如激活了 PDH 或 PC) ,使丙酮

酸进入 TCA 循环的通量增加。

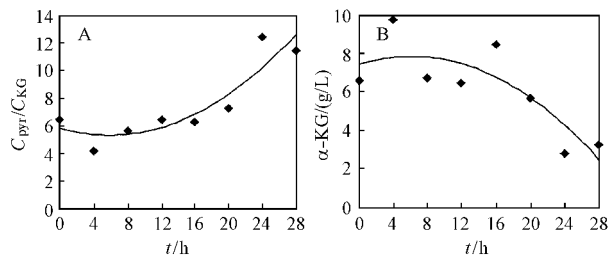


图 1 CaCO_3 (40 g/L) 添加时间对 α -KG 生成的影响
Fig. 1 Effect of feeding time of CaCO_3 (40 g/L) on pyruvate production

表 2 不同装液量下 CaCO_3 质量浓度对丙酮酸发酵的影响
Table 2 Effects of CaCO_3 concentrations on pyruvate production in different fermentation

Volume CaCO_3 /(g/L)	30 mL			50 mL	
	0	20	40	20	40
Final pH	2.1	3.9	5.1	3.9	5.0
DCW/(g/L)	3.8	12.1	17.3	13.4	15.3
Pyruvate/(g/L)	1.2	27.2	37.9	25.9	31.2
α -KG/(g/L)	0	3.6	15.8	3.2	9.9
Residual glucose/(g/L)	95.7	31.3	9.7	19.8	8.5
$C_{\text{Pyr}}/C_{\alpha\text{-KG}}$	∞	9.78	3.1	10.48	4.08

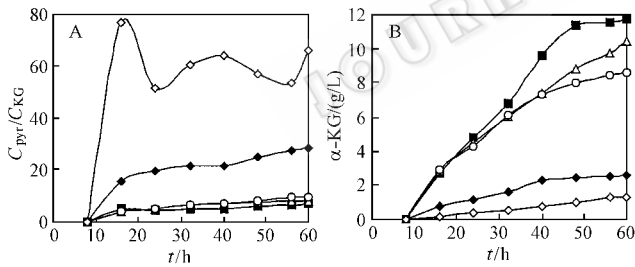


图 2 不同物质调节 pH 时对 α -KG 产生的影响
Fig. 2 Effects of different pH buffers on α -KG production
◆ Na_2CO_3 ; ■ CaCO_3 ; △ $\text{CaCl}_2 + \text{Na}_2\text{CO}_3$; ○ $\text{CaCl}_2 + \text{NaOH}$; ◇ NaOH

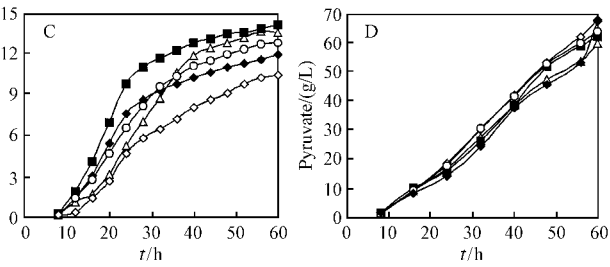
此外,在图 2(C)中发现,与用 NaOH 调节 pH 的发酵过程相比,当培养基中有大量 Ca^{2+} 存在时,细胞生长较快,最终细胞浓度也较高。这可能是因为 Ca^{2+} 作为细胞内的第二信使^[9],能够加速细胞的生长。此外,有 Ca^{2+} 存在时 α -KG 浓度较高,为合成更多细胞物质提供了可能,导致最终细胞量有所提高。

研究还发现用不同物质调节 pH 时对丙酮酸的积累速度和产量也有影响。如图 2(D)所示,当有 Ca^{2+} 存在时,由于细胞生长较快,丙酮酸积累速度也较快,但丙酮酸的产量有所下降。同时由于 α -KG 的产生,丙酮酸对葡萄糖得率有所下降(数据未给出)。

2.3 Ca^{2+} 、 CO_3^{2-} 对 α -KG 的影响

发酵液中 CaCO_3 的存在促进了 α -KG 的积累,但具体是 Ca^{2+} 还是 CO_3^{2-} 或者是两者共同促进了 α -KG 的积累呢?为了解释这一问题,作者设计了 5 种方法来自动控制 7 L 发酵罐(装液量 4 L)发酵过程的 pH:(1)流加 5 mol/L 的 NaOH;(2)流加 2.5 mol/L 的 Na_2CO_3 ;(3)流加 CaCO_3 悬浊液(150 g CaCO_3 /100 mL 水);(4)在发酵开始后流加浓度为 40% 的 CaCl_2 浓缩液,流加速度 25 mL/h,共流加 8 h,使发酵液中 CaCl_2 终浓度达到 20 g/L;同时流加 5 mol/L 的 NaOH;(5)在发酵开始后流加浓度为 40% 的 CaCl_2 浓缩液(流加方法同(4)),同时用 2.5 mol/L 的 Na_2CO_3 调节 pH。5 种情况下的发酵过程曲线如图 2 所示。

从图 2(A)可知,当用 NaOH 对发酵过程的 pH 进行调节时, $C_{\text{Pyr}}/C_{\alpha\text{-KG}}$ 值可保持在 50~60 之间;用 Na_2CO_3 调节 pH 时,发酵过程中的 $C_{\text{Pyr}}/C_{\alpha\text{-KG}}$ 值下降到 20~30。当用 CaCO_3 调节 pH 时,或者当发酵液中有大量 CaCl_2 存在、再用 NaOH 或 Na_2CO_3 调节 pH 时,发酵过程中的 $C_{\text{Pyr}}/C_{\alpha\text{-KG}}$ 值均低于 10。结合图 2(B)可以认为, Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} 都促进了 α -KG 的积累,其中 Ca^{2+} 对 α -KG 积累起主要促进作用。



2.4 硫胺素和生物素浓度对 α -KG 生成的影响

在菌株 *T. glabrata* CCTCC M202019 中,PDH 和 PC 是控制丙酮酸降解进入 TCA 循环的两个重要酶(系见图 3),其活性的高低决定了进入 TCA 循环碳流的多少。由于该菌株自身不能合成硫胺素(B_1)和生物素(Bio),因此该菌株胞内的 PDH 和 PC 活性可分别被培养基中的 B_1 和 Bio 浓度所控制。为了考察具体是哪个酶(系)影响 α -KG 的产生,作者在 CaCO_3 添加浓度为 40 g/L 的前提下,研究了不同 B_1 和 Bio 浓度对 α -KG 积累的影响。结果发现,改变培

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

培养基中 B_1 的浓度,对 α -KG 的积累、特别是对 $C_{PYR}/C_{\alpha-KG}$ 值没有影响(图 4A)。而增加培养基中 Bio 的浓度,则导致 α -KG 的浓度不断上升且 $C_{PYR}/C_{\alpha-KG}$ 值不断下降(图 4B)。由于 Bio 是 PC 的辅因子,据此可以认为 α -KG 的产生是由 PC 活性变化而引起的。

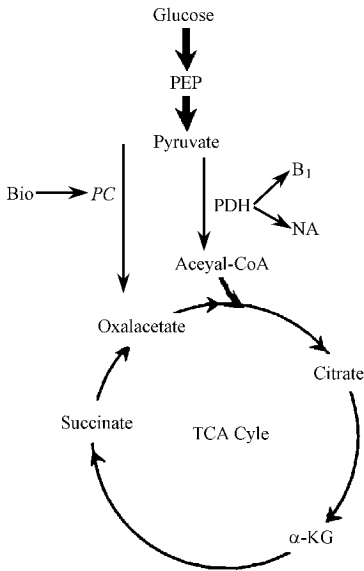


图 3 *Torulopsis glabrata* 丙酮酸代谢

Fig. 3 Pyruvate metabolism in *T. glabrata*

B_1 : Thiamin; NA: Nicotine acid; Bio: Biotin;

PC: Pyruvate carboxylase; PDH: Pyruvate dehydrogenase complex

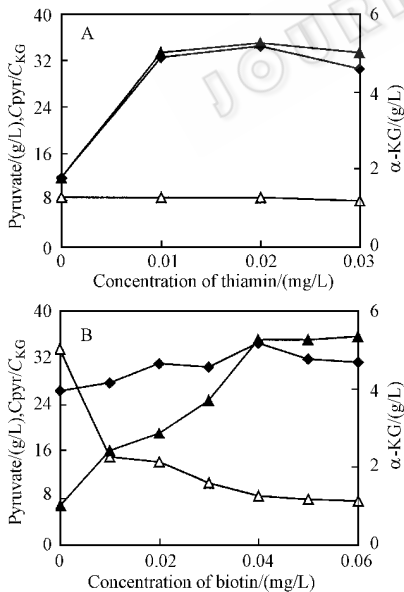


图 4 硫胺素、生物素浓度对 α -KG 积累的影响

Fig. 4 Effects of biotin and thiamin concentrations on α -KG production

The biotin and thiamine concentrations were fixed at 0.04 mg/L and 0.015 mg/L, respectively, in the experiments shown in Fig. 4A and Fig. 4B

◆ PYR; △ C_{PYR}/C_{KG} ; ▲ α -KG

2.5 采用不同调节 pH 物质对 PDC 和 PDH 活性的影响

维持培养基中维生素质量浓度不变,在发酵进行到细胞对数生长期时(20 h),测定采用不同物质调节发酵液中 pH 时细胞内 PC 和 PDH 活性的变化。结果发现(图 5),当有 Ca^{2+} 存在时,胞内 PC 的活性最高可提高 40%,而 PDH 的活性没有明显变化。表明 Ca^{2+} 可提高 PC 的活性,从而使丙酮酸通过丙酮酸羧化途径进入 TCA 循环的通量增加。由于 α -KG 脱氢酶亦以 B_1 为辅因子,在 B_1 限制的条件下, α -KG 脱氢酶活性也很低,由此导致发酵液中 α -KG 大量积累。已有研究发现 Ca^{2+} 能够加速肝细胞线粒体中的丙酮酸羧化反应^[10]。本文首次发现酵母的 PC 活性有可能被 Ca^{2+} 激活,为深入研究 Ca^{2+} 在微生物中的生理作用提供了一个重要证据。

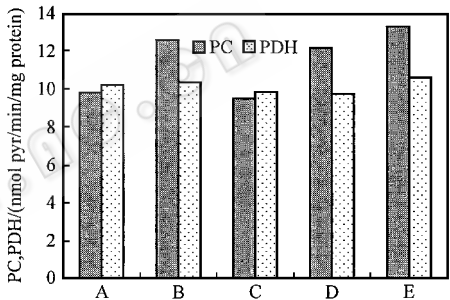


图 5 不同调节 pH 的物质对 PC 和 PDH 活性的影响

Fig. 5 Effects of different pH buffers on the activities of PC and PDH in *T. glabrata*

A. NaOH; B. NaOH + $CaCl_2$; C. Na_2CO_3 ;
D. Na_2CO_3 + $CaCl_2$; E. $CaCO_3$

REFERENCES(参考文献)

[1] Miyata R, Yonehara T. Improvement of fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata* IFO 0005. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82**: 475-479

[2] 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**: 680-685

[3] LIU L M (刘立明), LI Y (李寅), DU G C (堵国成) *et al*. Breeding of high-pyruvate-producing *Torulopsis glabrata* with acetate as supplement carbon source. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 2002, **32**(3): 10-14

[4] Miller G L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1960, **31**: 426-428

[5] Schreier H J, Smith T M, Bemlohr R W. Regulation of nitrogen catabolic enzymes in *Bacillus* spp. *J Bacteriol*, 1982, **151**(2): 971-975

yeast. *Baioisaiensu to Indasutori* (in Japanese), 1994 , **52** : 567 – 570

[7] Dunn M F , Encarnacion G , Araiza G *et al.* Pyruvate carboxylase from *Rhizobiummetli* : mutant characterization , nucleotide sequence , and physiological role. *J Bacteriol* , 1996 , **178** : 5960 – 5970

[8] NING Z X(宁正祥). Handbook of analysis of food component. Beijing : Chinese Light Industrial Press(中国轻工业出版社), 1998

[9] LU Q(卢青), LIU J I(刘冀琰), CHEN D Y(陈大元). The calcium signal of cytoplasm. *Chemistry of Life(生命的化学)*, 1999 , **19**(2) : 78 – 82

[10] Walajtys-Rhode E , Zapatero J , Moehren G *et al.* The role of the matrix calcium level in the enhancement of mitochondrial pyruvate carboxylation by glucagon pretreatment. *J Biol Chem* , 1992 , **267**(1) : 370 – 379

CaCO₃ Stimulates α -ketoglutarate Accumulation During Pyruvate Fermentation by *Torulopsis glabrata*

LIU Li-Ming^{1 2} LI Yin^{1 2} DU Guo-Cheng¹ CHEN Jian^{1 2 *}

¹(Key Lab of Industrial Biotechnology of Ministry of Education ,Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

²(Environmental Biotechnology lab , School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract A large amount of α -ketoglutarate (α -KG) (6.8 g/L) was accumulated in flask culture when CaCO₃ was used as a buffering agent in the production of pyruvate by multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019. In a 5 L jar-fermentor , less α -KG (1.3 g/L) was produced when NaOH was used to adjust the pH , while more α -KG (11.5 g/L) detected when CaCO₃ was used as the buffer. In the latter case , the molar carbon ratio of pyruvate to α -KG ($C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$) was similar to that obtained in flask culture , suggesting the accumulation of α -ketoglutarate was related to the addition of CaCO₃ . Furthermore , it was found that : (1) delaying the addition time of CaCO₃ decreased the α -ketoglutarate formation but increased $C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$; and (2) under vitamin limitation conditions increasing the concentration of CaCO₃ led to an increased α -KG accumulation at the expenses of pyruvate. To study which ions in CaCO₃ was responsible for the accumulation of α -KG , the effects of different pH buffers on the α -KG accumulation were studied. The level of α -KG was found to correlate with the levels of both Ca²⁺ and CO₃²⁻ , with Ca²⁺ played a dominant role and CO₃²⁻ played a minor role. To find out which pathway was responsible for the accumulation of α -KG , the effects of biotin and thiamine on α -KG accumulation was investigated. The increase in biotin concentration led to an increase in α -KG accumulation and a decrease in $C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$, while the levels of α -KG and $C_{\text{PYR}}/C_{\alpha\text{-KG}}$ were not affected by thiamine concentration. The activity of pyruvate carboxylase was increased as much as 40% when the medium was supplemented with Ca²⁺ . On the other hand , the activity of the pyruvate dehydrogenase complex was unaffected by the presence of Ca²⁺ . To conclude , the higher level of α -KG was caused by higher activity of pyruvate carboxylase stimulated by Ca²⁺ , with CO₃²⁻ served as the substrate of the reaction.

Key words *Torulopsis glabrata* , α -ketoglutarate , CaCO₃ , pyruvate carboxylase , pyruvate , production

Received : 04-29-2003

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2002072) and the Key Technologies R & D Program of Jiangsu Province of the 9th Five-Year Plan Period (No. BG98015-3).

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

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