

## 提高光滑球拟酵母乙酰辅酶 A 水平促进 $\alpha$ -酮戊二酸合成

梁楠<sup>1,2</sup>, 王森<sup>2</sup>, 刘立明<sup>1\*</sup>, 堵国成<sup>1</sup>, 陈坚<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>工业生物技术教育部重点实验室, <sup>2</sup>江南大学食品学院, 无锡 214122)

**摘要:**【目的】为了了解光滑球拟酵母中乙酰辅酶 A 含量对其碳代谢及其通量的影响。【方法】将来源于酿酒酵母中编码乙酰辅酶 A 合成酶 ACS2 基因过量表达于发酵法生产丙酮酸的生产菌株 *Torulopsis glabrata* 中, 获得了一株乙酰辅酶 A 合成酶活性提高 9.2 倍(1.20 U/mg protein)的重组菌 *T. glabrata* ACS2-1。【结果】与出发菌株 WSH-IP303 相比, 重组菌 *T. glabrata* ACS2-1: (1)能以乙酸为唯一碳源在胞内积累 0.94 mmol/(L·g DCW)的乙酰辅酶 A; (2)以葡萄糖为唯一碳源时胞内乙酰辅酶 A 浓度、 $\alpha$ -酮戊二酸产量和  $C_{\alpha\text{-KG}}/C_{\text{pyr}}$  是出发菌株 WSH-IP303 的 3.22、2.05 和 2.52 倍; (3)在葡萄糖培养基中添加 4 g/L 乙酸, 使乙酰辅酶 A 浓度、 $\alpha$ -酮戊二酸产量和  $C_{\alpha\text{-KG}}/C_{\text{pyr}}$  是出发菌株 WSH-IP303 的 4.55、2.47 和 3.75 倍,  $\alpha$ -酮戊二酸浓度达到 17.8 g/L。【结论】这一结果表明, 改变细胞内关键辅因子的浓度能使碳代谢流的流向与通量发生改变, 从积累丙酮酸转向过量积累 $\alpha$ -酮戊二酸。

**关键词:** 光滑球拟酵母; 乙酰辅酶 A 合成酶; 乙酰辅酶 A

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0874-05

辅酶 A(CoA)及其衍生物乙酰辅酶 A 作为重要辅因子, 参与了微生物细胞内 100 多条合成与分解代谢途径<sup>[1, 2]</sup>, 同时也是合成重要应用价值的精细化学品如酯类和脂质的前体<sup>[3]</sup>。调节微生物细胞内辅酶 A 或乙酰辅酶 A 的浓度或比率可以实现碳代谢流的调控, 使碳代谢流最大化或快速化的导向目标代谢产物或合成新的代谢产物。美国 Rice 大学 San KY 研究小组在 *E. coli* 中通过过量表达乙酰辅酶 A 合成酶截断乙酰辅酶 A 的竞争途径<sup>[4]</sup>、过量表达泛酸激酶<sup>[5]</sup>、丙酮酸脱氢酶系<sup>[6]</sup>等策略增加乙酰辅酶 A 含量, 调控碳代谢流, 实现了乙酸异戊酯生产的高产量、高产率和高生产强度的统一<sup>[7]</sup>。在酿酒酵母中过量表达肉毒碱乙酰转移酶(CAT2), 可以调控胞内乙酰辅酶 A/辅酶 A 的比例, 导致胞内乙酰辅酶 A 的量提高, 有助于发酵过程中芳香酯的产生<sup>[8]</sup>。在大肠杆菌中过量表达乙酰

辅酶 A 合成酶(ACS2)明显增强乙酸消耗速度, 导致胞内乙酰辅酶 A 节点的代谢通量增加<sup>[4]</sup>。Akamatsu 等在酵母中过量表达乙醛脱氢酶、乙酰辅酶 A 合成酶和乙酰辅酶 A 水解酶 3 个与乙酸代谢有关的酶, 阐述了 ACS2 的过量表达明显减少了胞外乙酸的积累<sup>[9]</sup>。调节以乙酸为底物的乙酰辅酶 A 合成酶, 是调控胞内辅酶 A 库形式及其水平的有效手段。

光滑球拟酵母(*Torulopsis glabrata*)能以葡萄糖为碳源过量积累丙酮酸的原因在于丙酮酸进一步降解为乙酰辅酶 A 的丙酮酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶系代谢旁路(由丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶、乙酰辅酶 A 合成酶组成)受培养基中低浓度 B<sub>1</sub> 所控制<sup>[10]</sup>。同时三羧酸循环(TCA)中处于乙酰辅酶 A 下游的 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)也因负责其进一步代谢的 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶以 B<sub>1</sub> 为辅因子而活性较低, 导致少许 $\alpha$ -KG 积累。因

基金项目: 国家杰出青年基金(20625619); 国家“863 计划”(2006AA02Z201); 国家自然科学基金(30670066, 20706025); 国家“973 项目”(2007CB71403)

\*通讯作者: Tel: +86-510-85918307; E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn; jchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 梁楠(1985-), 女, 陕西延安人, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。 E-mail: xushishujun@163.com

收稿日期: 2008-01-15; 修回日期: 2008-03-31

此 *T. glabrata* 中丙酮酸和 $\alpha$ -KG 的代谢是研究乙酰辅酶 A 水平与碳流代谢及其通量关系的极好模型。本文希望通过过量表达 *ACS2* 基因, 研究乙酰辅酶 A 水平对 *T. glabrata* 积累丙酮酸和 $\alpha$ -KG 的影响, 以期了解乙酰辅酶 A 浓度在控制碳代谢流方向及通量中的关键作用。

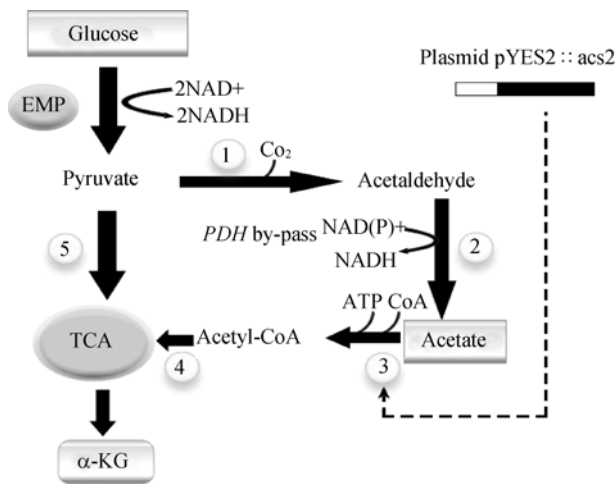


图 1 光滑球拟酵母代谢流示意图

Fig. 1 Metabolic flux distribution in *Torulopsis glabrata*. EMP, Embden-Meyerhof pathway; TCA, tricarboxylic acid cycle. Key enzymatic reactions at the pyruvate branch point are catalyzed by the following enzymes: 1-3. pyruvate dehydrogenase bypass (PDH by-pass); 1. pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1); 2. acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.4 or EC 1.2.1.5); 3. acetyl coenzyme A (CoA) synthetase (EC 6.2.1.1); 4. acetyl shuttle from the cytosol to mitochondria; 5. pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1). Enzymatic reactions involved in lactate and ethanol syntheses have been omitted. Black arrows indicate the metabolic pathway leading to the production of  $\alpha$ -KG from glucose in *T. glabrata* WSH-IP303. Dash line represents the expression cassette [GAL1 promoter and *S. cerevisiae ACS2* gene] on the plasmid pYES2-ACS2.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**：光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) WSH-IP303, 是烟酸、生物素、硫酸素、盐酸吡哆醇等 4 种维生素营养缺陷型, 为本研究室选育<sup>[10]</sup>。大肠杆菌 JM109 为本实验保存, pMD18-T Simple Vector 载体购于 TaKaRa 公司, 穿梭质粒 pYES2 为清华大学陈国强教授惠赠。

**1.1.2 培养基**：LB 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, pH 7.0 L。需要时使用前加入 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素, 固体培养基添加 20 琼脂, 用于大肠杆菌培养。斜面 and 种子培养基(g/L)：

葡萄糖 30, 蛋白胨 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 琼脂 20(斜面用), pH5.5。发酵培养基(g/L)：葡萄糖 100,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.8,  $\text{CaCO}_3$  40 (摇瓶时添加), 微量元素液 10 mL, 维生素液 10 mL, 乙酸钠添加量视实验设计而定, pH5.0, 自来水定容至 1 L。完全培养基(CM, g/L)：葡萄糖 20, 胰蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 固体培养基添加 20 g 琼脂, 用于酵母培养。基本培养基(MM, g/L)：葡萄糖 20, 硫酸铵 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, 微量元素液 10 mL, 维生素液 10 mL, 加入 60 mg 尿嘧啶为补充培养基(SM), 在 SM 培养基中加入 0.5 g 5-氟乳清酸(5-FOA)即为 5-FOA 培养基(FOASM)。微量元素液： $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{ZnCl}_2$  0.5 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  12 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, 2 mol/L HCl 溶解后定容至 1 L。维生素液：烟酸 80 mg, 硫酸素 0.15 mg, 吡哆醇 40 mg, 生物素 4 mg, 核黄素 10 mg, 自来水定容至 1 L。

**1.1.3 培养条件**：从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基(50 mL/500 mL 锥形瓶), 于 30、200 r/min 下摇瓶培养 24 h 后, 以 10%接种量(v/v)接入发酵培养基。摇瓶发酵：500 mL 锥形瓶中发酵培养基为 50 mL, 温度为 30, 转速 200 r/min, 发酵时间为 48 h。

### 1.2 DNA 操作

酵母总 DNA 抽提, 质粒提取、DNA 回收、消化、连接、大肠杆菌感受态细胞制备、转化参见相应试剂盒手册进行。*T. glabrata* 感受态细胞制备、转化参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行。

### 1.3 目的片段的 PCR 扩增

根据 NCBI 网站发表的 *S. cerevisiae* S288C 的乙酰 CoA 合成酶基因 *ACS2* 序列, 设计一对引物, 见表 1, 用于从 *S. cerevisiae* 总 DNA 中扩增 *ACS2* 基因和重组质粒中 *ACS2* 基因的 PCR 验证。

### 1.4 尿嘧啶缺陷型菌株的构建

根据 NCBI 网站发表的 *T. glabrata* 尿嘧啶基因 *URA3* 基因所在染色体序列, 设计两对引物, 分别为 *URA3*-R、*URA3*-L, 见表 1。

首先以 *T. glabrata* WSH-IP303 总 DNA 为模板分别扩增得到 *URA3* 基因左右臂, 利用 FusionPCR 原理连接左右臂, PCR 反应条件：94 4 min; 94 1 min, 55 50 s, 72 1 min, 30 个循环; 72 10 min。将连接好的左右臂片段电转化 *T. glabrata* WSH-IP303 感受态细胞, 通过在选择培养基 FOASM 平板上筛选,

表 1 本文所用引物详细信息  
Table 1 Primers used in this study

Name of Primer	Sequence(5' - 3')	Restriction enzyme cutting site
ACS2	S: GGATTGGAATTCGCGGTTAGTGATTGTTATAC A: GTTAGCGGCCGCTTCTTAGCTGACCAGTAAAA	EcoR Not
URA3-R	S: GTCTTGAATTCGTAAAGTGTACTCTTGATGG A: TCGCGGATCCAACAATCAACATTATACTTA	EcoR BamH
URA3-L	S: TACTGCGGCCGCTAAAGTTGACTCTCGCTAC A: ACTTACAGAATTCAGAGCATATCCAATAG	Not EcoR

将能在 FOASM 平板上长出的转化子在 SM、MM 平板上划线分离,在 SM 上生长良好,在 MM 平板上不生长的转化子即认为是阳性转化子。

### 1.5 表达载体的构建及鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* 和 *Not* 双酶切纯化的 ACS2 基因和克隆载体 pYES2,按载体 目的片段 =6 : 1 的比例配成连接体系 16 过夜,连接产物热激转化大肠杆菌感受态细胞,挑取转化子,提取质粒,并通过 PCR 和酶切鉴定表达质粒 pYES2-ACS2。

### 1.6 *T. glabrata* 过量表达 ACS2 工程菌的构建

将表达质粒 pYES2-ACS2 电转化 *T. glabrata*  $\Delta$ ura3 感受态细胞,1 mol/L 山梨醇 30 后培养 1 h,取 100  $\mu$ L 培养液涂于 MM 平板上 30 培养 2 d,挑单菌落(转化子)转接到新的 MM 平板上,30 培养 2 d,连续转接 3 代以上,观察其生长情况。

### 1.7 分析与测定

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>[11]</sup>。乙酰 CoA 合成酶的测定方法参见文献<sup>[12]</sup>。粗酶液蛋白质含量采用 Bradford 法测定,以 BSA 为标准蛋白<sup>[13]</sup>。HPLC 法测定 CoA/acetyl-CoA<sup>[14]</sup>。HPLC 条件:StableBond C18 反相柱,柱温:20 ,检测器:254 nm,流动相:A 为 0.2 mol/L 的磷酸钠(pH 5.0),B 为 800 mL 0.25 mol/L 的磷酸钠(pH 5.0)和 200 mL 乙腈的混合物,比例:70%A、30%B,流速:1.0 mL/min,进样体积:10  $\mu$ L。

## 2 结果和讨论

### 2.1 目的基因 ACS2 扩增与表达质粒的构建

以 *Saccharomyces cerevisiae* 全基因组序列为模板,PCR 扩增得到与预期大小相符的 ACS2 目的片段(2 kb)。将其克隆入质粒 pYES2,得到 ACS2 基因表达质粒 pYES2-ACS2,构建好的重组质粒 pYES2-ACS2 经酶切分析,并进行 DNA 测序证明。*Sna*BI 单酶切得到大小为 1671 bp 和 6431 bp 的两条条带,克隆的 ACS2 基因与预期结果一致,表明重组质粒构建正确。

### 2.2 过量表达 ACS2 的 *T. glabrata* 重组菌的筛选

将连接好的大小为 1000 bp 的左右臂片段电转化 *T. glabrata* WSH-IP303 感受态细胞,通过 FOASM 平板初筛,将能在 FOASM 平板生长的菌落在 SM、MM 平板上划线分离,筛选得到在 SM 上生长良好而不在 MM 平板生长的转化子即为尿嘧啶营养缺陷型菌株 *T. glabrata*  $\Delta$ ura3。将重组质粒 pYES2-ACS2 电转化 *T. glabrata*  $\Delta$ ura3 感受态细胞。将在含有尿嘧啶的 MM 平板上筛选到阳性重组菌株,挑取阳性重组子若干进行菌落 PCR,得到 2 kb 大小的片段。所得重组菌命名为 *T. glabrata* ACS2-1。该菌在以葡萄糖为碳源的培养基上生长时,ACS2 酶活为 1.20 U/mg protein,是出发菌株的 9.2 倍。

### 2.3 过量表达 ACS2 促进 *T. glabrata* 好氧生长性能

当 *T. glabrata* ACS2-1 分别以乙酸钠、葡萄糖、葡萄糖和乙酸为碳源生长时(图 2),细胞干重分别是出发菌株 WSH-IP303 的 5.2 (0.5 g/L)、1.12(9.6 g/L)和 1.52 倍(9.8 g/L),分别以葡萄糖、葡萄糖和乙酸为碳源生长时 ACS2 的表达是对照菌(WSH-IP303)的 5.73 倍和 9.2 倍(表 2)。这一结果表明,乙酰辅酶 A 合成酶的过量表达,不仅强化了 *T. glabrata* 对乙酸的利用能力,还增强了菌株利用葡萄糖为碳源生长的能力。

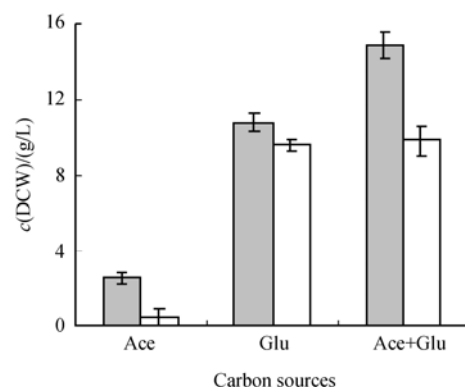


图 2 重组菌 *T. glabrata* ACS2-1(灰色)和出发菌株 WSH-IP303 (白色)利用不同碳源的生长情况

Fig. 2 The growth of *T. glabrata* ACS2-1 (gray) and WSH-IP303 (white) on different carbon sources. Ace: acetate, Glu: glucose, Ace+Glu: 4g/L acetate and 100 g/L glucose.

表 2 不同碳源条件下 *T. glabrata* ACS2-1 和 WSH-IP303 中 ACS 酶活Table 2 The ACS activity of strain *T. glabrata* ACS2-1 and WSH-IP303 on different carbon sources (Samples were draw after 24 h culture)

Carbon sources	Enzyme activity /U		Specific enzyme activity/(U/mg protein)	
	WSH-IP303	<i>T. glabrata</i> ACS2-1	WSH-IP303	<i>T. glabrata</i> ACS2-1
Glucose	0.02	0.08	0.11	0.63
Acetate	ND	ND	ND	ND
Glucose + acetate	0.01	0.09	0.13	1.20

#### 2.4 增加乙酰辅酶 A 含量促进 $\alpha$ -酮戊二酸合成

重组菌 *T. glabrata* ACS2-1 与出发菌株 WSH-IP303 具有不同的代谢特性(图 3-A、B、C),体现在:(1)两者均不利用乙酸为唯一碳源合成丙酮酸,但对于 *T. glabrata* ACS2-1,却能分泌 5.4 mmol/L (0.8 g/L)的 $\alpha$ -KG;(2)以葡萄糖为唯一碳源时,尽管 *T. glabrata* ACS2-1 的丙酮酸产量仅为出发菌株的 80%,但 $\alpha$ -KG 产量和  $C_{\alpha\text{-KG}}/C_{\text{pyr}}$  比菌株 WSH-IP303 分别高 105%和 152%;(3)在葡萄糖培养基中添加 4 g/L 乙酸, *T. glabrata* ACS2-1 的丙酮酸产量、 $\alpha$ -KG 产量和  $C_{\alpha\text{-KG}}/C_{\text{pyr}}$  分别是菌株 WSH-IP303 的 0.66、2.47 和 3.75 倍;(4)与以葡萄糖为唯一碳源比较,添加 4 g/L 乙酸则使 *T. glabrata* ACS2-1  $\alpha$ -KG 产量和  $C_{\alpha\text{-KG}}/C_{\text{pyr}}$  分别提高 27.1%和 56.2%。但乙酸的添加并不改变菌株 WSH-IP303 的代谢特性。

分析不同碳源对对数生长中期菌株 *T. glabrata* ACS2-1 和菌株 WSH-IP303 胞内乙酰辅酶 A 含量的影响(图 3-D)。发现:(1)*T. glabrata* ACS2-1 能以乙酸为唯一碳源在胞内积累 0.94 mmol/(L·g DEW)的乙酰辅酶 A,而菌株 WSH-IP303 却不能利用乙酸合成乙酰辅酶 A;(2)葡萄糖为唯一碳源时 *T. glabrata*

ACS2-1 中乙酰辅酶 A 的浓度是菌株 WSH-IP303 的 3.22 倍;(3)添加 4 g/L 乙酸并不增加菌株 WSH-IP303 胞内乙酰辅酶 A 浓度,但使 *T. glabrata* ACS2-1 乙酰辅酶 A 浓度增加到 13.07 mmol/(L·g DCW),是菌株 WSH-IP303 的 4.55 倍。这一研究结果表明,过量表达乙酰辅酶 A 合成酶,增加了 TCA 循环中乙酰辅酶 A 浓度,导致进入 TCA 循环的碳通量增加,从而促进了 $\alpha$ -KG 产量的增加。

### 3 讨论

*T. glabrata* 作为过量合成丙酮酸的真核微生物,因其丙酮酸脱氢酶系和 $\alpha$ -酮戊脱氢酶均以维生素 B<sub>1</sub> 为辅因子,在过量积累丙酮酸的同时可积累微量 $\alpha$ -KG,因此是研究真核细胞中乙酰辅酶 A 水平与碳流调控之间关系的极好模型。

本研究所使用的受体菌 *T. glabrata* 属于真核微生物中的新型宿主,利用遗传互补筛选法成功地构建了过量表达乙酰辅酶 A 合成酶基因的重组菌,重组菌 *T. glabrata* ACS2-1 可利用乙酸,ACS 酶活提高了 9.2 倍,同时胞内乙酰辅酶 A 的含量也提高到 13.07 mmol/(L·g DCW),导致碳流从丙酮酸节点(从 35.6 g/L 下降到 23.6 g/L)流向 $\alpha$ -KG 节点(18.7 g/L)。本研究证明了丙酮酸脱氢酶代谢旁路中 ACS 是影响胞内乙酰辅酶 A 水平的关键因素,并且为进一步研究丙酮酸脱氢酶旁路代谢的另两个关键酶:丙酮酸脱羧酶(PDC)、乙醛脱氢酶(ACDH)与乙酰辅酶 A 库的关系提供理论支持。本研究通过调节微生物细胞中关键辅因子的浓度,促进流向目标代谢产物的代谢流的最大化和快速化,实现代谢产物过量积累的策略,为工业生物技术特别是发酵过程优化提供了新的技术思路。

### 参 考 文 献

- [1] Chohan S, Furukawa H, Fujio T, *et al.* Changes in the size and composition of intracellular pools of nonesterified coenzyme A and coenzyme A thioesters in aerobic and facultatively anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (2): 553-560.

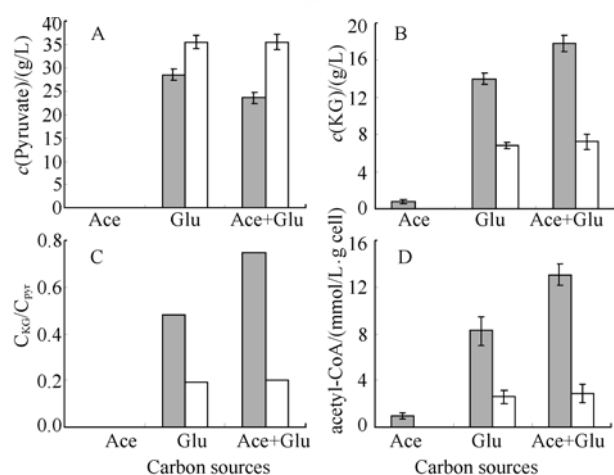


图 3 重组菌 *T. glabrata* ACS2-1(灰色)和出发菌株 WSH-IP303(白色)在不同碳源上的代谢情况

Fig. 3 The metabolic behavior of *T. glabrata* WSH-IP303 ACS2-1 (gray) and WSH-IP303 (white) on different carbon source. Ace: acetate, Glu: glucose, Ace+Glu: 4g/L acetate and 100 g/L glucose.

- [2] Wolfe AJ. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69 (1): 12–50.
- [3] Simpson KJ, Venkatesan S, Peters TJ. Effect of chronic alcohol feeding with a low-fat diet on acetyl-CoA carboxylase and fatty-acid synthase activities in rat-liver. *Biochem Soc Trans*, 1989, 17(6): 1116.
- [4] Lin H, Castro NM, Bennett GN, *et al.* Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *Appl Microbiol and Biotech*, 2006, 71(6): 870–874.
- [5] Vadali RV, Bennett GN, San KY. Cofactor engineering of intracellular CoA/Acetyl-CoA and its effect on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2004, 6 (2): 133–139.
- [6] Vadali RV, Bennett GN, San KY. Enhanced isoamyl acetate production upon manipulation of the acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(3): 692–697.
- [7] Vadali RV, Bennett GN, San KY. Applicability of CoA/Acetyl-CoA manipulation system to enhance isoamyl acetate production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2004, 6(4): 294–299.
- [8] Cordente AG, Swiegers JH, Hegardt FG, *et al.* Modulating aroma compounds during wine fermentation by manipulating carnitine acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 267(2): 159–66.
- [9] Akamatsu S, Kamiya H, Yamashita N, *et al.* Effects of aldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase on acetate formation in sake mash. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90(5): 555–60.
- [10] Li Y, Chen J, Liang DF, *et al.* Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *J Biotechnol*, 2000, 81(1): 27–34.
- [11] Liu LM, Li Y, Li HZ, *et al.* Manipulating the pyruvate dehydrogenase bypass of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata* enhanced pyruvate production. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 39 (2): 199–206.
- [12] van den Berg MA, de Jong-Gubbels P, Kortland CJ, *et al.* The two acetyl-Coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 1996, 271(46): 28953–28959.
- [13] Kuang Y, Salem N, Wang F, *et al.* A colorimetric assay method to measure acetyl-CoA synthetase activity: application to woodchuck model of hepatitis virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(4): 649–655.
- [14] Boynton ZL, Bennett GN, Rudolph FB. Intracellular concentrations of coenzyme A and its derivatives from *Clostridium-Acetobutylicum* Atcc-824 and their roles in enzyme regulation. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(1): 39–44.

## Enhancing $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Torulopsis glabrata*: increase of acetyl-CoA availability

Nan Liang<sup>1,2</sup>, Miao Wang<sup>2</sup>, Liming Liu<sup>1\*</sup>, Guocheng Du<sup>1</sup>, Jian Chen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, <sup>2</sup>School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed at increasing the  $\alpha$ -ketoglutaric acid production of a multi-vitamin auxotrophic yeast *Torulopsis glabrata*, by increasing the availability of acetyl-CoA. [Methods] For this, we expressed ACS2 encoding acetyl-CoA synthase from *Saccharomyces cerevisiae* in the pyruvate producer *Torulopsis glabrata* WSH-IP303. [Results] Compared with that of the parent strain, the acetyl-CoA synthase activity of the mutant ACS2-1 increased about 920% and the mutant could use acetate as the sole carbon source for growth (2.6 g/L dry cell weight). When growing with glucose, the acetyl-CoA concentration,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, and the value of  $C_{\alpha\text{-KG}}/C_{\text{pyr}}$  were 222%, 105% and 152% higher than those of the parent strain WSH-IP303, respectively. The addition of 4 g/L acetate to the culture broth of mutant ACS-1 led to a significant increase of these values to 355%, 147% and 275%, respectively, compared with that of the parent strain WSH-IP303. [Conclusion] The  $\alpha$ -ketoglutaric acid concentration reached 17.8 g/L by increasing the availability of acetyl-CoA and this strategy may provide an alternative approach to enhance metabolite production in yeast.

**Keywords:** *Torulopsis glabrata*; acetyl-CoA synthase; acetyl-CoA

Supported by the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars (20625619), the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z201), the National Natural Science Foundation of China (30670066, 20706025) and the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB71403)

\*Corresponding author. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309 E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn; mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 15 January 2008/ Revised: 31 March 2008