

# 光滑球拟酵母新霉素抗性株加速葡萄糖代谢

刘立明<sup>1</sup> 李华钟<sup>1</sup> 李寅<sup>1,2</sup> 陈坚<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

(<sup>2</sup>华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘要:** 为进一步提高光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸的生产强度,在能量代谢分析的基础上提出了降低 ATP 合成酶活性、但不影响 NADH 氧化的育种策略。通过亚硝基胍诱变,获得一株新霉素抗性突变株 N07,该菌株  $F_1$ -ATPase 活性降低 65%、丙酮酸产量高于 48g/L 且单位细胞消耗葡萄糖能力提高 38%。添加双环己基碳二亚胺(DCCD)叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )、新霉素显著降低出发株  $F_1$ -ATPase 活性但不影响突变株  $F_1$ -ATPase 活性。突变菌株胞内 ATP 含量下降 23.7% 导致生长速率和最终菌体浓度(为出发菌株的 76%)均低于出发菌株,但葡萄糖消耗速度和丙酮酸生产速度分别提高 34% 和 42.9%,发酵周期缩短 12h。进一步研究发现,突变株糖酵解途径中关键酶磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶和磷酸甘油醛激酶的活性提高了 63.7%、28.8% 和 14.4%,电子传递链关键酶活性提高 10%。结果表明降低真核微生物  $F_1$ -ATPase 活性有效地提高了糖酵解关键酶活性而加速葡萄糖代谢。

**关键词:** 光滑球拟酵母, 丙酮酸生产, 糖酵解,  $F_1$ -ATPase, 新霉素抗性

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2005)04-0617-04

利用生物催化剂(微生物、酶)采用取之不尽、用之不竭的可再生生物质资源大规模生产人类所需的能源、化工、医药、食品及农用原材料的工业生物技术是支撑 21 世纪社会可持续发展的战略技术<sup>[1]</sup>。为了提高微生物利用碳水化合物发酵生产目标代谢物的生产强度,需要加速碳水化合物中心代谢途径(糖酵解途径)的代谢流量。而微生物细胞对糖质底物(以葡萄糖为例)的代谢速度主要受细胞内能量水平控制<sup>[2]</sup>(图 1)。

前期研究表明,光滑球拟酵母中胞内高 ATP 含量抑制糖酵解关键酶磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶活性,在一定程度上降低胞内 ATP 含量能有效地提高糖酵解速度<sup>[2]</sup>。由电子传递链和 ATP 合成酶(ATPase)构成的氧化磷酸化系统对维持细胞内 ATP 含量起着关键作用,在前期研究中作者通过选育呼吸缺陷型菌株,降低电子传递链的活性有效地降低了胞内 ATP 含量而显著提高了糖酵解速度<sup>[3]</sup>。但糖酵解所需  $\text{NAD}^+$  由于电子传递链的阻断使 NADH 无法氧化而短缺,在一定程度上限制了糖酵解速度的进一步提高。理想状态是削弱 ATPase 的活性使 NADH 氧化成  $\text{NAD}^+$  以满足酵解途径的需要而不产生 ATP。

原核生物中, Jensen 等和 Yokota 等分别降低大肠杆菌(*Escherichia coli*)中  $\text{H}^+$ -ATPase 和  $F_1$ -ATPase 的活性,使胞内 ATP/ADP 比率下降而加快了葡萄糖消耗速度<sup>[4,5]</sup>。同样, Sekina 降低 *Corynebacterium glutamicum* 中  $\text{H}^+$ -ATPase 75% 的活性,使葡萄糖比消耗速率提高了 70% 而加速了谷氨酸的合

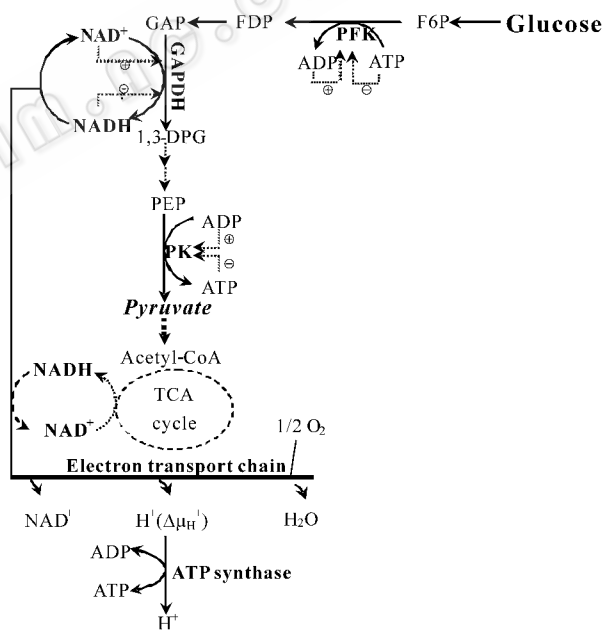


图 1 糖酵解途径中的能量代谢

Fig.1 Energy metabolism in glycolytic pathway

成<sup>[6]</sup>; *Bacillus subtilis* 缺失  $F_0F_1$ -ATPase 突变株也表现出相类似的变化<sup>[7]</sup>。这些研究表明,降低原核生物中 ATPase 的活性能有效降低能量代谢而强化目标代谢物的生产。降低真核生物中 ATPase 的活性能否有效地提高糖酵解速度,目前

基金项目: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工程国家重点实验室开放课题;教育部高等学校博士点建设专项资金(20040294003)

\* 通讯作者。E-mail: jchen@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: mingli@sytu.edu.cn

收稿日期:2004-12-28,修回日期:2005-03-21

尚不清楚。已有研究表明,在降低 *C. glutamicum*<sup>[6]</sup>, *Methanobacterium thermoautotrophicum*<sup>[8]</sup>, *Escherichia coli*<sup>[9]</sup> 能量代谢的研究中,新霉素有效降低了细胞能量代谢,降低细胞内能量水平。同时新霉素抗性菌株表现出较低 ATPase 活性<sup>[10,11]</sup>,这些研究表明,利用新霉素作为菌种选育的筛子,能获得  $F_1$ -ATPase 活性降低的突变株。本文希望通过选育光滑球拟酵母新霉素抗性菌株以降低光滑球拟酵母中 ATPase 的活性,以期全面了解 ATPase 对光滑球拟酵母能量代谢和糖酵解的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**光滑球拟酵母(*Torulopsis 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,且丙酮酸脱羧酶活性组成型降低,本研究室选育<sup>[12]</sup>。

**1.1.2 培养基和培养方法:**参见文献<sup>[12]</sup>。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**新霉素、双环己基碳二亚胺(DCCD)、叠氮钠、糖酵解关键酶测定所用试剂均购自 SIGMA 公司,其他常规试剂购自普通商业渠道。高效液相色谱仪采用 Agilent 1100 系列。

**1.2 葡萄糖、有机酸、细胞浓度(Dry cell weight, DCW)测定**  
具体操作参见文献<sup>[12]</sup>。

### 1.3 胞内 ATP 含量的测定<sup>[3]</sup>

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-C<sub>18</sub> 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 $\mu$ L;洗脱时间:10min。

### 1.4 糖酵解关键酶活性的测定

参见文献<sup>[13]</sup>进行测定。

### 1.5 胞内 ATPase 活性的测定

测定方法见文献<sup>[11]</sup>,酶活定义为每分钟每毫克酶蛋白消耗的 NADH 的  $\mu$ mol 数。

### 1.6 线粒体呼吸链酶复合体的测定

具体操作参见文献<sup>[3]</sup>进行。

### 1.7 蛋白质含量的测定

参见文献<sup>[14]</sup>进行操作。

## 2 结果和讨论

### 2.1 新霉素抗性菌株的选育

出发菌株经 NTG 诱变后,将诱变后的菌液经适当稀释后涂布在含有 10 mg/L 新霉素的平板上,选取能在新霉素抗性平板上生长的菌株 136 株。将 136 株菌株接种于发酵培养基中,发现 20 株菌株的丙酮酸产量和单位细胞消耗葡萄糖的能力高于原种。将这 20 株菌株同时接种于以发酵性底物(葡萄糖)和非发酵性底物(甘油、乙酸)为唯一碳源的培养基中进行培养,获得 7 株能利用葡萄糖生长但不能利用非发酵性底物(琥珀酸、乳酸)生长的突变菌株。检测 7 株的 ATPase 活性、丙酮酸产量、单位细胞消耗葡萄糖能力,获得一株 ATPase 活性降低 65%、丙酮酸产量高于 48 g/L 且单位细胞消耗葡萄糖能力提高 38% 的突变株 N07。经传代实验证实该菌株具有良好的遗传稳定性。

### 2.2 ATPase 抑制剂对 $F_1$ -ATPase 的影响

在发酵培养基中添加不同浓度的  $F_1$ -ATPase 典型抑制剂 DCCD、NaN<sub>3</sub>、新霉素对出发菌株和突变株 N07  $F_1$ -ATPase 活性的影响如图 2 所示。图 2 表明,3 种抑制剂并不能显著降低突变株中  $F_1$ -ATPase 的活性,而对出发菌株中  $F_1$ -ATPase 酶活性有强烈抑制作用。在出发菌株中添加 1mmol/L DCCD 使  $F_1$ -ATPase 活性降低 53.3% (图 2-A),而添加 0.1mmol/L 的 NaN<sub>3</sub> 就使出发菌株的  $F_1$ -ATPase 下降 75% (图 2-B)。这一结果表明,通过选育新霉素抗性突变菌株能有效地降低胞内  $F_1$ -ATPase 的活性。

### 2.3 突变株与原种发酵的比较

图 3 (A-C) 为突变株和出发菌株发酵生产丙酮酸过程中细胞干重、葡萄糖质量浓度和丙酮酸质量浓度的变化曲线。根据  $q_s$  和  $q_p$  的定义式:

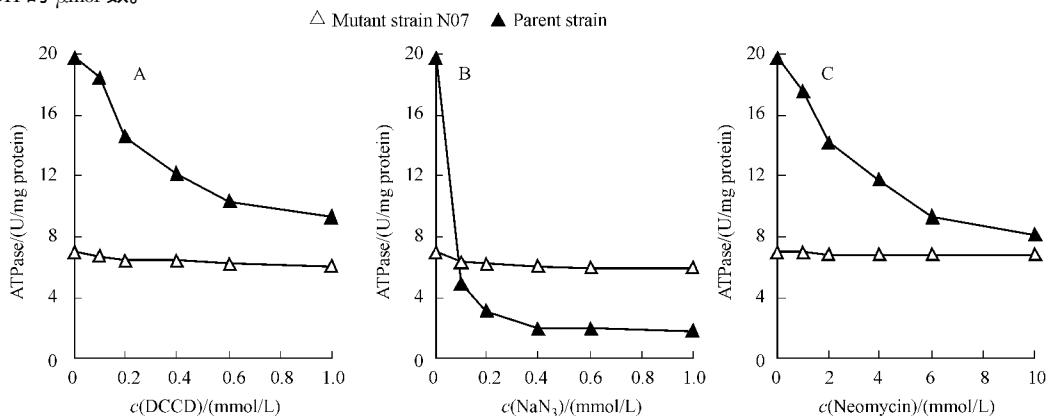


图 2  $F_1$ -ATPase 典型抑制剂对出发菌株和突变株  $F_1$ -ATPase 活性的影响

Fig.2 Effect of  $F_1$ -ATPase inhibitors on the activity of  $F_1$ -ATPase

A :DCCD inhibit activity of  $F_1$ -ATPase ;B :NaN<sub>3</sub> inhibit activity of  $F_1$ -ATPase ;C :Neomycin inhibit activity of  $F_1$ -ATPase.

$$q_s = -\frac{ds}{x \cdot dt} \quad q_p = \frac{dp}{x \cdot dt}$$

当时间间隔很小时,可以近似用上述公式直接计算得到

$\mu$ 、 $q_s$  和  $q_p$ :

$$q_s = -\frac{\Delta s}{x \cdot \Delta t} \quad q_p = \frac{\Delta p}{x \cdot \Delta t}$$

因此,作者利用 GRAFTOOL 图形软件,对图 3(A-C)中的数据点进行插值计算(时间间隔为 0.1 h),再利用 EXCEL 软件,求解得到发酵过程中不同时刻的  $q_s$  和  $q_p$ ,经平滑处理,得到两株菌发酵过程动力学参数  $q_s$  和  $q_p$ (图 3-D,表 1)。

△ Mutant strain N07    ▲ Parent strain

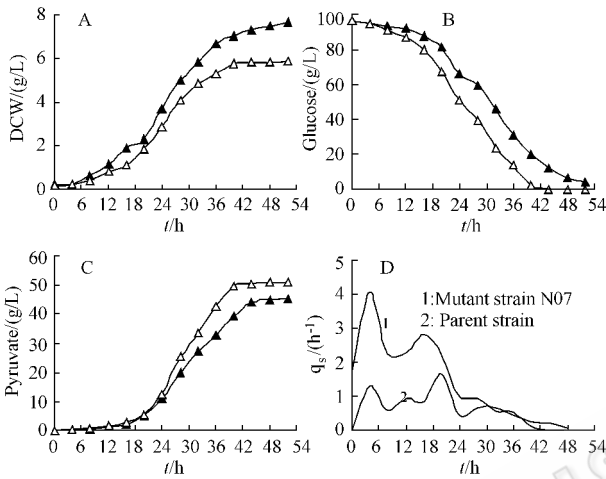


图 3 出发菌株和 N07 发酵过程曲线

Fig. 3 Time course of pyruvate fermentation by parent strain and mutant strain N07

表 1 不同菌株的特征参数

Table 1 Fermentation patterns of the two strains

Parameters	Strain	
	Parent strain	Mutant strain N07
$F_1$ -ATPase (U/mg protein)	19.8	6.93
The content of intracellular ATP (mg/g DCW)	6.65	5.04
Fermentation time (h)	52	40
Total consumed glucose (g/L)	92.2	95.6
Average specific glucose consumption rate ( $q_s$ , $\text{h}^{-1}$ )	0.62	1.68
Average specific pyruvate production rate ( $q_p$ , $\text{h}^{-1}$ )	0.115	0.212
Rate of glucose consumed (g/L/h)	1.773	2.39
Pyruvate production on cell (g/g)	5.94	8.51
Pyruvate productivity (g/L/h)	0.871	1.245

$F_1$ -ATPase 活性的降低使得胞内 ATP 含量下降 23.7% (表 1),导致突变株的生长缓慢(图 3-A),最终菌体浓度为 5.85g/L,仅为出发菌株的 76%。但葡萄糖平均消耗速度(图 3-B)和丙酮酸生产强度分别比出发菌株(图 3-C)高出 34%和 42.9%(表 1)。突变株 N07 与出发菌株在葡萄糖消耗、丙酮酸产量及丙酮酸生产强度的差异如表 1 所示。突变株平均葡萄糖消耗比速  $q_s$  和丙酮酸生成比速  $q_p$  分别比出发菌株提高 170%和 84.3%。突变株 N07 单位细胞消耗葡萄糖的能力比出发菌株提高了 35.2%,可能是因为突变株 ATPase 活性下降了 65%导致突变株中胞内 TP 的含量大幅度下降,减少了 ATP 对糖酵解中关键酶的抑制。

2.4 糖酵解和电子传递链关键酶活性的变化

与出发菌株相比,为何突变株在  $F_1$ -ATPase 活性下降 65%的情况下,胞内 ATP 含量只下降 23.7%? 胞内 ATP 主要来源于氧化磷酸化和底物水平磷酸化,由于  $F_1$ -ATPase 活性的下降导致由氧化磷酸化途径产生 ATP 急剧下降,细胞为了满足自身对 ATP 的需要,就必须加速底物水平磷酸化。取对数生长中期的细胞,测定糖酵解关键酶活性(表 2)。 $F_1$ -ATPase 活性降低突变株中,糖酵解途径中关键酶 PFK、PK 和 GAPDH 的活性分别比出发菌株增加了 63.7%、28.8%和 14.4%。这可能是为什么突变株单位细胞消耗葡萄糖的能力提高了 35.2%的缘故(表 1)。对于菌株 *T. glabrata* CCTCC M 202019,由于丙酮酸脱羧酶活性下降,导致 NADH 无法通过丙酮酸到乙醇而氧化成  $NAD^+$ ,细胞内 NADH 必须通过电子传递链氧化成  $NAD^+$ ,以满足糖酵解速度的提高对  $NAD^+$  的需要,从而导致突变株中电子传递链关键酶的活性比出发菌株提高了 10%左右(表 2)。尽管突变株电子传递链活性得到增强,但由于  $F_1$ -ATPase 活性的降低,使胞内总 ATP 水平下降 23.4%。

酵母细胞在有氧呼吸的条件下,胞内 ATP 绝大部分来源于线粒体内的氧化磷酸化<sup>[15]</sup>。在氧化磷酸化过程中, $H^+$ 通过电子传递链后在 ATP 合成酶的作用下生成 ATP(图 1)。由于新霉素抗性菌株的  $F_1$ -ATPase 活性降低了 65%(表 1)而导致胞内 ATP 浓度也发生下降。在光滑球拟酵母糖酵解关键酶中,磷酸果糖激酶(PFK)丙酮酸激酶(PK)等受胞内高浓度的 ATP 变构抑制,降低胞内 ATP 水平能有效提高糖酵解关键酶的活性<sup>[21]</sup>。当胞内处于低 ATP 水平时,细胞为了满足自身对 ATP 的需求,需要通过电子传递链的氧化磷酸化氧化 NADH 和底物水平磷酸化产生 ATP。氧化磷酸化途径的加强,表现为电子传递链关键酶活性的增强(表 2)。在酵解途径中, $\beta$ -磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的活性受高水平的

表 2 糖酵解和电子传递链关键酶活性的比较

Table 2 Comparison of activities of glycolytic enzyme and electronic transfer chain in parent strain and mutant strain<sup>a</sup>

Strain	HK	PFK	PK	GAPDH	Complex I	Complex I + III	Complex II + III
Parent strain	1.0	1.35	0.45	2.43	4.36	36.54	35.36
Strain N07	1.03	2.21	0.58	2.78	4.82	40.13	39.73

Abbreviations: HK hexokinase; PFK phosphofructokinase; PK pyruvate kinase; GAPDH glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. a: All activity of enzymes were expressed as U/mg protein.

NAD<sup>+</sup> 激活。氧化磷酸化途径的加强,使得由 NADH 氧化 NAD<sup>+</sup> 的能力加强,表现为胞内 NAD<sup>+</sup> 的增加,提高了 3-磷酸甘油醛脱氢酶的活性,也提高酵解速度。低 ATP 水平同时促进底物水平磷酸化,导致糖酵解中关键酶的活性得以提高。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Causey T B, Shanmugam K T, Yomano L P, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *PNAS*, 2004, **101**( 8 ): 2235 - 2240.
- [ 2 ] 刘立明,李华钟,陈 坚,等. 氧化磷酸化抑制剂对光滑球拟酵母糖酵解速度的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**( 3 ) 251 - 257.
- [ 3 ] 刘立明,陈 坚,李华钟,等. 降低光滑球拟酵母电子传递链活性加速丙酮酸合成. *微生物学报*, 2004, **44**( 6 ): 800 - 804.
- [ 4 ] Yokota A, Henmi M, Takaoka N, *et al.* Enhancement of glucose metabolism in pyruvic acid-hyperproducing *Escherichia coli* mutant defective in F<sub>1</sub>-ATPase activity. *J Ferment Bioeng*, 1997, **83**: 132 - 138.
- [ 5 ] Yokota A, Terasawa Y, Takaoka N, *et al.* Pyruvic acid production by an F<sub>1</sub>-ATPase-defective mutant of *Escherichia coli* W1485lip2. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**: 2164 - 2167.
- [ 6 ] Sekine H, Shimada T, Hayashi C, *et al.* H<sup>+</sup>-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 534 - 540.
- [ 7 ] Santana M, Ionescu M S, Vertes A, *et al.* *Bacillus subtilis* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase: DNA sequence of the atp operon and characterization of atp mutants. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 6802 - 6811.
- [ 8 ] Smigan P, Polak P, Majernik A, *et al.* Isolation and characterization of a neomycin-resistant mutant of *Methanobacterium thermoautotrophicum* with a lesion in Na<sup>+</sup>-translocating ATPase (synthase). *FEBS Lett*, 1997, **420**( 1 ): 93 - 96.
- [ 9 ] Baruch I K, David L G. Use of neomycin in the isolation of mutants blocked in energy conservation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1972, **111**( 1 ): 287 - 289.
- [ 10 ] Lardy H, Reed P, Lin C H. Antibiotic inhibitors of mitochondrial ATP synthesis. *Fed Proc*, 1975, **34**: 1707 - 1710.
- [ 11 ] Kanner B I, Gutnick D L. Use of neomycin in the isolation of mutants blocked in energy conservation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1972, **111**: 287 - 289.
- [ 12 ] Liu L M, Li Y, Li H Z, *et al.* Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Letts in Appl Microbiol*, 2004, **39**: 199 - 206.
- [ 13 ] Willis A W. *Methods in Enzymology: Carbohydrate metabolism*. New York: Academic Press, 1982, **3**: 165.
- [ 14 ] 宁正祥. *食品成分分析手册*. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [ 15 ] de Vries S, Marres C A M. The mitochondrial respiratory chain of yeast: Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1987, **895**: 205 - 239.

## *Torulopsis glabrata* neomycin-resistant mutant abolishes pyruvate production with enhancement of glucose consumption rate

LIU Li-ming<sup>1</sup> LI Hua-zhong<sup>1</sup> LI Yin<sup>1,2</sup> CHEN Jian<sup>1\*</sup>

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

(<sup>2</sup> The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** To further increase the rate of glucose consumption by multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata*. A neomycin-resistant mutant N07, with the activity of F<sub>1</sub>-ATPase decreased roughly 35% but glucose consumed per cell was increased 38% than that of parent strain, was bred based on analysis of energy metabolic pathway. The typical inhibitors of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, DCCD, NaN<sub>3</sub> and neomycin, depressed the F<sub>1</sub>-ATPase activity of parental strain but no effect on that of mutant strain. Strain N07 was cultured in a pyruvate fermentation medium containing 100g/L of glucose using flask. It was found that the rate of glucose consumption and pyruvate production were higher by 34% and 42.9% in the mutant than in the parent, respectively. However, the rate and yield of growth (about 24%) of the mutant was lower than that of the parent. The content of intracellular ATP of the mutant also decreased 23.7% than that of the parent. The activities of key enzymes in glycolytic pathway and electron transfer chain of the mutant and the parent were determined. Enzymatic analysis revealed that, compared with the parent strain CCTCC M202019. The activities of key enzymes, phosphofructokinase, pyruvate kinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the mutant N07 increased 63.7%, 28.8% and 14.4%, respectively, all the key enzymes of electron transfer chain in the mutant N07 also increased roughly 10%.

**Key words:** *Torulopsis glabrata*, Pyruvate production, Glycolytic pathway, F<sub>1</sub>-ATPase, Neomycin-resistant

Foundation items: 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 Ph.D. Programs Foundation of Ministry of Education of China(20040294003)

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

Received date: 12-28-2004