

曲霉 N1-14'胞质酶活性与产 L-苹果酸能力的关系*

周小燕 吴清平 蔡芷荷 张菊梅

(广东省微生物研究所 广州 510070)

摘 要 L-苹果酸(LMA)高产突变株曲霉 N1-14'在高产酸状态下,其胞质中催化 CO_2 固定反应的酶有四种:丙酮酸羧化酶(PC)、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(PEPC)、磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶(PCK)和苹果酸酶(ME)。除 ME 之外,三种羧化酶的活性与 LMA 产生速率呈较好的线性正相关关系;苹果酸脱氢酶(MDH)活性比 PC 等酶高 2~3 个数量级;琥珀酸脱氢酶(SDH)活力则明显低,几种酶中只有 SDH 与发酵醪中 LMA 含量呈线性正相关($r=0.9252$)。动态研究发现,在菌丝生物量正常增长情况下,胞质中蛋白含量明显变化,通气条件的改变是引起这种变化的重要原因。各种酶活性变化与胞质蛋白量变化之间的线性相关系数呈规律性变化:PC($r=0.9563$)、PEPC($r=0.7688$)、PCK($r=0.7300$)、MDH($r=0.3920$)、SDH($r=-0.2086$)。不增加氮源,适当加大孢子接种量可提高 LMA 产率、降低琥珀酸(SA)含量,提示发酵早期胞质酶合成中存在 PC 先于 SDH 这种规律的可能性。在 5L 罐上通气培养 120 h, LMA 含量达 105.88 g/L,平均产生速率 0.883 g/(L·h),酸对糖转化率 78.43%。

关键词 L-苹果酸,直接发酵法,曲霉 N1-14'胞质酶分析

中图分类号:TQ92 文献标识码:B 文章编号:1001-6209(2000)05-0500-06

L-苹果酸(LMA)是继柠檬酸之后的一种很有发展前途的有机酸新产品,有许多食用、药用和工业用途,但目前生产成本高是其发展的限制性因素。金其荣等将 LMA 的酶转化法与直接发酵法做了全面比较^[1],明确指出直接发酵法是有竞争力的工艺路线。本研究组从 1988 年起,一直从事糖质原料直接发酵生产 LMA 的研究,选育出高产酸突变菌株曲霉 N1-14'(*Aspergillus* sp. N1-14')^[2],经过多年优化发酵条件,摇瓶发酵 140 h 产 LMA 达 94 g/L,平均产酸速率(the overall productivity)达 0.67 g/(L·h)^[3],在 20 m³ 发酵罐上平均产酸速率达到 0.65~0.71 g/(L·h)^[4]。为了将产酸速率进一步大幅度提高,从酶水平上加深对产酸代谢机制的理论认识显得非常必要。

在糖质原料直接发酵 LMA 领域,国内外研究者均认为 CO_2 固定途径起很重要的作用^[5],要提高产酸率值得对此途径做深入研究。Scrutton^[6,7]等从丙酮酸羧化酶(PC)在细胞中的定位进行研究,发现与大多数真核生物不同,构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)的 PC 主要存在于胞质中,并提出这种胞质中的 CO_2 固定反应是有机酸积累的机制。本研究组在多年研究中,发现曲霉 N1-14'(*Aspergillus* sp. N1-14')在利用葡萄糖直接发酵产生 LMA 过程的最初两天中产酸速率达到峰值,为了对其中

* 广东省自然科学基金资助项目(GDSF920329)

作者简介 周小燕(1945-),女,湖南省益阳县人,广东省微生物研究所副研究员,现主要从事微生物发酵、代谢调控和工艺优化研究

收稿日期 :1999-07-12, **修回日期** :1999-10-20

存在的高产酸机制进行考查 ,我们观察了胞质中几种有关酶类活性的变化动态 ,了解其与产物积累的一些规律。

1 材料和方法

1.1 菌种

曲霉 N1-14' (*Aspergillus* sp. N1-14') 本研究组选育^[2]。

1.2 发酵培养基

主要成分为葡萄糖、CaCO₃ 及其它无机盐类^[4] 均为工业级。

1.3 分析试剂

盐类、HCl 为国产分析纯 ,生化试剂从 Sigma 公司购进。

1.4 细胞抽提物制备

将曲霉 N1-14'孢子接种于 5 L 发酵罐的培养基中 ,分别于发酵后 6、9、12、15、18、21、24、27、33 和 39 h 收取发酵醪样品 ,依照文献^[8] 制备各分析样本和细胞抽提物。

1.5 菌丝量测定

菌丝量表示为 g/100mLFS (FS :发酵醪 fermenting slurry)。

1.6 胞质蛋白量测定

将制备的细胞抽提物用考马斯亮蓝 G250 染色法测定^[9] ,胞质蛋白量表示为 mg/100mLFS。

1.7 细胞抽提物中六种酶的比酶活测定

丙酮酸羧化酶 (Pyruvate carboxylase ,简写 PC)按照 Osmani 的方法^[7]测定。磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxylase ,简写 PEPC)按照 Walker 的方法^[10]测定。磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxkinase ,简写 PCK)按照 Cheng 的方法^[11]测定。以上三种酶活力计算均依据 340nm 吸光值的减少量 ,表示为 nmol/100mLFS·min。苹果酸酶 (malic enzyme ,简写 ME)按照 Outhow 的方法^[12]测定 ,酶活力计算依据在 340nm 吸光值的增加量 ,表示为 nmol/100mLFS·min。苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase ,简写 MDH)按照 Smith 的方法^[13]测定 ,酶活力计算依据 340nm 吸光值的减少量 ,表示为 $\mu\text{mol}/100\text{mLFS}\cdot\text{min}$ 。琥珀酸脱氢酶 (Succinate dehydrogenase ,简写 SDH)按照 Arrigoni 的方法^[14]测定 ,酶活力计算依据与对照 (加丙二酸为对照)管 600nm 吸光度之差的增加量 ,表示为 nmol/100mLFS·min。

1.8 发酵醪中有机酸的含量测定

用 HPLC 方法^[15]测定发酵醪中的 LMA 含量(C_L)和 SA 含量 ,校正到发酵醪原来的体积来表示。按下式计算出 LMA 的产生速率(R_L):

$$R_L = \frac{\Delta C_L}{\Delta t} \quad (R_L \text{ 的单位 :g/(L} \cdot \text{h)})$$

式中 t 为发酵时间 , C_L 为苹果酸含量。

1.9 发酵醪中铵态氮的含量测定

用凯氏微量定氮法测定^[16]。

2 结果

2.1 胞质酶活性测定

为了真实反映酶水平变化与发酵醪菌丝体产酸能力高低的关系,比酶活用每 100mL 发酵醪每分钟生成产物的摩尔数即 $\text{mol}/(100\text{mLFS}\cdot\text{min})$ 表示^[8]。发酵至 6 h 的时候,加入培养基的 NH_4^+ 态氮源(200mg/L)已基本耗尽,只剩下大约百万分之一,已经开始积累 LMA,SA 尚测不到(表 1)。这时 PC、PEPC、PCK 和 MDH 的活力已达到在 39h 发酵期间各自最高活力的 51.42%、38.28%、38.70% 和 17.90%。三种羧化酶中以 PC 的活力最高,PEPC 和 PCK 次之。MDH 在 6h 时出现的相对活性虽较三种羧化酶小,但其实际酶活已为 PC 的 65 倍。然而 SDH 在此时尚检测不出。ME 的活性在前六次取样(21 h 之前)没有测到,从发酵 24h 的第七次取样以后可明确测到,其活力比 PC、PPC 和 PCK 相对低一些。SDH 活力在六种酶中最低(图 1)。

表 1 发酵前期(6~39h) LMA 含量和 SA 含量的变化
Table 1 Changes in LMA and SA during 6~39 h of fermentation

Order of sampling	Time of sampling	Content of LMA in FS	Production rate of LMA in FS	Content of SA in FS	Content of NH_4^+ in FS
n	/h	$C_1(\text{g/L})$	$A(\text{g/L}\cdot\text{h})$	$A(\text{g/L})$	$A(\text{mg/mL})$
1	6	1.78	—	—	3.42×10^{-4}
2	9	4.09	0.77	0.35	1.19×10^{-4}
3	12	6.72	0.88	0.86	4.18×10^{-5}
4	15	10.04	1.11	1.60	3.49×10^{-6}
5	18	14.69	1.55	2.81	0
6	21	13.63	—	2.68	0
7	24	15.88	0.20	2.30	0
8	27	17.60	0.58	3.23	0
9	33	22.16	0.76	3.46	0
10	39	27.67	0.92	4.66	0

2.2 各种酶活力与 LMA 产生速率的关系

以 LMA 产生速率或发酵醪中 LMA 含量为 X,各个酶的比酶活为 Y 做线性回归分析,将 r 值列于表 2 进行比较。PC 和 PEPC 的活力与 LMA 产生速率之间有较好的线性正相关性,其次是 PCK 和 MDH,而 SDH 则没有关系。而在各种酶活力与发酵醪中 LMA 含量之关系上,只有 SDH 才呈较好的线性正相关关系($r=0.9252$)(表 2)。

2.3 胞质蛋白量变化情况

发酵至 6 h 的时候,发酵醪中的无机氮源几乎耗尽(表 1),菌丝体生长明显减慢(图 2),而 LMA 的积累却在加速(表 1)。通气条件改变情况在图 2 中用 a、b、c、d 指示,a 为改变点 1,之前为低罐压(0.02Mpa),在此时将罐压提高到之前的 2.5 倍;b 为改变点 2,由此时开始将搅拌速度提高到之前(400r/min)的 1.1 倍;c 为改变点 3,将搅拌速度进一步提高到改变点 2 之前的 1.2 倍;d 为改变点 4,由此时将搅拌速度降回到改变点 2 之前的水平。这一阶段菌丝量增长平稳,其随时间变化的曲线可以表示为 $y=1.616+0.5064\ln X$ ($r=0.9728$, $n=10$),菌丝量于 6~39h 只增长了 40%,胞质蛋白量呈现大幅度的波动,其最高含量(36.37mg/100mLFS)为最低含量(2.51mg/100mLFS)的 14.5 倍。

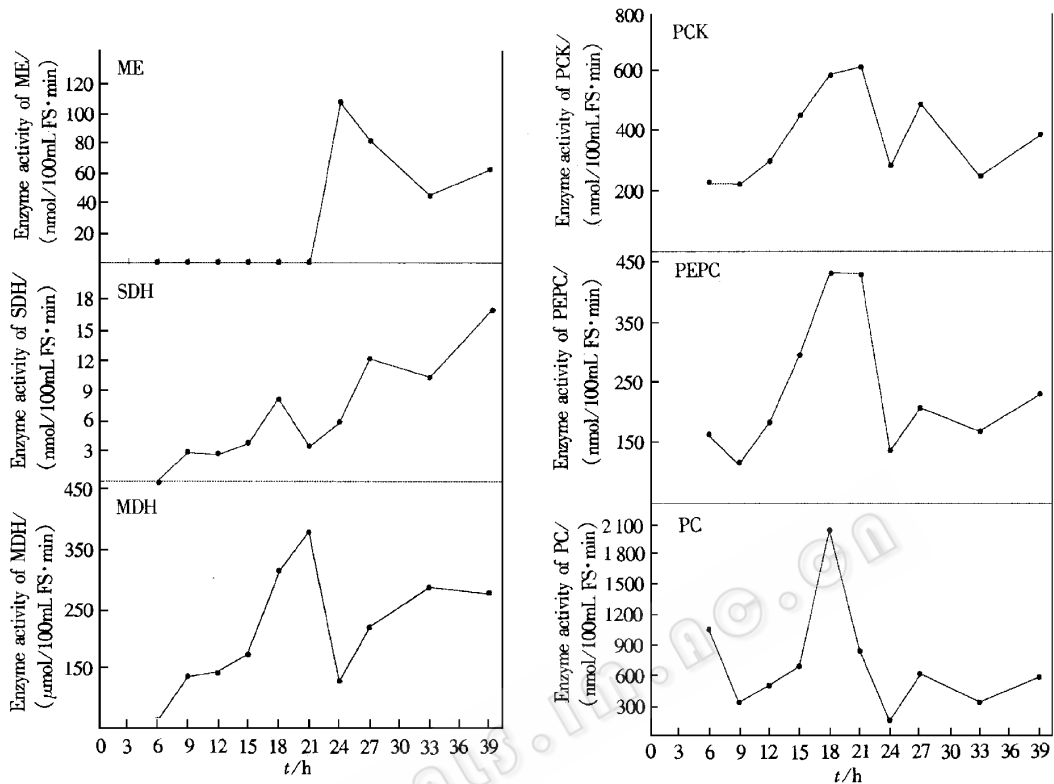


图 1 各种酶活力变化情况的比较

Fig. 1 Comparison of changes of enzyme activity

表 2 几种酶活力与 LMA 产生速率或含量的相关系数

Name of enzyme	Correlation coefficients/r	
	X ₁ production rate of LMA (n=8)	X ₂ content of LMA in FS (n=10)
	Y= A+BX (Y: Enzyme activity)	
PC	0.8454	-0.0406
PEPC	0.8542	0.0334
PCK	0.6161	0.0018
MDH	0.5615	0.3955
SDH	0.0006	0.9252

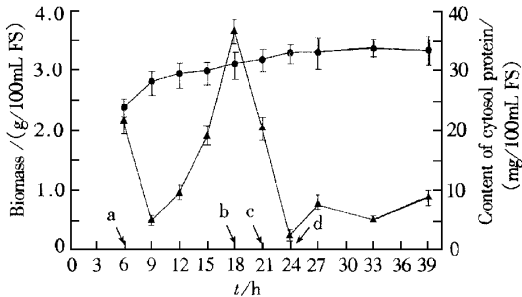


图 2 通气条件改变对菌丝量和胞质蛋白量的影响

Fig. 2 Effects of aeration on biomass and content of cytosol protein
a b c d indicate the time points of aeration changes :
a At this time raised pressure of fermentor to 2.5-fold of that before ;
b Picked up impeller speed to 110% of that before ;
c Picked up impeller speed to 120% of that before (b) ;
d Slowed down impeller speed to that before (b).
—●— Biomass , —▲— Content of cytosol protein.

2.4 各种酶活力与胞质蛋白量的关系

以胞质蛋白量为 X ,分别以各酶比酶活为 Y 做线性回归分析,比较各个相关系数,值

(表 3)。羧化酶类与蛋白量变化有正相关性,尤以 PC 的相关性最好。与此不同,二种脱氢酶 DMH 和 SDH 活性大小与蛋白量变化无关。

2.5 加大孢子接种量对产酸的影响

2.5.1 摇瓶发酵实验结果:在摇瓶发酵中,按原发酵工艺的孢子接种量和原接种量的两倍及原接种量的 3 倍接种发酵,比较 LMA 和 SA 的含量的差别(表 4)。结果看到在原来发酵工艺的基础上适当加大孢子接种量,LMA 产量进一步提高了,而杂酸 SA 含量有所下降。三种不同接种量中的 LMA/SA 比值分别为 3.19、3.84 和 5.02。

表 4 加大孢子接种量对 LMA 和 SA 产生量的作用

Table 4 Effects of increasing spore inoculum on production of LMA and SA

Lot number	Original amount of inoculum		Original amount of inoculum×2		Original amount of Inoculum×3	
	Content of	Content of	Content of	Content of	Content of	Content of
	LMA/(g/L)	SA/(g/L)	LMA/(g/L)	SA/(g/L)	LMA/(g/L)	SA/(g/L)
1	93.75	26.72	104.21	25.51	114.32	20.01
2	88.92	30.55	100.55	25.95	105.28	22.67
3	90.68	28.27	102.83	28.62	106.76	22.33
Mean	91.12	28.51	102.53	26.69	108.79	21.67
SD	±2.44	±1.93	±1.85	±1.68	±4.85	±1.45

2.5.2 5L 发酵罐发酵实验结果:根据摇瓶发酵实验的结果,采取原接种量 3 倍的条件,在 5L 发酵罐上进行发酵,结果列于表 5。5L 罐发酵 120 h,LMA 含量达 105.88 g/L,LMA/SA 比值为 5.02,发酵效果与摇瓶发酵的结果相近。

表 5 5L 发酵罐实验结果*

Table 5 LMA production in a 5L stirred fermentor

Lot number	Content of LMA/(g/L)	Overall productivity of LMA/(g·L·h)	The rate of converting glucose to LMA/%	Content of SA/(g/L)
1	104.58	0.872	77.47	21.76
2	107.18	0.893	79.39	20.48
Mean	105.88±1.84	0.883±0.015	78.43±1.35	21.12±0.91

* Fermenting for 120 h with 3-fold of the original amount of spore inoculum

3 讨论

本研究观察到曲霉 N1-14'在发酵 LMA 过程中,其胞质中有活跃的 PC、PEPC、PCK、ME、MDH 和 SDH 等多种酶的活性,其中三种羧化酶的活性与胞质蛋白量(C_p)和 LMA 产生速率(R_L)之间都存在很好的正相关关系,尤其是 PC,伴随着胞质蛋白量波动 14.5 倍,LMA 产生速率波动 5.6 倍,PC 酶活力波动 13 倍。表明胞质中羧化酶类合成的增多或减少是其酶活力增强或减弱的重要原因,从而引起 LMA 生成速度加快或减慢,所以,曲霉 N1-14'胞质中羧化酶蛋白分子的合成是产生 LMA 的重要机制。通气条件可以影响

表 3 胞质蛋白量与几种酶活性的相关系数的比较

Table 3 Comparison of the correlation coefficients(r) between content of cytosol protein and activities of several enzymes (Y=A+BX
X:Content of cytosol protein,Y:Enzyme activity)

Name of enzyme	Correlation coefficient/r (n=10)
PC	0.9563
PEPC	0.7688
PCK	0.7300
MDH	0.3920
SDH	-0.2086

这一酶合成过程 ,值得深入研究。MDH 活性与 C_p 及 R_L 变化的关系不大 ,其活力比羧化酶高数百倍 ,从而保证生成的中间产物草酰乙酸向 LMA 转化 ,从 6h 时 MDH 活力占 39h 发酵期间最高酶活力的比例比三种羧化酶小 ,说明 MDH 在发酵早期合成比羧化酶迟。至于 SDH 的活性不但与 C_p 及 R_L 的变化没有关系 ,而且在检测的六种酶中 ,只有 SDH 与发酵醪中的 LMA 含量呈正比 ,而 SA 含量亦与 LMA 含量呈正比($r = 0.9820$) ,说明发酵产生的 LMA 积累后对 SDH 呈激活作用。SDH 在 6h 时还完全检测不到 ,在所测定的酶中活力最低 ,发生比较迟。实验中 ,在几种羧化酶活力最低时 ,却测到相对高的 ME 活性 ,是否 ME 与羧化酶发生条件不同 ,有待进一步研究。

通常 ,在糖酵解途径中有多种酶类可能参与并协同完成从磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)或丙酮酸到 LMA 形成的催化过程(图 3) ,按其催化的反应类型可分为三个层次 ,第一层次是直接催化 CO_2 固定反应的三种羧化酶 ,产物是草酰乙酸 ,第二层次是 MDH 催化草酰乙酸加氢还原成 LMA ,第三层次的 SDH 催化富马酸加氢还原生成 SA ,使发酵生成的 LMA 再转化为 SA ,对 LMA 积累有不利的影响。通过本研究看到 ,曲霉 N1-14'胞质酶在发酵早期的合成有按第一层次到第三层次顺序进行的趋势。加大孢子接种量的实验得到了既提高 LMA 含量又降低 SA 含量的令人惊喜的结果 ,用前面所分析的那种酶在发酵早期合成的趋势 ,可解释为 :在氮源严格限量的情况下 ,孢子萌发为菌丝体 ,只能进行有限的生长 ,适当加大孢子接种量后 ,不增加氮源 ,菌丝体在利用有限的氮来合成酶分子时 ,在代谢链前面发育较早的酶(如 PC)的合成趋向多一些 ,在代谢链后面 ,发育较迟的如 SDH 则趋向合成少一些 ,从而使各自催化的反应的产物增多或减少。

从酶和分子水平的调节深入进行探讨 ,不但有助于发酵 LMA 工艺水平的提高 ,而且由于 CO_2 固定反应是 TCA 循环的 C_4 羧酸的重要补充回路 ,深入了解其中酶反应的本质对柠檬酸发酵、谷氨酸发酵以及天冬氨酸族的氨基酸发酵(包括天冬氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、高丝氨酸等)都会具有一定的促进作用。

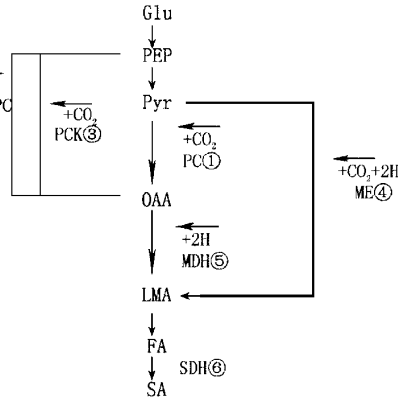


图 3 CO_2 固定途径的酶系

Fig.3 Enzymes of CO_2 Fixation Reactions

Glu :Glucose ;
PEP :Phosphoenolpyruvic acid ;
Pyr :Pyruvic acid ;
OAA :Oxalacetic acid ;
FA :Fumaric acid.

参 考 文 献

[1] 金其荣 ,许贇荣 ,吴燕萍 . 食品科学 ,1994 ,15(1) :25~28.
[2] 吴清平 ,周小燕 ,钟 瑜 ,等 . 真菌学报 ,1993 ,12(4) :304~312.
[3] 周小燕 ,吴清平 ,陈素云 ,等 . 微生物学通报 ,1993 ,20(1) :42~45.
[4] 吴清平 ,周小燕 ,陈素云 ,等 . 中华人民共和国专利公报 ,公开号 CN 1112160A. 1995. 11. 22.
[5] 吴清平 ,周小燕 . 微生物学通报 ,1990 ,17(1) :30~33.
[6] Osmani S A ,Scrutton M C . *Eur J Biochem* ,1983 ,133 :551~560.
[7] Osmani S A ,Scrutton M C . *Eur J Biochem* ,1983 ,147 :119~128.

中国科学微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [8] 周小燕,吴清平,张菊梅,等.氨基酸和生物资源,1996,18 增刊(应用生化专利) 22~27.
- [9] 吴如丹.溶液中蛋白质浓度的测定.见:鲁子贤主编.蛋白质和酶学研究方法.北京:科学出版社,1989.1~7.
- [10] Walker G H, Ku B S B, Edwards G E. *Plant physiol*, 1986, **80** 848~855.
- [11] Cheng L. *J Biol Chem*, 1986, **24** 2413~2420.
- [12] Outhow W H. *Methods Enzym Anal*, 1983, **3** :176~182.
- [13] Smith A F. *Methods Enzym Anal*, 1983, **3** :163~168.
- [14] Arrigoni O. *Nature*, 1962, **193** :1256~1258.
- [15] 李明元.高效液相色谱法及其在食品分析中的应用.北京:北京大学出版社,1988.161~162.
- [16] 杭州大学编.分析化学手册第二册化学分册.北京:化学工业出版社,1982.944.

STUDIES ON THE CORRELATION BETWEEN PRODUCTION OF L-MALIC ACID AND SOME CYTOSOLIC ENZYMES IN THE L-MALIC ACID PRODUCING STRAIN *ASPERGILLUS* SP. N1-14' *

Zhou Xiaoyan Wu Qingping Cai Zhihe Zhang Jumei
(The Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract : The cytosol enzymatic study in the case of high L-malic acid (LMA) production of *Aspergillus* sp. N1-14' was reported. The activities of 4 kind enzymes that catalyse the CO₂ fixation reactions have been detected, which are pyruvate carboxylase (PC), phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) and malic enzyme (ME). With the exception of ME, the linear correlation was found between activities of three carboxylases and the production rate of LMA. The activity of malate dehydrogenase (MDH) was at the level of 2~3 exponential higher than that of the other analysed enzymes, while the activity of succinate dehydrogenase (SDH) was much lower, and as a discrepancy, SDH was in a positive correlation to the content of LMA in fermenting slurry ($r=0.9252$). It is shown that the accumulated LMA acted as an activator of SDH. Through dynamic study, it is found that, in contrast with the slow and even increase of biomass, the content of cytosol protein (C_p) sharply fluctuated mainly due to the changes of aeration conditions. The data of the linear correlation coefficient (r) of activities of cytosol enzymes to C_p (PC $r=0.9563$, PEPC $r=0.7688$, PCK $r=0.7300$, MDH $r=0.3920$, SDH $r=-0.2086$) exhibited an inner law of protein synthesis. Experiment of increasing the amount of spore inoculum resulted in increase of LMA and decrease of SA. After fermenting 120 h in a 5 L stirred fermentor, with 3-fold of original spore inoculum 105.88 g/L of LMA was achieved, the overall productivity was 0.883 g/(L·h), the converting rate of glucose to LMA was 78.43%. This result supports the exist of a inner law of protein synthesis in the early period of LMA fermentation by *Aspergillus* sp. N1-14'.

Key words : L-malic acid, LMA production from carbohydrate, *Aspergillus* sp. N1-14', Analysis of Cytosolic enzymes