

放线菌酮对米根霉积累 L-苹果酸代谢途径的调控作用

何皓, 李霜, 徐晴, 张凯, 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: 实验考察了富马酸酶活抑制剂放线菌酮对米根霉发酵产 L-苹果酸和富马酸的影响. 结果表明, 发酵 16 h 加入浓度 15 mg/L 的放线菌酮使米根霉富马酸酶胞质同功酶比活力峰值降低 48.7%, 而苹果酸脱氢酶胞质同功酶活力却未有明显改变, 生成的富马酸比对照样减少 37.1%, 而 L-苹果酸积累量提高 54.6%, 达到 21.7 g/L. 表明通过对米根霉富马酸酶胞质同功酶的抑制作用能减弱米根霉积累富马酸代谢途径中由 L-苹果酸向富马酸的转化, 从而促进米根霉积累 L-苹果酸.

关键词: L-苹果酸; 米根霉; 放线菌酮; 富马酸酶; 富马酸

中图分类号: TQ921.7; Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2009)01-0153-04

1 前言

米根霉(*Rhizopus oryzae*)是经美国 FDA 认证的安全菌株, 广泛应用于 L-乳酸和富马酸的发酵生产^[1]. 研究发现, 米根霉和黄曲霉利用相同的丙酮酸羧化支路, 即 CO₂ 固定途径代谢葡萄糖^[2], 但主要积累产物却明显不同, 该途径中富马酸酶催化的 L-苹果酸脱水反应是导致两者产生差异的关键所在. 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. 而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. 理论上采用代谢调控手段利用米根霉发酵生产 L-苹果酸具有极大的潜力^[5], 并将有效解决生产菌株的安全性问题.

放线菌酮(Cycloheximide)是一种对真菌有很强抑制作用的抗生素, 其作用方式是干扰真核生物的蛋白质合成. Peleg 等^[6]报道了放线菌酮对米根霉胞质富马酸酶具有抑制作用, 而米根霉胞质富马酸酶催化 L-苹果酸转化为富马酸, 因此, 放线菌酮可尝试用于调控米根霉的代谢产物. 本研究考察了添加放线菌酮对米根霉产富马酸发酵过程中菌体生长、关键酶活力及主要代谢产物的影响, 为利用代谢调控手段发酵米根霉菌株制备 L-苹果酸提供了研究基础.

2 材料与方法

2.1 菌种及试剂

米根霉(*Rhizopus oryzae*)ME-M15 菌株, 南京工业

大学制药与生命科学学院代谢工程实验室诱变选育保藏.

玉米浆由上海西王淀粉糖有限公司提供, 真菌线粒体分离试剂盒为上海杰美基因医药科技有限公司产品, 放线菌酮(Cycloheximide)购自 BBI 公司, 高纯级, 其他化学试剂均为国产分析纯.

2.2 培养基及培养方法

2.2.1 斜面产孢培养

斜面产孢培养基参见文献[7]. 接入米根霉保藏菌种, 于 34 °C 培养 7~8 d.

2.2.2 种子培养

(1) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 尿素 1, 玉米浆 3, KH₂PO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.25, ZnSO₄·7H₂O 0.066, FeCl₃·6H₂O 0.01, 琼脂 1.0, 初始 pH 3.5.

(2) 培养条件: 调整米根霉孢子悬浮液浓度为 10⁷ mL⁻¹, 取 2 mL 接种至 50 mL 种子培养基中, 置于 34 °C 往复摇床, 转速 200 r/min 下培养 24 h.

2.2.3 摇瓶产酸培养

(1) 产酸培养基(g/L): 葡萄糖 80, (NH₄)₂SO₄ 1, KH₂PO₄ 0.15, ZnSO₄·7H₂O 0.05, FeCl₃·6H₂O 0.068, MgSO₄·7H₂O 0.1, CaCO₃ 60, 自然 pH.

(2) 培养条件: 取 4 mL 种子培养液接种至 50 mL 发酵培养基中, 34 °C 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.

2.3 细胞抽提物的制备和细胞分级分离

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. 菌丝体用棉布过滤, 冷蒸馏水洗涤除去多余

收稿日期: 2008-10-13, 修回日期: 2008-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20706031); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2007CB707805); 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2006AA02Z240); 江苏省自然科学基金资助项目(编号: BK2007186)

作者简介: 何皓(1982-), 男, 四川省宜宾市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 黄和, 通讯联系人, Tel: 025-86990023, E-mail: biotech@njut.edu.cn.

钙盐. 每 2 g 新鲜生长的湿菌丝体用 15 mL 10 mmol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液(含 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA 及 187 mmol/L 甘露醇、62 mmol/L 蔗糖、10 μmol/L PMSF)重悬. 细胞抽提物和分级分离制备过程参照 Osmani 等^[8]的方法加以改动, 线粒体和胞质组分的分离通过试剂盒进行操作.

2.4 酶活力测定

富马酸酶(以苹果酸为底物)、NAD-苹果酸脱氢酶(以草酰乙酸为底物)活力测定方法见文献[3,9], 丙酮酸羧化酶活力测定方法由文献[8]的方法改进. 比活力定义为 30℃下 1 mg 蛋白 1 min 转化底物或辅酶的量 [μmol/(min·mg)].

2.5 蛋白含量测定

采用 Bradford 法^[10]测定蛋白质浓度, 标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA).

2.6 分析方法

样品制备: 停止发酵后添加适量 6 mol/L HCl, 调节发酵液至酸性并水浴加热使富马酸溶解, 抽滤后取上清液用于分析检测.

发酵液中葡萄糖含量测定采用 SBA-40C 生物传感仪, L-苹果酸及富马酸含量用 HPLC 法^[11]测定.

菌体生物量的测定: 抽滤, 无菌水洗涤, 菌丝体 60℃烘干至恒重后称重.

3 结果与讨论

3.1 抑制剂添加时间对米根霉发酵的影响

向处于发酵不同阶段的产酸培养基中分别添加经过过滤灭菌的放线菌酮溶液, 对米根霉生长及产酸的影响如表 1 所示.

表 1 抑制剂对米根霉生长和产酸的影响

Table 1 Effects of inhibitor on mycelial growth and acid production by *R. oryzae* ME-M15

Inhibitor	Concentration (mg/L)	Addition time (h)	Relative result (%)		
			Growth	Fumaric acid	L-Malic acid
Control	-	-	100.0 (4.23 g/L)	100.0 (18.9 g/L)	100.0 (14.4 g/L)
		0	81.6	66.5	74.3
		8	83.2	69.0	105.8
		16	89.6	71.5	142.2
		24	93.9	95.1	99.7

由表 1 可见, 米根霉由种子培养液接入产酸培养基时(0 h), 加入放线菌酮使菌体生长受到抑制, 富马酸和 L-苹果酸积累量都显著下降, 抑制率达 33.5%和 25.7%; 而进入产酸阶段后, 在发酵培养 24 h 加入放线菌酮, 米根霉富马酸和 L-苹果酸积累量无显著变化, 菌体生长虽然受到了抑制, 但抑制率较低(6.1%); 而当发酵产酸培养 16 h 时发酵液中加入 10 mg/L 的放线菌酮, L-苹果酸积累量大幅增加 42.2%, 富马酸产量却降低 28.5%, 影响明显. 故在后续实验中选定在发酵 16 h 时加入放线菌酮溶液作进一步考察.

3.2 放线菌酮不同添加量对米根霉发酵的影响

在发酵产酸培养 16 h 后向发酵液中添加放线菌酮溶液, 使其终浓度分别为 10, 15, 20, 25 mg/L, 其对米根霉生长及产酸的影响如图 1 所示. 由图可知, 随着添加放线菌酮浓度的增加, 米根霉富马酸(FA)的产量逐步下降; L-苹果酸(L-MA)产量比对照样都有较大增加, 在放线菌酮浓度为 15 mg/L 时达到最高, 当放线菌酮浓度进一步增加, 苹果酸积累量逐步减少. 在发酵 16 h 添加 15 mg/L 的放线菌酮后, 菌体生长受到抑制, 富马酸积累量从 19.4 g/L 降低至 12.2 g/L, 减少 37.1%, 而 L-苹果酸积累量则由 14.1 g/L 提高了 54.6%, 达 21.7 g/L, 在此添加条件下对米根霉产酸影响最为显著.

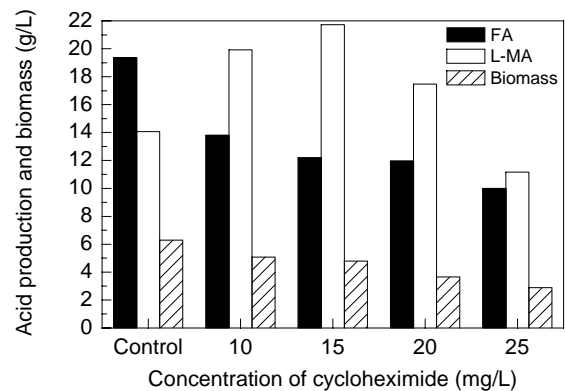


图 1 抑制剂添加量对米根霉生长和产酸的影响

Fig.1 Effects of addition concentration of inhibitor on biomass and acid accumulation by *R. oryzae* ME-M15

3.3 放线菌酮添加后米根霉的发酵过程

依前述条件添加放线菌酮, 每隔 12 h 取样(24 h 前为 0, 8, 16 h 取样)测定菌体生物量及 L-苹果酸产量, 考察米根霉发酵过程生长及产酸情况, 结果如图 2 所示. 发酵 16 h 添加 15 mg/L 的放线菌酮后, 米根霉 ME-M15 的生长速率及生物量均显著变化, 与对照样相比 16 h 后菌体生长放缓, 最终生物量减少 34.1%, 仅为 4.17 g/L; 而 L-苹果酸的产量有较大幅度增加, 在 16 h 添加放线菌酮后产酸速率明显加快, 在余后的 80 h 发酵时段内达

到 0.21 g/(L·h)，而对照样产酸速率仅为 0.11 g/(L·h)。由耗糖曲线分析，两者耗糖速率大致相同，在发酵 12~48 h 阶段葡萄糖消耗最快，这也是苹果酸积累和菌体生长的主要阶段。

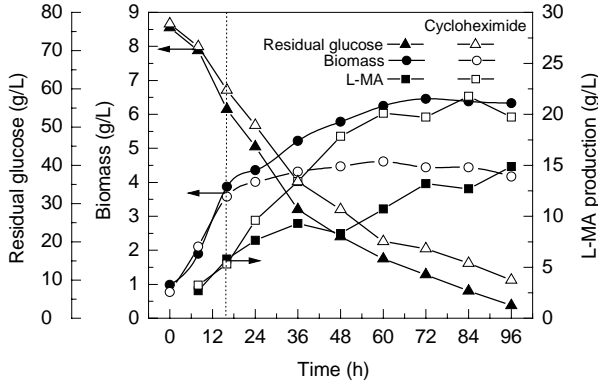


图 2 16 h 时添加放线菌酮的发酵过程
Fig.2 Fermentation results with cycloheximide addition during the acid accumulation stage

3.4 放线菌酮对代谢途径关键酶活力的影响

在米根霉等丝状真菌的细胞代谢途径中，丙酮酸羧化支路被认为是影响 L-苹果酸积累的主要途径^[12,13]，富马酸酶、苹果酸脱氢酶的胞质途径同功酶及丙酮酸羧化酶是其中起重要作用的关键酶，而发酵 16 h 添加放线菌酮后米根霉产酸量的变化必然伴随着主代谢途径关键酶活力的改变。依上述条件添加放线菌酮，每隔 12 h 取样(24 h 前为 8 和 16 h 取样)分别测定富马酸产量、线粒体和胞质途径富马酸酶同功酶的活力，结果如图 3 所示。

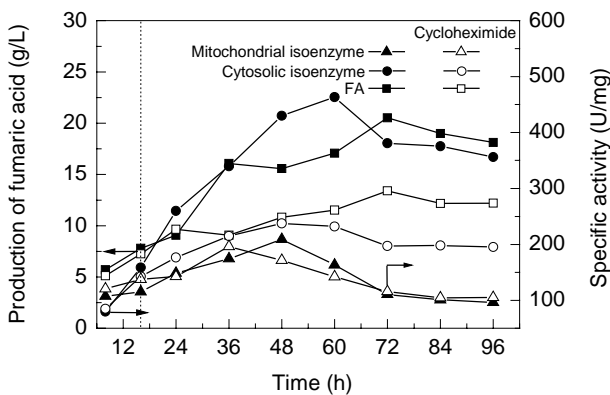


图 3 放线菌酮对米根霉富马酸酶活力的影响
Fig.3 Effect of cycloheximide on the activity of fumarase in *R.oryzae* ME-M15

由图 3 可见，米根霉 ME-M15 胞质途径富马酸酶活力随发酵培养时间推移而逐步增强，在培养 60 h 时达最高比活力 463.5 U/mg，与此对应的是富马酸的积累量快速增加，在培养 72 h 时富马酸产量达到最高，为 20.5

g/L。发酵培养 16 h 时添加放线菌酮，ME-M15 胞质途径富马酸酶活力受到明显抑制，因而在 16 h 后富马酸积累缓慢增加，产量峰值比对照样减少 34.8%。而添加抑制剂与否对线粒体中存在的富马酸酶活力无明显影响，在产酸培养的初期其活力略高于胞质途径同功酶，但培养 12 h 后逐渐被胞质组分的富马酸酶活力超出。

周小燕等^[14]利用黄曲霉发酵积累 L-苹果酸的过程中发现，代谢关键酶—丙酮酸羧化酶、胞质苹果酸脱氢酶、胞质富马酸酶在发酵早期存在着合成的先后趋势，即按 CO₂ 固定途径代谢链逐一顺序进行，在代谢链前面的酶合成较早。本研究中米根霉发酵 16 h 时添加放线菌酮导致代谢积累产物的大幅改变，因而推测与米根霉发酵过程中代谢途径关键酶的合成先后趋势有关。放线菌酮是一种作用方式为干扰蛋白质合成的抗生素，在发酵培养早期不同时间添加，使处于不同合成时期的各种酶合成受到不同程度的影响，导致酶类合成量变化，而胞质同功酶活力的增加需要新生蛋白质的合成，这正是其酶活力变化的重要原因，从而呈现出随放线菌酮加入时间不同，菌体的 L-苹果酸和富马酸产量不同的变化趋势：在由种子培养液接入产酸培养基时(0 h)加入放线菌酮，使与四元二羧酸积累直接相关的胞质酶合成乃至菌体细胞生长都受到极大抑制，米根霉 ME-M15 的主要代谢产物富马酸和苹果酸都大幅下降；发酵培养后 24 h 加入放线菌酮，富马酸和 L-苹果酸积累量无显著变化，发酵 36 h 加入放线菌酮后两者甚至都有所增加(数据未列出)，原因可能是发酵培养 24 h 后胞质中苹果酸脱氢酶及富马酸酶的合成基本完成，36 h 后其他代谢支路节点酶处于快速合成期，其酶活力本应快速上升，而放线菌酮的加入使其活力被抑制从而使丙酮酸羧化支路代谢流量增加；当发酵培养 8~24 h 时，苹果酸脱氢酶合成可能已先于富马酸酶完成，而富马酸酶胞质途径同功酶却正处于快速合成阶段，此时加入放线菌酮正好减弱了其活力，使富马酸产量下降，L-苹果酸积累量大幅增加。

对产酸发酵阶段不同时期所得菌体所含的苹果酸脱氢酶胞质同功酶及丙酮酸羧化酶活力进行测定，并与

表 2 放线菌酮对苹果酸脱氢酶及丙酮酸羧化酶活力影响
Table 2 Effects of cycloheximide on the activity of NAD-malate dehydrogenase (MDH) and pyruvate carboxylase (PC) in *R.oryzae* ME-M15

Fermentation time (h)	Specific activity of enzymes (U/mg)			
	MDH ¹⁾	MDH ²⁾	PC ¹⁾	PC ²⁾
16	115.9	126.8	101.6	98.7
24	176.3	200.4	85.2	77.6
48	224.1	256.4	62.5	73.8
72	187.1	191.7	73.1	81.8

Note: 1) Enzyme activity in the presence of cycloheximide;
2) Enzyme activity in the absence of cycloheximide.

发酵 16 h 添加放线菌酮的发酵样品对比, 结果如表 2 所示, 表明加入放线菌酮后未造成苹果酸脱氢酶胞质途径同工酶活性明显改变, 酶比活力仅有小幅降低, 而丙酮酸羧化酶活力几乎不受影响, 这与 Peleg 等^[6]的报道一致. 富马酸酶胞质同工酶的活性影响更为显著, 但正因如此, 适时添加放线菌酮才可能使 L-苹果酸积累量大幅上升.

4 结论

研究了添加放线菌酮对米根霉发酵产富马酸过程中菌体生长、关键酶活力及主要代谢产物的影响, 得到如下结论:

(1) 米根霉发酵积累 L-苹果酸的放线菌酮最适添加时间为发酵 16 h, 添加浓度为 15 mg/L; 发酵液中 L-苹果酸积累量提高至 21.7 g/L, 富马酸产量减少 37.1%.

(2) 发酵 16 h 添加 15 mg/L 的放线菌酮后, 米根霉的富马酸酶胞质同工酶比活力峰值降低 48.7%, 而线粒体中富马酸酶活力无显著变化; 丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶胞质同工酶活力变化不显著.

(3) 抑制米根霉富马酸酶胞质同工酶能显著减弱其丙酮酸羧化途径中由 L-苹果酸向富马酸的转化, 改变米根霉代谢终产物, 促进 L-苹果酸的积累.

参考文献:

- [1] Oda Y, Yajimab Y, Kinoshita M, et al. Differences of *Rhizopus oryzae* Strains in Organic Acid Synthesis and Fatty Acid Composition [J]. Food Microbiol., 2003, 20: 371–375.
- [2] Tsao G T, Cao N J, Du J X, et al. Production of Multifunctional

- Organic Acids from Renewable Resources [J]. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 1999, 65: 245–280.
- [3] Peleg Y, Stieglitz B, Goldberg I, et al. Malic Acid Accumulation by *Aspergillus flavus*: I. Biochemical Aspects of Acid Biosynthesis [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 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 [J]. 真菌学报, 1993, 12(4): 304–312.
- [5] Magnuson J K, Lasure L L, Tkacz J, et al. Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine [M]. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. 307–340.
- [6] Peleg Y, Battat E, Scrutton M C, et al. Isoenzyme Pattern and Subcellular Localization of Enzymes Involved in Fumaric Acid Accumulation by *Rhizopus oryzae* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 32: 334–339.
- [7] Lorraine B, Ling N D, Thomas K N, et al. Fermentation Process for Carboxylic Acids [P]. US Pat.: 4877731, 1989–10–31.
- [8] Osmani S A, Scrutton M C. The Sub-cellular Localization of Pyruvate Carboxylase and of Some Other Enzymes in *Aspergillus nidulans* [J]. Eur. J. Biochem., 1983, 133: 551–560.
- [9] Peleg Y, Barak A, Scrutton M C, et al. Malic Acid Accumulation by *Aspergillus flavus*: III. ¹³C NMR and Isoenzyme Analyses [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 30: 176–183.
- [10] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248–254.
- [11] 刘宁, 李霜, 何皓, 等. 少根根霉利用木糖和葡萄糖分步发酵制备富马酸 [J]. 过程工程学报, 2008, 8(4): 716–719.
- [12] Osmani S A, Scrutton M C. The Sub-cellular Localization and Regulatory Properties of Pyruvate Carboxylase from *Rhizopus arrhizus* [J]. Eur. J. Biochem., 1985, 147: 119–128.
- [13] Kenealy W, Zaady E, Preez J C du, et al. Biochemical Aspects of Fumaric Acid Accumulation by *Rhizopus arrhizus* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52(1): 128–133.
- [14] 周小燕, 吴清平, 蔡芷荷, 等. 曲霉 N1-14'胞质酶活性与产 L-苹果酸能力的关系 [J]. 微生物学报, 2000, 40(5): 500–505.

Effect of Cycloheximide on Regulation of Metabolic Pathway for L-Malic Acid Accumulation by *Rhizopus oryzae*

HE Hao, LI Shuang, XU Qing, ZHANG Kai, HUANG He

(State Key Lab. Materials-oriented Chem. Eng., Col. Life Sci. Pharmacy, Nanjing Univ. Technol., Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: The effects of fumarase inhibitor cycloheximide on fermentation of L-malic acid and fumaric acid by *Rhizopus oryzae* ME-M15 were investigated. The results showed that the addition of cycloheximide (15 mg/L) during the acid production stage after 16 h incubation greatly affected the metabolism of *Rhizopus oryzae* ME-M15. The activity of cytosolic isoenzyme of fumarase was decreased markedly by 48.7%, but the activity of NAD-malate dehydrogenase in the cytosol fraction did not change significantly in the presence of cycloheximide. Fumaric acid production was severely decreased in the presence of cycloheximide with 37.1% in comparison with the control mycelium. In contrast to the inhibitory effect of fumaric acid fermentation, the addition of cycloheximide caused the increase of L-malic acid accumulation to 21.7 g/L, which was 54.6% higher than that of the control. The analyses revealed that the inhibition of fumarase isoenzyme in the cytosol fraction could reduce the metabolic flux from L-malic acid to fumaric acid in the pyruvate carboxylation pathway (cytosolic pathway), promoting the L-malic acid accumulation by *Rhizopus oryzae* ME-M15.

Key words: L-malic acid; *Rhizopus oryzae*; cycloheximide; fumarase; fumaric acid