

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):468-473; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

米根霉利用木糖与葡萄糖的代谢差异

窦畅, 徐晴, 宋萍, 江凌, 李霜*

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要:【目的】木质纤维素是世界上储量最丰富、最廉价的可再生生物质资源,以米根霉为研究对象,探讨对木质纤维素中主要单糖成分——木糖和葡萄糖的代谢差异,为木质纤维素的高效利用提供科学依据。【方法】分别以木糖和葡萄糖为碳源,考察米根霉的生物量、细胞大分子组分、胞内还原力(NADH/NAD^+)、ATP含量以及有机酸积累的差异。【结果】以木糖为碳源时,米根霉生物量较高,达到 9.93 g/L ,对糖转化率达 37.2% ,同时胞内还原力(NADH/NAD^+)和ATP含量较高,几乎不积累有机酸;以葡萄糖为碳源时,米根霉生物量为 7.28 g/L ,对糖转化率仅 25.46% ,细胞大分子组分、胞内还原力以及ATP的含量较低,但有机酸(乳酸为主)积累量较高。在混糖条件下培养时,米根霉优先利用葡萄糖,当剩余葡萄糖浓度较低时,转向利用木糖。【结论】米根霉代谢木糖和葡萄糖时,胞内还原力和ATP等能量代谢存在较大差异,前者趋向生物大分子合成和生物量的积累,后者趋向积累有机酸等小分子。

关键词: 木糖, 葡萄糖, 物质代谢, 能量代谢, 米根霉

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0468-06

木质纤维素是地球上储量最丰富的可再生资源^[1],是化石原料最理想的替代者。但目前这些生物质资源仅有一小部分为人类所用,更多的是被遗弃或焚烧,资源浪费的同时造成了严重的环境污染。研究表明木质纤维素经物理、化学、生物等方法处理后,可转化为葡萄糖(约占 $1/2$)、木糖(约占 $1/3$)等单糖^[2]。前者可进一步被微生物有效利用,而后者的利用过程往往受到抑制,成为限制木质纤维素有效利用的一大瓶颈。

为提高木糖的利用效率,研究者在构建工程菌^[3-4]和优化发酵条件^[5]等方面做了大量工作,但尚缺乏对于木糖代谢特征的充分了解,而只有尽可

能清晰的了解微生物的代谢过程,才有可能从全局上实现微生物代谢木糖的过程调控。

米根霉是一种重要的工业微生物,主要用于富马酸、乳酸等大宗化学品^[6]以及蛋白酶等酶制剂^[7-8]的生产。国内外对米根霉利用五碳糖的研究主要集中于从外部手段优化发酵过程,效果往往不明显。如Kautola等^[5]以少根根霉为发酵菌株,采用固定化技术优化木糖为碳源的培养条件,经 10 d 发酵,富马酸最高转化率仅 0.24 g/g ,生产强度仅 $0.071\text{ g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。本研究团队结合实践经验,采用分步利用木糖和葡萄糖的策略,建立了以木质纤维素为原料发酵制备富马酸的新工艺^[9-11],但缺乏深入的理论依据。

基金项目:国家自然科学基金(21076104);国家“973项目”(2009CB724701);江苏省“青蓝工程”资助

* 通信作者。Tel: +86-25-83172094; E-mail: lishuang@njut.edu.cn

作者简介:窦畅(1989-),男,江苏南京人,2007级生物工程专业本科生。E-mail: douchang2011@gmail.com

收稿日期:2010-09-07;修回日期:2010-01-05

本研究以米根霉为研究对象,通过分析木糖、葡萄糖培养下其胞内外物质代谢及能量代谢的差异,获取木糖代谢的关键因素,为工业发酵合理利用木糖提供参考,为微生物高效利用木质纤维素提供理论研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:米根霉 (*Rhizopus oryzae*) ME-F12 (ATCC 20344 的诱变菌株),南京工业大学代谢工程实验室保藏。

1.1.2 培养基及培养方法:培养基组成(g/L):木糖或葡萄糖 30, MgSO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.6, ZnSO₄ · 7H₂O 0.0176, FeSO₄ · 7H₂O 0.000498, 尿素 2。用 1:9 浓硫酸调节至 pH 3.0。调整米根霉孢子悬浮液浓度为 10⁷ 个/mL,取 1mL 接种至 50 mL 培养基,置于 35℃ 往复摇床,转速为 200 r/min,培养 54 h。

1.2 分析检测方法

1.2.1 pH 的测定:pHS-3C 型精密酸度计测定。

1.2.2 细胞干重的测定:将培养物抽滤,蒸馏水洗涤 3 次,60℃ 烘干至恒重,称重。

1.2.3 总蛋白的测定:考马斯亮蓝法^[12]。

1.2.4 脂肪的测定:索氏抽提法^[12]。

1.2.5 细胞内碳水化合物的测定:比色分析法^[12]。

1.2.6 对糖转化率的测定:菌体积累量与糖耗量的比值。

1.2.7 残糖及有机酸的测定^[13]:高效液相色谱法。高效液相色谱工作站 DIONEX HPLC P680 BIO-RAD Aminex HPX-87H, 300 mm × 7.8 mm; 流动相: 5 mmol/L H₂SO₄; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 65℃。采用示差检测器分析糖,采用紫外检测器分析有机酸,检测波长 210 nm。

1.2.8 NADH, NAD, ATP 的提取与分析^[14]:取 1 mL 菌液于 -40℃ 甲醇中淬灭 5 min, -8℃ 5000 × g 离心 5 min,弃上清;加入 1 mL 0.1 M NaOH 或 HCl 沸水浴 10 min,冰浴冷却至 0℃,滴加一定量 HCl 或 NaOH 进行中和,5000 × g 离心 10 min,上清用于 NADH, NAD, ATP 的测定。NADH, NAD, ATP 的分析:高效液相色谱工作站 DIONEX HPLC P680,分析柱:sepax HP-C18 column 4.6 mm × 250 mm;流动相 A:0.6% H₂PO₄(用三乙胺调 pH 至 6.6),流动相 B:

甲醇,A、B 按照 9:1 配比;流速:1 mL/min;进样量:20 μL;柱温:25℃;紫外波长 254 nm。

2 结果和讨论

2.1 不同碳源条件下米根霉的生长特性

分别以木糖和葡萄糖为碳源培养米根霉,结果如图 1 所示,米根霉利用两种不同碳源生长时存在明显的差异:以木糖为碳源时,菌体迟滞期较葡萄糖长,这可能与微生物对六碳糖的偏爱性有关^[5]。但培养结束时(54 h),以木糖为碳源生物量达 9.93 g/L,对糖转化率为 37.19%;而葡萄糖为碳源的最高生物量仅为 7.28 g/L,对糖转化率为 25.46%。故相较于葡萄糖,木糖更利于米根霉的生物量积累。

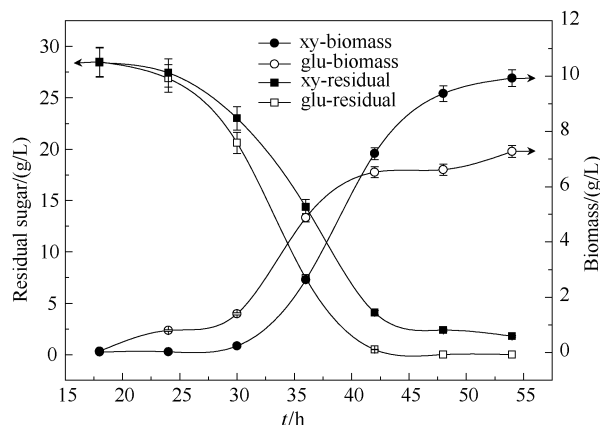


图 1 不同碳源下米根霉生长趋势以及糖耗变化

Fig. 1 Effect of different carbon resources on accumulating the biomass.

将木糖与葡萄糖以等质量混合(总糖浓度为 30 g/L),考察混糖培养条件下米根霉的生长状况,结果如图 2 所示。米根霉优先利用葡萄糖进行生长,当葡萄糖消耗至较低浓度时(30 h, 2.5 g/L),开始迅速消耗木糖,生物量也从 2.5 g/L 上升到 6 g/L,在 42 h 生物量达到最大值 6.58 g/L;从糖耗和生长特性可见,米根霉中可能存在类似酵母细胞的糖转运模式,即木糖、葡萄糖的转运基于相同的膜蛋白,而该蛋白对葡萄糖的亲合力较高,故在较高浓度的葡萄糖存在时,木糖的利用受到抑制,而当葡萄糖消耗殆尽后,转运蛋白可大量转运木糖,促进其利用^[15]。

2.2 不同碳源对米根霉细胞组分的影响

取发酵 36 h 和 48 h 时两种碳源培养条件下的

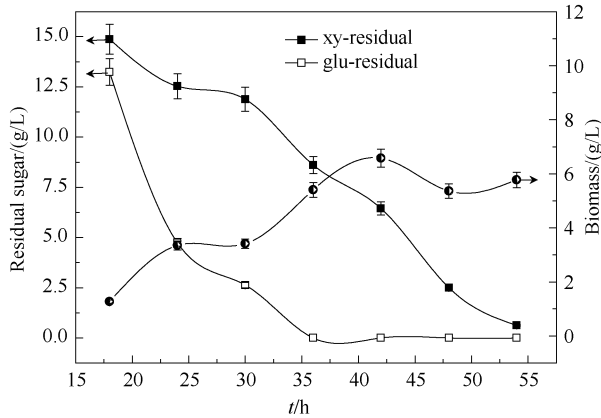


图2 两种碳源混合培养下米根霉生长趋势以及糖耗变化

Fig.2 Effect of combination of two carbon resources on sugars consumption and biomass accumulation.

米根霉菌体进行细胞组分测定,其碳水化合物、蛋白质、脂肪含量如表1所示。以木糖为碳源的培养条

表1 不同碳源对米根霉胞内各大分子物质含量的影响(36h&48h)

Table 1 Effects of different carbon resources on biomacromolecule contents (36h&48h)

Carbon source	c(carbohydrate) (mg/g)	c(protein) (mg/g)	c(lipid) (mg/g)	c(carbohydrate) (mg/g)	c(protein) (mg/g)	c(lipid) (mg/g)
Xylose	69 ± 3	46 ± 4	191 ± 5	28 ± 2	23 ± 3	137 ± 4
Glucose	40 ± 2	10 ± 1	93 ± 4	17 ± 2	8 ± 2	94 ± 4

Note: Values represent means of triplicate determinations ± standard deviations.

2.3 不同碳源对米根霉产酸特性的影响

考察了米根霉利用木糖、葡萄糖条件下胞外小分子物质的代谢情况,结果如图3所示。可以明显看出,葡萄糖培养条件下(3-A),L-乳酸、L-苹果酸、富马酸最大积累量分别为1.97、0.63、0.56 g/L,木糖培养下(3-B)三者分别仅为0.86、0.62、0.47 g/L。葡萄糖的代谢主要与糖酵解途径相关,利于有机酸等小分子物质的合成,致使在培养过程中pH呈下降趋势;相反,在木糖为碳源的培养过程中,pH不断上升,最后维持在中性状态。该现象也可能是导致在木糖培养条件下生物量相对较低的原因之一,即以葡萄糖为碳源时,不断降低的pH对菌体生长产生了抑制作用,使得最终生物量偏低;而以木糖为碳源时,pH上升,抑制作用不明显,促使培养后期菌体大量积累。

2.4 不同碳源对米根霉胞内还原力的影响

不同碳源下胞内还原力的大小,主要通过NADH/NAD⁺体现出来^[19-20]。对不同碳源条件下的胞内NAD⁺、NADH和ATP含量进行分析,结果如图4所示。

件下,细胞相关组分的含量明显高于葡萄糖,碳水化合物、蛋白质和脂肪的含量,在36 h分别比葡萄糖培养下高出42.0%、78.3%、51.3%;在48 h分别比葡萄糖培养下高出39.3%、65.2%、31.4%。

碳水化合物、蛋白质、脂肪属于生物大分子物质,而木糖在微生物体内的代谢主要通过磷酸戊糖途径(PP途径)^[16-17],其中涉及NADPH、核糖及其衍生物的大量合成,为生物大分子的合成提供了充足的原料。如脂肪酸的合成^[16],需要足够的NADPH,仅以葡萄糖为碳源时,主要经苹果酸酶转化苹果酸,而木糖代谢直接通过PP途径可以生成大量的NADPH,在不影响TCA循环的同时,满足脂肪酸的合成;此外,蛋白质,碳水化合物等细胞结构物质合成过程中^[18],也受到一部分PP途径中代谢产物的影响。故木糖的利用促进了生物大分子物质的合成,从而使得培养结束时米根霉生物量较葡萄糖为碳源时高。

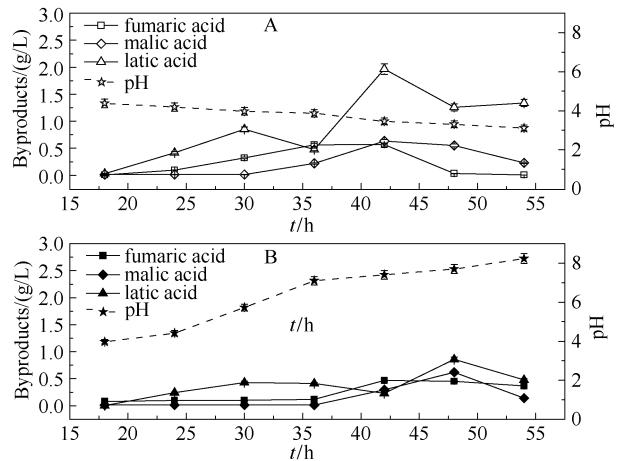


图3 不同碳源对米根霉产酸量的影响

Fig.3 Effect of different carbon resources on organic acid accumulation. A: Glucose; B: Xylose.

通过对图4的分析发现,木糖培养条件下胞内还原力高于葡萄糖培养,这可能是由于木糖醇转化为木酮糖的过程中,大量消耗了NAD⁺,生成NADH,最终导致NADH/NAD⁺提高^[21]。王桂兰^[22]

和 San^[23] 提出, 菌体胞内还原力与碳源还原力呈正相关, 本文的情况与之类似: 木糖的还原力高于葡萄糖, 对应培养条件下米根霉菌体的胞内还原力也相对要高。

ATP 是主要能量载体。如图 4 分析可知, 总体而言, 在木糖培养条件下, 胞内 ATP 含量较葡萄糖为碳源培养时要高, 尤其是在菌体生长初期, 木糖培养下 ATP 含量是葡萄糖培养时的 5 倍。由此可见, 菌体在木糖培养下能量更充沛, 这与上文本糖培养 NADH 含量高的现象相对应, 即木糖培养下菌体为维持 NAD⁺ 与 NADH 的相对平衡, 通过电子传递链将更多 NADH 氧化成 NAD⁺, 为菌体提供更多 ATP, 最终导致利用木糖过程中菌体生物量积累较多。通过对 2 种碳源下 NADH/NAD⁺、ATP 的变化监测, 可见指向生物量积累的能量代谢旺盛是影响木糖产酸量低的主要原因, 这与 Maas^[17] 的结论相一致。

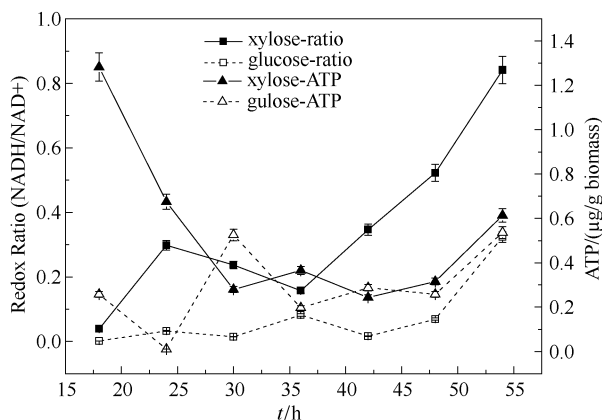


图 4 不同碳源下米根霉胞内还原力和 ATP 含量的变化

Fig. 4 Effect of different carbon resources on intercellular redox ratio and ATP content.

3 结论和展望

本文以木糖和葡萄糖为碳源, 考察了不同碳源培养条件下米根霉菌体生长、细胞组分以及有机酸代谢的差异, 同时联系胞内能量代谢分析了造成木糖代谢特性的原因。研究结果表明, 米根霉代谢木糖时产生较高的胞内还原力及 ATP, 促使细胞生物量的合成以及细胞大分子组分的合成, 指向生物量

积累的能量代谢旺盛是影响木糖产酸量低的原因, 为分步利用木质纤维素中的木糖和葡萄糖制备大宗化学品提供了理论依据。

基于上述研究, 在木糖代谢过程中, 除了对物质流进行扰动外, 加入对能量代谢流的扰动, 或许可以有效提高木糖的利用效率。此外, 基于木糖利于细胞大分子的合成这一特性, 可以将木质纤维素资源中的木糖组分用于几丁质、壳聚糖以及菌体蛋白等细胞组分的合成^[24], 促进木质纤维素的全面、高效利用。

参考文献

[1] Jeffries TW, Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi // Chan YK, Fiechter A, Gong CS, Jansen NB, Janshekar H, Jeffries TW, Kurtzman CP, Maleszka R, McCracken ZD. Pentoses and Lignin, Berlin: Springer-Verlag, 1983, 1-32.

[2] Chandrakant P, Bisaria VS. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53: 301-309.

[3] Jeffries TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17: 320-326.

[4] Hahn-Hägerdal B, Wahlbom CF, Gárdonyi M, van WHV Zyl, Otero R, Jönsson L. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Utilization // Nielsen J, Eggeling L, Dynesen J, Gárdonyi M, Gill RT, Graaf AA, Metabolic Engineering, Berlin/Heidelberg: Springer, 2001, 53-84.

[5] Kautola H, Linko YY. Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, 31: 448-452.

[6] 付永前, 黄和, 李霜, 徐晴, 何皓, 韦萍. 固定化米根霉发酵生产有机酸现状及研究进展. *现代化工 (Modern Chemical Industry)*, 2008, 28(12): 88-91.

[7] Essamri M, Deyris V, Comeau L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *Journal of Biotechnology*, 1998, 60: 97-103.

[8] Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 1701-1705.

- [9] 刘宁,李霜,何皓,吴华,黄和,嵇松杨. 少根根霉利用木糖和葡萄糖分步发酵制备富马酸. 过程工程学报 (*The Chinese Journal of Process Engineering*), 2008, 8 (4): 794-797.
- [10] Xu Q, Li S, Fu Y, Tai C, Huang H. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 6262-6264.
- [11] 黄和,李霜,高振,刘宁,何皓. 一种完全利用木质纤维素生产富马酸的方法. 中国发明专利. ZL200810018773.
- [12] Herbert D, Phipps PJ, Strange RE, Norris JR, Ribbons DW. Chapter III Chemical Analysis of Microbial Cells, *Methods in Microbiology*, New York: Academic Press, 1971, 209-344.
- [13] Zhou Y, Du J, Tsao G. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84-86: 779-789.
- [14] Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, Ohba T. On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90: 294-301.
- [15] Kotyk A. Properties of the sugar carrier in baker's yeast. *Folia microbiologica*, 1967, 12:121-131
- [16] 沈同,王镜岩. 生物化学(第三版). 北京:高等教育出版社,2007.
- [17] Maas RHW, Springer J, Eggink G, Weusthuis RA, Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*; effect of growth and respiration on l (+)-lactic acid production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35: 569-578.
- [18] Vuong C, Kidder JB, Jacobson ER, Otto M, Proctor RA. Somerville GA, *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187: 2967-2973.
- [19] 秦义,董志姚,刘立明,陈坚. 工业微生物中 NADH 的代谢调控. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2009, 25(2): 161-169.
- [20] Alexeeva S, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ, Requirement of ArcA for Redox Regulation in *Escherichia coli* under Microaerobic but Not Anaerobic or Aerobic Conditions. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (1): 204-209.
- [21] McLaughlin KJ, Strain-Damere CM, Xie KF, Brekasis D, Soares AS, Paget MSB, Kielkopf CL. Structural Basis for NADH/NAD(+) Redox Sensing by a Rex Family Repressor. *Molecular Cell*, 38: 563-575.
- [22] 王桂兰,王益娜,马江锋,陈可泉,姜岷. 不同还原性碳源对重组大肠杆菌厌氧发酵生产丁二酸的影响. 中国酿造(*China Brewing*), 2009, 3: 16-19.
- [23] San KY, Bennett GN, Berríos-Rivera, Susana J, Vadali RV, Yang Y, Horton E, Rudolph FB, Sariyar B, Blackwood K. Metabolic Engineering through Cofactor Manipulation and Its Effects on Metabolic Flux Redistribution in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2002, 4: 182-192.
- [24] Tai C, Li S, Xu Q, Ying HJ, Huang H, Ouyang PK. Chitosan production from hemicellulose hydrolysate of corn straw: impact of degradation products on *Rhizopus oryzae* growth and chitosan fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51: 278-284.

Metabolism of *Rhizopus oryzae* with xylose or glucose as carbon resource

Chang Dou, Qing Xu, Ping Song, Ling Jiang, Shuang Li*

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: [**Objective**] As one of the most abundant and cheapest recyclable bio-resources, cellulosic biomass appear to be the promising new energy if the two major components, glucose and xylose, are efficiently used. [**Methods**] We compared the metabolism of *Rhizopus oryzae* growing on glucose or xylose. We measured biomass accumulation, intercellular metabolite contents, and organic acids production. [**Results**] When cultured on xylose, the rate of bio-transformation reached 35.2% compared to 24.3% in the glucose. Intercellular contents accumulated much more by using xylose as sole carbon than using glucose. However, the quantity of organic acid was less with xylose than with glucose. In addition, during the coexistence of both substrates, *Rhizopus oryzae* utilizes glucose first, and xylose later when the glucose is almost exhausted. [**Conclusion**] With our data analysis, both the NADH/NAD⁺ and ATP quantity are differed between the utilization of two carbon resources. In xylose, biological macromolecule and biomass accumulation are in advantage, while in glucose, the inorganic acid production is enhanced.

Keywords: xylose, glucose, material metabolism, energy metabolism, *Rhizopus oryzae*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(21076104), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(2009CB724701) and by the Qing Lan Project of Jiangsu Province

* Corresponding author. Tel: +86-25-83172094; E-mail: lishuang@njut.edu.cn

Received: 7 September 2010 / Revised: 5 January 2011

《微生物学报》审稿程序

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 本刊严格遵守“三审制”, 即: 编辑部内审, 专家外审, 主编总审。从投稿日期开始, 争取在 2 个月之内给出审稿结果, 5-7 个月之内发表。

- (1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 E-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后, 经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者, 在没有完成全部审稿之前, 不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。