



微生物基础知识讲座



普 通 微 生 物 学

(六) 微生物的代谢活动

北京大学制药厂生物化学专业 72 届工农兵学员

自然界广泛分布着各式各样的微生物，它们代谢及营养的方式也是多种多样的。只有人们掌握了微生物的代谢活动规律以后，才能有意识地控制它们，限制或消灭它们的有害活动，利用它们的有益活动，并把它们广泛地应用到医药、农业、食品、化工、纺织、皮革、石油及冶金等各个领域，为人民创造更多的财富。

有关物质代谢的细节，在生物化学书中已有详细介绍。这里，是在了解微生物代谢活动本质的同时，适当介绍人们如何利用这些活动进行工农业生产的一些典型范例。

第一部分 微生物对不含氮有机物的分解

第一节 微生物对多糖类物质的分解

一、纤维素的分解

(一) 分解纤维素的微生物

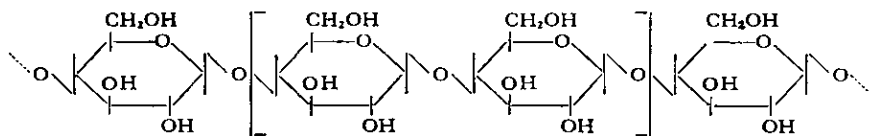
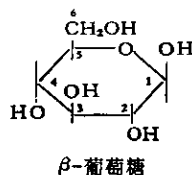
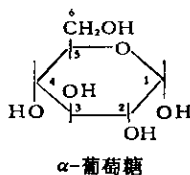
纤维素是植物细胞壁的主要成分。一年生的植物死后，全部以有机物状态进入土壤。多年生植物也有大量枯枝、落叶、朽根、树皮等落到土壤内。农田中还要施用大量有机肥料，纤维素含量也很丰富。所有这

些有机质中，大约 50% 以上是纤维素的成分。因此，纤维素的分解不仅对提高土壤肥力，增加作物产量具有十分重要的意义，而且也是自然界碳素转化的重要环节。

在自然界中纤维素的分解是一些细菌、放线菌和真菌的生命活动所引起的。随着环境条件的不同，分解纤维素的微生物种类、数量和活动强度都有很大差异。一般在好气条件下主要是霉菌（包括木霉、镰刀霉、青霉、曲霉、毛霉、葡萄霉等属中的一些种）、放线菌和好气性细菌（如粘细菌占有特别重要的地位）在起作用，而在嫌气条件下则主要由厌气性细菌，大都是生芽孢的，属于丁酸类型发酵的细菌，如奥氏芽孢梭菌、溶纤维芽孢梭菌和高温芽孢杆菌等。

(二) 纤维素分解的化学过程

纤维素是由约 1000—10,000 个 β -葡萄糖以 1-4 糖苷键联结起来的高分子多糖化合物。



纤维二糖单位

纤维素分子的片断结构

微生物分解纤维素是通过纤维素酶的催化作用。它水解纤维素生成纤维二糖和葡萄糖，只能分解 4-位上有 β -吡喃葡萄糖基的糖苷，具有不同的组分。一般真菌的纤维素酶是胞外酶，易于从细胞外培养液中提出，而细菌产生的纤维素酶往往与细胞表面结合存在，因此只有当纤维素和细胞接触时才能被分解，要把酶从细胞中单独提出使用就有一定困难。所以目前工业生产多用真菌为生产菌种。国内主要是用绿色木霉。

(三) 纤维素酶的生产和应用

纤维素是自然界中最丰富的有机物质，借纤维素酶的作用，将纤维素转变为糖，供作发酵原料、饲料或食品等用，可节约大量粮食，具有重大的经济意义。因此纤维素酶的研究、生产和应用普遍受到国内外的重视。国内目前主要采用麸曲固体发酵法生产纤维素酶，也可用液体深层培养，培养时除普通营养成分外，一般需加纤维素作为诱导物来提高产量。

因纤维素酶能破坏细胞壁的纤维素成分，故一般在用植物为原料制酒、制酒精、制油和提取淀粉、蛋白质时添加少许纤维素酶，能显著提高内含物得率。另外在做猪的发酵饲料时添加少许纤维素酶，可以提高饲料的营养价值。

利用植物秸秆为原料制沼气时，首先是一些嫌气性的非甲烷产生菌对纤维素进行分解，将纤维素等有机物分解成醇类和有机酸（如乙酸等）等，为产生甲烷的细菌提供了营养。此外在进行高温堆肥的过程中，也有大量嗜高温的分解纤维素的微生物参与活动。

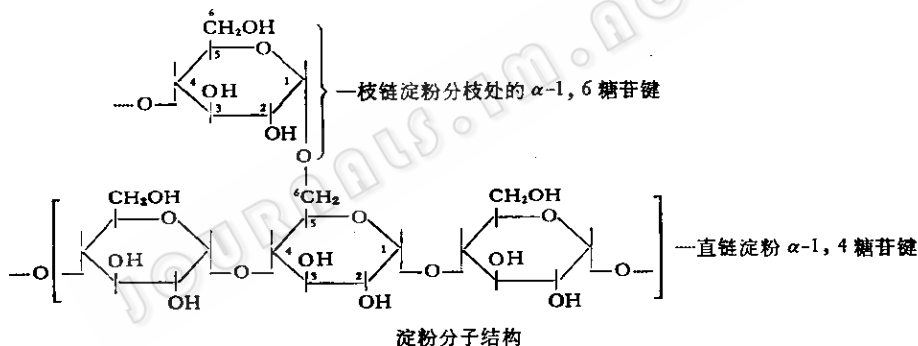
二、淀粉的分解

淀粉大都存在于植物的种子、块茎（如甘薯、马铃薯）、及干果（栗子、白果等）中。很多野生植物如金剛头（茨茯苓）中淀粉含量也很高。由于淀粉是微生物的碳源，又是生产饴糖及葡萄糖等的原料，所以利用微生物对淀粉的分解，在发酵工业中有很大重要性。

(一) 淀粉的分子结构

淀粉也是由很多葡萄糖分子联结起来的大分子，但和纤维素不同，淀粉的基本组成单位是 α -葡萄糖。

淀粉有直链淀粉和枝链淀粉二种，直链淀粉是由 300—400 个葡萄糖分子以 1,4 糖苷键联结而成。枝链淀粉中葡萄糖分子除去有 α -1,4 糖苷键外，还有 α -1,6 糖苷键。枝链淀粉的分子比直链淀粉大，约有 1300 个或更多的葡萄糖分子组成。



(二) 微生物产生的淀粉酶的种类

淀粉酶是水解淀粉中糖苷键的一类酶的总称。根据水解淀粉作用的部位不同，分为以下几种：

1. α -淀粉酶（液化型淀粉酶） 此酶可将直链淀粉分解成麦芽糖及糊精，切断直链淀粉分子内的 α -1,4 糖苷键，但不能分解枝链淀粉的 α -1,6 糖苷键。水解产物为分子量较低的糊精，同时淀粉粘度下降，这个过程称为液化。糊精的葡萄糖链长短很不一样，根据与碘呈不同颜色的反应，又有紫糊精、红糊精及无色糊精之分。淀粉与碘呈兰色反应，当其与淀粉酶作用至与碘液生成红棕色或无色时，液化即完成。

目前我国生产 α -淀粉酶的菌种是枯草杆菌 BF7658。

2. β -淀粉酶（糖化型淀粉酶） 此酶可将直链淀粉彻底水解成二个葡萄糖联成的分子，叫麦芽糖。对枝链淀粉只能从分子外端切下麦芽糖，而不能作用于

α -1,6 糖苷键。

β -淀粉酶存在于麦芽及谷物中。最近报道微生物中也有类似的酶。

3. 葡萄糖淀粉酶（糖化型淀粉酶） 葡萄糖淀粉酶能从淀粉的非还原性末端一个个地将葡萄糖切下，既可作用于 α -1,4 糖苷键，也可作用于 α -1,6 糖苷键。水解的最终产物是葡萄糖，这个过程称为糖化。

常用的葡萄糖淀粉酶生产菌种是黑曲霉、红曲霉、雪白根霉等，其中雪白根霉因其不含转移糖苷酶，对淀粉的糖化率高达 100%，但不适于液体培养。黑曲霉可以液体培养，是目前国内使用的主要菌种，但含转移糖苷酶，须设法除去。国外报道用诱变的几乎不含转移糖苷酶的曲霉菌株，用该酶制成葡萄糖 DE（葡萄糖值）可达 99.7—99.9%。

4. 异淀粉酶 此酶存在于某些酵母和细菌中，专门分解 α -1,6 糖苷键。它作用于枝链淀粉，可切可

分支点,形成较短链的直链淀粉,可用作食品包装薄膜。它与 β 淀粉酶联合作用时,可将淀粉彻底分解成麦芽糖。用于饴糖生产上可以提高麦芽糖含量,提高饴糖质量。用于酶法制啤酒可以提高发酵度。

5. 转移糖苷酶 此酶能使麦芽糖生成异麦芽糖、寡糖,降低糖液的纯度,并阻碍葡萄糖结晶,所以生产上多筛选不含转移糖苷酶的菌株,或用诱变方法改造原有菌株,也可用水合硅酸镁、漂白土、陶土等处理方法,将此酶除去。或是加用异淀粉酶将寡糖分解成葡萄糖。

(三)淀粉酶的工业生产和应用

细菌淀粉酶一般采用液体深层培养进行生产。霉菌中黑曲霉过去采用麸曲法进行培养,现在也可改用液体法。但根霉不适于液体培养,一般采用麸曲法进行固体培养。

淀粉酶的应用极广,如:

1. 在制糖工业中的应用 过去生产葡萄糖都是采用酶法水解,不仅质量差、产量低,而且需要耐酸设备。改用酶法生产,可先用液化型淀粉酶将淀粉液化成糊精,再用糖化型淀粉酶糖化,糖化液中葡萄糖DE度大大提高,并且不需耐酸设备,改善了劳动条件。用淀粉酶代替麦芽制造饴糖,每吨原料可节省小麦160公斤。

2. 纺织工业上用于上浆和退浆 为了使纤维增加强度和光滑性,便于纺织,需要先上浆,上浆所用的淀粉要用 α -淀粉酶处理到一定粘度后才可作为浆料。在纺织品漂白、印染之前,则需用 α -淀粉酶除去浆料,以便染色并使产品手感柔软。

3. 在食品和发酵工业中的应用 在制醋、制酱油时利用黑曲霉和根霉等菌株将淀粉原料糖化,在我国已有悠久历史和丰富经验。目前我国在酒精发酵时使用细菌淀粉酶进行浓醪发酵,使酒精含量提高到10.5—11.5%,每吨酒精减低耗煤10%,还提高了设备生产能力。

4. 在日用化学工业方面的应用 国外将淀粉酶加到洗涤剂、牙膏、牙粉和漱口水中。加酶洗涤剂具有缩短洗涤时间、延长织物使用寿命、提高洗涤效果等优点。

5. 在医药方面的应用 我国古时就利用“神曲”治疗腹疾。霉菌淀粉酶现多作为消化酶使用。

三、果胶物质的分解

果胶是植物细胞间质的主要成分,占植物体的15—30%,它与钙结合成不溶性的原果胶存在于植物体内,使细胞与细胞相互联结。当原果胶被原果胶酶分解时,水解成为聚合链较短的、可溶性的多聚甲基半乳糖醛酸,称可溶性果胶,这时植物细胞彼此分离而成游离状态。可溶性果胶又进一步被果胶甲酯水解酶分解成由不含甲酯的半乳糖醛酸组成的果胶酸,最后半

乳糖醛酸酶将果胶酸水解成半乳糖醛酸的单体。

我国民间将大麻、亚麻的茎秆进行脱胶制麻的传统方法,主要就是借助于微生物将果胶质分解的过程。将大麻或亚麻浸泡在池塘中数日,其中的芽孢杆菌分泌果胶酶,使薄壁组织的细胞间质溶解,而比较坚韧的纤维维管束就可与之分开。分解到一定程度即可取出,成为纤维。目前在脱胶时,进行人工接种费地浸麻梭状芽孢杆菌,大大加速了浸麻速度。

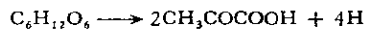
果胶酶除用于浸麻外,主要用于果汁制造时作为澄清剂,降低果汁粘度,和制桔子罐头时利用果胶酶脱去囊衣,效果显著。

第二节 微生物对己糖的分解

己糖是植物体内最基本的、不含氮的有机化合物。植物体中所含的单糖、双糖及多糖类物质的总量可以达到植物干重的50—80%,其中己糖更占有首要地位。例如,葡萄糖和果糖都是植物体内单独存在的己糖,而葡萄糖更是植物光合作用的关键性产物。在植物体和动物体内存在的双糖主要有麦芽糖、蔗糖和乳糖等,它们分解时,都成为二个己糖。至于多糖中的淀粉、肝糖和纤维素等都是葡萄糖的多聚物,显然,己糖的合成和分解在生物碳素代谢中占有十分重要的地位,同时也是酿造工业的发酵基础。

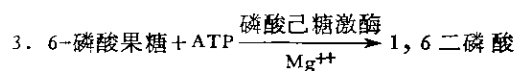
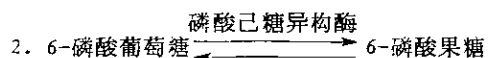
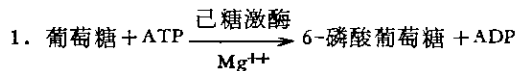
一、葡萄糖的酵解作用

己糖的酵解作用是在无氧条件下进行的,最终结果是使一分子己糖成为二分子丙酮酸,并脱去四个原子的氢:



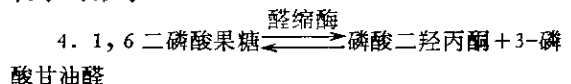
这个过程共有10步,可分三个主要阶段来完成。每个步骤又包括许多连续的化学反应过程,几乎每种反应都有特异的酶催化才能进行。现将过程叙述如下:

(一)第一阶段葡萄糖经磷酸化变成1,6二磷酸果糖的过程

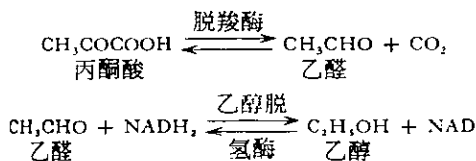


果糖

(二)第二阶段由1,6二磷酸果糖分解生成一分子3-磷酸甘油醛和一分子磷酸二羟丙酮,所以至此是一分子己糖分裂成两分子丙糖,消耗了两分子ATP



葡萄糖的受氢体,成为乙醇,即酒精:



酒精发酵除应有充足的发酵基质(糖)外,还需有酵母菌生活及进行发酵作用所需的养料、温度、pH 值和适宜的通气条件。酵母菌能利用糖类、醛类、有机酸及其盐类,甘油等作为碳素养料,但不能直接利用淀粉、纤维素等多糖。氮素养料中以铵盐是最适宜的无机氮源,氨基酸和蛋白胨等可作有机氮源,但不能利用硝酸盐和尿素。为了促进酵母旺盛生长,还需要维生素类的物质。因此,糖蜜或果汁等均可直接作为酒精发酵的原料,至于淀粉和纤维素等原料,如薯干、碎米、野生植物的种子或块茎、碎木屑等则必须经过酸水解或酶解成糖后,才能使用。我国酒精工业主要采用薯干或糖蜜为原料。

酒精发酵分制备酒母和发酵二步。酒母是酒精发酵时用的接种剂,因此要求酵母细胞量多、健壮、无杂菌。制备酒母选用营养丰富的淀粉质原料,经过糖化、酸化、灭菌后,接种酵母。以薯干为例,薯干粉碎,加水蒸煮成醪、冷至 60℃,加入黑曲霉制成的糖化曲,在 55—60℃ 下糖化,使醪液含糖 12—13 Brix,并添加 0.1% (NH₄)₂SO₄ 作为氮源,酵母菌生长适宜的 pH 为 5.0—5.5,为了防止杂菌污染,糖化醪内应加 0.1% H₂SO₄,使 pH 维持在 4—4.5 之间。酵母菌生长的适宜温度在 28—34℃,若温度超过 35℃,酵母菌的活力减退。制备酒母时,温度保持在 28—30℃,并进行搅拌通气促使细胞大量繁殖,等细胞繁殖到每毫升含 1 亿个左右,发芽率在 25% 左右,糖度下降到 2—2.5 Brix 时,在显微镜下进行检查,如细胞壮大且无杂菌,即可作为发酵的种子。

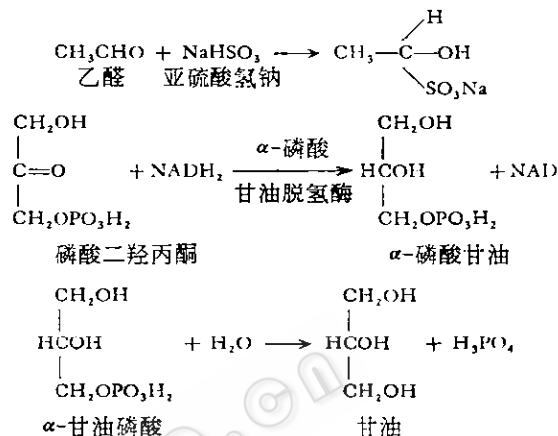
发酵时应控制发酵醪的酸度、温度和接种酵母的数量,并控制厌氧条件。薯干同样经过糖化,使含糖浓度为 17 Brix,接种酵母量在 5—10%,pH 调节在 4.5 左右。整个发酵过程一般经过三个阶段:(1) 前发酵:约经 10 个小时左右,此时温度应控制在 27—29℃,酵母迅速繁殖,酒精和 CO₂ 产生少,糖度由 17 Brix 下降到 10 Brix;(2) 主发酵:此阶段约需 12 小时,此时发酵旺盛,CO₂ 大量排出,发酵液出现大量泡沫如沸腾状、酒精迅速增多,温度上升很快,应控制在 32—34℃,糖度消耗下降至 3 Brix 左右;(3) 后发酵:排出 CO₂ 逐渐减少,泡沫也逐渐消失,总糖下降到 1—1.2 Brix 以下,温度控制在 30—32℃,约经 40 小时发酵完毕,即可进行蒸馏得出产品。

(三) 甘油发酵

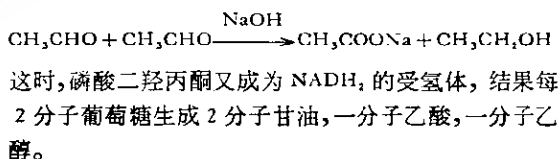
酵母菌除能进行酒精发酵外,在环境条件改变时

也会改变发酵途径。例如在发酵液中加入亚硫酸或亚硫酸盐,或调节发酵液成碱性时,可使酒精发酵转变为以产生甘油、乙醛(或乙醇和乙醛酸)为主的发酵过程。

甘油发酵的机理是因为葡萄糖经酵解途径产生乙醛后,亚硫酸或亚硫酸盐与乙醛结合成为复合物,乙醛不再能作为受氢体,而迫使磷酸二羟丙酮代替乙醛受氢,生成 α-甘油磷酸。α-甘油磷酸在磷酸甘油酯酶催化下水解,除去磷酸,生成甘油:



在碱性条件下(pH 7.6),发酵产生的乙醛同样不能作为正常的受氢体,而是两分子乙醛之间发生歧化反应,即一分子乙醛氧化成乙酸,另一分子乙醛还原成乙醇。



甘油是重要的化工原料,又是制造炸药的原料,故具有重要价值。过去甘油主要是通过油脂皂化而获得,现已可由发酵法生产,提供了方便的生产途径。

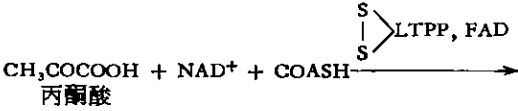
总之,从上述三例,可以得出一般性的结论,即:葡萄糖(或其他基质)发酵产物的多样性,不仅决定于微生物种类,而且也决定于发酵环境条件。环境条件改变后,发酵过程中某些环节也随之变化,结果也就改变了发酵类型。因此发酵工业不仅要选择好的菌种,还要控制适宜的环境条件。

三、糖的有氧分解

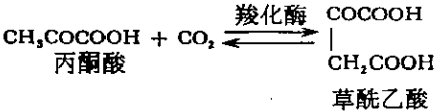
(一) 三羧酸循环的反应过程

许多好气性及兼性厌氧微生物利用葡萄糖生成丙酮酸后,在有氧的条件下,不是生成各种发酵产物,而是进行比较复杂的三羧酸循环。在一系列酶的催化反应下,经过缩合、脱羧、脱氢等过程,形成各种含有三个羧基(—COOH)或二个羧基的有机酸,最后被彻底氧化,成为 CO₂ 和水,并生成大量能量。

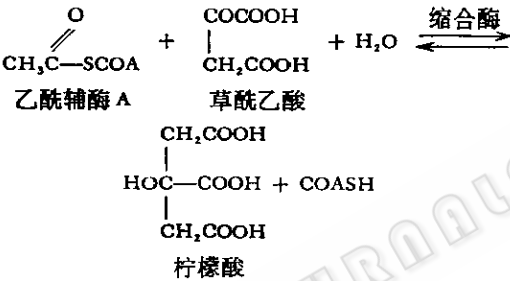
1. 由酵解作用产生的丙酮酸在进入三羧酸循环之前,首先被氧化脱羧,生成乙酰辅酶 A。这个反应需要有焦磷酸硫胺素 (TPP)、 α -6, 8 二硫辛酸 $\begin{pmatrix} S \\ | \\ S \end{pmatrix} L$ 辅酶 A (COA-SH)、烟酰胺核苷酸 (NAD) 及黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 等辅助因素参加。



2. 一部分丙酮酸羧化,生成草酰乙酸:



3. 乙酰辅酶 A 和草酰乙酸在缩合酶的催化下,合成柠檬酸而进入三羧酸循环,开始了环的运转:



4. 此后柠檬酸在顺乌头酶的催化下,脱去一分子水生成顺乌头酸,顺乌头酸加水成为异柠檬酸。异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶的催化下脱氢,变成草酰琥珀酸。它迅速脱去一分子 CO_2 而成为二个羧基的五碳化合物—— α -酮戊二酸。所产生的 α -酮戊二酸在氧化脱羧酶系的催化下,又失去一分子 CO_2 ,生成二个羧基的四碳化合物——琥珀酸,琥珀酸又经脱氢、加水等过程,最后又生成了草酰乙酸。生成的草酰乙酸又可参加第一步反应,与乙酰辅酶 A 缩合成柠檬酸,因而此环可以不断运行。

三羧酸循环各反应可以汇集如图 2。

由图 2 中反应可以看出,每循环一周有一分子乙酰辅酶 A 被消耗。从丙酮酸脱羧开始,共放出 3 分子 CO_2 。在丙酮酸氧化脱羧以及环内 4 个反应共放出 10 个氢原子,交给 NAD、NADP 或 FAD,经生物氧化系统传递给氧,生成 5 分子水,除去环内产生的一分子水及消耗去 4 分子水外,净余 2 分子水。因此丙酮酸彻底氧化的结果,产生 3 分子 CO_2 和 2 分子水:

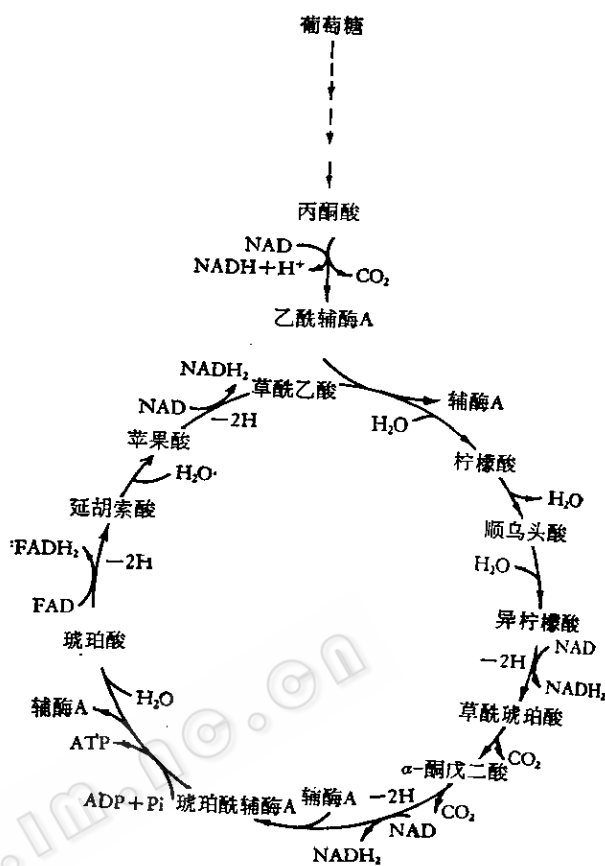
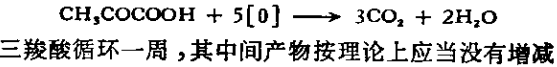


图 2 三羧酸循环

但生物有机体的代谢是相互联系的,这些中间产物随时都有参加其他代谢反应而被消耗的可能,同时也随时可以有其他代谢物产生中间产物而打破平衡的状况。因此平衡是相对的,变化是绝对的,不应将三羧酸循环看作是一成不变的东西。

(二)三羧酸循环的生理意义

1. 糖在有氧分解过程通过三羧酸循环可放出大量能量供生命活动需要。从丙酮酸开始经三羧酸循环,由于脱氢作用所产生的 3 分子 NADH, 1 分子 NADPH 和 1 分子 FADH_2 , 经过生物氧化链,每分子 NADH 或 NADPH 可生成 3 ATP, 每分子 FADH_2 可生成 2 ATP, 加上由琥珀酰辅酶 A 生成琥珀酸时所产生的 1 分子 ATP, 产生 15 ATP。因每分子葡萄糖产生 2 分子丙酮酸, 则每分子葡萄糖经三羧酸循环完全被氧化成 CO_2 和水, 共产生 30 个 ATP。由此可见,糖在有氧代谢中产生的能量大大超过了酵解作用所产生的能量,可见有氧分解在供能方面的重要性。

2. 三羧酸循环不仅是糖代谢的重要途径,也是脂类、蛋白质、核酸代谢最终氧化成 CO_2 和水的重要途径。例如蛋白质中的丙氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸经脱氨后分别生成丙酮酸、 α -酮戊二酸和草酰乙酸进入三羧酸循环。脂肪经水解生成脂肪酸和甘(下转第19页)

(上接第 34 页)

油、脂肪酸经 β -氧化作用变成乙酰辅酶 A 而进入三羧酸循环。因此三羧酸循环是各类有机物终末氧化的共同途径,也是各类有机物质相互转变的枢纽。通过三羧酸循环使糖、脂肪和蛋白质等代谢彼此相联系。

(三)糖好气性分解代谢产物的代表——

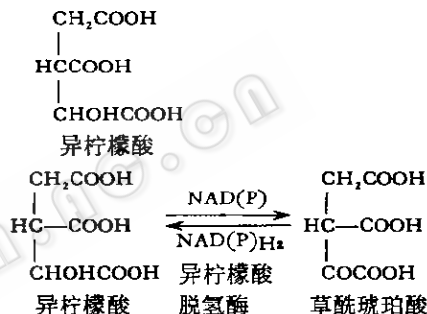
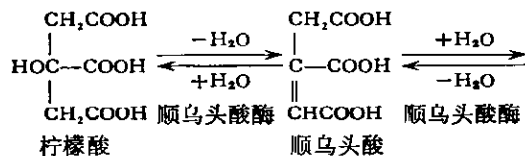
柠檬酸发酵

三羧酸循环中的代谢产物不仅是有生理上的重要性,而且还可利用发酵方法生产一些化工原料。例如延胡索酸(反丁烯二酸)、 α -酮戊二酸、柠檬酸等。可用于合成树脂、塑料、涂料、农药及医药工业。柠檬酸广泛应用于食品及医药工业,近年来还应用在石油、塑料、印染、皮革和电镀等行业。在文化大革命的推动下,我国试验成功了以薯干为原料直接发酵的深层培养法,在产量、质量、工艺、菌种选育和开展节粮、代粮等方面,都取得了很大成绩。

能产生柠檬酸的菌种很多,目前我国所用以薯干为原料发酵的菌种是黑曲霉经氮芥处理后得到的 N-558 号及经 γ 射线处理后得到的 γ -114 号等变异菌株。解脂假丝酵母是以正构烷烃为原料生产柠檬酸的菌种。

由于黑曲霉 N-558 具有淀粉酶,所以用薯干为原料不必先将原料经过糖化过程,黑曲霉本身的淀粉酶将淀粉分解成葡萄糖,经酵解生成丙酮酸,然后在有氧情况下进入三羧酸循环而生成柠檬酸。

催化柠檬酸成顺乌头酸及异柠檬酸的酶是顺乌头



酸酶,此酶在二价铁离子和有半胱氨酸时表现最大活性,而在有铁离子络合剂如亚铁氰化钾存在时则受抑制。由于柠檬酸在正常情况下不能积累,所以生产上采取添加亚铁氰化钾的办法抑制顺乌头酸酶的活性使不能产生顺乌头酸或异柠檬酸。此外也有用诱变剂亚硝基胍、氟醋酸等处理生产菌种,选择缺失异柠檬酸脱氢酶的变异菌株,提高了柠檬酸的产量。

通气量的大小在发酵过程中对柠檬酸的产生也有很大影响。例如黑曲霉 N-558 发酵时,当通气量为 1:0.3(体积/体积/分)时,柠檬酸产量为 7.02%,通气量为 1:0.5 时,产量为 7.71%,通气量为 1:1 时,柠檬酸为 9.01%,可以看出黑曲霉 N-558 发酵要求较高的通气量。