

降低光滑球拟酵母电子传递链活性加速丙酮酸合成

刘立明^{1,2} 陈 坚^{1,2} 李华钟² 李 寅^{1,3*}

(¹ 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

(² 江南大学生物工程学院 无锡 214036)

(³ 华东理工大学 生物反应器国家重点实验室 上海 200237)

摘 要 光滑球拟酵母 CCTCC M202019 经溴化乙锭诱变,挑选假阳性呼吸缺陷型菌株共 40 株。对其中 7 株丙酮酸产量提高的突变株进行发酵性底物(葡萄糖)和非发酵性底物(甘油、乙酸)的利用能力测试,鉴定得到 3 株呼吸缺陷型突变株 RD-16、RD-17 和 RD-18。相对于出发菌株,呼吸缺陷型突变株生长速率下降,最终菌体浓度降低 21%~29%,胞内 ATP 含量下降 15%~21%,但单位细胞耗葡萄糖能力和单位细胞产丙酮酸能力分别提高了 20.7%~30.7% 和 30.7%~55.5%。进一步研究发现,呼吸缺陷型突变株线粒体复合体 I、I+III、II+III 和 IV 的活性分别下降了 34%~41%、38.6%~52.6%、21%~25%、150%~630%,表明线粒体电子传递链氧化 NADH 的功能受到抑制。为使酵解产生的 NADH 正常氧化,在 RD-18 菌株的对数生长期流加 2.1mmol/L 外源电子受体乙醛。发现细胞合成丙酮酸能力提高 21.6%,且葡萄糖消耗速度明显加快,发酵周期缩短 14h。结果表明适当削弱能量代谢能够提高真核微生物中心代谢途径的速度。

关键词 光滑球拟酵母,呼吸缺陷型,电子传递链,细胞色素,线粒体复合体,丙酮酸

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2004)06-0800-05

具有多重维生素营养缺陷型标记的光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)具有工业化生产丙酮酸的潜力^[1]。在高溶氧强度(Dissolved Oxygen Tension,简称 DOT)下,如 DOT 为 85% 时,该菌株以葡萄糖为底物生产丙酮酸的得率可高达 0.73g/g,但此时由于细胞中 90% 以上的 NADH 通过电子传递链氧化,胞内能荷较高,导致酵解速度变慢、丙酮酸生产强度降低。将 DOT 降低至 50%,ATP 通量下降了 16%,酵解速度虽然加快,但大约有 11% 的 NADH 通过形成甘油而氧化,由此不可避免地导致丙酮酸得率下降^[2]。理想的状态是使 *T. glabrata* 在高 DOT 下实现快速酵解,这样可获得丙酮酸生产过程高得率和高生产强度的统一。若要实现这一目标,首先要解决高 DOT 下高能荷对酵解途径的抑制问题。

已经发现在原核细胞中降低胞内 ATP 水平可有效地提高糖的分解速度^[3-7]。但真核生物中是否存在类似规律目前尚不清楚。高东等^[8]曾报道酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的呼吸缺陷型菌株中电子传递链被有效阻断,ATP 的产生减少,但没有研究 ATP 水平与酵解速度的关系。能够过量合成

丙酮酸的 *T. glabrata* 是研究真核细胞中 ATP 水平与酵解速度关系的极好材料,因为丙酮酸的积累速度可以很好地表征酵解速度。本文希望通过选育 *T. glabrata* 的呼吸缺陷型菌株来削弱细胞合成 ATP 的能力,从而提高酵解速度,在保证丙酮酸对葡萄糖高得率的同时提高丙酮酸的生产强度。

1 材料和方法

1.1 菌株

出发菌株为光滑球拟酵母 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,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,本研究室选育^[9]。

1.2 培养基

斜面 and 种子培养基:每升含葡萄糖 30g,蛋白胨 10g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g,琼脂 20g(斜面添加),pH 5.0。发酵培养基配置参见文献[2]。呼吸缺陷型菌株筛选培养基见文献[10]。

SD 培养基:每升含酵母氮基 6.7g,葡萄糖 20g,

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2002072);江苏省高等学校研究生创新计划;华东理工大学生物反应器国家重点实验室开放课题;教育部留学回国人员科研启动基金

* 通讯作者。Tel 86-510-5885727; Fax 86-510-5888301; E-mail yinli@sytu.edu.cn

作者简介:刘立明(1976-),男,安徽宿松人,博士研究生,从事生化工程研究。E-mail lingli@sytu.edu.cn

收稿日期 2004-03-19,修回日期 2004-07-28

KH_2PO_4 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, pH 5.0.

GYP 培养基:每升含葡萄糖 30g, 蛋白胨 10g,

KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, pH 5.0.

GlyYP 培养基:每升含蛋白胨 10g, KH_2PO_4 1g,

硫酸镁 1g, 甘油 15mL, pH 5.0.

GGYP 培养基:每升含葡萄糖 20g, 蛋白胨 10g,

KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, 甘油 15mL, pH 5.0.

1.3 呼吸缺陷型菌株的选育

参照文献[10]将一环光滑球拟酵母接入 GYP 培养基中,于 30℃、200r/min 培养 24 h 后,取 5mL 培养物接入含有 250mg EtBr 的 50mL SD 培养基中,用锡箔纸包严在 30℃、200r/min 避光培养 24h,然后将上述培养物进行梯度稀释,将 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释度的稀释液涂布 GGYP 培养基上,30℃培养 3d,挑选在 GGYP 上长得较小的菌落得到假阳性呼吸缺陷型菌株。用无菌蒸馏水将上述假呼吸缺陷型菌株小菌落制成菌悬液,对应点种 GYP 和 GlyYP 平板。30℃培养 3d 后,挑选在 GYP 平板上生长而 GlyYP 平板上不长的菌株供研究用。

1.4 葡萄糖、丙酮酸、细胞浓度测定

具体操作参见文献[9]

1.5 胞内 ATP 含量的测定^[11,12]

取 5mL 处于对数生长期的细胞发酵液,置于已加热煮沸的 5mL 50g/L 的三氯乙酸中,共同煮沸 5min,迅速置于冷水中冷却,加 50g/L 三氯乙酸定容到 10mL 然后用高效液相色谱法测定。测定条件:柱子:Stable-C₁₈ 反向柱,流动相:10mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.0),流速 1.2mL/min;检测器:260nm;柱温 25℃,进样:10 μ L,洗脱时间:10min。

1.6 胞内 ATPase 活性的测定

测定方法见文献[13],酶活定义为每分钟每毫克酶蛋白消耗的 NADH 的 μ mol 数。

1.7 细胞色素定性测定

具体方法参见文献[10,14]

1.8 线粒体呼吸链酶复合体的测定^[15-19]

复合体 I、I + III、II + III 的测定在 25℃ 下按表 1 所示条件进行,用酶的假一级反应的初速度来计算酶活性。

表 1 线粒体呼吸链酶复合体的测定^a

Table 1 Assay of the specific activities of mitochondrial enzyme complex^a

Complex	Phosphate buffer pH 7.4/mL	3mmol/L EDTA-K /mL	0.1mol/L KCN /mL	10mmol/L K ₃ F ₆ CN ₆ /mL	Mitochondrial suspension /mL	1mmol/L Oxidation Cyt c /mL	H ₂ O /mL	Initiate conditions	Total volume /mL
I ^b	1.5	—	0.05	0.3	0.3	0.1	0.45	0.1mol/L NADH 0.3 mL	3.0
I + III ^c	1.5	0.3	0.05	—	0.3	0.1	0.45	0.1mol/L NADH 0.3 mL	3.0
II + III ^d	1.5	0.3	0.05	—	0.3	0.1	0.69	1 mol/L succinic acid 0.06 μ L	3.0

^a All units shown in this table is mL. ^b Assay was monitored at 340 nm. Phosphate buffer was added to the blank and the control instead of mitochondrial suspension. NADH was added to the control while no NADH was added to the blank. The activity of complex I was expressed as micromoles of NADH consumed per minute per mg protein. ^c Measurement was done at 550 nm. Phosphate buffer was added to the control instead of mitochondrial suspension and no NADH was added. The activity of complex I and III was expressed as micromoles of cytochrome (Cyt) c reduced per minute per mg protein. Micromoles of Cyt c reduced = $(OD_{550} - OD_{550_0})/0.0211$, where OD_{550} and OD_{550_0} are the absorbance of Cyt c and the oxidized Cyt c at 550 nm, respectively. ^d Phosphate buffer was added to the blank instead of mitochondrial suspension and no succinic acid was added. The other was the same as described in footnote c.

复合体 IV 的测定:在样品杯中加入 0.15mol/L, pH6.0 的磷酸钾缓冲液 1.5mL, 1mmol/L 还原型 Cyt c 0.1mL, 用双蒸水补充体积至 2.97mL, 在 550nm 波长下连续监测 1min, 加入线粒体悬浮液 0.03mL 作为起动剂, 再在 550nm 波长处进行监测。动力学测定完成后, 分别先后加入少量的固体维生素 C 和高铁氰化钾作为还原剂和氧化剂, 测定 Cyt c 被完全还原和被完全氧化的光吸收, 由此确定加入的 Cyt c 的准确的量。空白杯中用同体积分离介质代替线粒体悬浮液, 并不加 Cyt c, 其余加入试剂均同样品杯。单位定义为每毫克线粒体蛋白每分钟氧化 Cyt c 的 μ mol 数。

1.9 蛋白质浓度测定

福林-酚法^[20]进行。

2 结果和讨论

2.1 呼吸缺陷型菌株的选育

出发菌株经 EtBr 诱变后, 得到小菌落菌株 40 株。将 40 株菌株接种于发酵培养基中, 发现 15 株丙酮酸产量高于原种。从这 15 株菌株中选取 RD-2、RD-4、RD-9、RD-14、RD-16、RD-17、RD-18 等 7 株菌株, 同时接种于发酵性底物(葡萄糖)和非发酵性底物(甘油、乙酸)的培养基中进行培养, 以鉴定呼吸缺陷型菌株。结果发现, 出发菌株虽然不能利用乙酸

为惟一碳源生长,但在以甘油或葡萄糖为碳源的培养基上细胞干重分别为 9.94g/L 和 8.66g/L;突变株 RD-16、RD-17、RD-18 不能利用乙酸或甘油为惟一碳源进行生长,其它突变株在以甘油为惟一碳源的培养基上菌体干重均高于以葡萄糖为碳源时的菌体干重。由于呼吸缺陷型菌株的特征是不能利用非发酵性底物为碳源生长,由此确定 RD-16、RD-17、RD-18 为呼吸缺陷型突变株。

2.2 菌株生长速率比较

维持发酵培养基的成分恒定不变,将呼吸缺陷型突变株 RD-16、RD-17、RD-18 以及出发菌株分别接种于发酵培养基中,于 30℃、200r/min 下进行培养,在对数生长期开始取样测定菌体浓度。结果表明,

呼吸缺陷型突变株 RD-16、RD-17、RD-18 的生长速率普遍低于出发菌株,且最终菌体浓度比出发菌株低 21%~29%(表 2)。经传代实验证实菌株 RD-16、RD-17、RD-18 具有良好的遗传稳定性。

2.3 出发菌株与突变株胞内 ATP 含量的比较

呼吸缺陷型突变株较出发菌株生长微弱,表明突变株胞内 ATP 水平有可能降低。取对数生长期的菌体进行测定,发现呼吸缺陷型突变株 RD-16、RD-17、RD-18 胞内 ATP 含量低于出发菌株 15%~21%。胞内 ATP 含量的下降减轻了对糖酵解途径的反馈抑制,因此单位细胞消耗葡萄糖的能力和单位细胞生产丙酮酸能力分别提高了 20.7%~30.7% 和 30.7%~55.5%(表 2)。

表 2 呼吸缺陷型菌株性能比较

Table 2 Comparison of the properties of respiratory deficient mutants

Strain	DCW		Pyruvate		Glucose consumption		Pyruvate/DCW		Glucose/DCW	
	Rate/%	Ab(g/L) ^a	Rate/% ^b	Ab(g/L)	Rate/%	Ab(g/L)	Rate/%	Ab(g/L)	Rate/%	Ab(g/L)
Parent	7.9±0.2	0	29.4±0.5	0	70.4±1.2	0	3.72±0.06	0	8.91±0.04	0
RD-16	5.6	-29.0	32.4	10.2	65.2	-7.3	5.36	55.5	11.6	30.7
RD-17	6.6	-26.0	32.1	9.1	71.0	0.8	4.86	30.7	10.8	20.7
RD-18	6.2	-21.0	32.4	10.2	67.1	-4.6	5.22	40.4	10.8	21.4

^a Ab is the abbreviation of absolute value; ^b Rate represents the increment compared to that of the parent strain.

已有研究表明,EtBr 直接作用于线粒体的电子传递链^[8],导致其功能的缺失。因此作者推测胞内 ATP 总量的减少只能源于电子传递链的减弱或缺失。故在后续研究中检测对数生长期细胞电子传递链中关键酶或复合体和 ATPase 活性的变化。

2.4 突变株与出发菌株线粒体电子传递链的对比

取对数生长期的细胞经三氯乙酸和连二硫酸钠处理后,在 450~650nm 波长范围内扫描特征吸收峰。结果表明,菌株 RD-16 和 RD-18 缺失细胞色素 aa₃ 和 b,菌株 RD-17 则缺失细胞色素 b。由于细胞色素 aa₃、b、c 为线粒体电子传递链不可缺失的组分^[15],菌株 RD-16、RD-17 和 RD-18 中部分细胞色素成分的缺失导致这些菌株电子传递链中复合体活性下降(表 3)。复合体 II + III、I + III 活性的下降是因为复合体 III 中缺失细胞色素 b 所致,而缺失细胞

色素 aa₃ 导致复合体 IV 活性成倍数下降。复合体活性下降,使得细胞代谢产生的 NADH 和 FADH₂ 不能通过电子传递链完全氧化,导致胞内 ATP 水平下降的重要原因之一。

2.5 出发菌株与突变株胞内 ATPase 活性的比较

呼吸缺陷型菌株 RD-16、RD-17 和 RD-18 中 ATPase 活性比出发菌株分别下降了 14.6%、15.4% 和 22.2%。因此,ATPase 活性的降低也是导致胞内 ATP 含量降低的原因之一。而呼吸缺陷型菌株中 ATPase 活性的降低可能是 EtBr 随机诱变的结果,详细原因目前还不清楚。

2.6 乙醛作为电子受体的影响

尽管呼吸缺陷型菌株单位细胞消耗葡萄糖的能力和单位细胞生产丙酮酸能力增强,但从整体来看,葡萄糖消耗速度和丙酮酸产量的提高并不显著(表 2)。这可能是由于线粒体电子传递链的破坏(表 3)导致酵解途径产生的 NADH 不能完全氧化而积累,对酵解途径造成了抑制。要使 *T. glabrata* 在高 DOT 下快速积累丙酮酸,希望 NADH 快速氧化(以提供糖酵解所需的 NAD⁺)但不产生或少产生 ATP。在呼吸缺陷型菌株中要达到上述目标有两条途径:或添加一定的外源电子受体(如乙醛);或突变 AT-

表 3 线粒体电子传递链复合体活性的变化

Table 3 Comparison of activities of four complexes in electron transfer chain

Complex	Parent	RD-16	RD-17	RD-18
I	4.28±0.02	2.56±0.03	2.80±0.02	2.50±0.02
I + III	37.91±0.15	23.28±0.17	22.00±0.15	17.77±0.21
II + III	34.36±0.4	25.77±0.1	27.00±0.2	26.23±0.2
IV	93.72±0.16	16.27±0.24	53.12±0.20	14.37±0.18

Pase 削弱其活性,以使氧化磷酸化(部分)解偶联(这部分研究工作正在进行中)。

乙醛作为外源电子受体,在参与 NADH 氧化和 NAD⁺ 还原,维持细胞 NADH/NAD⁺ 比率平衡中起着重要作用。实验发现,由于乙醛本身的毒性,在发酵初期(0~20h)添加导致细胞生长微弱,发酵后期添加(26h 以后)难以达到转化 NADH 为 NAD⁺ 而不生成 ATP 的效果。细胞生长的对数期(22~26h),在呼吸缺陷型菌株中添加一定量乙醛(2.1mmol/L)促进了突变株的生长(细胞干重增加 24%),加快细胞消耗葡萄糖的速度(生产周期缩短 14h)和提高了丙酮酸生产能力(丙酮酸产量提高 21.6%) (图 1),而对出发菌株没有显著影响(数据未给出)。若乙醛过量,对出发菌株和突变株的生长和生产丙酮酸均产生抑制作用(数据未给出)。

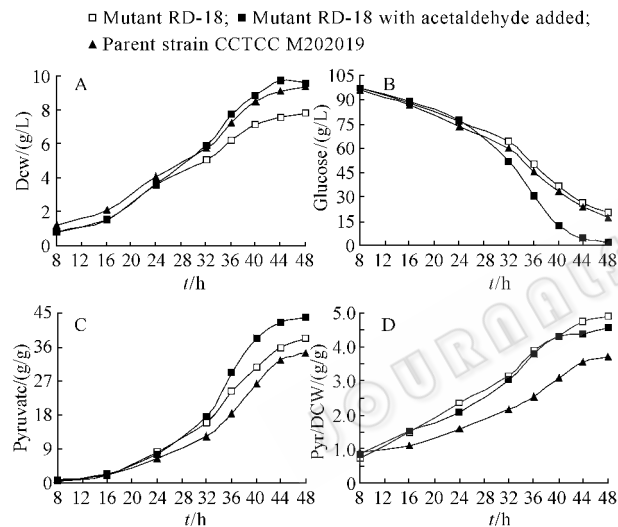


图 1 乙醛对呼吸缺陷型突变株发酵生产丙酮酸的影响

Fig. 1 Effect of acetaldehyde on pyruvate production by respiratory-deficient mutant

T. glabrata 作为过量合成丙酮酸的真核微生物,因其糖酵解速度可通过丙酮酸的积累速度予以表征,因此是研究真核细胞中 ATP 水平与酵解速度关系的极好材料。本研究成功地选育到 ATP 产生能力下降的 *T. glabrata* 呼吸缺陷型菌株,并通过在培养基中添加一定量的外源电子受体(乙醛),使不能通过电子传递链氧化的 NADH 通过将电子传递给乙醛而得到氧化,从而在保证丙酮酸对葡萄糖高得率的同时提高了丙酮酸的生产强度。本文研究结果为进一步阐明 *T. glabrata* 中物质代谢与能量代谢的关系以及相应的代谢调控机制奠定了基础。

致谢 江南大学生物工程学院生物工程专业 2003 届毕业生黄慧娟参与部分研究工作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Li Y, Chen J, Lun S Y. Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 451 - 459.
- [2] Li Y, Hugenholtz J, Chen J, et al. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**: 101 - 106.
- [3] Shen L C, Atkinson D E. Regulation of pyruvate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Interactions of adenylate energy charge and other regulatory parameters. *J Biol Chem*, 1970, **245**: 5974 - 5978.
- [4] Dietzler D N, Leckie M P, Magnani J L, et al. Evidence for the coordinate control of glycogen synthesis, glucose utilization, and glycolysis in *Escherichia coli*. II. Quantitative correlation of the inhibition of glycogen synthesis and the stimulation of glucose utilization by 2,4-dinitrophenol with the effects on the cellular levels of glucose 6-phosphate, fructose 1,6-diphosphate, and total adenylates. *J Biol Chem*, 1975, **250**: 7195 - 7203.
- [5] Jensen P R, Michelsen O, Westerhoff H V. Control analysis of the dependence of *Escherichia coli* physiology on the H⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8068 - 8072.
- [6] Jensen P R, Michelsen O. Carbon and energy metabolism of ATP mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 7635 - 7641.
- [7] Sekine H, Shimada T, Hayashi C, et al. H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 534 - 540.
- [8] 高东, 刘家建, 金建玲. 啤酒酵母呼吸缺陷型诱变机制初探. *遗传学报*, 1989, **16**(3): 219 - 225.
- [9] 刘立明, 李寅, 堵国成, 等. 乙酸渗漏型丙酮酸高产菌的选育. *工业微生物*, 2002, **32**(3): 10 - 14.
- [10] O'Connor R M, McArthur C R, Clark-Walker G D. Respiratory-deficient mutants of *Torulopsis glabrata*, a yeast with circular mitochondrial deoxyribonucleic acid of 6 μ m. *J Bacteriol*, 1976, **126**: 959 - 968.
- [11] Sato K, Yoshida Y, Hirahata T, et al. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *J Biosci Bioeng*, 2000, **90**: 294 - 301.
- [12] Stanley P E. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic acid. *Methods Enzymol*, 1986, **133**: 14 - 22.
- [13] Monk B C, Niimi M, Shepherd M G. The *Candida albicans* plasma membrane and H⁺-ATPase during yeast growth and germ tube formation. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 5566 - 5574.
- [14] de Deken R H. The crabtree effect and its relation to the petite mutation. *J Gen Microbiol*, 1966, **44**: 157 - 165.
- [15] Bulder C J. Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. *J Microbiol*, 1964, **30**: 1 - 9.
- [16] Gerhardt P. 普通细菌学方法手册. 厦门大学生物学系微生物学教研室译. 厦门: 厦门大学出版社, 1989.
- [17] Small W C, McAlister-Henn L. Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4051 - 4055.
- [18] Kerschner S J, Okun J G, Brandt U. A single external enzyme confers alternative NADH ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci*, 1999, **112**: 2347 - 2354.

[19] de Vries S , Marres C A . The mitochondrial respiratory chain of yeast : Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism . *Biochim Biophys Acta* , 1987 , **895** : 205 - 239 .

[20] 宁正祥 . 食品成分分析手册 . 北京 : 中国轻工业出版社 , 1998 .

The Decrease of The Activity of Electron Transfer Chain of *Torulopsis glabrata* Enhanced Pyruvate Productivity

LIU Li-Ming^{1,2} CHEN Jian^{1,2} LI Hua-Zhong² LI Yin^{1,3*}

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

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

(³ The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering , East China University of Science & Technology , Shanghai 200237 , China)

Abstract : *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 was mutated by ethidium bromide to screen for respiratory-deficient mutants . Seven mutants that produced pyruvate higher than that of the parent were subjected to the tests of the capability assimilating fermentable substrate (glucose) and non-fermentable substrates (glycerol and acetate) to characterize true respiratory-deficient mutants . Mutants RD-16 , RD-17 and RD-18 were unable to assimilate acetate or glycerol and were therefore identified as respiratory-deficient mutants . Compared to the parent strain , the growth the intracellular ATP content of those mutants decreased by 21% ~ 29% and 15% ~ 21% , respectively , while the glucose consumption per cell and the pyruvate production per cell of those mutants were enhanced by 20.7% ~ 30.7% and 30.7% ~ 55.5% , respectively . Qualitative analysis of cytochromes involved in electron transfer chain showed that mutants RD-16 and RD-18 lacked both cytochrome aa3 and b , while mutant RD-17 lacked cytochrome b . Enzymes analysis indicated that the activities of ATPase , succinate-cytochrome c reductase (complex I) , complex I + III , complex II + III , and complex IV of those mutants decreased by 14.6% ~ 22.2% , 34% ~ 41% , 38.6% ~ 52.6% , 21% ~ 25% , and 150% ~ 630% , respectively . However , increased glucose consumption per cell was not observed in those mutants , which might be due to that the NADH generated in glycolysis can not be completely oxidized via electron transfer chain . To avoid the accumulation of NADH , 2.1mmol/L acetaldehyde was added to the culture broth of mutant RD-17 at 26h of fermentation . Using this strategy , the amount of pyruvate produced increased by 21.6% while the fermentation time was shortened from 62h to 48h .

Key words : *Torulopsis glabrata* , Respiratory-deficient , Electron transfer chain , Cytochrome , Mitochondria complex , Pyruvate

Foundation items : Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2002072) ; The Postgraduate Innovation Project of Jiangsu Province ; The Open Project Program of The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering , East China University of Science and Technology ; The Scientific Research Foundation for The Returned Overseas Chinese Scholars , State Education Ministry

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

Received date : 03-19-2004

《微生物学报》综述文章投稿说明

本刊一些综述类来稿存在一些问题 , 主要表现为 : 篇幅庞大 , 罗列文献 , 内容空泛 , 缺乏观点 . 为使此栏目更加新颖并更具可读性 , 特提出几点说明 , 欢迎大家根据要求 , 踊跃投稿 , 并提出你们对该栏目的建议和想法 .

1. 本刊主要刊登微型综述 (Mini review) , 来稿字数最好控制在 5000 字以内 (不包括参考文献) .
2. 综述的选题要有新意 , 对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值 .
3. 参考文献应控制在 40 篇以内 , 近 3 年发表的文献不少于 10 篇 .
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展 , 不要泛泛罗列文献 , 只述不评 .
5. 应结合自己的研究工作 , 就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点 .
6. 欢迎投送 “ 能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义 ” 的述评类文章 .