

维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用^{*}

李寅 陈坚^{**} 伦世仪

(无锡轻工大学 生物工程学院 环境生物技术研究室 无锡 214036)

芮新生

(常州曙光化工厂 常州 213016)

摘要 研究了烟酸、硫胺素、吡哆醇、生物素和核黄素对一株光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) WSH-IP303 以葡萄糖为碳源、以氯化铵为唯一氮源生产丙酮酸的影响。利用正交试验方法,确证了硫胺素是影响 WSH-IP303 生产丙酮酸的最重要因素。在硫胺素浓度一定(0.01~0.015mg/L)的前提下,提高烟酸浓度有助于加快耗糖速度。当烟酸、硫胺素、吡哆醇、生物素和核黄素的浓度分别为 8、0.015、0.4、0.04 和 0.1mg/L 时,摇瓶发酵 48h,丙酮酸产量和产率可分别达到 52.4g/L 和 0.525g/g。采用优化的维生素组合方式,进行 2.5L 罐分批发酵,在初糖浓度 120g/L 的条件下发酵 57.5h,丙酮酸产量和产率分别达到 69.4g/L 和 0.593g/g,分别比摇瓶培养的最好结果提高了 32.4% 和 13%。

关键词 丙酮酸,光滑球拟酵母,硫胺素,烟酸,培养

中图分类号 :TQ921.7 **文献标识码** :B **文章编号** :0001-6209(2000)05-0528-34

丙酮酸是糖代谢途径中最重要的中间产物,是多种氨基酸、维生素及其它一些有用物质的重要前体,在化工、制药及农用化学品工业中有着广泛的用途。目前市场上的丙酮酸产品多为化工合成,价格较高,限制了以丙酮酸为原料的产品(如左旋多巴、色氨酸和酪氨酸)的发展,因此,采用发酵法生产丙酮酸,以求降低其生产成本,对推动丙酮酸及其相关工业的发展,意义重大。

发酵法生产丙酮酸的研究始于本世纪 50 年代。由于丙酮酸在代谢途径中所处的特殊地位,使得丙酮酸高产菌株的选育十分困难。在关于发酵法生产丙酮酸的众多论文和专利中,Miyata 和 Yonehara^[1,2]报道的 *Torulopsis glabrata* IFO0005 经 63h 流加发酵,丙酮酸产量达 67.8g/L(对葡萄糖产率 0.494g/g)和 Yokota^[3]报道的缺乏 F₁-ATP 酶活力的 *E. coli* 经 24h 发酵,丙酮酸产量达 30g/L(对葡萄糖产率 0.6g/g),是目前该领域研究的最高水平。国内在发酵法生产丙酮酸上尚属空白。根据切断丙酮酸降解途径,从而使其大量积累的研究思路,筛选获得一株光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) WSH-IP303,该菌株是烟酸、硫胺素、吡哆醇和生物素四种维生素的营养缺陷型,与 *T. glabrata* IFO0005^[1,2]相比,该菌株的独特之处在于能够很好地利用无机氮源(如氯化铵和尿素)。本文首先考察了不同维生素浓度组合对 WSH-IP303 过量合成丙酮酸的影响,发现硫胺素

^{*} 江苏省“九五”工业重大科技攻关项目(BG98015-3)

^{**} 责任作者

作者简介 李寅(1974-),男,上海人,无锡轻工大学生物工程学院博士,讲师,主要从事生化工程和环境生物技术研究

收稿日期 :1999-05-07,**修回日期** :1999-07-12© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

是最重要的影响因素,并得到了较优的维生素浓度组合。然后,采用优化的维生素供给方式,在 2.5L 罐上分批发酵 57.5h,丙酮酸产量达 69.4g/L(对葡萄糖产率 0.593g/g),初步实现了丙酮酸发酵过程高产量和高产率的统一。

1 材料和方法

1.1 菌种

光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*) WSH-IP303 是本研究室筛选得到的一株丙酮酸积累株 WSH-IP12^[4]经再次诱变筛选获得,保留原有遗传标记(硫胺素、生物素、烟酸和吡哆醇的营养缺陷型),其特点是能利用氯化铵或尿素为唯一氮源进行生长和产酸。

1.2 培养基

1.2.1 斜面 and 种子培养基 :葡萄糖 20g,蛋白胨 10g,KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g,琼脂 20g(斜面用),pH5.5,自来水定容至 1L。

1.2.1 发酵培养基 :葡萄糖 100g,NH₄Cl 7g,KH₂PO₄ 5g, KCl 5g,MgSO₄·7H₂O 0.8g, CaCO₃ 40g(摇瓶时添加),pH5.0,自来水定容至 1L。烟酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醇、生物素和核黄素根据实验需要添加。

1.3 培养方法

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(50mL/500mL 锥形瓶),在 30℃、200r/min 下培养 12h 后,以 10% 接种量接入发酵培养基。摇瓶发酵装液量为 50mL/500mL 锥形瓶,转速 220r/min,发酵时间如无特指均为 48h。分批发酵时,2.5L 发酵罐装液量 1.5L,通气量 1.5L/min,用 5mol/L NaOH 控制 pH5.0。发酵温度均为 30℃。

1.4 分析方法

4mL 发酵液在 8000r/min 下离心 5min 后,上清液分别用乳酸脱氢酶法^[5]、苯酚-硝普盐法^[6]和 3,5-二硝基水杨酸法分析丙酮酸浓度、铵离子浓度和葡萄糖浓度。在摇瓶发酵液离心得到的菌体中加入 2mL 2mol/L 的盐酸(上罐不用加),溶解沉淀中的 CaCO₃,离心弃去上清液后用蒸馏水洗涤两次,菌体在 90℃ 下烘干至恒重后称重。发酵过程中乙醇浓度用本研究室研制的乙醇浓度监测仪^[7]在线监测。

2 结果和讨论

2.1 维生素对 WSH-IP303 过量合成丙酮酸的影响

2.1.1 WSH-IP303 过量合成丙酮酸的生理学依据 :微生物过量合成丙酮酸研究的两个主要目标是 : (1) 在保证细胞正常生命活动的前提下,尽可能减少丙酮酸的降解或转化,这是获得丙酮酸的高产量和高产率的必要条件 ; (2) 加速从葡萄糖到丙酮酸的代谢,以确保获得丙酮酸的高生产强度。分析丙酮酸在细胞中的代谢途径(图 1)可以发现,丙酮酸脱氢酶系(PDH)、丙酮酸脱羧酶(PDC)、丙酮酸羧化酶(PC)和转氨酶负责丙酮酸的降解,若能使微生物细胞中这四种酶的活性减弱(而不是完全丧失),就有可能使丙酮酸得以大量积累。根据这一思路,经不断筛选和物理、化学诱变,得到了一株光滑球拟酵母 WSH-IP303,该菌株不能合成硫胺素、烟酸、生物素和吡哆醇,这四种维生素分别是 PDH、PDC、PC 和转氨酶的辅因子,在发酵培养基中控制这些维生素处于亚适量水平,就有可能使

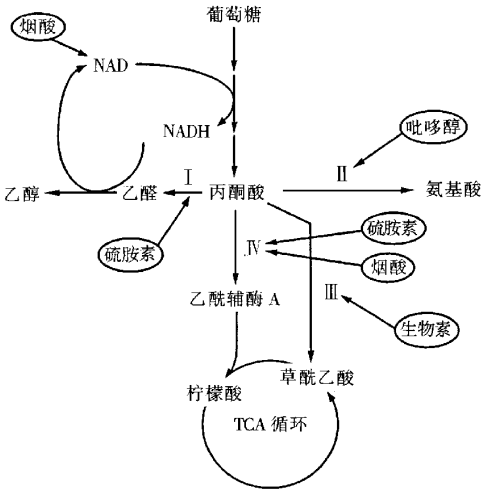


图 1 WSH-IP303 中丙酮酸的代谢途径

Fig. 1 Metabolism pathway of pyruvic acid in *T. glabrata* WSH-IP303

I :Pyruvate Decarboxylase ; II :Transaminase ;
III :Pyruvate Carboxylase ; IV :Pyruvate Dehydrogenase Complex.

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素水平表

Table 1 Level table of factors in $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment

Factor \ Level	1	2	3	4
A :Nicotinic acids/(mg/L)	2	4	6	8
B :Thiamine/(mg/L)	0.01	0.02	0.03	0.04
C :Pyridoxine/(mg/L)	0.1	0.2	0.3	0.4
D :Biotin/(mg/L)	0.01	0.02	0.03	0.04
E :Riboflavin/(mg/L)	0	0.05	0.1	0.15

素也会促进 WSH-IP303 产酸,究其原因,有可能是核黄素的添加加速了电子传递,从而加快酵解。为了考察这五种维生素对丙酮酸发酵的影响,作者按照 $L_{16}(4^5)$ 正交试验因素水平表(表 1)安排正交试验(表 2),其中各种维生素的浓度范围是通过前期的单因素试验确定的。具体实验方案及结果见表 2。

表 2 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果*

Table 2 Results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal experiment*

No. \ Factor	A	B	C	D	E	Growth (OD_{660}) **	Pyruvic acid/(g/L)	Glucose consumption/(g/L)	Pyruvic acid yield/(g/g)
1	1	1	1	1	1	0.268	30.8	56.3	0.549
2	1	2	2	2	2	0.402	38.7	80.2	0.482
3	1	3	3	3	3	0.474	42.3	95.6	0.443
4	1	4	4	4	4	0.514	32.0	97.7	0.327
5	2	1	2	3	4	0.308	32.2	59.3	0.542
6	2	2	1	4	3	0.427	47.7	89.0	0.536

WSH-IP303 中负责丙酮酸降解的酶的活性很低,从而实现丙酮酸的过量合成。此外,由于烟酸是 EMP 途径氢载体 NAD 的前体,增大烟酸浓度,又有可能加快糖的酵解速度,因此,维持这四种维生素间的浓度平衡,对丙酮酸过量合成非常重要。

2.1.2 维生素对 WSH-IP303 过量合成丙酮酸的影响 :Miyata^[1] 曾经研究过维生素对 *Torulopsis glabrata* IFO0005 发酵生产丙酮酸的影响。以大豆水解液和硫酸铵为混合氮源时,Miyata 用单因素试验确定了烟酸、吡哆醇、硫胺素和生物素的最适浓度,并认为烟酸是 IFO0005 生产丙酮酸最重要的维生素。实际上,由于有机氮源中或多或少含有一些维生素,因此,在有机氮源存在下,研究维生素对丙酮酸生产的影响的结果并不可靠。此外,单因素试验也无法阐明各种维生素影响相互间的关系。

WSH-IP303 和 IFO0005 具有相似的遗传标记,但 WSH-IP303 的优点在于能够很好地利用氯化铵或尿素为唯一氮源生长和产酸,这是实现工业化的有利条件,也使得观察维生素的影响变得十分容易。作者发现,除了烟酸、吡哆醇、硫胺素和生物素之外,适宜浓度的核黄

续表 2

7	2	3	4	1	2	0.583	36.3	97.6	0.372
8	2	4	3	2	1	0.613	26.8	97.6	0.275
9	3	1	3	4	2	0.296	31.3	56.9	0.550
10	3	2	4	3	1	0.482	46.0	96.9	0.475
11	3	3	1	2	4	0.580	28.8	97.7	0.294
12	3	4	2	1	3	0.626	27.1	97.7	0.278
13	4	1	4	2	3	0.291	35.4	58.2	0.608
14	4	2	3	1	4	0.481	40.9	97.0	0.421
15	4	3	2	4	1	0.569	35.1	97.6	0.360
16	4	4	1	3	2	0.595	20.3	97.7	0.208

* All the data was the average value of two same samples. **data determined after diluting 100 times.

从正交试验的直观分析图(图 2)可以看出,在所选择的浓度范围内:(1)硫胺素是影响 WSH-IP303 细胞生长、葡萄糖消耗及产酸的最重要因素;(2)增大吡哆醇、生物素和核黄素的浓度,对细胞生长和葡萄糖消耗没有显著影响,但对产酸有一定的促进作用;(3)增大烟酸浓度可促进耗糖,但不利于产酸。据此,若将硫胺素的量控制在一个比较低的水平(0.02mg/L 以下),而将吡哆醇、生物素和核黄素的量控制在最适水平,同时适当增加烟酸浓度,有可能在保持较高产率的基础上,提高葡萄糖消耗速度,从而提高生产强度。

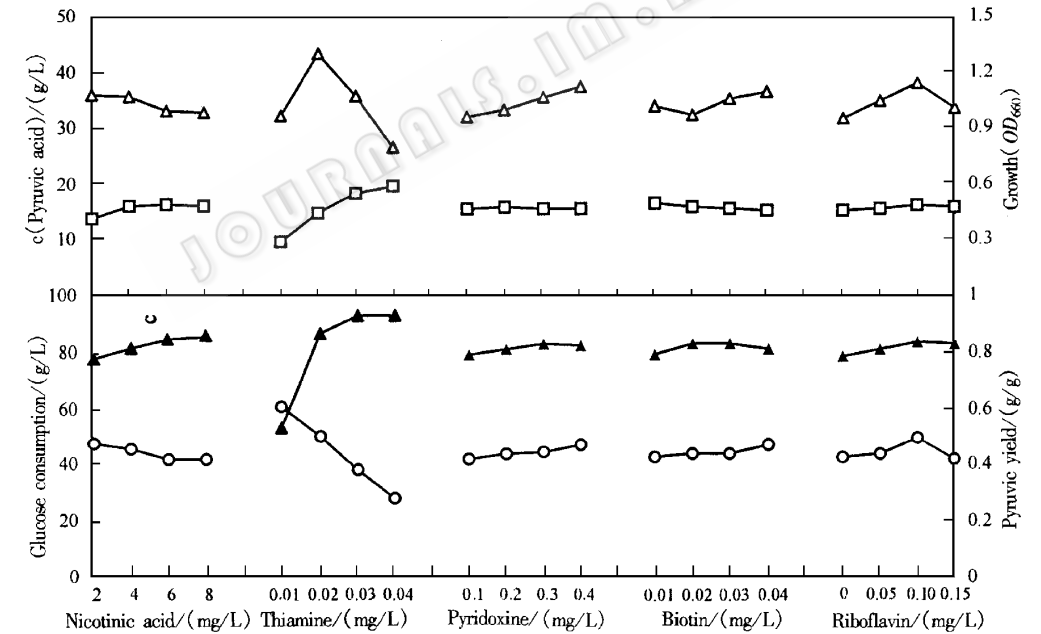


图 2 正交试验直观分析*

Fig.2 Audio-visual analysis of the orthogonal experiment*

△ Pyruvic acid ; □ Cell growth ; ▲ Glucose consumption ; ○ Pyruvic acid yield

* The data of OD₆₆₀ was determined after diluting 100 times.

对正交试验结果进行极差分析,分别得到了针对丙酮酸高产量和高产率的维生素最优组合。除了硫胺素浓度分别为 0.02 和 0.01mg/L 以外,其它四种维生素浓度为(mg/

L) 烟酸 2,吡哆醇 0.4,生物素 0.04,核黄素 0.1。作者对以上最佳组合进行实验验证,同时,在保持吡哆醇、生物素和核黄素浓度不变的基础上,适当变化烟酸和硫胺素的浓度,考察烟酸和硫胺素水平对丙酮酸合成的协同作用,结果示于表 3。

表 3 针对丙酮酸高产量和高产率的维生素组合验证及烟酸和硫胺素临界浓度的确定*

Table 3 Experimental results by using the optimized combination of factors and the confirmation of the critical concentration of nicotinic acid and thiamine*

Nicotinic acid/(mg/L)	Thiamine /(mg/L)	Pyridoxine /(mg/L)	Biotin /(mg/L)	Riboflavin /(mg/L)	Cell growth (OD ₆₆₀)*	Residual glucose/(g/L)	Pyruvic acid/(g/L)	Pyruvic acid yield/(g/g)
2	0.01	0.4	0.04	0.1	0.303	38.9	37.5	0.614
4	0.01	0.4	0.04	0.1	0.328	28.8	40.2	0.565
8	0.01	0.4	0.04	0.1	0.353	23.1	44.1	0.573
10	0.01	0.4	0.04	0.1	0.445	18.2	48.4	0.592
12	0.01	0.4	0.04	0.1	0.445	14.5	46.4	0.543
2	0.02	0.4	0.04	0.1	0.441	8.4	48.4	0.528
8	0.02	0.4	0.04	0.1	0.545	0.2	43.5	0.436
8	0.015	0.4	0.04	0.1	0.488	0.2	52.4	0.525
10	0.015	0.4	0.04	0.1	0.504	0.2	48.4	0.485

* All the data was the average value of two same samples. ** Data determined after diluting 100 times.

如表 3 所示,采用分别针对丙酮酸高产率和高产量的维生素浓度组合进行实验,丙酮酸产率(0.614g/g)和产量(48.4g/L)均略高于正交试验中的最高产率(0.608g/g)和最高产量(47.7g/L)。当硫胺素浓度为 0.01mg/L 时,丙酮酸产率虽高,但耗糖速度却较慢,增大烟酸浓度可使糖耗明显加快,烟酸浓度提高至 10mg/L 时,丙酮酸产量可增加 29%,而产率仅下降了 3.6%,而当硫胺素浓度为 0.02mg/L 时,将烟酸浓度增大至 8mg/L,虽然也能加速耗糖,但丙酮酸产量和产率却明显降低,表明在这个硫胺素浓度下,丙酮酸合成和降解的平衡易被打破。在烟酸浓度为 8mg/L 的前提下,将硫胺素浓度降低至 0.015mg/L,则可以获得较高的产率(0.525g/g)和较高的丙酮酸产量(52.4g/L),然而,烟酸浓度再增大,丙酮酸产率和产量又会下降。由此可知,将培养基中烟酸和硫胺素的量控制在一个临界范围,协调好其对丙酮酸代谢途径的作用,以维持丙酮酸合成(糖酵解)和降解(主要是氧化脱羧)的精确平衡,可以实现丙酮酸发酵过程高产物浓度、高产率和高生产强度(发酵时间短)的统一。

2.2 维生素限量供给下的 WSH-IP303 分批发酵过程

采用维生素浓度组合(mg/L) 烟酸 8、硫胺素 0.015、吡哆醇 0.4、生物素 0.04、核黄素 0.1,在 2.5L 发酵罐上,采用 0~15h 700r/min、15h 以后 500r/min 的搅拌转速^[4]进行分批发酵,过程曲线如图 3 所示。WSH-IP303 与 IFO0005^[2,8]利用葡萄糖为碳源生产丙酮酸各项指标的比较见表 4。

如图 3 所示,发酵前 10h,溶氧和乙醇浓度的变化最为显著,此时细胞生长较快,比生长速率(μ)在 0.2~0.23h⁻¹ 范围内(数据略),此后 μ 逐渐下降到 0.1h⁻¹ (24h) 以下,36h 后稳定在 0.02h⁻¹ 的水平,且 15h 后细胞产率均低于 0.2g/g。与之相对应,12h 后丙酮酸开始大量产生,20~40h 丙酮酸产率基本维持在 0.6g/g 以上,最终,57.5h 丙酮酸产量达到 69.4g/L,表明在以氯化铵为唯一氮源的前提下,采用优化的维生素供给方式进行分批培养,WSH-IP303 产丙酮酸的潜力就已得到了进一步挖掘,丙酮酸产量、产率和生产强度

分别比摇瓶培养的最好结果提高了 32.4%、13% 和 11%，均高于目前国际上已报道的同类菌株的最佳研究结果(表 4)。

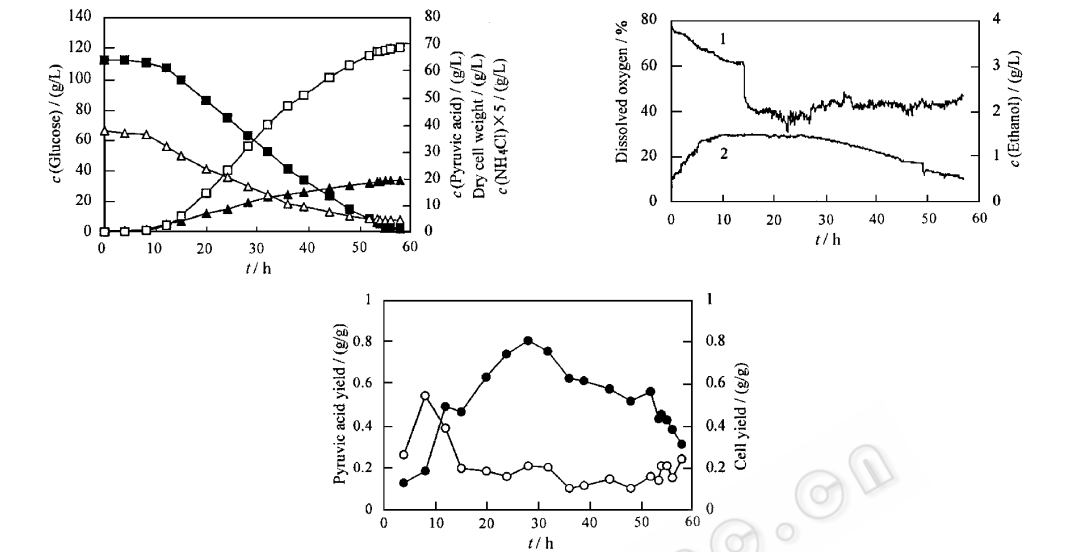


图 3 WSH-IP303 分批发酵过程曲线

Fig. 3 Time-course of batch fermentation process of WSH-IP303

■Glucose concentration；□Pyruvic acid concentration；△NH₄Cl concentration；▲Dry cell weight；
1. Dissolved oxygen；2. ethanol concentration；●Yield of Pyruvic acid to glucose；○Yield of cell to glucose.
Notes Pyruvic acid (PA) yield = $\frac{[PA]_i - [PA]_{i-1}}{[Glucose]_i - [Glucose]_{i-1}}$, Cell yield = $\frac{[Dry\ cell\ weight]_i - [Dry\ cell\ weight]_{i-1}}{[Glucose]_i - [Glucose]_{i-1}}$.

表 4 *T. glabrata* WSH-IP303 与 IFO 0005^[2,8]以葡萄糖为碳源产丙酮酸能力比较

Table 4 Comparison of the production ability of pyruvic acid by *T. glabrata* WSH-IP303 and IFO 0005^[2,8] with glucose as carbon source

Strain	Culture manner	Pyruvic acid / (g/L)	Total glucose / (g/L)	Residual glucose / (g/L)	Pyruvic acid yield / (g/g)*	time /h	Productivity / (g/L/h)	Ethanol / (g/L)	Nitrogen source / (g/L)
WSH-IP303	Batch culture	69.4	120	3.0	0.593	57.5	1.21	1.6	NH ₄ Cl 7
IFO 0005 ^[2]	Fed-batch culture	67.8	140	2.8	0.494	63	1.08	4.0	Soya hydro-lysate 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ 6
IFO 0005 ^[8]	Fed-batch culture	25	48	10	0.53	40	0.63	4.0	Peptone 5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 6

* Pyruvic acid yield = Pyruvic acid produced totally / glucose consumed totally. This value is an average yield of the process.

由于采用氯化铵为唯一氮源,再辅之以维生素的限量供给,因此,WSH-IP303 菌株培养过程中乙醇浓度很低(表 4),这也是 WSH-IP303 丙酮酸产率较高的原因。实际上,丙酮酸产率完全可以达到 0.8g/g 以上(丙酮酸的理论产率接近 1g/g),这一结果在本研究室已得到证实,结果将另文发表。此外,采用流加培养技术还有望将丙酮酸产量进一步提高,这些研究目前正在进行之中。

致谢 本院 95 级本科生陈燕、94 级本科生梁大芳和 97 级硕士生傅为民参加部分实验工作,特此致谢。此外,本校信息与控制工程学院潘丰副教授为本课题研制发酵罐自动控制

系统和乙醇浓度在线监测仪,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Yonehara T, Miyata R. *J Ferment Bioeng*, 1994, **78** :155~159.
- [2] Miyata R, Yonehara T. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82** :475~479.
- [3] Yokota A, Terasawa Y, Takaoka N, *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58** :2164~2167.
- [4] Li Y, Chen J, Lun S Y. *J Biotechnol*, 2000 (in press).
- [5] Bergmeyer H U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1984, **6** :570~577.
- [6] Scheiner D. *Water Research*, 1976, **10** :31~36.
- [7] 李 寅, 潘 丰, 陈 坚, 等. 乙醇浓度监测仪的研制及其在酵母生产中的应用. 见:曹竹安等编. 第八届全国生物生化学术会议论文集. 北京:化学工业出版社, 1998. 665~669.
- [8] Hua Q, Yang C, Shimizu K. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**(2) :206~213.

THE IMPORTANT ROLE OF VITAMINS IN THE OVER-PRODUCTION OF PYRUVIC ACID^{*}

Li Yin Chen Jian Lun Shiyi

(Lab of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Rui Xinsheng

(Changzhou Shuguang Chemical Engineering Factory, Changzhou 213016)

Abstract : The effect of nicotinic acid, thiamine, pyridoxine, biotin and riboflavin on the production of pyruvic acid by *Torulopsis glabrata* WSH-IP303 with glucose as carbon source and NH_4Cl as sole nitrogen source was investigated. By using orthogonal experiment method, thiamine was confirmed to be the most important factor affecting the production of pyruvic acid. Based on a certain concentration range of thiamine (0.01~0.015mg/L), glucose consumption rate can be enhanced by increasing the concentration of nicotinic acid. When the concentration of nicotinic acid, thiamine, pyridoxine, biotin and riboflavin were 8, 0.015, 0.4, 0.04 and 0.1mg/L, respectively, the concentration and yield to glucose of pyruvic acid reached 52.4g/L and 0.525g/g at 48h in flask culture, respectively. Batch culture was conducted in a 2.5 L fermentor with initial glucose concentration of 120g/L. By adopting the optimal concentration combination of vitamins, the concentration and yield to glucose of pyruvic acid reached 69.4g/L and 0.593g/g at 57.5h, which were increased by 32.4% and 13% than the best results in flask culture, respectively.

Key words : Pyruvic acid, *Torulopsis glabrata*, Thiamine, Nicotinic acid, Culture

* Project Granted by Science and Technology Committee of Jiangsu Province (BG98015-3)