

微生物利用糖质原料积累 L-苹果酸的代谢机理

周小燕 吴清平 陈素云 钟瑜

(广东省微生物研究所, 广州 510070)

在众多的有机酸中, L-苹果酸以其独特的风味, 广泛的用途^[1], 在国内外引起人们的关注。为了创造出有工业价值的生产工艺, 许多国家的研究人员在不断地努力探索。到目前为止, 研究工作仍集中在两条途径上。一是利用微生物的富马酸酶以富马酸为底物转化生成 L-苹果酸。虽然日本人用这种方法在 1974 年即已进行小规模生产, 至今, 生产规模不大, 而且产品成本仍较高。另外一条路子就是用微生物直接发酵天然糖质原料生产 L-苹果酸。随着产酸率的提高, 生产规模可以迅速扩大, 加上消费者崇尚天然产品的心理的影响, 这条路子将会成为生产物美价廉的 L-苹果酸的途径。

这方面的研究可以追溯到本世纪初叶, 到现在, 这中间经过了曲折的过程。近十年来, 这一领域的工作不断取得进展, 发酵葡萄糖产生 L-苹果酸接近或已达到工业化生产水平的见表 1。

这些进展的取得一方面是由于选育出了优良的菌种, 另一方面是对这些菌种利用糖质原料积累 L-苹果酸的代谢机制进行了较深入的研究, 从而使菌种本身潜在的产酸能力较充分地发挥出来。

本文经广东省微生物研究所简浩然研究员审阅, 特此致谢。

表1 发酵葡萄糖产生L-苹果酸研究进展

时间	研究者	国别	菌种名称	发酵时间(h)	L-苹果酸含量(g/L)	备注
1987	金其荣等 ⁽¹⁾	中国	黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	140	68	摇瓶
1991	田渊武士等 ⁽²⁾	日本	棒状黑粉孢菌 <i>Ustilago cruv-galli</i> K391	168	52	摇瓶
1991	Emil Battat等 ⁽⁴⁾	以色列	黄曲霉* <i>Aspergillus flavus</i> Kyowa A-114 (ATCC 13697)	190	113	16L 发酵罐
1991	吴清平等	中国	曲霉 <i>Aspergillus sp. NI-14</i>	140	94**	摇瓶
				130	85***	240L 发酵罐

* 此菌株产生黄曲霉毒素⁽⁴⁾。

** 此结果糖酸转化率为 62.7%。

*** 此结果糖酸转化率为 56.7%。

(一) 微生物中与L-苹果酸有关的主要的代谢途径

L-苹果酸广泛存在于生物界,有重要的生理作用。人们对其在微生物中的生理作用也有了清晰的了解。它是三羧酸循环(TCA)及其支路乙醛酸循环中的重要有机酸,也是CO₂固定反应的产物。伍德-沃克曼首先报道了微生物可以通过C₃+C₁的加成反应生成L-苹果酸作为TCA循环中间产物的补充方式。深入的研究发现有三种途径完成CO₂固定⁽⁵⁾:(1)由磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化(激)酶(或称草酰乙酸激酶)催化,使PEP加CO₂生成草酰乙酸再还原为L-苹果酸;(2)由丙酮酸羧化酶催化丙酮酸(PYA)加CO₂生成草酰乙酸再还原为L-苹果酸;以上两个反应均需核糖三磷酸作辅酶;(3)由苹果酸酶催化,进行还原羧化作用生成L-苹果酸,在这里参与反应的辅酶是NAD(P)。应该指出的是,在正常情况下,微生物是不会积累L-苹果酸的。要积累L-苹果酸必须有补充4碳酸的途径的活跃因子⁽⁶⁾,从理论上推论,如果只考虑乙醛酸循环,1分子葡萄糖生成1分子苹果酸,理论摩尔转化率应为100%;如果单纯走CO₂固定反应,1分子葡萄糖可以生成2分子苹果酸,则理论摩尔转化率应为200%。我们将国内外研究者的实验结果进行归纳,以探求L-苹果酸积累的

机制。

(二) CO₂固定反应在L-苹果酸积累中的重要作用

Elhissy等⁽⁷⁾发现赭曲霉*Aspergillus ochraceus*和葡萄糖霉*Stachybotrys atra*的菌丝吸收了H¹⁴CO₃,¹⁴C主要进入L-苹果酸和天门冬氨酸。Piskorz-Binczycka⁽⁸⁾用标记的CO₂培养棒状孢状青霉*Penicillium isariaciforme*,在4.5天的菌丝中产生的L-苹果酸比富马酸多,而且放射性集中在L-苹果酸中。Takayuki⁽⁹⁾将裂褶菌接种于含限量的生物素、CaCO₃及NaH¹⁴CO₃的培养基中,振荡培养4天,收获菌丝,取菌丝抽提物做纸层析分析,对酸斑进行扫描测定,结果放射性又是主要在L-苹果酸的斑上检出。1988年Kubicek等⁽¹⁰⁾在研究黑曲霉生成草酸的途径中也使用NaH¹⁴CO₃,他们观察到¹⁴C不在草酸中,而是在L-苹果酸及乙酸中,由此指示出CO₂在分子中固定的位置是C₁。

到目前为止,研究者都必须在L-苹果酸的产酸培养基中使用碳酸盐,其中最主要的是CaCO₃。国内外学者认为CaCO₃是发酵产生的酸的中和剂,但其更重要的作用则是为羧化反应提供CO₂。1967年Tachibana⁽¹¹⁾用裂褶菌得到L-苹果酸的产量与培养基中的CaCO₃初浓度呈某种正相关的结果。1973年他们的实

验重复了这一结果,当培养基中不加 CaCO_3 时,能检测到的L-苹果酸极少。1985年 Takayuki^[9] 也得到类似的实验结果(表2、3)。

表2 葡萄糖为碳源时, CaCO_3 浓度对裂褶菌产生 L-苹果酸的影响

$\text{CaCO}_3(\text{g}/60\text{ml})$	0	1	2	3
L-苹果酸 (mg/100ml)	50	1650	2010	2870

表3 马铃薯淀粉为碳源时, CaCO_3 浓度对裂褶菌产生 L-苹果酸的影响

$\text{CaCO}_3(\text{g}/60\text{ml})$	0	1	2	3	4
L-苹果酸 (mg/100ml)	60	1160	1668	1953	2323

1990年 Battat 等^[4]报道将黄曲霉产酸培养基中 CaCO_3 浓度从 60g/L 提高到 90g/L, L-苹果酸产率从 0.4g/L·h 上升到 0.6g/L·h。由此可见 CaCO_3 是作为反应底物而参加反应的。在我们自己的实验中,对产酸过程做动态观察时,看到 CaCO_3 的颗粒聚集在菌丝体周围,呈某种紧密程度的结合,一般地用水冲洗, CaCO_3 不从菌丝体上脱落;而生成的苹果酸钙结晶却自然地脱落、游离开来。

以上所列举的各种实验结果都指出了 CO_2 固定反应对 L-苹果酸生成的重要作用。1985年, Takayuki 等^[9]根据对裂褶菌产生 L-苹果酸的研究,提出了如下的 L-苹果酸合成途径模式(图1)。

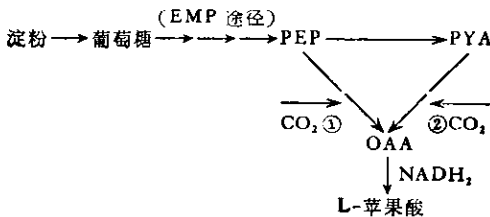


图1 裂褶菌发酵淀粉生成 L-苹果酸

①磷酸烯醇丙酮酸羧化酶, ②丙酮酸羧化酶, EMP: 糖酵解的己糖磷酸途径, PEP: 磷酸烯醇丙酮酸, PYA: 丙酮酸, OAA: 草酰乙酸。

当时他们做了用裂褶菌细胞抽提物从 PEP 形成 L-苹果酸的验证实验,其结果列于表4。

近年一些实验给出了更多证据支持上述模式。Peleg 等^[12]将 $[1-^{13}\text{C}]$ 标记的葡萄糖用于黄曲霉 *Aspergillus flavus* Kyowa A-II4

表4 用裂褶菌细胞抽提物从 PEP 形成 L-苹果酸的验证实验

反应混合液	1	2	3	4	5
PEP(0.4mol/L)	+	-	+	+	+
$\text{KHCO}_3(1.0\text{mol/L})$	+	+	+	+	+
$\text{MgCl}_2(0.1\text{mol/L})$	+	+	-	+	+
苹果酸脱氢酶 (300U/ml)	+	+	+	+	-
细胞抽提物(12.4mg 蛋白/ml)	+	+	+	-	+
$\text{NADH}(0.03\text{mol/L})$	+	+	+	+	+
KPB(pH6.8 0.1mol/L)	+	+	+	+	+
反应后生成的 L-苹果酸 (mg/L)	46.4	1.9	51.0	-	47.3

注: 25℃, 反应 17 小时的测定值。

(ATCC 13697) 产 L-苹果酸研究, 发现同位素标记只出现在 L-苹果酸的 C_3 上。他们还发现在胞质中丙酮酸羧化酶和一种 NAD^+ -苹果酸脱氢酶的同功酶的活性较高。Battat^[4]也是对上述这株黄曲霉进行研究。他们为了提高其产酸能力,做了多种对比实验,将培养了 160—185 小时所得的菌丝体进行破碎, 提取粗酶进行分析, 发现从产酸高的处理得到的粗酶中其苹果酸脱氢酶 (MDH) 的活性亦明显提高。

(三) 微生物产酸机制与其生长有关

围绕着提高糖的利用率,充分发挥 CO_2 固定反应在合成,积累 L-苹果酸的潜力方面已做了较多的研究,从中也体会到微生物的生长与产酸二者之间密不可分的关系。比如, Takayuki^[9]一方面强调限量的生物素对 L-苹果酸产生的促进作用,同时还指出硫胺素的作用方式很不一样。他们在几组处理中使用了基本成份相同的合成培养基,其中包括每 100ml 培养基中加入 2 μg 的生物素,不同的硫胺素($\text{V}_{B1}-\text{HCl}$) 浓度对产酸及菌丝干重的影响(表5)。

表5 $\text{V}_{B1}-\text{HCl}$ 浓度对黄曲霉产 L-苹果酸及菌丝干重的影响

$\text{V}_{B1}-\text{HCl}$ ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	L-苹果酸 (mg/100ml)	菌丝干重 (g/100ml)
0	测不到	不生长
1	2880	0.540
5	3331	0.800
10	2970	0.802
20	2900	0.822
100	1500	0.849