

文章编号:1673-1689(2009)01-0091-06

低氮促进红发夫酵母合成虾青素机理的研究

胡建中, 巩继贤, 董庆霖, 陈洵, 赵学明*

(天津大学 化工学院, 天津 300072)

摘要: 培养基中初始氮(硫酸铵)浓度对红发夫酵母虾青素合成有明显的影响, 低氮能够促进红发夫酵母合成虾青素。运用代谢通量分析的方法, 定量分析不同氮浓度下红发夫酵母的中心碳代谢表明: 生成乙酰辅酶A的反应的通量与合成虾青素反应的通量正相关, 并且这两个通量都随培养基中初始氮浓度的降低而升高。这说明乙酰辅酶A是红发夫酵母合成虾青素的一个限制因素。进一步测定红发夫酵母丙酮酸代谢相关酶的活性表明: 参与丙酮酸脱氢酶旁路的两种酶——乙醛脱氢酶和乙酰辅酶A合成酶在红发夫酵母中的活性极低; 然而, 柠檬酸裂解酶的活性较高, 并且与红发夫酵母虾青素的合成明显呈正相关。该结果说明, 柠檬酸裂解反应决定着红发夫酵母细胞质中乙酰辅酶A的供给, 从而显著影响着其虾青素的合成。低氮条件能够提高柠檬酸裂解酶的活性和限制蛋白质的合成, 从而增加乙酰辅酶A的供给, 促进红发夫酵母合成虾青素。

关键词: 红发夫酵母; 虾青素; 丙酮酸; 代谢; 柠檬酸裂; 解酶

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

The Mechanism of Low Nitrogen Promoting Astaxanthin Biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*

HU Jian-zhong, GONG Ji-xian, DONG Qing-Lin, CHEN Xun, ZHAO Xue-ming*

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The initial nitrogen (ammonium sulfate) concentration remarkably affected astaxanthin biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. Low nitrogen concentration promoted the biosynthesis of astaxanthin of *P. rhodozyma*. Metabolic flux analysis was utilized to characterize the influences of nitrogen concentration on the central metabolism of *P. rhodozyma*. The flux of acetyl-CoA production was positively correlated with the flux of astaxanthin biosynthesis and both of these two fluxes increased with the decrease of the nitrogen concentration. This suggested that acetyl-CoA was a limiting factor for astaxanthin biosynthesis in this yeast. Further more, the enzyme assays were employed to investigate the pyruvate metabolism of *P. rhodozyma* in detail. The activities of acetaldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase, two enzymes functioning in pyruvate dehydrogenase bypass, were extremely low. In contrast, the activity of ATP: citrate lyase was much higher. Furthermore, the activity of ATP: citrate lyase was positively correlated with the biosynthesis of astaxanthin in *P. rhodozyma*. These results showed that ATP: citrate

收稿日期: 2008-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(20536040); 国家 973 基础研究项目(2003CB716003 和 2007CB707802)。

* 通讯作者: 赵学明(1946-), 男, 河北邯郸人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物反应与代谢工程研究。

Email: xzmzhao@tju.edu.cn

lyase reaction determines the supply of acetyl-CoA, the precursor for astaxanthin biosynthesis, in cytosol of this yeast. Low nitrogen concentration improved the activity of ATP; citrate lyase and limited the synthesis of protein, thereby increasing the supply of acetyl-CoA and promoting the biosynthesis of astaxanthin in *P. rhodozyma*.

Key words: *Phaffia rhodozyma*, astaxanthin, pyruvate metabolism, citrate, lyase

虾青素是一种非维生素 A 源的类胡萝卜素。它使鸟、虾和鲑鱼等生物呈现特殊的粉红色,已经被用作家禽和鲑鱼养殖的饲料添加剂^[1-2]。此外,虾青素还是一种有效的抗氧化剂^[3],具有抗癌和增强免疫功能的作用^[4]。因此,虾青素生产菌——红发夫酵母,目前受到广泛的关注。

到目前为止,对红发夫酵母的研究主要集中在不同培养条件对于其虾青素产量的影响^[5-7]。实验表明,低氮有利于红发夫酵母积累虾青素^[5, 8],但是其作用机理并不明确,限制了红发夫酵母的虾青素产量的进一步提高。

虾青素是次级代谢产物,从代谢工程的角度看,其合成应与红发夫酵母的初级代谢紧密相联。作者首先应用代谢通量分析的方法,研究了氮浓度对于红发夫酵母中心碳代谢的影响。然后,用酶活分析的方法进一步研究了红发夫酵母的丙酮酸代谢。在此基础上,从初级代谢的角度,提出了低氮促进红发夫酵母合成虾青素的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) AS2.1557,购自中科院微生物研究所。

1.1.2 培养基 斜面培养基(g/L):葡萄糖 10,蛋白胨 5,酵母抽提物 3,麦芽汁 3,琼脂粉 20; pH 5.0。种子培养基:不加琼脂粉,其余成分与斜面培养基相同。发酵培养基(g/L):葡萄糖 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1、5 或 20, KH_2PO_4 1, NaCl 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1,酵母抽提物 0.2; pH 5.0。

1.2 方法

1.2.1 种子培养方法 从斜面上挑取一环菌体接入 50 mL 种子培养基(500 mL 的摇瓶),22 ℃,150 r/min 振荡培养 28 h。

1.2.2 发酵培养方法 将培养 28 h 的种子培养基,按体积分数 10% 的接种量接入发酵培养基中(50 mL 培养基/500 mL 的摇瓶),150 r/min 振荡培养。

1.2.3 葡萄糖浓度的测定 采用 SBA 生物传感分析仪测定。

1.2.4 虾青素的测定 DMSO 法^[9]。

1.2.5 丙酮酸的测定 高效液相色谱法^[10]。

1.2.6 菌体生物量测定 取 40 mL 发酵液于 5 000 r/min 下离心 10 min 后,倒掉上清液。将收集的菌体用去离子水洗涤两次,于 105 ℃ 下烘干至恒重。

1.2.7 红发夫酵母的中心碳代谢网络 采用孙乃霞等人^[10]构建的代谢网络。

1.2.8 代谢通量分析方法 参见文献^[11]。

1.2.9 粗酶液的制备 取 20 mL 发酵液,5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。将菌体用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH=7.5, 4 ℃,含 2 mmol/L EDTA)洗涤两次。然后加入抽提缓冲液(抽提缓冲液含 100 mmol/L 的磷酸钾,2 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT),冰浴下超声破碎 15 min。超声破碎仪工作功率为 200 W,工作 5 s,间隔 10 s。随后在 4 ℃,10 000 r/min 下离心 10 min,取出上清液。该上清液即为粗酶液。

1.2.10 酶活力的测定 在特征吸收波长下,测定比色皿内的反应体系反应 3 min 吸收光度的变化量。具体方法见参考文献:乳酸脱氢酶^[12-17]。

1.2.11 蛋白质浓度的测定 考马斯亮蓝法^[18]。

2 结果与讨论

2.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对红发夫酵母虾青素合成的影响

在整个培养过程中,红发夫酵母的虾青素的含量都是随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度的降低而升高。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度为 1 g/L 时,其最大虾青素质量分数达到 0.52 mg/g(以干物质计),分别是 5 g/L 和 20 g/L 时的 1.11 倍和 1.30 倍(图 1)。说明低氮有利于红发夫酵母合成虾青素。

2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度对红发夫酵母中心碳代谢通量的影响

在间歇培养条件下,分别测定不同氮浓度下,处于对数生长期的红发夫酵母的菌体比生长速率、

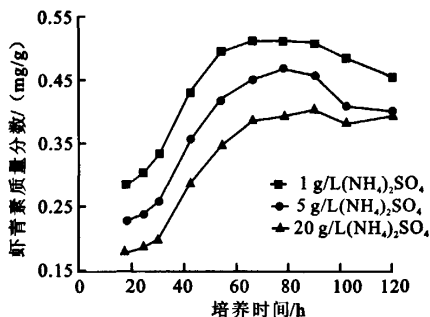
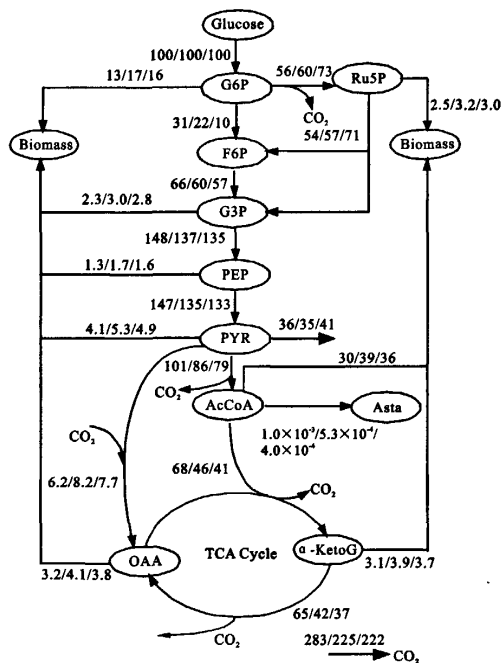


图 1 不同质量浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 条件下虾青素合成
Fig. 1 Time course of astaxanthin content at various $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations

葡萄糖消耗速率、虾青素比生成速率、丙酮酸比分泌速率,并计算得到二氧化碳的比释放速率。求解矩阵方程,得到不同氮浓度下红发夫酵母中心碳代谢的通量分布。结果如图 2 所示,图中数据依次表示 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 培养下的通量值。



G6P: 6-磷酸葡萄糖; Ru5P: 5-磷酸核酮糖; F6P: 6-磷酸果糖;
G3P: 3-磷酸甘油醛; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; PYR: 丙酮酸;
AcCoA: 乙酰辅酶 A; OAA: 草酰乙酸; α -KetoG: α -酮戊二酸;
Asta: 虾青素。

图 2 不同氮源质量浓度下红发夫酵母的中心碳代谢通量分布图

Fig. 2 Metabolic flux distribution of *Phaffia rhodozyma* at various nitrogen concentrations

对比不同的氮质量浓度下红发夫酵母中心碳

代谢的通量分布可以发现:

(1)在不同的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度下,红发夫酵母磷酸戊糖途径的通量都比较高。Cannizzaro 等人^[19]在以不同稀释率连续培养红发夫酵母的条件下,通过代谢网络分析也发现红发夫酵母磷酸戊糖途径的相对通量很高。Dong 等人^[20]代谢通量分析的结果也表明,在纯培养及其与雨生红球藻的混合培养条件下,红发夫酵母磷酸戊糖途径的相对通量都较高,分别为 48% 和 51%。这些结果都可以从红发夫酵母的生理特点来解释。红发夫酵母是一种富含脂质的、生产虾青素的红酵母。无论是脂肪酸的合成,还是虾青素的合成都需要大量 NADPH。磷酸戊糖途径的高通量,就为其脂肪酸和虾青素的合成提供了充足的还原力。

(2)与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度为 5 g/L 相比,在低氮 (1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 条件下,用于细胞合成的前体物质 (6-磷酸葡萄糖, 5-磷酸核酮糖, 3-磷酸甘油醛, 磷酸烯醇式丙酮酸, 丙酮酸, 乙酰辅酶 A, 草酰乙酸, α -酮戊二酸) 的通量明显下降,这说明低氮限制了红发夫酵母的生长及蛋白质合成。

(3)在不同的氮浓度下,红发夫酵母丙酮酸节点均有大于 35% 的通量分泌到胞外。这个结果与作者前面的研究结果一致^[10, 20-21]。

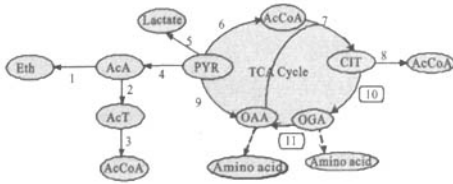
(4)虾青素合成反应的相对通量随着氮质量浓度的降低而升高。

(5)生成乙酰辅酶 A 反应的相对通量随着氮质量浓度的降低而升高。这个规律与虾青素合成反应的相对通量随氮质量浓度的变化规律一致。乙酰辅酶 A 既是红发夫酵母合成虾青素的结构单元,又是合成初级代谢物如脂肪酸等的前体。Vustin^[8]和董庆霖^[21]等人都认为红发夫酵母细胞中的乙酰辅酶 A 是其虾青素合成的一个限制因素。通量分析结果表明,生成乙酰辅酶 A 的反应的通量越高,虾青素合成反应的通量也就越高。这个结果支持了 Vustin 和董庆霖等人的观点。那么,低氮培养条件很可能是通过促进红发夫酵母生成乙酰辅酶 A,进而促进了其虾青素的合成。

2.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度对红发夫酵母丙酮酸代谢相关酶活性的影响

为进一步揭示低氮促进红发夫酵母虾青素合成的机理,作者又采用酶活分析的方法,研究了红发夫酵母的丙酮酸代谢。

从图 3 可以看出,丙酮酸——这一位于酵解和呼吸作用分支点的关键初级代谢中间物,在红发夫酵母中可能有多个去路。



Eth;乙醇;AcA;乙醛;AcT;乙酸;AcCoA;乙酰辅酶 A;Lac;乳酸;PYR;丙酮酸;CIT;柠檬酸;OGA; α -酮戊二酸;OAA;草酰乙酸;

1;乙醇脱氢酶;2;乙醛脱氢酶;3;乙酰辅酶 A 合成酶;4;丙酮酸脱羧酶;5;乳酸脱氢酶;6;丙酮酸脱氢酶复合体;7;柠檬酸合成酶;8;柠檬酸裂解酶;9;丙酮酸羧化酶;10 和 11 表示由多个酶催化的多步线性反应。

图 3 红发夫酵母的丙酮酸代谢模型

Fig. 3 Pyruvate metabolism model of *P. rhodozyma*

丙酮酸羧化酶、丙酮酸脱氢酶、乙酰辅酶 A 合成酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、 NAD^+ -乙醛脱氢酶、 NADP^+ -乙醛脱氢酶、乙醇脱氢酶、柠檬酸裂解酶的活性都在实验中测得(结果见图 4—6),说明这些酶在红发夫酵母细胞内存在。结合上述实验结果以及文献报道^[19, 21, 22],提出了红发夫酵母的丙酮酸代谢模型)。

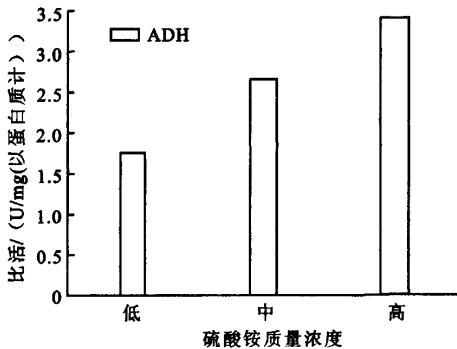


图 4 不同氮质量浓度下 24 h 培养物的粗液中乙醇脱氢酶(ADH)的活性

Fig. 4 The activity of alcohol dehydrogenase in cell extracts from cultures of 24 h at various nitrogen concentrations

在各个 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度下,乙醇脱氢酶的活性都较高,而 NAD^+ -乙醛脱氢酶、 NADP^+ -乙醛脱氢酶和乙酰辅酶 A 合成酶的活性都很低。这说明由丙酮酸脱羧酶催化产生的乙醛可能主要是通过乙醇脱氢酶代谢产生乙醇,而不是通过丙酮酸脱氢酶旁路产生乙酸或乙酰辅酶 A。同时,在不同的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度下,红发夫酵母的丙酮酸脱氢酶活性相差不大,而柠檬酸裂解酶的活性随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度的降低而升高(图 6)。柠檬酸裂解酶是富含脂质的酵母细胞质中的一种酶,Ev-

ans 等人认为,这类酵母合成脂类的前体——乙酰辅酶 A 主要由该酶催化产生^[23]。红发夫酵母是一种富含脂质的红酵母,并且其合成虾青素的前体也是乙酰辅酶 A。由此推断低氮促进红发夫酵母的虾青素合成很可能是与其提高了柠檬酸裂解酶的活性,进而促进了乙酰辅酶 A 的合成有关。

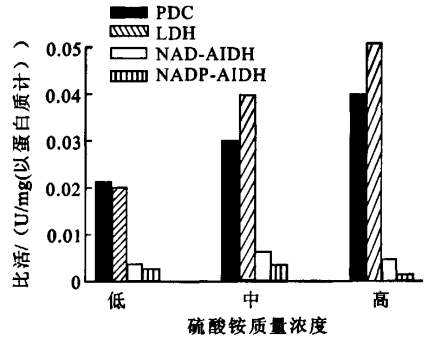


图 5 不同氮质量浓度下 24 h 培养物的粗液中丙酮酸脱羧酶(PDC)、乳酸脱氢酶(LDH)、 NAD^+ -乙醛脱氢酶(NAD-AIDH)和 NADP^+ -乙醛脱氢酶(NADP-AIDH)的活性

Fig. 5 The activities of pyruvate decarboxylase, lactate dehydrogenase, NAD^+ and NADP^+ dependent acetaldehyde dehydrogenase in cell extracts from cultures of 24 h at various nitrogen concentrations

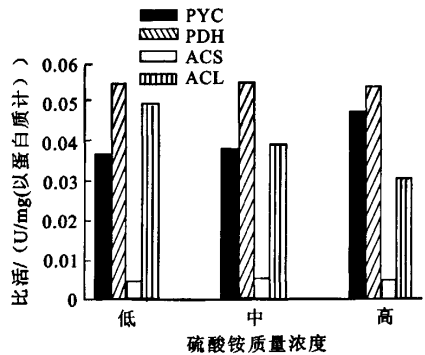


图 6 不同氮质量浓度下 24 h 培养物的粗液中丙酮酸羧化酶(PYC)、丙酮酸脱氢酶(PDH)、乙酰辅酶 A 合成酶(ACS)和柠檬酸裂解酶(ACL)的活性

Fig. 6 The activities of pyruvate carboxylase, pyruvate dehydrogenase, acetyl-CoA synthetase and ATP: citrate lyase in cell extracts from cultures of 24 h at various nitrogen concentrations

2.4 低氮促进红发夫酵母合成虾青素的机理

为进一步确定红发夫酵母的虾青素合成和它的柠檬酸裂解酶活性的关系,作者测定了柠檬酸裂解酶活性的变化曲线(结果见图 7)。

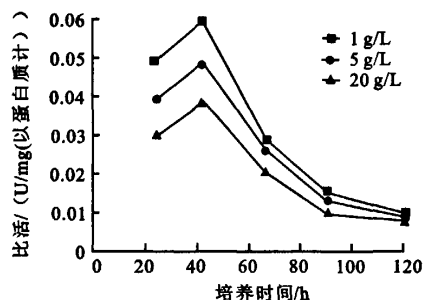


图7 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度下柠檬酸裂解酶活性随时间的变化

Fig. 7 Time course of the activity of ATP: citrate lyase in cell extracts from cultures at various $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentrations

对比图1和图7可以看出:在不同的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度下,红发夫酵母的柠檬酸裂解酶活性与它的虾青素合成两者之间总存在这样的关系:24~60 h,柠檬酸裂解酶活性较高,细胞中虾青素的含量也增加较快;66~78 h,酶活性较低,细胞中虾青素的含量微增;80~120 h,酶活性进一步降低,细胞中虾青素的含量几乎不增加,甚至开始下降。

Flores-Cotera 等人认为红发夫酵母虾青素合成途径中的上游反应发生在细胞质中^[24]。由于乙酰辅酶A不能直接通过线粒体膜,所以红发夫酵母细胞质中的乙酰辅酶A源自两条途径:(1)丙酮酸脱氢酶旁路;(2)柠檬酸裂解酶催化的柠檬酸裂解反应,即线粒体内的柠檬酸通过三羧酸载体转运透过线粒体膜,然后由细胞质中的柠檬酸裂解酶裂解为乙酰辅酶A和草酰乙酸。而红发夫酵母丙酮酸脱氢酶旁路相关酶的活性极低。那么,红发夫酵母

细胞质中乙酰辅酶A的产生主要由柠檬酸裂解反应决定。随着氮质量浓度的降低,该裂解反应的通量将增加,产生乙酰辅酶A的量也将增加;第一,催化该反应的酶——柠檬酸裂解酶活性随着氮质量浓度的降低而升高。第二,代谢通量分析表明,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度为1 g/L时,红发夫酵母的生长和蛋白质合成受到抑制。那么,在低氮条件下,一方面,用于蛋白质合成的ATP的量降低,可以有更多的ATP用于柠檬酸裂解反应;另一方面,从TCA循环中移出的,用于合成氨基酸的草酰乙酸和 α -酮戊二酸的量将大大降低,线粒体中积累并转运到细胞质的柠檬酸的量可能增加(图3)。因此,降低培养基中的氮质量浓度可以提高红发夫酵母柠檬酸裂解反应的通量,增加其细胞质中乙酰辅酶A的合成。由于乙酰辅酶A既是红发夫酵母合成虾青素的前体物质,也是其积累虾青素的限制因素,所以低氮促进了红发夫酵母的虾青素合成。

3 结 语

参与红发夫酵母丙酮酸脱氢酶旁路的乙醛脱氢酶和乙酰辅酶A合成酶的活性很低。柠檬酸裂解反应是其细胞质中乙酰辅酶A的重要来源。降低培养基中氮质量浓度,通过限制红发夫酵母的蛋白质合成及提高它的柠檬酸裂解酶活性的方式,提高柠檬酸裂解反应的通量,增加红发夫酵母细胞质中乙酰辅酶A的生成,从而促进其虾青素的合成。因此,通过基因工程的方法,过量表达编码柠檬酸裂解酶的基因,可能进一步提高红发夫酵母的虾青素产量。

参考文献(References):

- [1] Johnson E A, Villa T G, Lewis M J. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets[J]. *Aquaculture*, 1980, 20(5): 123-134.
- [2] Kobayashi M T, Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 867-873.
- [3] Johnson E A, Schroeder W A. Microbial carotenoids[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1996, 53: 119-178.
- [4] Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, et al. Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin [J]. *Cancer Research*, 1995, 55(18): 4059-4064.
- [5] 梁新乐,岑沛霖,张虹,等. 摇瓶培养条件对 *Phaffia rhodozyma* 生物合成虾青素的影响[J]. 天津轻工业学院学报, 2000 (2): 6-9.
- LIANG Xin-le, CEN Pei-lin, ZHANG Hong, et al. Influences on nutrition on biosynthesis of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* in batch cultivation[J]. *Journal of Tianjin Institute of Light Industry*, 2000(2): 6-9 (in Chinese).
- [6] 朱明军,梁世中. 红发夫酵母生长和虾青素积累培养参数的优化[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2005, 20(2): 17-19.
- ZHU Ming-jun, LIANG Shi-zhong. Optimization of culture parameters of growth and astaxanthin accumulation by *Phaf-*

- fia rhodozyma*[J]. **Journal of Zhengzhou University of Light Industry, Natural Science**, 2005, 20(2): 17—19 (in Chinese).
- [7] WANG W, YU L, ZHOU P. Effect of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. **Bioresource Technology**, 2006, 97(1): 26—31.
- [8] Vustin M M, Belykh E N, Kishilova S A. Relationship between astaxanthin production and the intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*[J]. **Microbiology**, 2004, 73(6): 643—649.
- [9] Sedmak J J, Weerasinbe K D, Jolly O S. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*[J]. **Biotechnology Techniques**, 1990, 4(2): 107—112.
- [10] 孙乃霞,董庆霖,赵学明. 高产虾青素红发夫酵母的选育及代谢通量分析[J]. 生物加工过程, 2006, 4(1): 54—60.
SUN Nai-xia, DONG Qing-lin, ZHAO Xue-ming. Breeding of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* and metabolic flux analysis[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2006, 4(1): 54—60 (in Chinese).
- [11] 马红武,赵学明,郭晓峰,等. 结合元素组成数据进行细胞生长过程代谢通量分析[J]. 化工学报, 2002, 53(8): 847—852.
MA Hong-wu, ZHAO Xue-ming, GUO Xiao-feng, et al. Metabolic flux analysis of cellular growth using additional elemental composition data[J]. **Journal of Chemical Industry and Engineering (China)**, 2002, 53(8): 847—852 (in Chinese).
- [12] Skory C D. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(6): 2343—2348.
- [13] Ruijter G J G, Panneman H, Visser J. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1997, 1334(2-3): 317—326.
- [14] Van den Berg M A, De Jong-Gubbels P, Kortland C J, et al. The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation[J]. **Journal of Biological chemistry**, 1996, 271(46): 28953—28959.
- [15] Postma E, Verduyn C, Scheffers W A, et al. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1989, 55(2): 468—477.
- [16] Huang Y, Picha D H, Kilili A W. Atmospheric oxygen level influences alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activities in sweetpotato roots[J]. **Journal of Plant Physiology**, 2002, 159(2): 129—136.
- [17] Antranikian G, Herzberg C, Gottschalk G. Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1981, 152(3): 1284—1287.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72(1-2): 248—254.
- [19] Cannizzaro C, Christensen B, Nielsen J, et al. Metabolic network analysis on *Phaffia rhodozyma* yeast using ¹³C-labeled glucose and gas chromatography-mass spectrometry[J]. **Metabolic Engineering**, 2004, 6(4): 340—351.
- [20] DONG Q L, ZHAO X M, MA H W, et al. Metabolic flux analysis of the two astaxanthin-producing microorganisms *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma* in the pure and mixed cultures[J]. **Biotechnology Journal**, 2006, 11(1): 1283—1292.
- [21] 董庆霖. 利用雨生红球藻和红发夫酵母代谢过程中的协同效应提高虾青素产量[D]. 天津: 天津大学, 2003.
- [22] Boulton C A, Ratledge C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase[J]. **Journal of General Microbiology**, 1981, 127(1): 169—176.
- [23] Evans C T, Scragg A H, Ratledge C. Regulation of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and nonoleaginous yeasts by adenine nucleotides[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1983, 132(3): 609—615.
- [24] Flores-Cotera L B, Martin R, Sanchez S. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels on ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001, 55(3): 341—347.

(责任编辑:朱明)