

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52(11):1311-1317; 4 November 2012  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 光滑球拟酵母生理功能解析与调控

陈修来<sup>1,2</sup>, 李树波<sup>1,2</sup>, 刘立明<sup>1,2,3\*</sup>

江南大学,<sup>1</sup>食品科学与技术国家重点实验室,<sup>2</sup>工业生物技术教育部重点实验室,<sup>3</sup>糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:**多重维生素营养缺陷型光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*), 是工业发酵生产丙酮酸最具竞争力的菌株。由于其独特的基因组特征和优越的生产表型, 通过营养、环境条件和辅因子水平能有效地调控 *T. glabrata* 的生理功能, 进而将代谢流最大化、快速化的导向目标产物。本文总结了 *T. glabrata* 在基因组测序、生理功能解析与调控等方面所取得的研究进展, 并评估了利用 *T. glabrata* 生产精细化学品的潜力。

**关键词:**光滑球拟酵母, 基因组信息, 生理功能, 解析与调控, 系统代谢工程

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 11-1311-07

利用生物催化剂(微生物、酶), 将可再生生物质资源大规模转化为人类所需的能源、化工、医药、食品及农业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。然而, 如何根据微生物的遗传特性和生理表型, 正确合理的调控微生物的生理功能, 使其充分发挥最大催化效能, 成为迫切需要解决的问题。

目前, 利用系统代谢工程合理的解析与调控微生物的生理功能, 有利于实现微生物催化效能的最大化, 主要体现在<sup>[1]</sup>: (1) 在生理功能解析方面: 运用系统生物学原理, 将基因组、蛋白组、转录组、代谢组、流量组和基因的调节与控制紧密结合, 深入分析微生物的生理和代谢特征, 获取控制微生物关键生理功能的基因靶点; (2) 在营养条件对生理功能调控方面: 运用生化及进化工程原理, 优化微生物的营养条件, 获取微生物的最优生理表型, 解析营养条件对微生物生理功能的影响, 同时也为在特异的环境

或遗传背景下, 通过定向或非定向进化, 获得具有新生理表型的宿主菌奠定基础; (3) 在辅因子对生理功能调控方面: 协同运用生化工程与辅因子工程原理, 借助分子生物学的手段, 改造微生物细胞内辅因子再生途径, 调节微生物细胞内辅因子的形式与浓度, 定向改变和优化微生物细胞的生理和代谢功能, 实现代谢流最大化、快速化的导向目标代谢产物<sup>[2]</sup>; (4) 在环境条件对生理功能调控方面: 综合运用生化工程与代谢工程原理, 借助基因工程的方法, 对微生物细胞中某些特定的生化反应进行修饰, 以达到定向改善细胞特性的目的; (5) 在代谢流调控方面: 运用合成生物学原理, 改造或创造细胞实现关键代谢节点碳流的合理疏导, 提高目标代谢产物的积累量。

本文综述了在运用比较基因组学等策略深入解析光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) 生理功能的同时, 通过改变营养条件、辅因子水平和环境条件来调

**基金项目:**全国优秀博士学位论文作者专项资金(200962);江苏省杰出青年基金项目(BK2012002);中组部青年拔尖人才支持计划

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

**作者简介:**陈修来(1985-), 男, 山东莒县人, 博士研究生, 研究方向为食品微生物制造工程。E-mail: cxl2006202420@126.com

**收稿日期:**2012-06-27; **修回日期:**2012-09-26

控 *T. glabrata* 的生理功能, 获取以丙酮酸为目标代谢产物的研究进展, 并展望了在调控 *T. glabrata* 代谢流生产其它精细化学品方面的应用。

## 1 基于全基因组序列的 *T. glabrata* 生理功能解析

*T. glabrata* (又称 *Candida glabrata*) 的全基因组测序工作于 2004 年完成并在 Nature 上进行了公布<sup>[3]</sup>: *T. glabrata* 全基因组序列大小为 12.3 Mb, 由 13 条染色体构成, G + C 含量 38.8% (*Saccharomyces cerevisiae* 为 38.3%), 含有 5283 个蛋白编码基因。基于全基因组序列, 采用 ClustalW 和 MacVector 对 *T. glabrata* 与 *S. cerevisiae* 的 18S rDNA 序列进行分析, 发现 *T. glabrata* 与 *S. cerevisiae* 在系统进化树上具有最近的亲缘关系, 表现为 2 株酵母的基因组具有高度同线性, 且直系同源蛋白的氨基酸平均相似度达 65%<sup>[4]</sup>。然而, 通过基因组解析发现 *T. glabrata* 缺失氮代谢途径、磷代谢途径、HOG-MAPK 信号转导途径以及维生素 B1 ( $V_{B1}$ )、生物素 (Bio)、烟酸 (NA) 和吡哆醇 (Pdx) 合成途径中的部分关键基因, 导致部分代谢功能的丢失<sup>[5]</sup>。

基于 *T. glabrata* 全基因组序列, 徐楠等利用比较基因组学策略并结合文献挖掘方法, 构建了 *T. glabrata* 全基因组规模代谢网络模型 iNX804。如图 1 所示, *T. glabrata* 拥有 3 条丙酮酸合成途径: (1) 糖酵解途径 (Embden-Meyerh of Pathway, EMP): 由 40 个蛋白编码基因组成, 催化葡萄糖转化为丙酮酸; (2) 磷酸戊糖途径 (Hexose Monophosphate Pathway, HMP): 由 27 个蛋白编码基因组成, 催化葡萄糖-6-磷酸转化为丙酮酸; (3) 丙酮醛降解途径 (Methylglyoxal Degradation Pathway, MDP): 由 15 个蛋白编码基因组成, 催化甘油酮-磷酸转化为丙酮酸。通过基因组规模代谢网络模型, 发现 *T. glabrata* 能在胞外积累 93.4 g/L<sup>[6]</sup> 丙酮酸的原因在于: (1) 磷代谢途径中 *PHO3, 5, 11, 12* 基因的缺失, 导致核黄素代谢缓慢、降低胞内 ATP 水平, 从而强化了糖酵解途径; (2) 氮代谢途径中 *DAL1, 2* 基因的缺失, 使 *T. glabrata* 能有效地将尿素转化为氨基酸进入 TCA 循环, 从而促进细胞生长、提高丙酮酸产量; (3) 维生素合成途径中关键基因 *THIC, BIO2,*

*BNA6* 和 *SNO1, 2, 3* 的缺失, 导致细胞难以合成  $V_{B1}$ 、Bio、NA 和 Pdx, 降低了丙酮酸脱氢酶系 (PDH)、丙酮酸脱羧酶 (PDC)、丙酮酸羧化酶 (PC) 和转氨酶 (TA) 的活性, 阻止了丙酮酸的进一步分解。

随着发酵液中丙酮酸浓度的不断增加, 其 pH 不断下降, 为维持发酵液处于最适 pH 范围, 通常需向发酵液中流加一定浓度的 NaOH, 导致发酵液渗透压不断升高, 通过氨基酸序列比对和基因功能注释, *T. glabrata* 抵御渗透压胁迫的生理机制为: (1) 依赖于 ABC 转运蛋白的离子体内平衡过程<sup>[7-8]</sup>: 质膜上的  $K^+ / H^+$ -反向转运蛋白和  $Na^+$ -ATP 酶分别将胞内/外过量的  $K^+$  和  $Na^+$  转运到胞外/内, 从而维持细胞质中离子浓度的相对稳定; (2) 积聚相容性溶质<sup>[9]</sup>: 在高渗条件下 (2603 mOsmol/kg), 精氨酸分解代谢相关的基因转录水平下调, 而精氨酸合成基因与氨基酸转运基因的转录水平显著上调, 导致胞内精氨酸浓度升高; (3) 依赖于 HOG-MAPK 信号转导途径 (缺失 *Ssk2p*)<sup>[5, 10]</sup>: 包括三级激酶级联系统 MAPKKK (*Ssk22p* 和 *Stel11p*)-MAPKK (*Pbs2p*)-MAPK (*Hog1p*), 通过级联机制激活 *Hog1p*, 最终通过转录因子参与基因转录调控。

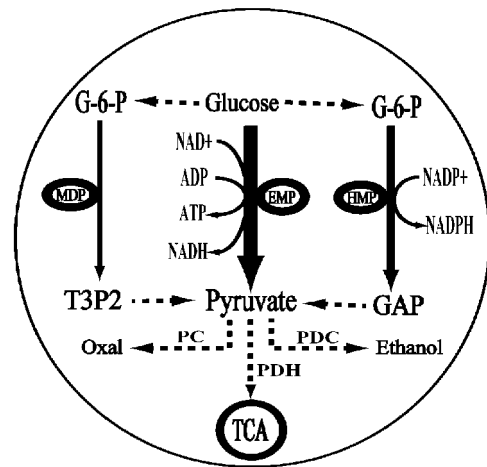


图 1 丙酮酸的中心代谢途径

Fig. 1 The metabolic pathway for pyruvate formation (G-6-P: Glucose-6-phosphate; T3P2: Glycerone-phosphate; GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; Oxal: Oxaloacetate).

## 2 营养条件对 *T. glabrata* 生产表型的调控与优化

生产表型是指在一定营养环境条件下, 微生物

细胞所表现的底物吸收与消耗、细胞生长特征、代谢产物合成与分泌等与工业化生产相关的生理特征。不同营养条件下 *T. glabrata* 生产表型总结于表 1, 由表 1 发现: (1) 满足 *T. glabrata* 生长所必需的营养条件能有效弥补因功能基因缺失带来的代谢缺陷, 提高丙酮酸合成能力; (2) 优化 *T. glabrata* 生

长所需的环境条件有利于生长性能的改善, 减少副产物的产生, 提高丙酮酸的产率; (3) 补充 *T. glabrata* 中间代谢产物可有效地降低维生素缺陷对 *T. glabrata* 细胞生长的影响, 加快葡萄糖消耗速率, 提高丙酮酸生产强度。

表 1 营养条件对 *T. glabrata* 生理功能的影响

Table 1 Effect of nutritional and environmental conditions on *T. glabrata* physiological function

Condition	Optimization objective	Strategy	Result	Reference
Carbon source	Relieving the inhibition of high glucose concentration to growth	Glucose concentration shifting strategy	Achieving the maximum dry cell concentration and redirecting the carbon flux to pyruvate formation.	[11]
Nitrogen source	Eliminating the effects of vitamins in organic nitrogen and the industrial obstacles	EMS mutagenesis	Pyruvate concentration was increased with NH <sub>4</sub> Cl as a sole nitrogen source in the mutant strain, thus making it possible to investigate the effect of each vitamin on pyruvate production in detail.	[12]
Vitamin	Achieving a good balance between anabolism and catabolism of pyruvate	Orthogonal experiment method	Under the optimal concentration, a good balance between high yield and high productivity of pyruvate was achieved.	[13]
Dissolved oxygen	Manipulating of cofactor metabolism generated from glycolysis	Two-stage oxygen supply control strategy	Under this strategy, most of the NADH was oxidized via respiration chain, where pyruvate yield and productivity were increased.	[14]
Temperature	Enhancing the rate of cell growth and the production capacity of pyruvate in the anaphase of fermentation	Temperature shifting strategy	The high specific cell growth rate and constant production capacity of pyruvate in the anaphase of fermentation were obtained. A high concentration, yield and productivity of pyruvate were achieved.	[15]
Oxaloacetate	Supplying cell growth demand under vitamins limitation	Addition of 10 g/L oxaloacetate	By supplement with 10 g/L of oxaloacetate, dry cell weight, yield and productivity of pyruvate were increased.	[16]
Amino acid	Decreasing the concentration of intracellular NADH and supplying cell growth demand under V <sub>B6</sub> limitation	Addition of 0.8 g/L Glu, 0.6 g/L Tyr and 0.2 g/L Met	The amount of glucose used for cell growth was reduced, but the yield of pyruvate on glucose was increased. The decreased intracellular NADH resulted in higher glycolytic flux.	[17]

### 3 辅因子对 *T. glabrata* 生理功能的调控

ATP、NADH、NADPH 和 CoA 等是微生物细胞内重要的辅因子, 作为底物或产物参与生化反应, 通过辅因子的再生和竞争性利用而影响代谢网络、信号转导和物质转运, 进而影响微生物细胞的生理功能。为透彻理解辅因子对 *T. glabrata* 生理功能的调控, 传统的生化工程策略和诱变技术已无法满足实验需求, 也不能有效阐明由于胞内辅因子供给变化而导致的一系列复杂的生理学现象。因此, 本研

究室通过整合融合 PCR、酵母高效电转化、制霉菌素富集和限制性培养基筛选等策略, 建立了: (1) 一种针对酵母的无抗性标记并可重复操作的大片段基因缺失营养缺陷型菌株构建方法<sup>[18]</sup>; (2) 借助 *ARG8<sup>m</sup>* 基因对 mtDNA 基因操作的方法, 运用基因枪转化法成功实现对 mtDNA 上基因的敲除<sup>[19]</sup>。上述代谢工程策略的建立, 为解析辅因子对生理功能的调控机制奠定了坚实的基础。

好氧微生物以 NADH 或 FADH<sub>2</sub> 为电子供体, 通过电子传递链和 F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 酶而大量合成 ATP, 是胞内 ATP 的主要来源<sup>[20]</sup> (图 2)。然而, 通过对 *T. glabrata* 的代谢通量分析表明: 合成的 ATP 仅有 45

-50% 用于合成代谢和维持代谢,其余 ATP 被无效循环所消耗<sup>[21]</sup>。因此,降低 *T. glabrata* 胞内 ATP 水平的策略,主要有改变氧化还原电位<sup>[22]</sup>、添加电子受体<sup>[23-24]</sup>、阻断或减弱电子传递链、降低  $F_0F_1$ -ATP 酶活性。微生物细胞内电子传递链由 NADH-泛醌还原酶、琥珀酸-泛醌还原酶、泛醌-细胞色素 C 还原酶和细胞色素 C 氧化酶组成,电子通过电子传递链而产生质子势,在  $F_0F_1$ -ATP 酶作用下合成 ATP。因此,针对电子传递链而降低 ATP 水平的策略,包括:添加电子传递链抑制剂(如鱼藤酮、寡霉素 A 等)<sup>[25]</sup>;缺失细胞色素  $aa_3$  和  $b$ <sup>[25]</sup>;降低  $F_0F_1$ -ATP 合成酶活性<sup>[25]</sup>;敲除 *ATP6*、*ATP8* 和 *ATP9* 基因获得  $F_0F_1$ -ATP 合成酶缺失突变株<sup>[19]</sup>;过量表达  $F_0F_1$ -ATP 合成酶抑制子 *INH1*<sup>[26]</sup>。

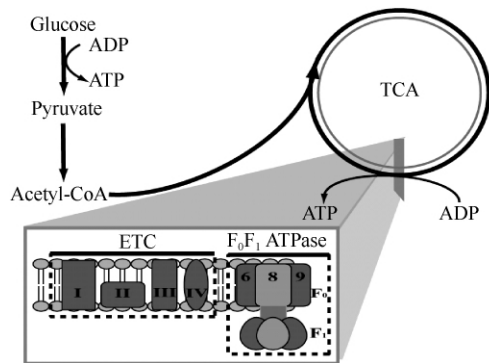


图2 真核微生物中 ATP 的合成途径  
Fig. 2 The ATP synthesis in eukaryotic cell.

由于 *T. glabrata* 细胞中  $NAD^+ / H$  不能自由穿过线粒体膜,因此,不同亚细胞结构中产生的 NADH 必须在相应的部位完成氧化还原,而且 NADH 氧化还原反应发生的部位显著影响生理功能:胞质中 NADH 氧化会导致糖酵解支路代谢增强,导致碳代谢流的扩散;线粒体中氧化磷酸化途径氧化 NADH 会产生大量 ATP,别构抑制糖酵解关键酶,降低糖酵解速率。因此,提高丙酮酸生产效率的最佳状态是 NADH 充分氧化为  $NAD^+$  的同时减少 ATP 产生和碳分流。为此,采用的生化工程策略包括:(1) 提高  $NAD^+$  含量<sup>[24]</sup>:添加 8 mg/L NA;(2) 强化胞质中 NADH 氧化<sup>[24]</sup>:提高乙醇脱氢酶活性,添加 4 mg/L 乙醛。改变 NADH 氧化途径的辅因子工程策略(图 3)包括:(1) 引入胞质  $NAD^+ / H$  再生系统:过量表达形成水的 NADH 氧化酶编码基因 *nox*<sup>[27]</sup>;(2) 引入线粒体  $NAD^+ / H$  再生系统:过量表达选择性氧化

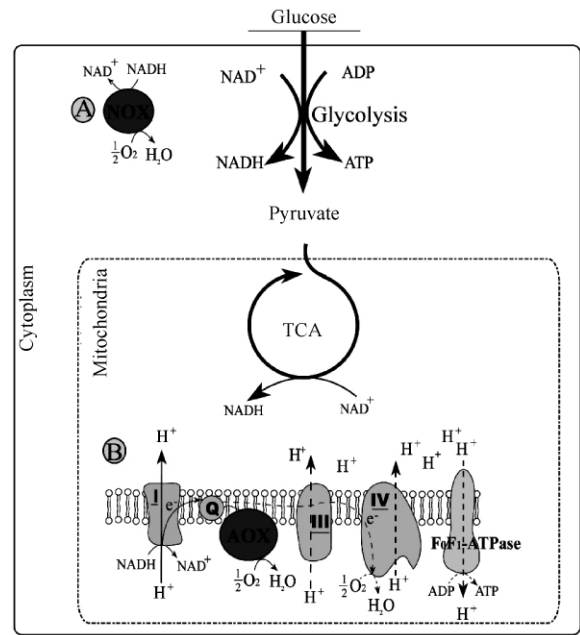


图3  $NAD^+ / H$  再生系统示意图

Fig. 3 Schematic of the  $NAD^+ / H$  regeneration systems in *T. glabrata*. (A)  $H_2O$ -forming NADH oxidase, (B) Alternative oxidase.

酶编码基因 *AOX1*<sup>[28]</sup>。

#### 4 环境条件对 *T. glabrata* 生理功能的调控

*T. glabrata* 发酵液中渗透压因丙酮酸积累和 NaOH 流加而从发酵初始时的 860 mOsmol/kg 上升到 2603 mOsmol/kg,导致细胞发生明显收缩,生长受到抑制甚至死亡,丙酮酸的合成能力降低<sup>[29]</sup>。研究表明,当发酵液中丙酮酸浓度大于 45 g/L 时,丙酮酸合成能力受到显著抑制,并成为限制细胞生理功能的关键性因素<sup>[30]</sup>。因此,为了提高 *T. glabrata* 对高渗透压的耐受性,采用策略包括:(1) 提高胞内相溶性溶质的水平;(2) 选育耐受高渗透胁迫的突变菌株;(3) 提高胞内合成水的含量。

转录组学研究表明,在高渗环境下 (2603 mOsmol/kg),脯氨酸特异性透性酶编码基因 *Put1* 转录水平显著上调<sup>[31]</sup>;精氨酸合成途径中的 N-乙酰谷氨酸合成酶和 N-乙酰谷氨酸激酶编码基因 *Arg2* 和 *Arg5* 转录水平显著上调<sup>[9]</sup>。因此,通过改变相溶性溶质的水平,提高 *T. glabrata* 对高渗环境耐受能力的策略,主要有:(1) 外源添加相溶性溶

质<sup>[9, 29]</sup>: 添加1.0 g/L的脯氨酸或0.5 g/L的精氨酸;  
(2) 提高细胞合成精氨酸的能力<sup>[9]</sup>: 过量表达 *Arg2* 和 *Arg5* 基因。为选育耐受高渗透胁迫的突变菌株, 采用 pH 控制的连续培养装置<sup>[6]</sup> 或采用 UV-DES 复合诱变与后期连续驯化相结合的策略<sup>[32]</sup>, 均获得耐受 70 g/L NaCl 的 *T. glabrata* 突变株。研究表明, 在高渗条件下, 细胞经历一个胞内水快速外流, 同时细胞收缩休克的过程<sup>[33]</sup>, 因此, 在 *T. glabrata* 胞质中过量表达 *nox* 基因, 能够将胞质中的 NADH 直接氧化成 NAD<sup>+</sup>, 并把 O<sub>2</sub> 还原成 H<sub>2</sub>O, 提高胞内水的合成速度, 增强细胞抵御高渗透压的能力<sup>[34]</sup>。

## 5 展望: 合成其它精细化学品

目前, 工业发酵法生产丙酮酸的首选菌株 *T. glabrata*, 能够在胞外积累 93.4 g/L 丙酮酸<sup>[6, 35]</sup>。如何将碳代谢流从丙酮酸节点高效地导向其它精细化学品, 是工业微生物研究者最为关心的问题。借助代谢工程与生化工程策略, 对 *T. glabrata* 的  $\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG) 代谢途径 (如图 4-A) 进行: (1) 修饰: 提高 PC 激活剂 Ca<sup>2+</sup> 水平<sup>[36]</sup>; (2) 改造: 过量表达 *PDC1* 基因, 添加  $\alpha$ -KG 脱氢酶抑制剂<sup>[37]</sup>; (3) 优化: 调节  $\alpha$ -KG 代谢关键酶的辅因子水平, 有效地将丙酮酸节点的碳流导向  $\alpha$ -KG, 最终使  $\alpha$ -KG 产量达 43.7 g/L<sup>[38]</sup>。

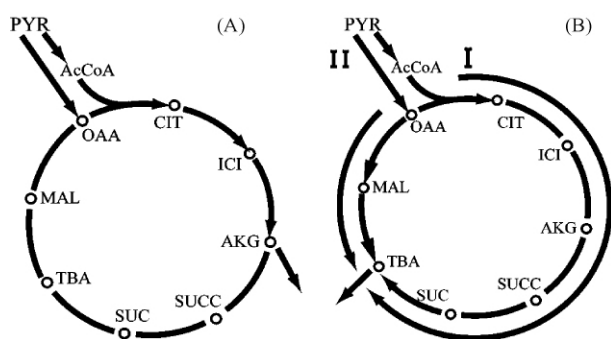


图 4  $\alpha$ -酮戊二酸 (A) 和富马酸 (B) 的积累途径

Fig. 4 The pathways for  $\alpha$ -ketoglutarate (A) and fumarate (B) production in *T. glabrata*. PYR: Pyruvate; AcCoA: Acetyl-CoA; OAA: Oxaloacetate; CIT: Citrate; ICI: Isocitrate; AKG:  $\alpha$ -ketoglutarate; SUCC: Succinyl-CoA; SUC: Succinate; TBA: Fumarate; MAL: Malate.

系统代谢工程是以全基因组规模代谢网络模型和高通量组学分析技术为基础, 通过全局性分析微生物代谢与调控网络, 定向遗传改造靶基因, 获得目

标代谢产物积累多、副产物少、细胞生长影响小的工程菌<sup>[1]</sup>。以 *T. glabrata* 全基因组规模代谢网络模型 *iNX804* 为基础, 精确模拟重构代谢途径, 如富马酸 (Trans-Butenedioic Acid, TBA) 氧化途径 (如图 4-B-I) 和还原途径 (如图 4-B-II), 对细胞生理代谢功能的影响; 结合高通量组学分析技术, 深入分析代谢途径积累目标代谢产物 (如: TBA) 的限制性靶点, 并进一步的定向改造和优化, 实现目标代谢产物 (如: TBA) 的高效积累。随着现代工业生物技术的深入发展, 系统代谢工程将成为克服现代工业技术瓶颈、构建具有工业化潜力工程菌的必要手段。

## 参考文献

- [1] Lee JW, Kim TY, Jang YS, Choi S, Lee SY. Systems metabolic engineering for chemicals and materials. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29 (8) :370-378.
- [2] 秦义, 董志姚, 刘立明, 陈坚. 工业微生物中 NADH 的代谢调控. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2009, 25 (2) :161-169.
- [3] Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, Montigny JD, Marck C, Neuvéglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisramé A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, Daruvar AD, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaia F, Wésolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 2004, 430 (6995) :35-44.
- [4] Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8 (4) :378-384.
- [5] Jandric Z, Schüller C. Stress response in *Candida glabrata*: pieces of a fragmented picture. *Future Microbiology*, 2011, 6 (12) :1475-1484.
- [6] Liu L, Xu Q, Li Y, Shi Z, Zhu Y, Du G, Chen J. Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant

- mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97 (4) :825-832.
- [7] Krauke Y, Sychrova H. Cnh1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and Ena1 Na<sup>+</sup>-ATPase play different roles in cation homeostasis and cell physiology of *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 2011, 11 (1) :29-41.
- [8] Krauke Y, Sychrová H. Chimeras between *C. glabrata* Cnh1 and *S. cerevisiae* Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporters are functional proteins increasing the salt tolerance of yeast cells. *Folia Microbiologica*, 2010, 55 (5) :435-441.
- [9] Xu S, Zhou J, Liu L, Chen J. Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. *Process Biochemistry*, 2011, 46 (6) :1230-1235.
- [10] Gregori C, Schüller C, Roetzer A, Schwarzmüller T, Ammerer G, Kuchler K. The high-osmolarity glycerol response pathway in the human fungal pathogen *Candida glabrata* strain ATCC 2001 lacks a signaling branch that operates in baker's yeast. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6 (9) :1635-1645.
- [11] 许庆龙, 刘立明, 堵国成, 陈坚. 丙酮酸发酵过程中光滑球拟酵母过程功能的强化. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2008, 24 (1) :95-100.
- [12] Li Y, Chen J, Liang DF, Lun SY. Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *Journal of Biotechnology*, 2000, 81 (1) :27-34.
- [13] 李寅, 陈坚, 伦世仪, 芮新生. 维生素在丙酮酸过量合成中的重要作用. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2000, 40 (5) :528-534.
- [14] Li Y, Hugenholtz J, Chen J, Lun SY. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60 (1) :101-106.
- [15] 许庆龙, 刘立明, 史仲平, 堵国成, 陈坚. 基于动力学模型的丙酮酸分批发酵温度控制策略. *化工学报 (Journal of Chemical Industry and Engineering)*, 2008, 59 (8) :2065-2070.
- [16] Liu LM, Du GC, Li Y, Li HZ, Chen J. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* through supplement of oxaloacetate as carbon source. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2005, 10 (2) :136-141.
- [17] 许庆龙, 许晓鹏, 刘立明, 史仲平, 堵国成, 陈坚. 氨基酸强化 *Torulopsis glabrata* 发酵生产丙酮酸. *过程工程学报 (The Chinese Journal of Process Engineering)*, 2008, 8 (6) :1200-1206.
- [18] Zhou J, Dong Z, Liu L, Du G, Chen J. A reusable method for construction of non-marker large fragment deletion yeast auxotroph strains: a practice in *Torulopsis glabrata*. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 76 (1) :70-74.
- [19] Zhou J, Liu L, Chen J. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Candida glabrata* after mitochondrial transformation. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9 (5) :806-814.
- [20] Senior A. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiological Reviews*, 1988, 68 (1) :177-231.
- [21] Liu L, Li Y, Du G, Chen J. Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate - level phosphorylation. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100 (5) :1043-1053.
- [22] Qin Y, Liu LM, Li CH, Xu S, Chen J. Accelerating glycolytic flux of *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019 at high oxidoreduction potential created using potassium ferricyanide. *Biotechnology Progress*, 2010, 26 (6) :1551-1557.
- [23] Liu L, Li Y, Du G, Chen J. Redirection of the NADH oxidation pathway in *Torulopsis glabrata* leads to an enhanced pyruvate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72 (2) :377-385.
- [24] Liu L, Li Y, Shi Z, Du G, Chen J. Enhancement of pyruvate productivity in *Torulopsis glabrata* : Increase of NAD<sup>+</sup> availability. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126 (2) :173-185.
- [25] Liu L, Li Y, Li H, Chen J. Significant increase of glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by inhibition of oxidative phosphorylation. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6 (8) :1117-1129.
- [26] Zhou J, Huang L, Liu L, Chen J. Enhancement of pyruvate productivity by inducible expression of a F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor *INH1* in *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019. *Journal of Biotechnology*, 2009, 144 (2) :120-126.
- [27] Hou J, Lages NF, Oldiges M, Vemuri GN. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2009, 11 (4) :253-261.
- [28] Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, McEwen JE. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast*, 2003, 20 (5) :381-388.

- [29] Xu S, Zhou JW, Liu LM, Chen J. Proline enhances *Torulopsis glabrata* growth during hyperosmotic stress. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15 (2) :285-292.
- [30] Li Y, Chen J, Lun SY, Rui XS. Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55 (6) : 680-685.
- [31] Poole K, E. Walker M, Warren T, Gardner J, McBryde C, de Barros Lopes M, Jiranek V. Proline transport and stress tolerance of ammonia-insensitive mutants of the PUT4-encoded proline-specific permease in yeast. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2009, 55 (6) :427-439.
- [32] 高年发, 张淼, 赵伟刚, 王勇. 耐受氯化钠的丙酮酸生产菌的选育. *中国酿造 (China Brewing)*, 2009, 4: 70-73.
- [33] Zupan J, Mavri J, Raspor P. Quantitative cell wall protein profiling of invasive and non-invasive *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 79 (3) :260-265.
- [34] Xu S, Zhou JW, Qin Y, Liu LM, Chen J. Water-forming NADH oxidase protects *Torulopsis glabrata* against hyperosmotic stress. *Yeast*, 2010, 27 (4) :207-216.
- [35] Li Y, Chen J, Lun SY. Biotechnological production of pyruvic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57 (4) :451-459.
- [36] Huang HJ, Liu LM, Li Y, Du GC, Chen J. Redirecting carbon flux in *Torulopsis glabrata* from pyruvate to  $\alpha$ -ketoglutaric acid by changing metabolic co-factors. *Biotechnology Letters*, 2006, 28 :95-98.
- [37] Zhang D, Liang N, Shi Z, Liu L, Chen J, Du G. Enhancement of  $\alpha$ -ketoglutarate production in *Torulopsis glabrata*: Redistribution of carbon flux from pyruvate to  $\alpha$ -ketoglutarate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, 14 (2) :134-139.
- [38] Liu L, Li Y, Zhu Y, Du G, Chen J. Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level. *Metabolic Engineering*, 2007, 9 (1) :21-29.

## Physiological function in *Torulopsis glabrata*—A review

Xiulai Chen<sup>1,2</sup>, Shubo Li<sup>1,2</sup>, Liming Liu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, <sup>2</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, <sup>3</sup>The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** A multi-vitamin auxotrophic yeast of *Torulopsis glabrata* was the most competitive strain for industrial production of pyruvate. Given its genomic characterizations and physiological functions, it was an efficient way to redirect carbon flux to the target metabolites through manipulating nutritional and environmental conditions, intracellular cofactor form and level. In this review, we summarized the progress on the elucidation and manipulation of physiological function of *T. glabrata*. Furthermore, we also evaluated the potential of *T. glabrata* as cell factory for production of fine chemicals.

**Keywords:** *Torulopsis glabrata*, genome information, physiological function, elucidation and manipulation, system metabolic engineering

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Outstanding Doctorate Paper Author Special Fund (200962), by the Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK2012002) and by the Support Program for Outstanding National Young Talents

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85197875; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 27 June 2012 / Revised: 26 September 2012