

产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究*

王正祥 诸葛健 曹钰 陈珺 方慧英

(无锡轻工大学生物工程学院工业微生物研究中心 无锡 214036)

摘 要:本文对产甘油假丝酵母的甘油代谢关键酶进行了研究,发现产甘油假丝酵母同化甘油能力极弱,少量葡萄糖明显改善其同化甘油的能力;线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶受 3-磷酸甘油的强烈诱导,受葡萄糖代谢的阻遏。在甘油发酵过程中,产甘油假丝酵母胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活处于较高水平并在 36h 和 60h 时出现两次酶活高峰,其中第一次酶活峰值水平决定产甘油假丝酵母的甘油合成和积累水平,成为甘油高速积累期(18~48h)甘油合成的关键性的限速酶。在甘油发酵 18~48h 内,3-磷酸甘油酯酶的酶活处于高水平,并在 36h 时出现酶活峰值;处于缓慢甘油积累阶段的 48~72h 间,3-磷酸甘油酯酶已处于低水平表达,此时,3-磷酸甘油酯酶则成为甘油合成的限速酶。产甘油假丝酵母稳定并高表达其胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因并且其所表达的 3-磷酸甘油酯酶酶活远高于胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶这一特征是其高产甘油根本所在。

关键词:甘油,产甘油假丝酵母,线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶,胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶,3-磷酸甘油酯酶

中图分类号:Q939.5 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)02-0180-87

葡萄糖在经磷酸化和醛缩酶的作用下分解成 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮,前者经脱羧反应进入三羧酸循环或 EMP 途径,后者在 NAD^+ 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶催化下还原为 3-磷酸甘油,此为进入甘油合成分支途径中的第一步酶促反应。3-磷酸甘油再在 3-磷酸甘油酯酶的作用下脱磷酸根而形成甘油,此为甘油合成过程中的另一步也是最后一步酶促反应。细胞 NAD^+ 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶酶活水平将直接决定葡萄糖分解代谢过程中向甘油合成方向的物质流分配量,由此也决定甘油的生成水平。3-磷酸甘油酯酶的酶活水平高低将最终决定甘油的生成水平,3-磷酸甘油酯酶酶活水平过低将使甘油合成的代谢流不畅通,3-磷酸甘油可进入脂质合成或经 FAD 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶催化脱氢成磷酸二羟丙酮,重新进入三羧酸循环或 EMP 途径。在真核微生物中,催化磷酸二羟丙酮还原为 3-磷酸甘油的 NAD^+ 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶位于细胞浆中,所以又被称为胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶或 3-磷酸甘油脱氢酶(ctGPD);催化 3-磷酸甘油脱氢为磷酸二羟丙酮的 FAD^+ 依赖性 3-磷酸甘油脱氢酶位于线粒体内,故常称此酶为线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶(mtGPD)。现今的研究结果显示,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的 ctGPD 和 3-磷酸甘油酯酶(GPP)都至少具有两个同工酶,分别为 Gpd1p、Gpd2p 和

* 国家“九五”科技攻关计划资助项目(96-C03-03-03)

作者简介:王正祥(1964-),男(汉族),江苏盐城市人,无锡轻工大学生物工程学院教授,工学博士,出版著作 1 部,发表论文 55 篇,获科技进步奖 7 项,现主要从事极端环境微生物分子生物学和工业微生物育种科学研究

收稿日期:1998-11-09, **修回日期:**1999-07-05

Gpp1p、Gpp2p,其中 Gpd2p 和 Gpp1p 为组成型,Gpd1p 和 Gpp2p 为渗透压诱导型,细胞中的 ctGPD 和 GPP 活性以 Gpd1p、Gpp1p 为主^[1~4]。产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)是一株能够以 60% 以上的转化率将葡萄糖转化为甘油并在胞外积累高达 120 g/L 甘油的甘油高产工业生产菌株^[5]。本文通过对其在不同环境条件下的 mtGPD,ctGPD 和 GPP 酶活水平的分析,初步确定了 *C. glycerolgenesis* 高产甘油机理。

1 材料和方法

1.1 菌种

产甘油假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*),由我校发酵甘油研究设计中心提供^[5]。

1.2 培养基

1.2.1 基本培养基:酵母氮基 6.7g,葡萄糖 20g,定容至 1L。

1.2.2 高渗培养基:在基本培养基中补加 0.5mol/L 或 1.0mol/L 的 KCl 或甘露醇。

1.2.3 种子培养基:葡萄糖 100g,玉米浆 10mL,尿素 2g,定容至 1L。

1.2.4 发酵培养基:葡萄糖 250g,尿素 2g,玉米浆 5mL,定容至 1L。

1.3 发酵试验

在 250mL 三角烧瓶中装入 30mL 发酵培养基,接入种子液后于 31℃,110 次/min 振荡,培养 72~96h 不等。

1.4 菌体培养

用接种环从试管斜面上取菌种接于盛有 30mL 液体培养基的 250mL 三角瓶中,于 31℃,110 次/min 摇瓶培养 18h。取 1.5mL 种子培养液接入盛有 30mL 液体发酵培养基的 250mL 的三角瓶中,摇瓶发酵,定时取样,发酵液在 5000r/min 离心 5min,收集菌体和上清液用于后续试验。

1.5 用于酶活检测的细胞裂解物的制备

湿重为 0.25~0.5g 的细胞悬于 0.5mL 匀浆缓冲液(10mmol/L 三乙醇胺,1mmol/L DTT,1mmol/L EDTA,0.2mmol/L PMS,pH7.5)中,加入 1g 直径为 0.5mm 的玻璃珠于 -70℃ 的超低温的冰箱中冻融数次后于 4℃ 匀浆 5min,收获匀浆液,用 0.5mL 匀浆缓冲液洗涤玻璃珠,收获洗涤液,合并。匀浆瓶于 18,000 × g 下离心 15min。上清液过 G-25 柱脱盐。蛋白质含量用考马斯蓝染色法测定,以牛血清蛋白作为测定参照标准^[6]。将酶液稀释至含 1mg/mL 蛋白质后立即进行酶活检测。

1.6 胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活测定方法^[7~8]

胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶活性的检测在检测缓冲液(20mmol/L 咪唑-HCl, pH7.0, 1mmol/L DTT, 1mmol/L MgCl₂, 0.67mmol/L DHAP (Sigma), 0.09mmol/L NADH (BIB))中进行,反应以加入 DHAP 为 0 时,线性范围为 2min。酶促反应温度为 30℃。无 NADH 氧化酶本底,比色皿中蛋白质的浓度为 0.05~0.5mg/mL 范围内。在 340nm 处测定 30s 和 90s 时的吸光度,NADH 的吸光系数为 $6.2 \times 10^3 / \text{mol} \cdot \text{cm}$ 。一个单位酶活定义为一分钟消耗 1 μmol NADH 所需的酶量。

1.7 3-磷酸甘油酯酶酶活测定方法^[9]

取稀释好的浓度为 1mg/mL 的酶液 50 μL ,加入 0.2mol/L DL- α 磷酸甘油(Sigma)

10 μ L, 1mol/L pH7.0 咪唑 10 μ L, 0.25mol/L 氯化镁 10 μ L, 再加入 20 μ L 超纯水, 使得总体积为 0.1mL, 在 30 $^{\circ}$ C 的恒温水浴中反应到所需时间后加入 2mL 5% 的三氯乙酸终止反应, 然后振荡、离心 (10000 r/min) 10min, 取上清液测其无机磷含量。在 30 $^{\circ}$ C, pH7.0 的条件下, 每分钟催化 3-磷酸甘油生成 1 μ mol 磷酸根所需的酶量为 1 个单位(U)。

1.8 线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶酶活测定

按 Sprague 和 Cronan 介绍的方法加以改进^[10]线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶(mtGPD)酶活测定反应体系的组成为: 0.5mol/L Tris, pH7.6, 0.05mol/L DL- α -磷酸甘油(Sigma), 1mg/mL MTT, 1mg/mL PMS。酶促反应温度为 30 $^{\circ}$ C。在 550nm 处测定 MTT 还原产物, 用 $8.1 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 摩尔消光系数来计算底物转化速率。一个单位酶活定义为一分钟还原 1 μ mol MTT。

1.9 其他分析方法

甘油测定按文献^[11]介绍方法用变色酸法进行。还原糖测定按文献^[12]介绍方法用费林热滴定法进行。

2 结果

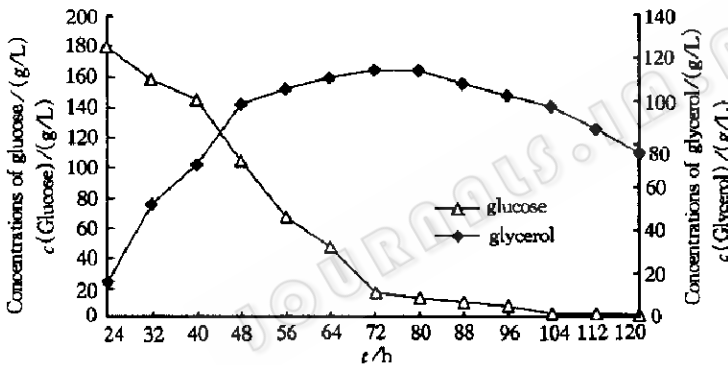


图 1 甘油生成及糖消耗与发酵时间的关系

Fig. 1 Time course of glycerol produced by *C. glycerolgenesis*

力的动态分析

250mL 的三角瓶装 30mL 发酵培养基, 以 10% 接种量接入种子, 摇瓶发酵。定时取样, 按上面所述的酶活测定方法测定 ctGPD 和 GPP 的酶活, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 在整个甘油发酵过程中, *C. glycerolgenesis* 皆具有较高水平的 ctGPD 酶活并在 36h 和 60h 时出现两次酶活峰值; *C. glycerolgenesis* 在 18~48h 间以最高速率积累甘油, 而在 48~72h 间甘油的积累速率明显降低。甘油发酵至 72h 之后, ctGPD 进入低水平阶段, 同化甘油的代谢占据主导地位。而在甘油发酵的 18~48h 内, GPP 的酶活处于高水平, 并在 36h 时出现酶活峰值。与 ctGPD 不同是, GPP 表达只出现一次表达峰值, 并且这一表达特征与 *C. glycerolgenesis* 以最高速率积累甘油在时间上相吻合, 因此, 在甘油发酵的初始阶段的 48h 内, 由于细胞中的 GPP 活性远高于 ctGPD, 经葡萄糖分解形成的磷酸二羟丙酮在 ctGPD 的催化下受氢还原为 3-磷酸甘油, 后者则在 GPP 的催化下迅速水解生成甘油, 并且在 ctGPD 第一次酶活峰值时, 甘油的比生成速率最大(表 1)。在这一阶段, 很显

2.1 甘油发酵试验

将新鲜种子液接入发酵培养基中, 发酵不同时间, 定时取样分析, 结果如图 1 所示。产甘油假丝酵母甘油积累过程大致可分为三个阶段, 即高速积累期(0~48h)、缓慢积累期(48~72h)、消耗期(72h~), 在发酵后期同化甘油明显。

2.2 发酵过程中胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶活

然,ctGPD 成为 *C. glycerol-gensis* 甘油合成的限速酶,ctGPD 在这一阶段的活力水平决定 *C. glycerol-gensis* 的甘油合成和积累水平。而处于缓慢甘油积累阶段的 48~72h 间,GPP 已处于低水平表达,虽然 ctGPD 的活酶水平处于整个发酵过程的最高值,但 GPP 降至较低水平并明显低于 ctGPD 的酶活水平,3-磷酸甘油在进入甘油合成代谢中处于过剩状态,一部分 3-磷酸甘油分流进入脂肪合成途径和 3-磷酸甘油穿梭。在这一阶段,甘油比生成速率也已明显降低(表 1)。因此,在这一阶段,GPP 则成为甘油合成的限速酶。

2.3 高渗胁迫对胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶表达的影响

将在基本培养基上摇瓶培养 18h 的细胞(不少于 0.3g)接入含不同浓度的氯化钾、甘露醇的高渗培养基上,30℃ 孵育 1.3h 后,分别离心收集菌体,按上述方法测定 ctGPD 和 GPP 的酶活,结果见表 2。

从表 2 可以看出,在环境渗透压的胁迫下,*C. glycerol-gensis* 的 ctGPD 和 GPP 活性水平发生改变。在以 KCl 作为渗透压溶质的作用下,ctGPD 和 GPP 活性皆有提高,但 GPP 活性诱导表达较 ctGPD 低;在以甘露醇作为渗透压溶质的作用下,ctGPD 活性水平显著提高而 GPP 活性没有改变。

2.4 发酵过程线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶表达特征

在发酵条件下定时取样分析发酵液中甘油浓度,残糖水平以及产甘油假丝酵母 mtGPD 酶活水平,结果如图 2 所示。

表 1 甘油合成过程中甘油合成关键酶活力和甘油比生成速率
Table 1 Specific activities of key enzymes and specific rate of glycerol formation in *C. glycerol-gensis*

Time/h	Specific activity of ctGPD/(mU/mg Pr)	Specific activity of GPP/(mU/mg Pr)	Specific rate of glycerol formation/(g/L/h/OD biomass)
12	29.1	180.9	-
18	41.8	200.1	0.089
24	43.2	241.5	0.199
30	58.8	280.3	0.428
36	68.0	310.8	0.446
42	64.7	259.6	0.273
48	60.5	165.5	0.253
54	80.6	69.8	0.035
60	94.7	56.6	0.038
66	76.1	56.3	0.021
72	48.0	48.6	0.020
78	49.8	47.5	-1.161
84	42.5	45.4	-1.159

表 2 高渗胁迫下胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶和 3-磷酸甘油酯酶活性
Table 2 Specific activities of ctGPD and GPP under osmotic stress

Treatment by high osmolarity	Specific activity of ctGPD/(mU/mg Pr)		Specific activity of GPP/(mU/mg Pr)	
	1h	3h	1h	3h
0	201.5	110.4	181.1	150.0
0.5mol/L KCl	247.2	220.8	160.0	226.7
1.0mol/L KCl	250.5	250.8	157.4	187.1
0.5mol/L Mannitol	224.0	168.9	175.7	143.9
1.0mol/L Mannitol	249.7	160.8	168.4	148.2

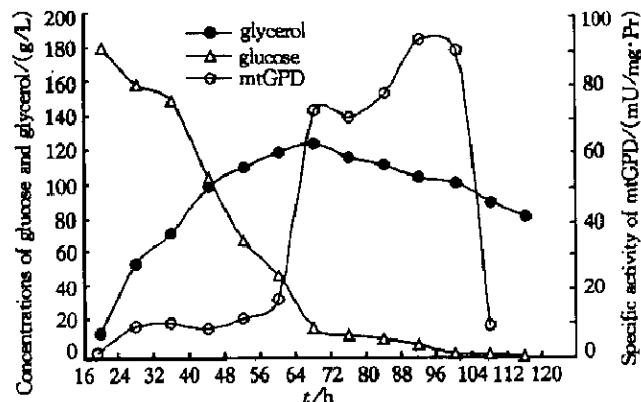


图 2 发酵过程线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶活变化特征
Fig. 2 Specific activity of mtGPD during glycerol formation

可以看出, *C. glycerolgenesis* 在甘油发酵的早期及中期几乎无 mtGPD 酶活, 在发酵液糖浓度降至 40g/L 以下时开始被诱导。随着 mtGPD 的诱导, 发酵液的甘油含量开始下降, 到发酵末期或延长发酵时间, 甘油浓度会进一步降低, 而此时的 mtGPD 酶活已很低, 甘油被消耗的一个可能的原因是甘油走向脂类合成或其他保护性物质的合成中。

2.5 甘油及 3-磷酸甘油对线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶基因表达的诱导作用

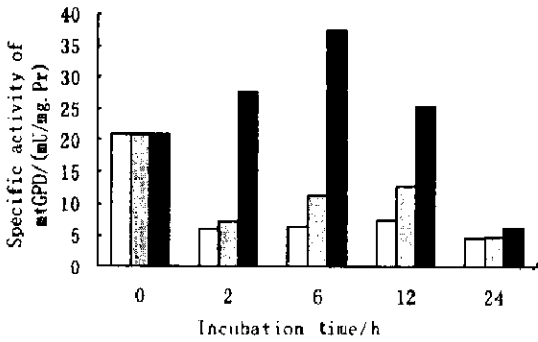


图 3 不同底物对线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶的诱导作用

Fig. 3 Induction of different substances to mtGPD

- 100g/L glycerol a sole carbon source
- ▨ 100g/L glucose and 20g/L glycerol as carbon sources
- 20g/L glycerol-3-phosphate as a sole carbon source

培养 24h 的 *C. glycerolgenesis* 离心收集后, 用无菌生理盐水洗涤, 接入以 100g/L 甘油为唯一碳源基本培养基中和含 20g/L 葡萄糖和 100g/L 甘油的基本培养基中, 于 30℃, 250r/min 下进行摇瓶培养, 分别于 4h, 8h, 12h, 24h 取样分析 mtGPD 酶活水平, 结果如图 3 所示。可以看出, 甘油对 mtGPD 基因的表达存在诱导作用, 但这一诱导作用明显受葡萄糖存在的影响, 仅以甘油为唯一碳源, 经过 24h 后, mtGPD 酶活才有轻度提高。当少量葡萄糖存在时, 经 6h 的诱导后, mtGPD 酶活便达到最高峰。

3-磷酸甘油对 mtGPD 的表达具有强烈的诱导作用, 与 3-磷酸甘油温育 24h 后, 呈现出 mtGPD 高水平的表达(图 3)。

3 讨论

在研究酵母细胞耐高渗透压的机理中, 主要是以 *S. cerevisiae* 为研究对象。大量的研究已揭示处于渗透压胁迫下的酵母细胞会增加甘油的合成和胞内甘油的积累^[13~16], 同样, 甘油合成的关键酶——ctGPD 的活力水平显著提高, 增幅达 3~6 倍, 甚至 30 倍以上^[17~19]。但这一受渗透压胁迫后的 ctGPD 酶活的提高可以被放线菌酮抑制; 同样, 运用免疫印迹法研究 ctGPD 表达量, 发现其量的增加与其活力的提高相平行^[18]。所有这些结果都有力地证明酵母细胞在渗透压胁迫下会诱导表达出更多的 ctGPD 以合成更多的甘油。大量的研究还显示, 不同的渗透压溶质对 *S. cerevisiae* 的渗透压胁迫多会得出如上相似的结果。因此, *S. cerevisiae* 对渗透压溶质引起的高渗环境的应答是对渗透压改变的应答。这一酵母细胞对外界高渗环境产生应答导致胞内甘油合成增加的过程受多个基因的调节和控制, 这一调节和控制过程现被称为高渗甘油应答途径(High Osmolarity Glycerol Response Pathway, 简称 HOG 途径)^[20~21]。HOG 途径中重要的靶基因已被克隆的有 *GPD1*^[3]、*STT1*^[22] 和 *GPP2*^[1], 其中 *GPD1* 和 *GPP2* 基因为细胞在高渗透压下甘油合成所必需。但在对耐盐酵母 *Debaryomyces hansenii* 的研究中则发现, *D. hansenii* 在普通培养基中的胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活为 144 ± 7.0mU, 经在含 70g/L 的氯化钠培养基中培养后, 其胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶酶活提高到 256 ± 5.6mU, 酶活仅提高 0.7 倍^[23]; 同样, 在对另一耐盐酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 的研究中更发现, 经 1mol/L 氯化钠诱导

后,其 ctGPD 酶活仅提高 0.5 倍^[24]。本研究中,*C. glycerolgenesis* 所能表达的 ctGPD 基础酶活比已有广泛研究的不耐高渗透压的 *S. cerevisiae* 和耐高渗透压的 *Z. rouxii* 等都要高,而高渗环境的胁迫对 *C. glycerolgenesis* 的 ctGPD 活性影响则与 *D. hansenii* 和 *Z. rouxii* 相似。因此,作者认为,*C. glycerolgenesis* 稳定并高表达其 ctGPD 编码基因并且其 GPP 酶活远高于 ctGPD 这一特征是高产甘油根本所在。另外,与不耐高渗透压的 *S. cerevisiae* 不同的是,*C. glycerolgenesis* (包括 *D. hansenii*, *Z. rouxii*) 在高渗环境作用下其 ctGPD 酶活变化远不如 *S. cerevisiae* 明显,表明耐高渗透压酵母的耐高渗透压机理远较细胞内积累甘油等相容性溶质复杂。

许多微生物都能利用甘油进行生长,在绝大多数酵母、大多数细菌和哺乳动物细胞中,甘油分解代谢途径是在甘油激酶的作用下将甘油转化成 3-磷酸甘油,再在 3-磷酸甘油脱氢酶的催化下脱氢生成磷酸二羟丙酮参与能量代谢。甘油激酶位于细胞质中,3-磷酸甘油脱氢酶在原核生物中位于细胞膜上,在真核生物中位于线粒体内膜上。这两种酶均受葡萄糖的分解代谢阻遏,其中 3-磷酸甘油脱氢酶还受甘油的诱导^[25]。在真核微生物细胞分解代谢甘油的过程中,3-磷酸甘油进入线粒体内,经线粒体内膜外侧上的线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶催化脱氢而形成磷酸二羟丙酮,再排出线粒体(也有称此过程为 G3P 穿梭)。位于线粒体内膜上的 3-磷酸甘油脱氢酶为 FAD 依赖性。

在酵母或霉菌中存在着不利用甘油的一类突变株,这类突变株是由于细胞质基因突变使线粒体 DNA 发生突变引起的^[26~28],其线粒体内膜上的 3-磷酸甘油脱氢酶活力大幅度降低,因而其利用甘油的途径被阻断或抑制。*C. glycerolgenesis* 在发酵后期糖浓度降至 20~30g/L 时,开始利用甘油。对 *C. glycerolgenesis* 的 mtGPD 进行分析的结果表明,mtGPD 受甘油的诱导,但这一诱导作用在以甘油为唯一碳源的情况下不十分明显,表明 *C. glycerolgenesis* 对甘油的同化能力不高,这一结果也预示 *C. glycerolgenesis* 的甘油激酶,甘油脱氢酶或二羟丙酮激酶基因受甘油诱导表达不显著。甘油诱导作用在有低浓度葡萄糖存在时得到明显加强的可能原因是葡萄糖代谢产生 ATP 可为甘油的磷酸化提供必需的能量支持,同时,低浓度葡萄糖的分解代谢产物已不再对线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶的表达产生阻遏作用,并且葡萄糖代谢产生的 3-磷酸甘油可对 mtGPD 基因表达产生强烈的诱导作用。这可从图 3 的实验结果得到进一步证实,*C. glycerolgenesis* 的 mtGPD 的表达主要受 3-磷酸甘油的诱导,这与在 *Bacillus subtilis* 观察到的结果不同。在 *B. subtilis* 中,甘油对其 3-磷酸甘油脱氢酶有强烈诱导作用^[29]。事实上,在甘油发酵的中后期,*C. glycerolgenesis* 胞内的 3-磷酸甘油由于 GPP 酶活水平降低而处于相对过剩状态(表 1),只是由于葡萄糖代谢产物的阻遏作用而使 mtGPD 的表达处于较低的水平。当葡萄糖分解代谢产物的阻遏作用消除后,mtGPD 受 3-磷酸甘油的诱导而高表达,细胞则主要通过 3-磷酸甘油穿梭获取能量并带动甘油的分解代谢。因此,有效控制发酵后期 *C. glycerolgenesis* 胞内 3-磷酸甘油的含量一方面可以控制甘油的分解代谢并有可能进一步提高甘油的产量,而要做到这一点,3-磷酸甘油酯酶基因的表达及其表达产物活力维持是至关重要的。当然,通过诱发线粒体 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因或甘油激酶编码基因的缺失突变也可以达到减少甚至消除 *C. glycerolgenesis* 在甘油发酵后期同化甘油的作用。

致谢 本研究得到日本富山县立大学刘吉泉博士的大力帮助,本校王晓晴硕士,陈德兆副教授曾参与部分研究工作,特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Norbeck J, Polman A-K, Akhtar N, *et al.* *J Biol Chem*, 1996, **271**:13875~13881.
- [2] Ansell R, Granath K, Hohmann S, *et al.* *EMBO J.* 1997, **16**: 2179~2197.
- [3] Albertyn J, Hohmann S, Thevelei N J M, *et al.* *Mol Cell Biol*, 1994, **14**:4135~4144.
- [4] Bjorkqvist S, Ansell R, Adler L, *et al.* *J Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 128~132.
- [5] 王正祥 诸葛健 方慧英. 微生物学报, 1999, **39**(1): 68~74.
- [6] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~254.
- [7] Blomberg A, Adler L. *J Bacteriol*, 1989, **171**:1087~1092.
- [8] Andre L, Hemming A, Adler L. *FEMS Letters*, 1991, **286**: 13~17.
- [9] Gancedo C, Gancedo J M, Sols A. *European J Biochem*, 1968, **5**: 165~172.
- [10] Sprague G F, Cronan Jr J E. *J Bacteriol*, 1977, **129**: 1335~1342.
- [11] Miller G L, Blum R, Glennon W E, *et al.* *Anal Biochem*, 1960, **2**: 127~132.
- [12] Lambert M & Neish A C. *Can J Research*, 1950, **28**: 83~89.
- [13] Brown A D. *Adv Microbial Physiol*, 1978, **17**: 181~243.
- [14] Blomberg A, Adler L. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 1087~1092.
- [15] Meikle A J, Reed R H, Gadd G M. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 3049~3060.
- [16] Reed R H, Chudek J A, Foster R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**: 2119~2123.
- [17] Gancedo C, Gancedo J M, Sols A. *J Biochem*, 1968, **5**: 165~172.
- [18] Edgley M, Brown A D. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 3453~3463.
- [19] Andre L, Hemming A, Adler L. *FEBS Letters*, 1991, **286**: 13~17.
- [20] Brewster J L, Devaloir T, Dwyer N C, *et al.* *Science*, 1993, **259**, 1760~1763.
- [21] 诸葛健 王正祥. 微生物学报, 1999, **39**(1):91~93.
- [22] Schuller C, Brewster J L, Alexander M R, *et al.* *EMBO J*, 1994, **13**: 4382~4389.
- [23] Adler L, Blomberg A, Nilsson A. *J Bacteriol*, 1985, **162**: 300~306.
- [24] Ohshiro K, Yagi T. *J Gen Appl Microbiol*, 1996, **42**:201~212.
- [25] Yamada K, Yani Y. *Agric Biol Chem*, 1987, **51**:2401~2407.
- [26] Visser J, van Rooijen R, Dijkema C, *et al.* *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 655~665.
- [27] O'Connor-Cox E S C, Lodolo E J, Axcell B C. *J Inst Brew*, 1996, **102**: 19~25.
- [28] Ohsiro K, Yagi T. *J Gen Appl Microbiol*, 1996, **42**: 201~212.
- [29] Wehtje C, Beijer L, Nilsson R-P, *et al.* *Microbiology*, 1995, **141**: 1193~1198.

THE KEY ENZYMES OF METABOLISMS OF GLYCEROL IN *CANDIDA GLYCEROLGENESIS* *

Wang Zhengxiang Zhuge Jian Cao Yu Chen Jun Fang Huiying

(Research Center of Microorganisms, School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: The specific enzymes for glycerol formation and dissimilation in *Candida glycerolgenesis* were studied. *C. glycerolgenesis* hardly assimilated glycerol without glucose and a

little amount of glucose remarkably stimulated this dissimilation pathway and the activity and expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase was induced strongly by glycerol-3-phosphate and repressed by glucose metabolism. During glycerol production fermented by *C. glycerolgenesis*, the activity of cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase maintained at a higher level and existed two peaks of activity, which appeared at 36h and 60h, respectively. The activity level of the first activity peak determines glycerol productivity and becomes a key enzyme of glycerol formation. The activity of glycerol 3-phosphatase maintained at a higher level just between 18h and 48h and appeared on peak activity at 36h. In that period, the activity of glycerol 3-phosphatase was up to more than two times of cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase and that was inoculated with the phase of rapid accumulation of glycerol during glycerol production by *C. glycerolgenesis*. In the phase of slowly accumulation of glycerol between 48h and 72h, the activity of glycerol 3-phosphatase decreased below that of cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase. So, cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase is a key enzyme of glycerol formation in the phase of rapid accumulation of glycerol and glycerol 3-phosphatase becomes a more effective factor after glycerol fermentation reached into slowly accumulation phase. In a conclusion, it is a fundamental for *C. glycerolgenesis* over-producing high level of glycerol that its cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase maintains at high activity and the activity of glycerol 3-phosphatase is much higher than that of cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase.

Key words: Glycerol; *Candida glycerolgenesis*; Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase; cytoplasmic glycerol 3-phosphate dehydrogenase; glycerol 3-phosphatase

* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-C03-03-03)