

出芽短梗霉发酵生产聚苹果酸的代谢通量及关键酶活性分析

乔长晟^{1,2}, 郑志达¹, 孟迪¹, 宋玉民¹, 盖丽丰²

(1. 天津科技大学工业微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

(2. 天津北洋百川生物技术有限公司, 天津 300457)

摘要: 野生型出芽短梗霉菌株 TKPM00006 及其诱变菌株 CGMCC30007 在相同条件下, 使用 5 L 罐进行聚苹果酸发酵, 分析这 2 株菌在相同发酵状态下发酵中后期代谢网络的代谢流分布和关键酶活变化, 对出芽短梗霉合成聚苹果酸的机理进行探究。结果表明, 菌株 TKPM00006 和菌株 CGMCC30007 的菌体生长情况相似, 但产酸量分别为 20.54 g/L 和 30.2 g/L。通过代谢通量分析及关键酶活性的测定可知, 丙酮酸羧化途径及乙醛酸途径是 PMLA 合成的主要途径, TCA 循环途径在发酵后期比较弱, 该结论通过添加代谢抑制剂及中间代谢物实验加以证明。酶活分析同时还证明了高产菌株比出发菌株的 PMLA 合成能力强主要是因为丙酮酸羧化途径的加强。根据实验分析可在丙酮酸节点进行靶点改造或通过发酵调控改变丙酮酸节点处碳架的分配, 通过加强丙酮酸羧化途径来减少因副产物的生产而造成的碳架流失, 达到增加聚苹果酸生物合成的目的。

关键字: 出芽短梗霉; 聚苹果酸; 代谢流分析; 酶活分析

文章编号: 1673-9078(2014)7-74-80

Metabolic Flux Analysis and Key Enzymes Activities Determination for the Production of Poly Malic Acid using *Aureobasidium pullulans*

QIAO Chang-sheng^{1,2}, ZHENG Zhi-da¹, MENG Di¹, SONG Yu-min¹, GE Li-feng²

(1. Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. Tianjin Peiyang Biotrans Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: In this paper, metabolic flux and enzyme activity analysis for wild type *Aureobasidium pullulans* TKPM00006 and its mutant strain CGMCC3337 was conducted in 5 L bioreactor in the same conditions. The mechanism of biosynthesis of PMLA using *Aureobasidium pullulans* was investigated. The results showed that the biomasses in the two strains during the fermentation process were almost the same, but the accumulated yield was 20.54 g/L and 30.2 g/L, respectively. Through the metabolic flux analysis and key enzyme activity determination, it was found that pyruvate carboxylation pathway and glyoxylate pathway were the main pathways in PMLA synthesis, while TCA pathway was weak in the two strains at the post fermentation. This was confirmed by adding metabolic inhibitors and intermediate metabolites into medium. Enzyme activity analysis also confirmed that pyruvate carboxylation pathway was strengthened in the high yield strain whose PMLA synthesis ability stronger than the wild strain. The carbon flux distribution on pyruvate node could be manipulated by genetic manipulation and fermentation control. The enhanced flux in pyruvate carboxylation pathway decreased other pathways flux, thereby reducing the byproduct generation and improving PMLA yield.

Key words: *Aureobasidium pullulans*; poly-(β -malic acid); metabolic flux analysis; enzymes activity analysis

聚苹果酸 (Poly malic acid, PMLA) 属于聚酯类聚合物, 是以苹果酸为单体的均聚高分子聚合物。

收稿日期: 2013-12-6

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金计划 (ZD200703); 科技部科技型中小企业技术创新基金 (11C262111200191); 天津市科技型中小企业技术创新基金 (10ZXCSY10900)

作者简介: 郑志达 (1988-), 男, 硕士, 研究方向: 生物高分子

通讯作者: 乔长晟 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物高分子

PMLA 主要有三种类型, 即 α 型、 β 型、 γ 型 PMLA, 生物体内只存在 β 型 PMLA, 是目前研究的热点。因 PMLA 具有良好的水溶性、易代谢性、可化学衍生性和生物安全性等特点而受到研究者的重视。在化妆品、生物医药、生物材料等领域具有巨大应用前景, 例如 Ding H^[1] 等将 PMLA 用于脑补肿瘤的治疗。

现知能合成 PMLA 的菌株主要有: 环状青霉 (*Penicillium cyclopium*)、短梗霉 (*Aureobasidium sp.*)、

黏菌 (*Physarum polycephalum*) 和出芽短梗 (*Aureobasidium pullulans*)。而短梗霉菌生产 PMLA 的能力较强,曹伟峰等^[2]通过重复分批培养法发酵最终得到 63.2 g/L 的聚苹果酸。由出芽短梗霉菌生产的聚苹果酸分子量分布在 5.1~7.9 kDa 之间^[3]。目前普遍认为微生物发酵积累 PMLA 是以 L-苹果酸为前体^[4]。刘双江等^[5]提出 *Aureobasidium pullulans* 合成 PMLA 的途径与多头绒泡菌 *Physarum polycephalum* 相似,在两种真菌中, PMLA 通过三羧酸循环和乙醛酸途径合成,其中乙醛酸途径作为 PMLA 合成的替代途径。程若东等^[6]通过添加代谢抑制剂推断出芽短梗霉菌积累 PMLA 与 TCA 循环和乙醛酸途径有关。Lee^[7]利用不同标记碳原子的 ¹³C-NMR 实验追踪 ¹³C 的去向,发现碳酸钙可以促进 PMLA 的合成,由于在丙酮酸羧化过程中提供碳酸根离子,然后羧化成为草酰乙酸,继而被还原为 L-苹果酸单体,在聚合酶的作用下最终得到 PMLA,王丽燕等也通过实验证明碳酸钙对 PMLA 合成的影响很大^[8]。

目前发酵法制备 PMLA 总体发酵水平偏低,无法满足规模化应用的需要。为了提高 PMLA 的转化率,必须进行生物合成的研究和代谢流量控制分析,了解特定培养条件下细胞合成的代谢与分解,利用代谢工程的手段对代谢网络进行有目的地修饰,使得基本代谢途径适合于特定代谢物的生产。本研究根据物料平衡和已知代谢途径,利用 MATLAB 软件线性规划比较两菌株之间的差异,得到 PMLA 分批发酵中后期的理想代谢流分布,以期对 PMLA 生产菌种的选育及发酵控制提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要仪器

摇床, SKY-2102, 上海苏坤实业有限公司; 酶标仪, sunrise 系列, 瑞士; 生物传感仪, SBA-40E, 山东省科学院生物研究所; 高效液相色谱仪, 1200 系列, Agilent; 高压匀浆机, APV-2000-4, 德国 APV

1.1.2 菌株

所用菌种出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans* TKPM00006 和 *Aureobasidium pullulans* CGMCC3337) 由天津北洋百川生物技术有限公司提供, 其中 *Aureobasidium pullulans* CGMCC3337, 已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

1.1.3 培养基

1.1.3.1 活化培养基 (g/L)

土豆葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 土豆 200, 葡萄

糖 20, 琼脂 2, pH 自然, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.1.3.2 种子培养基 (g/L)

蔗糖 60, 酵母膏 3, 琥珀酸铵 3, K₂CO₃ 0.4, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 5×10⁻³, CaCO₃ 20 (分开灭菌), 玉米浆 0.1% (V/V)。

1.1.3.3 发酵培养基 (g/L)

葡萄糖 100, KH₂PO₄ 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.31, CaCO₃ 12 (分开灭菌), 腺嘌呤 0.02, 天冬氨酸 0.42。

1.2 方法

1.2.1 种子液制备

选取生长良好的斜面种子用无菌生理盐水洗下孢子, 制备孢子浓度约 10⁶ 个/mL 的孢子悬浮液, 按 10% (V/V) 接种量接种装有 100 mL 液体种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 25 °C, 200 r/min 条件下培养 2~3 d, 制得种子液。

1.2.2 5 L 罐发酵

按 10% 接种量将种子液接入 5 L 发酵罐中; 初始装液量 3 L; 恒定搅拌转速 500 r/min; 通风量 1 vvm, 培养温度 25 °C, 发酵时间为 144 h。

1.2.3 分析方法

1.2.3.1 葡萄糖的测定

葡萄糖浓度采用生物传感器 SBA-40E (山东省科学院生物研究所) 测定

1.2.3.2 PMLA 含量测定^[9]

发酵液 5000 r/min 离心, 取上清液 5 mL, 等体积加入 1 mol/L 硫酸, 90 °C、水解 12 h, HPLC 检测水解前后的苹果酸的含量, 二者之差便是聚苹果酸的产量。HPLC 条件: PrevailC18 色谱柱 (4.6 mm 150 mm)、流动相磷酸二氢钾 (用磷酸调 pH 2.5) 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 25 °C。

1.2.3.3 代谢物测量

谷氨酸和乳酸的测量用发酵液适当稀释并经 4000 r/min 离心处理 10 min 后取上清液。用生物传感器测量。乙酸浓度参照文献^[10]进行测定。

1.2.3.4 生物量的测定

菌体测量采用干重法测量, 取 5 mL 发酵液置于离心管中, 加入 5 mL 1 mol/L 的 HCl, 除去碳酸钙, 10000 r/min 离心 20 min, 弃去上清, 重悬于 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液中离心去上清, 所得沉淀 80 °C 下烘干至恒重, 称量菌体干重 (g/L)。

1.2.3.5 粗酶液提取方法

10 mL 发酵液在 4 °C 条件下 10000 r/min 冷冻离心 10 min 得到菌体细胞, 用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液离心洗涤 2 次, 重悬于 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中 (pH 7.0),

采用高压匀浆法于低温 (4 °C) 破碎细胞, 破碎压力为 1500 bar, 破碎后于 10000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。

1.2.3.6 关键酶活测定

丙酮酸羧化酶活性测定^[21]。反应体系 1 mL, 包括 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.0, 7.5 mmol/L MgSO₄, 0.1 mmol/L 乙酰辅酶 A, 20 mmol/L KHCO₃, 0.15 mmol/L NADH, 3 U/mL 苹果酸脱氢酶, 10 mmol/L 丙酮酸钾, 4 mmol/L ATP, 加入 0.05 mL 酶溶液启动反应, 25 °C 时, 测定在 340 nm 处吸收值的降低。酶活性定义: 每分钟 1 μmol NADH 转化成 NAD⁺ 所需要的酶量为 1 个酶活单位 U。

苹果酸脱氢酶活性测定^[11]。反应体系 1 mL, 包括 33 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH 7.0, 0.15 mmol/L NADH, 0.17 mmol/L 草酰乙酸, 加入 0.05 mL 酶溶液启动反应, 25 °C 时, 测定在 340 nm 处吸收值的降低。酶活性定义: 每 min 1 μmol NADH 转化成 NAD⁺ 所需要的酶量为 1 个酶活单位 U。

苹果酸合成酶活性测定^[12]。反应体系 1 mL, 包括 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L MgCl₂, 0.25 mmol/L 乙酰辅酶 a, 1 mmol/L 乙醛酸, 0.2 mmol/L DTNB (溶于乙醇), 加入 0.05 mL 酶溶液启动反应, 25 °C 时, 测定在 412 nm 处吸收值的增加。酶活性定义: 每分钟催化 1 μmol 乙酰 CoA 生产 CoA 所需要的酶量为 1 个酶活单位 U。

延胡索酸酶活性测定^[13]。反应体系 3 mL, 2 mL 0.05 mol/L 延胡索酸溶液, 溶剂为 0.05 mol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (pH 8.0), 25 °C 水浴平衡后, 加入 1 mL 酶液, 250 nm 测定吸光度变化。酶活定义: 每分钟催化 1 μmol 延胡索酸生产苹果酸所需的酶量为 1 个酶活单位 U。

2 结果与讨论

对两株菌的研究发现 PMLA 的合成与菌体的生长呈半偶联关系, 菌体的生长伴随着 PMLA 的合成, 但在稳定期, 菌体量不再增加, PMLA 仍能大量合成, 所以本研究分析稳定时期的代谢途径, 物料平衡方程中将不考虑菌体的合成。在出芽短梗霉菌中, 存在 EMP 途径、TCA 循环、HMP 途径和乙醛酸循环途径。HMP 途径能为某些代谢物的合成提供大量的 NADPH 作为还原力, 因此在构建聚苹果酸生物合成途径中应保留完整途径。研究表明 TCA 循环和乙醛酸循环是出芽短梗霉发酵过程中的主要氧化途径; 同时出芽短梗霉合成聚苹果酸的过程中, 认为丙酮酸羧化反应是聚苹果酸合成途径也是 TCA 循环的主要回补途径,

在途径分析中不可忽略。结合上述分析及文献^[14-15], 基于以下几点假设建立代谢网络:

基于拟稳态假设的基础对代谢途径分析, 发酵后期细胞处于非生长时期或菌体量变化不大, 为了简化模型所以将其忽略;

为了减少代谢网络的反应数目, 将无分支点的反应合并成一个反应;

假设细胞内的中间代谢产物均处于拟稳态, 即在瞬间内浓度的变化速率为零;

反应途径中消耗的 NADPH 与 TCA 循环、HMP 途径产生的 NADPH 总数相等, 即 NADPH 供需平衡;

细胞生长停滞阶段, 由于大量无效循环的存在, 细胞维持能总量与 ATP 的消耗量并不相等, 所以不考虑 ATP 总量的平衡;

聚苹果酸生物合成代谢网络如图 1。

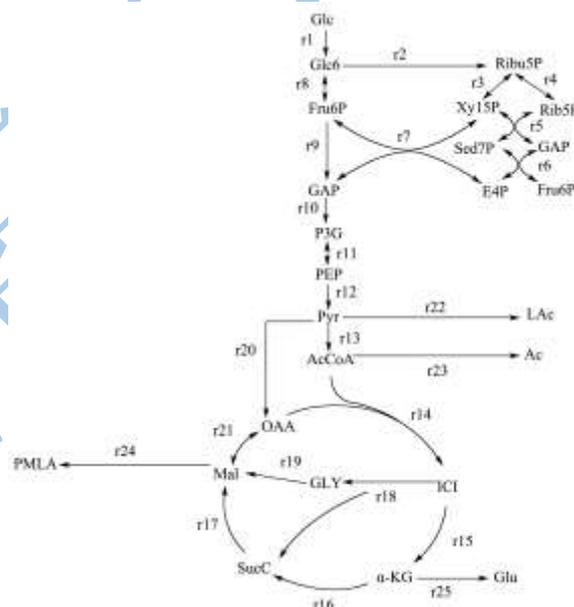


图 1 聚苹果酸生物合成代谢网络

Fig.1 PMLA biosynthesis metabolic network

Note: (1) Glc: Glucose; (2) Glc6P: Glucose-6- phosphate; (3) Ribu5P: Ribulose-5-phosphate; (4) Xyl5P: Xylulose-5-phosphate; (5) Rib5P: Ribose-5- phosphate; (6) Sed7P: Sedoheptulose-7-phosphate; (7) E4P: Erythrose-4-phosphate; (8) Fru6P: Fructose -6- phosphate; (9) GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; (10) P3G: 3-phosphoglycerate; (11) PEP: Phosphoenolpyruvate; (12) Pyr: Pyruvate; (13) AcCoA: AcetylcoenzymeA; (14) OAA: Qxaloacetate; (15) α-KG: α-ketoglutarate; (16) Glu: Glutamate; (17) Lac: lact acid; (18) Ac: acetic acid; (19) ICI: isocitric acid; (20) GLY: glyoxylic acid; (21) Mal: malic acid; (22) SuCC: Succinic acid; (23) PMLA: poly malic acid.

2.1 代谢反应间的计量关系

根据代谢网络图以及各部反应的化学计量平衡式, 可以得出各反应速率具有以下计量关系, 代谢通量方程式如表 1 所示:

表 1 代谢通量方程式

Table 1 Metabolic flux equations

代谢物	代谢通量方程式	代谢物	代谢通量方程式
Glc6	r1-r2-r8=0	Pyr	r12-r22-r13-r20=0
Ribu5P	r2-r3-r4=0	AcCoA	r13-r23-r14=0
Xyl5p	r3-r5-r7=0	OAA	r20-r14-r21=0
Rib5p	r4-r5=0	ICI	r14-r15-r18=0
Seq7P	r5-r6=0	α-KG	r15-r16-r26=0
E4P	r6-r7=0	Mal	r17+r19+r21-r24=0
GAP	2r9-r10+r5+r7-r6=0	GLY	r18-r19=0
Fru6p	r8-r9+r6+r7=0	SucC	r18+r16-r17=0
P3G	r10-r11=0	NADPH	2r2+r15-r25=0
PEP	r11-r12=0	NADH	r10+r13+r16-r21-r22=0

流量平衡方程计算: 假设细胞内的中间代谢物均处于拟稳态, 即其浓度变化速率为 0。根据物料质量守恒定律, 计算代谢物的积累速率有:

$$r_i(t) = \sum_{j=1}^M a_{ij}r_j(t) - \sum_{k=1}^N a_{ik}r_k(t)$$

注: $r_i(t)$ 表示中间代谢物 i 的积累速率; $r_j(t)$ 、 $r_k(t)$ 分别表示合成物质 i 第 j 步和第 k 步反应的反应速率, a_{ij} 和 a_{ik} 是对应各反应的化学计量系数, 代谢网络中的每一个代谢物都是可以根据这个原理建立方程。

由拟稳态假定可得 $ri(t)=0$ 。代谢网络中的 m 个中间代谢物 n 个反应, 构成 m 个代谢流平衡方程式, 自由度为 $F=n-m$, 通过实验测出 F 个反应速率即可确定胞内整体流分布。

观察出芽短梗霉发酵合成 PMLA 的代谢网络, 中间代谢物的个数 ($n=20$), 反应速度的总个数 ($m=25$), 自由度为 5, 需测定 5 步反应速率就可确定出芽短梗霉代谢网络的流量分配。在 PMLA 的发酵过程中葡萄糖的消耗速度 $r1$, 乳酸的生成速率 $r22$ 、乙酸生成速率 $r23$ 、Glu 生成速率 $r25$ 和 PMLA 的生成速率 $r24$, 以此为已知参量, 代入上述代谢速率平衡方程组, 利用 MATLAB 软件下的 linprog 函数求得代谢流分布。

2.2 出芽短梗霉 TKPM00006 与 CGMCC3337

生产 PMLA 过程参数比较

利用 5 L 发酵罐发酵比较两菌株发酵过程参数的差异。两菌株发酵过程中生长曲线如图 2(a)所示, 菌体量在整个发酵过程中总体并未表现出差异, 从 96 h

开始菌体生长进入停滞状态, 在该发酵阶段平均菌体量分别达到 20.18 g/L (TKPM00006) 和 20.23 g/L (CGMCC 3337)。然而, 从 PMLA 合成速率来看 (图 2(b)), CGMCC3337 最大产量为 30.2 g/L, 是 TKPM00006 的 1.47 倍, 表现出了明显的差异性。

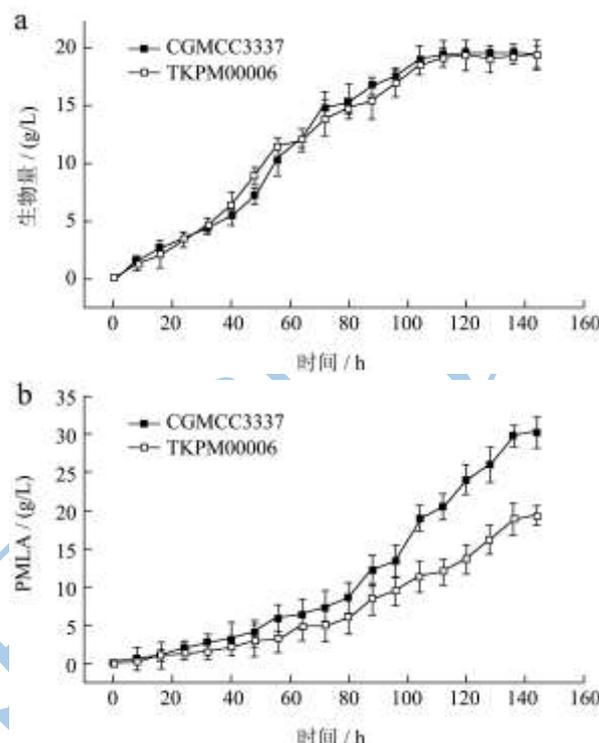


图 2 两菌株生物量与 PMLA 发酵过程曲线

Fig.2 Comparison of biomass variation with time change

2.3 不同菌株的代谢流计算

表 2 代谢产物变化速率及代谢流速

Table 2 Variation rate and metabolic flux of metabolites

代谢物	生产或消耗速率/[g(L·h)]		代谢流速	
	TKPM 00006	CGMCC 3337	TKPM 00006	CGMCC 3337
葡萄糖	0.7275	0.75	100	100
乙酸	0.0197	0.0035	8.12371	1.4
乳酸	0.02228	0.008	6.12371	2.13333
谷氨酸	0.01895	0.00387	3.18616	0.63121
PMLA	0.2809	0.33	55.60165	63.36

根据两株菌的生长曲线, 发酵中后期菌体浓度变化均不大, 符合拟稳态假设理论。分别测定出芽短梗霉 CGMCC3337 与 TKPM00006 在相同条件下, 发酵中后期 (112 和 120 h) 发酵液中的葡萄糖、乙酸、乳酸、谷氨酸和 PMLA 的胞外浓度, 计算各自的消耗或积累速率如表 2 所示, 为便于计算, 葡萄糖摩尔消耗速率假定为 100 mmol/(L·h)。研究代谢网络中在该阶

段的代谢流分布状况。结果见表3

表3 PMLA 生物合成代谢流分布

Table 3 Metabolic flux distribution of PMLA biosynthesis

	反应	TKPM00006	CGMCC 3337	
HMP 途径	R1	100.00	100.00	
	R2	15.68	12.96	
	R3	0.00	0.00	
	R4	15.68	12.96	
	R5	15.68	12.96	
	R6	-15.68	-12.96	
	R7	-15.68	-12.96	
	R8	84.32	87.04	
	R9	52.97	61.11	
	R10	121.61	135.18	
	EMP 途径	R11	121.61	135.18
		R12	121.61	135.18
		R13	38.74	40.09
		R14	30.62	38.69
TCA 循环	R15	-28.17	-25.30	
	R16	-108.10	-118.88	
	R17	-49.31	-54.89	
乙醛酸途径	R18	58.79	63.99	
	R19	58.79	63.99	
丙酮酸羧化 回补途径	R20	76.74	92.95	
	R21	46.13	54.26	
副产物	R22	8.12	1.40	
	R23	6.12	2.13	
	R24	3.19	0.63	
主产物	R25	55.60	63.36	

2.4 关键节点分析

2.4.1 6-磷酸葡萄糖节点代谢流分析

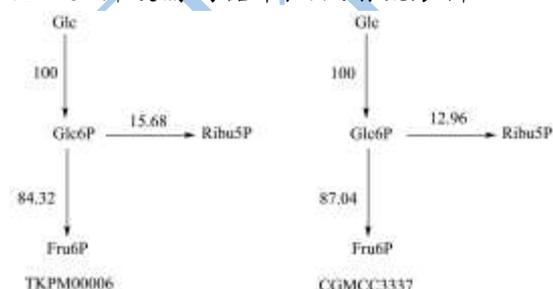


图3 不同菌株下 Glc6P 节点处的流量分配

Fig.3 Flux distribution at the Glc6P node under different bacterial strains

作为葡萄糖代谢过程中出现的第一个节点6-磷酸葡萄糖节点也是通向EMP途径和HMP途径的为通路。由于在发酵后期没有菌体的生长，HMP的主要作

用是提供NADPH，为副产物氨基酸的合成提供还原力。诱变后的高产菌株CGMCC3337与TKPM0000相比，HMP途径(R2)由15.6781%减弱到12.9646%，EMP途径(R8)由84.3219%增强至87.0354%，这样的改变会减少一些氨基酸的合成，同时更多的碳流向EMP途径对产量合成有利。

2.4.2 丙酮酸节点代谢流分析

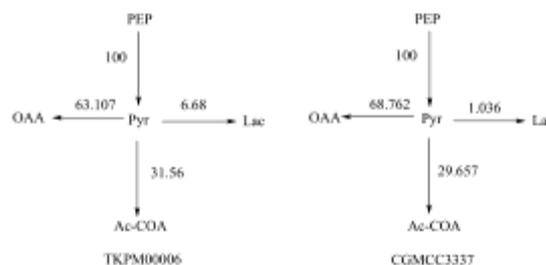


图4 不同菌株下 Pyr 节点处的流量分配

Fig.4 Flux distribution at the Pyr node under different bacterial strains

丙酮酸是一关键节点，丙酮酸直接或间接参与了一些副产物氨基酸氨基酸、有机酸的合成以及TCA循环。丙酮酸通过羧化作用转化成草酰乙酸，草酰乙酸经还原生产苹果酸，然后生产聚苹果酸。由图4看出，两株菌的羧化途径(R20)代谢流分别为68.762%和63.107%，都大于其它途径，且草酰乙酸还原成苹果酸途径(R21)增加了17%，说明丙酮酸羧化作用可能是合成PMLA的主要途径，诱变后的菌株该途径更强，而流向AcCoA的代谢流量(R13)为29.657%和31.56%减少了1.9%，更少的碳架直接由AcCoA流入TCA，避免了由于副产物的生成造成的碳架浪费。发酵过程中可通过提高二氧化碳浓度加强该途径或通过基因操作尽量减少乳酸等副产物的生成。

2.4.3 异柠檬酸节点代谢流分析

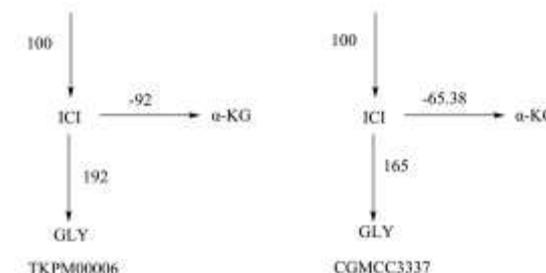


图5 不同条件下 ICI 节点处的流量分配

Fig.5 Flux distribution at the ICI node under different conditions

异柠檬酸节点是通向乙醛酸循环和TCA循环的关键节点，从图5中可以看到，两株菌的TCA循环都为负数，说明该途径很弱，在该阶段菌体不大量合成，所以不需要过多的能量供给，但为了维持菌体的

正常生长, 仍然存在能量的需求, 这需要存在一个平衡关系。诱变后的菌株适当增加了该途径, 可以更好地满足菌体的正常生长对产物合成有利。相比 TCA 循环, PMLA 的合成过程中乙醛酸循环更为重要, 但是要平衡两者之间的比例关系。

2.5 关键酶活分析

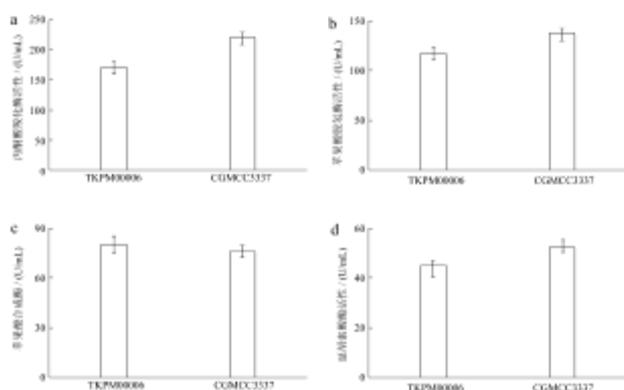


图 6 PMLA 合成相关酶活测定

Fig.6 Related enzyme of PMLA synthesis activity determination

苹果酸合成的还原途径涉及到丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶, 从图 6 中可以看出, 两株菌的丙酮酸羧化酶都很高, 这使得更少的碳直接流向三羧酸循环循环, 与诱变前的菌株相比出芽短梗霉 CGMCC3337 的丙酮酸羧化酶活力和苹果酸脱氢酶活力分别提高了 29% 和 18%, 该途径可能是引起两株真菌产量差距的主要原因, 该结论与代谢流分析结果一致。苹果酸合成酶是乙醛酸循环的限速酶, 从酶活力来看, 两株菌的酶活都很高, 该途径应该为聚苹果酸合成的另一个重要途径, 而诱变后比诱变前活性降低了 3%, 这使得乙醛酸循环受到限制而提高 TCA 循环的流速。两株菌延胡索酸酶的活性诱变后的酶活性比诱变前提高了 5%, 但两株菌该酶的活性都较低, 说明该途径较弱这与代谢流分析结果基本相同。

2.6 代谢中间体及代谢抑制物对 PMLA 合成的影响

2.6.1 延胡索酸对 PMLA 合成的影响

延胡索酸在延胡索酸脱氢酶的催化下生成苹果酸, 其作为 TCA 循环中苹果酸的前体物质, 用于考察 TCA 循环对 PMLA 合成的影响。出芽短梗霉 CGMCC3337 的发酵稳定期是 PMLA 合成的主要时期, 发酵 96h 即进入发酵稳定期时加入不同浓度的延胡索酸, 其对菌体的生长和产物的合成见图 7。

从图 7 中可知, 延胡索酸对菌体生长和产物的合成的影响都不大。当延胡索酸的浓度达到 3 g/L 时, PMLA 的产量达到最大 31.1 g/L, 只提高了 3%, 而菌体量也略有提高, 这说明在发酵稳定期 TCA 循环对 PMLA 合成的影响并不大。

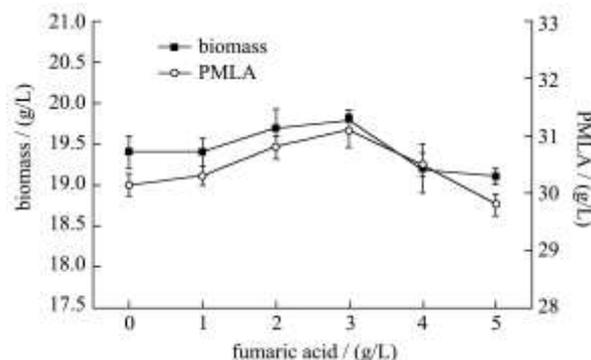


图 7 延胡索酸对 PMLA 发酵的影响

Fig.7 Effects of fumaric acid on PMLA production

2.6.2 代谢抑制剂对 PMLA 合成的影响

三氟乙酸可以使柠檬酸合成酶失活, 所以它是 TCA 循环和乙醛酸循环的强抑制剂^[5]。丙二酸作为琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂抑制 TCA 循环过程^[7]。在进入发酵稳定期时分别添加不同浓度的三氟乙酸和丙二酸, 其对 PMLA 发酵过程的影响如图 8、图 9 所示。

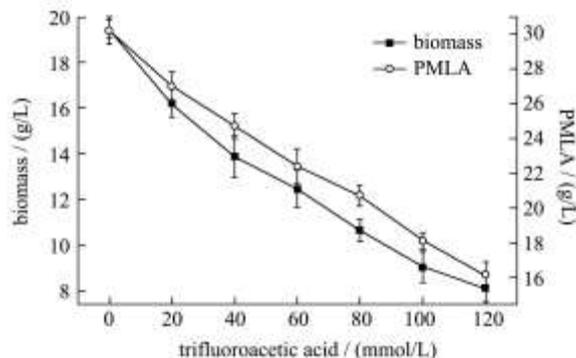


图 8 三氟乙酸对 PMLA 发酵的影响

Fig.8 Effects of trifluoroacetic acid on PMLA production

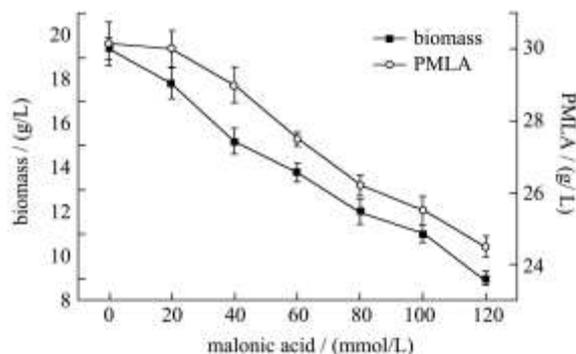


图 9 丙二酸对 PMLA 发酵的影响

Fig.9 Effects of malonic acid on PMLA production

从图 8 可以看出, 三氟乙酸阻断 TCA 循环和乙

醛酸途径,降低能量代谢并使PMLA前体物质的合成减少,随着三氟乙酸浓度的增加,PMLA的合成量和菌体量都呈下降趋势。但从降低幅度来看,菌体量降低幅度要明显高于PMLA。如当加入80 mmol/L的三氟乙酸时,菌体量由17.4 g/L下降到12.5 g/L,菌体量降低35.5%,而此时PMLA由30.15 g/L下降到22.4 g/L,只下降了25.7%,这可能是由于TCA循环和乙醛酸途径受到限制后,丙酮酸羧化途径加强,所以推测丙酮酸羧化途径是PMLA的合成途径的一条重要途径。

如图9所示,丙二酸对菌体生长的影响与三氟乙酸的作用类似,但从PMLA的合成来看,丙二酸对PMLA合成的影响小于三氟乙酸。例如当三氟乙酸和丙二酸的浓度分别为60 mmol/L和80 mmol/L时,菌体量分别为12.5 g/L和12.7 g/L,几乎相同,但PMLA产量分别为22.4 g/L和26.2 g/L,两者相差很大,据此猜测乙醛酸途径对PMLA的合成也有重要影响。上述结果与前面的途径分析结果基本一致,所以推测乙醛酸途径和丙酮酸羧化途径是出芽短梗霉CGMCC3337合成聚苹果酸的主要途径。该结论与程若东等^[6]的实验结果不符这可能是由于不同的菌株之间存在的差异造成。

3 结论

通过对两菌株的代谢途径分析,丙酮酸羧化途径和乙醛酸途径为PMLA的主要合成途径,在发酵中后期,菌体不再生长,TCA循环很弱,仅用于维持细胞的正常代谢过程。该结论通过代谢途径分析实验得以证明,当延胡索酸的浓度达到3 g/L时,PMLA的产量达到最大31.1 g/L,只提高了3%,说明在发酵后期TCA循环不是合成PMLA的主要途径。三氟乙酸的添加对菌体量及PMLA合成的限制程度不同,判断丙酮酸羧化途径对PMLA的合成有很大影响,而从三氟乙酸和丙二酸对PMLA合成影响的差异推测乙醛酸途径是PMLA合成的主要途径。通过对酶活分析发现,引起两株菌产量差异的途径主要是丙酮酸羧化途径,同时酶活分析也很好的验证了代谢途径分析的结论。在丙酮酸节点有三个途径:1、丙酮酸可通过羧化途径生成草酰乙酸,草酰乙酸可通过脱羧作用生成苹果酸也可作为TCA循环的回补途径;2、丙酮酸通过乙酰辅酶a的途径碳架流向TCA循环的时,在乙酰辅酶a节点还可生成乳酸,由于副产品的生产该途径也造成碳架的浪费;3、丙酮酸还可被还原生成乳酸。所以在发酵过程中可通过代谢调控增大丙酮酸羧化途径(例如增大二氧化碳浓度)或在丙酮酸节点进行靶点

改造减少丙酮酸流向其它途径造成碳架的流失,同时可以抑制副产物的生成,降低提取的难度。

参考文献

- [1] Ding H, Inoue S, Ljubimov A V, et al. Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly (β -L-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(42): 18143-18148
- [2] Cao W, Luo J, Zhao J, et al. Intensification of β -poly (L-malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* ipe-1 in the late exponential growth phase [J]. Journal of Wndustrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(7): 1073-1080
- [3] Manitchopisit P, Skory C D, Peterson S W, et al. Poly (β -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(1): 125-132
- [4] Schmidt A, Windisch C, Holler E. Nuclear accumulation and homeostasis of the unusual polymer β -poly (L-malate) in plasmodia of *Physarum polycephalum* [J]. European Journal of cell Biology, 1996, 70(4): 373-380
- [5] Liu Shuang-jiang, Steinbuechel. Production of poly (malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans* [J]. Biotechnology Letters, 1997, 19(1): 11-14
- [6] 程若东,王浩,周华,等.出芽短梗霉积累聚苹果酸途径及调控研究[J].化工学报,2012,63(11):3639-3644
CHENG Ruo-dong, WANG Hao, ZHOU Hua, et al. Investigation of poly (β -malic acid) synthesis pathways and regulation by strains of *Aureobasidium pullulans* [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2012, 63(11): 3639-3644
- [7] Lee B S, Maurer T, Kalbitzer H R, et al. β -Poly (L-malate) Production by *Physarum polycephalum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(3): 415-420
- [8] 王丽燕,郑谊丰,刘婷婷,等.聚苹果酸的发酵培养条件优化 [J].生物加工过程,2010,8(2):41-45
WANG Li-yan, ZHENG Yi-feng, LIU Ting-ting, et al. Optimization of fermentation conditions for poly (β -malic acid) production [J]. Journal of Bioprocess Engineering, 2010, 8(2): 41-45
- [9] 乔长晟,姜少丽,马正旺,等.反向高效液相色谱测定发酵液中的聚苹果酸[J].现代食品科技,2012,28(4):453-455
QIAO Chang-sheng, JIANG Shao-li, MA Zheng-wang, et al. Determination of poly (malic acid) in fermentation

- broth by RP-HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 453-455
- [10] 冯向东. 高效液相色谱法测定白酒中乳酸和乙酸含量[J]. 酿酒科技, 2009, 5: 115-116
- FENG Xiang-dong. Determination of the content of lactic acid & acetic acid by HPLC [J]. Liquor-making Science & Technology, 2009, 5: 115-116
- [11] Jong-Gubbels D, Vanrolleghem P, Heijnen S, et al. Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol [J]. Yeast, 1995, 11(5): 407-418
- [12] Silverstein R, Webster F. Spectrometric identification of organic compounds [M]. John Wiley & Sons, 2006
- [13] 施巧琴, 吴松刚, 郑腾, 等. 苹果酸产生菌 F-871 变株合成延胡索酸的研究[J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 283-288
- SHI Qiao-qin, WU Song-gang, ZHENG Teng, et al. The study is about synthesis of fumarase in L-malic acid producing bacteria mutants F-871 [J]. Mycosystema, 2003, 22(2): 283-288
- [14] 刘畅. 出芽短梗霉的发酵条件及其糖酵解研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012
- LIU Chang. Study on fermentation conditions and glycolytic pathway of *Aureobasidium pulluans* [D]. Wu Xi: Jiang Nan University, 2012
- [15] 胡丹. 出芽短梗霉双产物发酵及其应用研究[D]. 天津: 南开大学, 2009
- HU Dan. Study of fermentation process and application of double products in *Aureobasidium pulluans* [D]. Tian Jin: NanKai University, 2009

现代食品科技