

积累 L-苹果酸的米根霉突变株酶活性初探

何 皓 李 霜 徐 晴 付永前 黄 和*

(南京工业大学制药与生命科学学院 材料化学工程国家重点实验室 江苏 南京 210009)

摘 要: 对富马酸产生菌株—米根霉 ME-F10 进行诱变育种的过程中, 得到一株性能稳定的高效积累 L-苹果酸的突变株 ME-M15。该菌株发酵 96 h 平均 L-苹果酸产量达 16.3 g/L, 较出发菌株 L-苹果酸积累量平均提高 3 倍, 而富马酸和乙醇的积累量大幅下降。对突变株代谢途径关键酶活研究表明, 突变株富马酸酶胞质途径同功酶和乙醇脱氢酶活力较之出发菌株酶活力明显减弱, 而丙酮酸羧化酶活力无明显差别。

关键词: 米根霉, L-苹果酸, 富马酸酶, 丙酮酸羧化酶, 乙醇脱氢酶

The Study of Enzymatic Activity of Mutant Strain *Rhizopus oryzae* with L-Malic Acid Accumulation

HE Hao LI Shuang XU Qing FU Yong-Qian HUANG He*

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: A stable and efficient L-Malic acid accumulation mutant strain *Rhizopus oryzae* ME-M15 was discovered occasionally in the mutation breeding for fumaric acid producers. *Rhizopus oryzae* ME-M15 gave a L-Malic acid output of 16.3 g/L on average after fermentation for 96 hours, more than 3 times than that of the parent strain ME-F10. In addition, other metabolites such as ethanol and fumaric acid were remarkably decreased in accordance with the depressed activity of the cytosolic isoenzyme of fumarase and alcohol dehydrogenase in strain ME-M15, while the activity of the pyruvate carboxylase had no significant difference.

Keywords: *Rhizopus oryzae*, L-Malic acid, Fumarase, Pyruvate carboxylase (PC), Alcohol dehydrogenase (ADH)

L-苹果酸是一种重要的有机酸, 可作为酸味剂和保鲜剂用于食品工业^[1], 是继柠檬酸、乳酸之后的世界第三大酸味添加剂。利用可再生生物质资源为原料一步发酵生产L-苹果酸的工艺最经济、最有发展前途^[2], 但目前报道的能直接利用糖质原料一步发酵生产L-苹果酸的微生物多为黄曲霉(*Aspergillus*

flavus)菌株^[3,4], 其次生代谢产物中可能存在对人体及动物有致癌作用的黄曲霉毒素, 倍受争议。

米根霉(*Rhizopus oryzae*)是经美国FDA认证的安全菌株, 所需营养源简单, 而广泛应用于L-乳酸和富马酸的生产^[5]。研究发现, 米根霉积累富马酸的代谢途径与黄曲霉积累L-苹果酸的途径类似^[6], 在

产富马酸的发酵过程中, L-苹果酸往往作为一种代谢副产物出现, 尚未引起人们的重视。因此, 利用米根霉发酵生产 L-苹果酸具有极大的潜力^[7]。

本课题组在对米根霉 ME-F10 进行诱变育种以期获得高产富马酸突变株的过程中, 发现了一株高效积累 L-苹果酸的突变株 ME-M15, 通过对其代谢过程关键酶的研究, 为利用代谢调控手段发酵米根霉菌株制备 L-苹果酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及试剂

米根霉(*Rhizopus oryzae*) ME-F10 菌株, 南京工业大学制药与生命科学学院代谢工程实验室保藏。

玉米浆由上海西王淀粉糖有限公司提供; 亚硝基胍(NTG)购自东京化成工业株式会社; 其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 斜面产孢培养: 斜面产孢培养基, 见文献[8]; 接入米根霉保藏菌种, 于 34℃ 培养 7 d~8 d。

1.2.2 筛选培养基: 1) 产酸指示平板: 参见文献[9]。2) 丙烯醇 YPD 平板: 参见文献[10]。

1.2.3 种子培养: 1) 种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 尿素 1 g/L, 玉米浆 3 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.066 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, 琼脂 1.0 g/L, 初始 pH 3.5。

2) 培养条件: 调整米根霉孢子悬浮液浓度为 10^7 个/mL, 取 2 mL 接种至 50 mL 种子培养基(4%, V/V), 置于 34℃ 往复摇床, 转速为 200 r/min 下培养 24 h。

1.2.4 摇瓶发酵培养: 1) 发酵培养基: 葡萄糖 80 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, KH_2PO_4 0.15 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.068 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCO_3 60 g/L, pH 自然。

2) 培养条件: 取 4 mL 种子培养液接种至 50 mL 发酵培养基(8%, V/V), 34℃ 恒温, 前 24 h 摇床转速为 160 r/min, 24 h 后调整为 120 r/min, 共发酵 96 h。

1.3 发酵液预处理

取 5 mL 米根霉发酵液, 添加 45 mL 1 mol/L 的 Na_2SO_4 溶液, 35℃, 150 r/min 摇床反应 10 min, 10000 r/min 离心 5 min 除去菌体和固体悬浮物, 上清液以孔径 0.45 μm 的滤膜过滤, 取 1 mL 滤液用水进行适当稀释即得到待测液。

1.4 分析方法

用 HPLC 法对发酵组分进行定量检测, 采用 BIO-RAD Aminex HPX-87H 色谱柱和 Shodex RI-101 型示差折光检测器, 65℃ 柱温下, 以 0.005 mol/L 硫酸溶液作为流动相, 流速 0.8 mL/min。

1.5 细胞破碎及组分分离

取发酵产酸阶段的米根霉菌体用于酶学分析和同功酶研究。菌丝体通过无菌棉布过滤, 冷蒸馏水洗涤除去多余钙盐。每 2 g 新鲜生长的湿菌丝体用其中含有 2 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L EDTA、187 mmol/L 甘露醇、62 mmol/L 蔗糖以及 10 $\mu\text{mol/L}$ PMSF 的 15 mL Tris-HCl(10 mmol/L, pH 7.5) 缓冲液重悬。细胞抽提物制备和细胞组分的分级分离参照 Osmani 和 Scrutton^[11] 所述方法略有改动, 改用液氮研磨破碎细胞。对所得的含胞质组分的上清液进行乙醇脱氢酶(ADH)、丙酮酸羧化酶(PC)以及富马酸酶胞质同功酶活力测定。

1.6 酶活力测定

乙醇脱氢酶活力测定参见文献[10], 富马酸酶胞质途径同功酶活力测定参见文献[3,12], 丙酮酸羧化酶活力测定方法参见文献[13]。比活力定义为 30℃ 下, 每毫克蛋白每分钟转化的产物或者辅酶的 μmol 数, 即 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

1.7 蛋白含量测定

采用 Bradford 法^[14] 测定蛋白质浓度, 标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA)。

2 结果与分析

2.1 突变株的筛选及遗传稳定性考察

通过诱变条件的研究, 制备浓度为 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL 的孢子悬浮液, 经紫外诱变 6 min 后, 于黑暗避光过夜, 经浓度为 1 mg/mL 的 NTG 溶液处理 30 min。经平板初筛和摇瓶复筛共发现 L-苹果酸积累为正突变的菌株 5 株, 其中突变株 ME-M15 的 L-苹果酸产量达 15.2 g/L, 比出发菌株提高了 271.7%, 而富马酸产量则从 30.3 g/L 减少到 18.3 g/L, 代谢副产物乙醇的积累量也减少 63.2%, 为 2.5 g/L, 如图 1 所示。

采用斜面传代法对上述苹果酸积累为正突变的 5 株菌株进行遗传稳定性实验, 结果见表 1。5 次传代实验的产酸结果表明, 突变株 M15、M90 具有稳

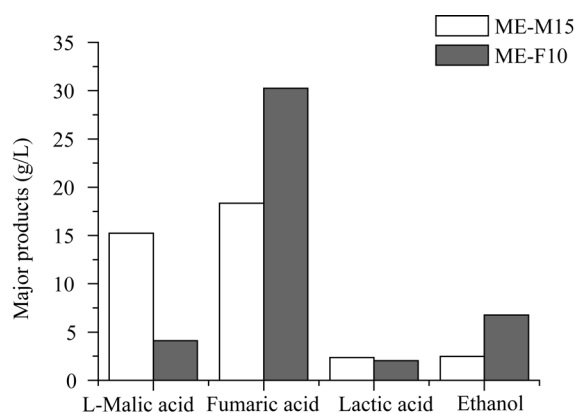


图 1 突变株 ME-M15 与出发菌株 ME-F10 的主要发酵产物比较

Fig. 1 The comparison of major fermentation products between mutant ME-M15 and original strain

Mutants	Generation				
	1	2	3	4	5
M4	7.3	6.8	6.5	5.9	4.7
M10	7.9	6.7	6.1	6.1	5.2
M15	16.6	18.7	15.8	14.8	15.7
M77	11.7	10.0	8.1	8.4	7.8
M90	9.6	8.5	9.0	8.7	8.8

定的遗传特性。而 ME-M15 五次传代平均 L-苹果酸产量 16.3 g/L, 最高产酸 18.7 g/L, 为获得的最佳突变株。

2.2 出发菌株与突变株 ME-M15 酶活力的比较

在突变株 ME-M15 和出发菌株 ME-F10 产酸摇瓶培养过程中, 每隔 12 h 取样并检测当时菌体丙酮酸羧化酶、富马酸酶胞质途径同功酶以及乙醇脱氢酶的活力。结果如下所示。

从图 2 可以看出, 突变株与出发株在发酵 96 h 内丙酮酸羧化酶的活力变化趋势基本一致, 而且各时间点两者的酶活力大小差异并不显著。

从图 3 可以看出, 突变株 ME-M15 的富马酸酶胞质同功酶活力明显降低, 其最大比活力为 300.01 U/mg, 出现在发酵 48 h 左右, 仅为出发菌株的 64.7%, 而图 4 表明, 突变株的乙醇脱氢酶比活力峰值 20.35 U/mg 也较出发菌株减少 40.7%。与酶活力变化相对应的是, 突变株 ME-M15 代谢产物中乙醇的积累量大幅下降, 而富马酸积累量与出发菌株 ME-F10 相比减少近 50%(如图 1 所示)。

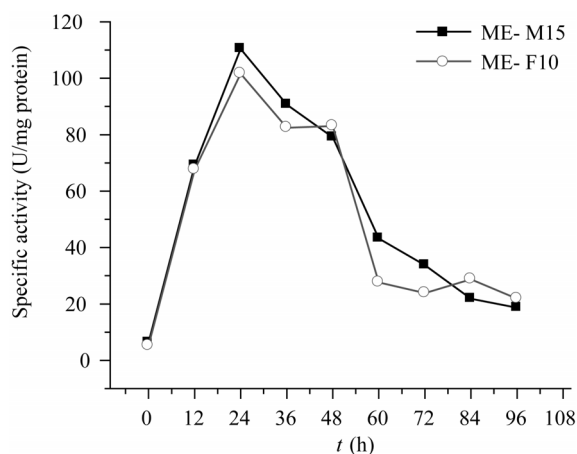


图 2 出发菌株和突变株丙酮酸羧化酶活力比较

Fig. 2 The comparison of PC activity between mutant ME-M15 and original strain

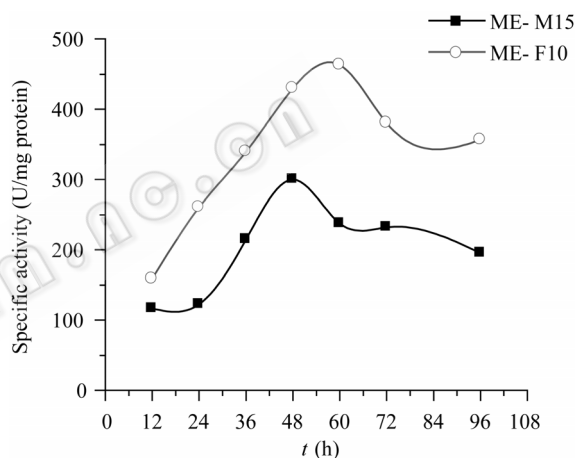


图 3 出发菌株和突变株富马酸酶胞质途径同功酶活力比较

Fig. 3 Activity comparison of the cytosolic isoenzyme of fumarase between mutant ME-M15 and original strain

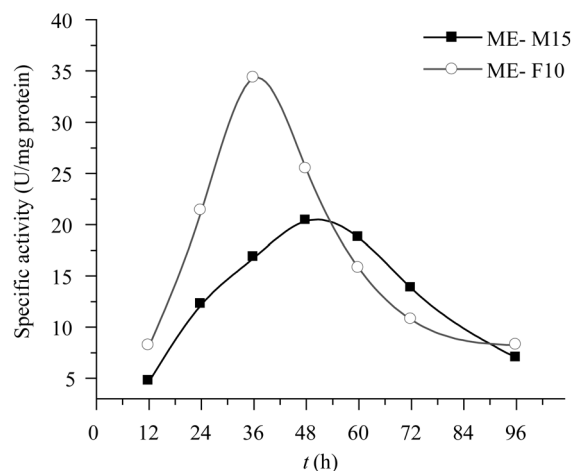


图 4 出发菌株和突变株乙醇脱氢酶活力比较

Fig. 4 The comparison of ADH activity between mutant ME-M15 and original strain

3 讨论

米根霉和黄曲霉利用相同的丙酮酸羧化支路, 即 CO_2 固定途径代谢葡萄糖, 但主要积累产物却明显不同, 该途径中富马酸酶催化的 L-苹果酸脱水反应可能是导致两者产生差异的关键所在(如图 5 所示)。

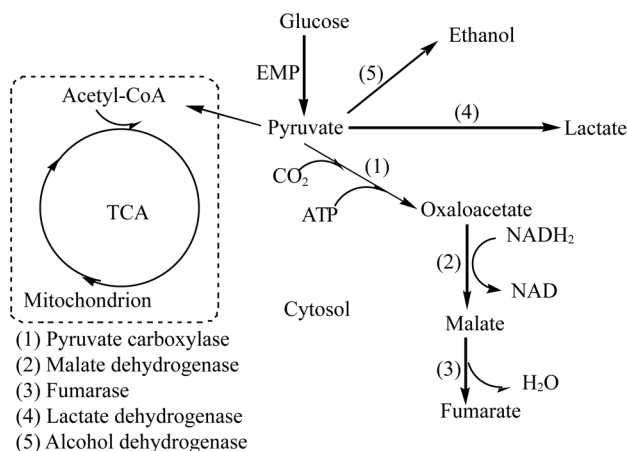


图 5 根霉菌体内的葡萄糖代谢模型

Fig. 5 Model of glucose metabolism in the *Rhizopus* sp.

突变株 ME-M15 富马酸酶胞质途径同功酶最大比活力为 300.01 U/mg, 活力较之出发菌株 ME-F10 下降 35.3%, 而代谢流进入 CO_2 固定途径的关键酶—丙酮酸羧化酶的活力没有明显的差异。可能由于突变株富马酸酶胞质途径同功酶活性的变化, 使得 L-苹果酸积累量大幅提高, 五次传代平均 L-苹果酸产量达 16.3 g/L, 较之出发菌株平均提高 3 倍, 而富马酸积累量仅为 18.3 g/L, 与出发菌株相比减少近 50%。同时, 由于出发菌株 ME-F10 是一株富马酸产生菌, 其发酵过程中主要代谢副产物为乙醇, 而乳酸积累量极少^[5], ADH 是乙醇积累途径中的关键酶^[15], 降低 ADH 活性有望提高丙酮酸羧化支路, 即 CO_2 固定途径的代谢流量, 从而有望增加富马酸的积累量。针对这种情况所设计的丙烯醇 YPD 平板, 原本期望筛选得到具有丙烯醇抗性的高产富马酸突变株, 而所获得的突变株 ME-M15 的代谢副产物中乙醇积累量也平均减少 63.2%(如图 1 所示), 其乙醇脱氢酶活力的下降说明了其乙醇积累支路的削弱。

目前国内外鲜有利用米根霉体系发酵制备 L-苹果酸的报道, 而菌株 ME-M15 是一株优良的高效积累 L-苹果酸突变株, 针对该突变株的代谢关键酶学研究表明, 通过削弱胞质代谢途径中富马酸酶的活力有望达到提高 L-苹果酸积累量的目的。未来可采用针对该酶的小分子扰动及反义 mRNA 技术进一步

抑制富马酸酶的活力, 从根本上改变代谢通量的分配, 使代谢途径终止于 L-苹果酸, 从而为利用代谢工程手段实现米根霉的一步发酵法生产 L-苹果酸奠定基础。

参考文献

- [1] Battat E, Peleg Y, Bercovitz A, et al. Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, **37**: 1108–1116.
- [2] 金其荣, 许贇荣, 吴燕萍. 直接发酵法与酶转化法生产 L-苹果酸的比较. *食品科学*, 1994, **169**(1): 25–28.
- [3] Peleg Y, Stieglitz B, Goldberg I, et al. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. I. Biochemical aspects of acid biosynthesis. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1988, **28**: 69–75.
- [4] 吴清平, 周小燕, 钟 瑜, 等. L-苹果酸产生菌的筛选及高产突变株诱变选育. *真菌学报*, 1993, **12**(4): 304–312.
- [5] Oda Y, Yajima Y, Kinoshita M, et al. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiology*, 2003, **20**: 371–375.
- [6] Tsao GT, Cao NJ, Du JX, et al. Production of multifunctional organic acids from renewable resources. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1999, **65**: 245–280.
- [7] Magnuson JK, Lasure LL, Tkacz J, et al. Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004: pp.307–340.
- [8] Ling LB, Ng TK. Fermentation process for carboxylic acids. US patent: No.4877731, 1989.
- [9] 臧 茹. 富马酸生产菌株米根霉的菌种选育及培养条件优化. 浙江大学硕士学位论文, 2007.
- [10] 郑 志, 姜绍通, 罗水忠, 等. 米根霉乙醇脱氢酶(ADH)突变菌株的诱变选育. *微生物学通报*, 2007, **34**(1): 24–27.
- [11] Osmani SA, Scrutton MC. The sub-cellular localisation of pyruvate carboxylase and of some other enzymes in *Aspergillus nidulans*. *European Journal of Biochemistry*, 1983, **133**: 551–560.
- [12] Peleg Y, Battat E, Scrutton MC, et al. Isoenzyme pattern and subcellular localisation of enzymes involved in fumaric acid accumulation by *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1989, **32**: 334–339.
- [13] 刘立明, 李 寅, 堵国成, 等. 碳酸钙促进丙酮酸发酵过程中 α -酮戊二酸的形成. *生物工程学报*, 2003, **19**(6): 745–746.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248–254.
- [15] Barbara EW, Angelika L, Jacqueline MR. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. *Journal of Theoretical Biology*, 1996, **182**: 453–457.