

# 代谢调节理论指导下的核黄素发酵条件

张星元 王 琴

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

**摘要** 发表了从葡萄糖到核黄素的整条生物合成途径。根据这条代谢途径和 T30 突变株的发酵条件试验结果, 对阿舒假囊酵母合成核黄素的过程中碳基质流量在 EMP 和 HMP 途径中的分配, 油和骨胶在核黄素合成中的不同作用, 以及丙酮酸的氧化能力等与核黄素过量合成的关系进行了初步的讨论。

**关键词** 阿舒假囊酵母; 核黄素生物合成; 代谢调节

**中图分类号** TQ 467. 2

## 0 前 言

前文<sup>[1]</sup>已报道无锡轻工大学从核黄素合成途径及其调节的角度对 1 株阿舒假囊酵母 (*Emmenthycium ashbyii*) 进行遗传性能的改良, 以<sup>60</sup>Co 辐射的  $\gamma$  射线为诱变剂, 以核黄素合成代谢的中间产物的结构类似物为“筛子”, 从结构类似物抗性突变株中筛选到数株高产核黄素的突变株, 其中杀结核菌素抗性突变株(简称 Tub<sup>y</sup> 突变株) T 30, 在与出发菌株同样条件下发酵, 核黄素产量比出发菌株提高 40% 以上。

本研究以 T 30 突变株为对象, 以核黄素合成途径及其调节理论为依据, 对核黄素发酵的工艺条件进行探索的研究, 并对研究结果进行理论性探讨。为了表述的方便, 首次发表了笔者综合归纳的从葡萄糖到核黄素的合成途径。

## 1 材料与方 法

### 1. 1 供试菌株

*Emmenthycium ashbyii* T30

### 1. 2 培养基

1) 固体完全培养基 葡萄糖 10. 0 g/L; 蛋白胨 10. 0 g/L; 麦芽汁\* 10. 0 ml/L; 玉米浆 10. 0 ml/L; NaCl 1. 0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2. 0 g/L; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0. 15 g/L; 琼脂 20 g/L; pH 消前 6. 8

\* 麦芽汁的制备按协定糖化法<sup>[2]</sup>。

2) 发酵培养基(一) 葡萄糖 20. 0 g/L; 蛋白胨 15. 0 g/L; 骨胶 10. 0 g/L; 玉米浆 10. 0 ml/L; NaCl 1. 0 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2. 0 g/L; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0. 15 g/L; 豆油 30. 0 ml/L;

pH 消前 6.8

3) 发酵培养基(二) 葡萄糖 20.0 g/L; 蛋白胨 5.0 g/L; 胍胶 30.0 g/L; 玉米浆 15.0 ml/L; NaCl 1.0 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15 g/L; 豆油 20.0 ml/L; pH 消前 8.0

### 1.3 培养条件

培养温度为 28~30℃。试管斜面菌种培养和摇瓶振荡培养时间均为 7 d; 培养皿单菌落分离时间为 4 d。摇瓶振荡培养条件为往复式摇床 100 r/min, 振幅 8~10 cm, 装液量为 500 ml 三角瓶内装液 70 ml。

### 1.4 核黄素发酵单位测定

发酵液经适当稀释后用分光光度法<sup>[3]</sup>测定核黄素发酵单位(mg/L)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 油促进核黄素合成的机理分析

2.1.1 不同油脂对核黄素产量的影响 核黄素标准曲线为  $Y = 33.49X - 1.067$ ; 相关系数  $r = 0.9994$ 。式中:  $Y$ ——核黄素浓度(mg/L);  $X$ ——444 nm 处 OD 值。

在不加油的发酵培养基(一)中分别添加 30.0 ml/L 的豆油、橄榄油、蓖麻油、菜油、麻油、猪油, 接入种子液发酵 7 d, 与相同条件不加油的发酵液作对比, 结果如图 1。

由图 1 可见, 油脂对核黄素的产量有明显的促进效果。豆油对核黄素产量的促进效果最为显著, 依次下来为菜油、麻油、橄榄油。这四种油的效果相差不大, 可视市场价格的高低来选择。猪油稍差一点。而蓖麻油对核黄素的促进作用不大。

2.1.2 不同种类的油对产核黄素的不同影响的分析

从表 1 可以看出, 豆油、橄榄油、菜油、麻油中, 以油酸( $\Delta^9$ -十八碳烯酸)、亚油酸( $\Delta^{9,12}$ -十八碳双烯酸)、芥酸( $\Delta^{13}$ 或 $\Delta^{11}$ 二十二碳单烯酸)等不饱和脂肪酸含量较高, 蓖麻油中蓖麻酸含量很高, 蓖麻酸是羟基酸。

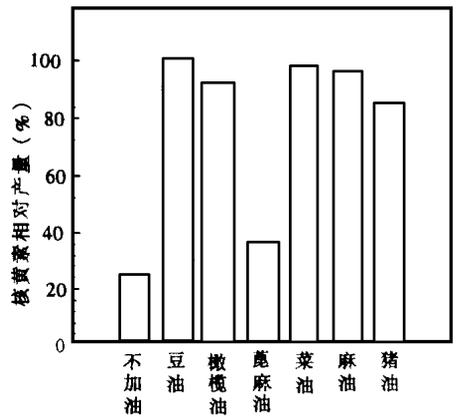


图 1 不同油脂对核黄素产量的影响

表 1 几种油脂主要成分<sup>[3,4]</sup>

种类	油酸	亚油酸	硬脂酸	棕榈酸	%	其它成分
豆油	22~30	50~60	2~5	7~10		花生酸 1~3, 亚麻油酸 5~9
橄榄油	65~86	4~15				花生酸 0.9
蓖麻油	3~9	2~3	3			蓖麻酸 80~88
菜油	14~29	12~24				芥酸 31~55, 亚麻油酸 1~10, 花生酸 0.4~1.0
麻油	35.0~49.4	37.7~48.4				花生酸 0.4~1.2

因此, 推测单烯酸、双烯酸等不饱和脂肪酸有利于核黄素的形成, 而羟基在烯酸分子中

的存在可能会影响这种促进作用。

**2.1.3 油在核黄素合成过程的作用的分析** 油会强烈地促进核黄素的合成,曾认为是油被降解形成四碳化合物——核黄素合成途径的一个中间产物(见图 3),但是 Quang Le Van 等<sup>[6]</sup>否定了这种推测,他认为该四碳化合物来自戊糖,由戊糖脱去第 4 位的碳原子而形成。我们的推测油的加入对 *E. ashbyii* 核黄素形成有两个作用:(1)油起到了碳源的作用。油水解生成甘油和脂肪酸,甘油可转变成 3-磷酸甘油醛进入 EMP 途径、TCA 循环,也可以和 6-磷酸果糖经 HMP 途径的非氧化阶段的转化而形成 5-磷酸核糖,参与核黄素的形成;脂肪酸则经  $\beta$ -氧化降解为乙酰辅酶 A,进入 TCA 循环或 DCA 循环而被氧化,为细胞的代谢和生长提供能量,促进细胞生长。另外,菌体内乙酰辅酶 A 多,则 TCA 循环畅通,形成大量 NADH。在有足够分子氧的情况下 NADH 通过电子传递、氧化磷酸化形成大量的 ATP。ATP 浓度上升对磷酸果糖激酶有抑制作用,所以经 EMP 途径降解的葡萄糖减少,胞质中的 6-磷酸葡萄糖转向经 HMP 途径降解,这样菌体细胞内五碳糖,磷酸核糖焦磷酸(PRPP)的浓度上升。PRPP 和五碳糖都参与合成核黄素,因而油的加入显著地促进了核黄素的合成,也可以认为油的加入和脂肪酸的氧化降解作用与核黄素的形成有直接的关系。(2)油的不饱和脂肪酸参与了细胞膜质的组成,改变了细胞膜的通透性,对核黄素的合成可能有利。

## 2.2 骨胶在核黄素合成中的作用机理的分析

**2.2.1 正交试验** 发酵培养基(一)来源于生产厂的摇瓶培养基配方,对于经诱变和筛选而得到的杀结核菌素抗性突变株 T30 不一定为最佳培养基配方,根据预备实验结果安排了葡萄糖、骨胶、蛋白胨、玉米浆和豆油的五因子三水平的培养配方的正交试验(培养基的其余成分见发酵培养基(一))。

表 2 因子水平表

水平因子	A 葡萄糖	B 骨胶	C 蛋白胨	D 玉米浆	E 豆油
1	1	1	0.5	1.0	2
2	2	2	1.0	1.5	3
3	3	3	1.5	2.0	4

表 3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F	显著性
A	$7.831 \times 10^5$	2	$3.916 \times 10^5$	4.092	[*]
B	$1.778 \times 10^6$	2	$8.890 \times 10^5$	9.289	*
C	$1.315 \times 10^6$	2	$6.575 \times 10^5$	6.870	[*]
D	$9.002 \times 10^4$	2	$4.501 \times 10^4$	0.470	
E	$2.969 \times 10^5$	2	$1.485 \times 10^5$	1.552	
误差	$3.828 \times 10^5$	4	$9.570 \times 10^4$		
总和	$4.646 \times 10^6$	14			

\*  $f_{0.05}(2, 4) = 6.94$ ; [\*]  $f_{0.25}(2, 4) = 2.00$

由此可见在试验条件下骨胶浓度对核黄素合成的影响最为显著。

根据正交试验结果调整发酵培养基配方,得发酵培养基(二)。将 T30 分别接种于发酵培养基(一)和(二),在相同的条件下发酵 7 d,其核黄素产量分别为 3 641 和 5 459 mg/L,调整的配方(骨胶 3%)比原配方(骨胶 1%)增产 50%。

**2.2.2 骨胶在核黄素合成中的作用的分析** 骨胶中 Gly(甘氨酸)的含量高达 41.4%<sup>[7]</sup>。Gly 对阿舒假囊酵母的生长及核黄素的合成的作用表现在:

1) Gly 直接进入核黄素合成途径,参与嘌呤核苷酸的合成。

2) Gly 可经转氨作用或氧化脱氨作用生成乙醛酸,进入乙醛酸支路和二羧酸循环,

为细胞的生长提供碳架和能量,可能会引起菌体浓度的适度提高。

3) Gly 转换为乙醛酸后,经过甘油酸途径形成 3-磷酸甘油酸,3-磷酸甘油酸逆 EMP 途径转变成 3-磷酸甘油醛,后者与 6-磷酸果糖经 HMP 途径的非氧化阶段由转酮转醛酶系催化形成 5-磷酸核糖,进入核黄素合成的代谢流。

## 2.3 丙酮酸的氧化与核黄素合成的机理的分析

### 2.3.1 发酵过程曲线 见图 2.

### 2.3.2 糖的补加对核黄素发酵的影响

将 T30 接种于三组发酵培养基(一)中分别于培养 24 h, 48 h, 72 h 时每瓶补加 1% 葡萄糖并继续培养至 168 h,测定核黄素产量,结果见表 4.

表 4 不同时间补糖对核黄素产量的影响

	对照	24 h	48 h	72 h
核黄素产量(g/L)	3.373	3.331	4.001	3.498
增幅(%)	0	-1.2	18.6	3.7

由表 4 可知,48 h 补糖,核黄素产量能提高 18.6%.

2.3.3 丙酮酸的氧化作用与核黄素合成的关系 从图 2 核黄素的发酵过程曲线上可以看出,pH 值先降后升。pH 值下降的原因是菌体生长过程中形成了丙酮酸、乙酸或其它有机酸<sup>[8]</sup>,使发酵液 pH 值有所下降。从 GMP 至核黄素的合成途径来看,见图 3, DHRAP 形成 ADRAP 时要放出  $\text{NH}_3$ ,核黄素合成的最后阶段放出  $\text{NH}_3$ ,使发酵液 pH 值有所上升,图 2 中 pH 值变化曲线就是这两种趋势总的反映。

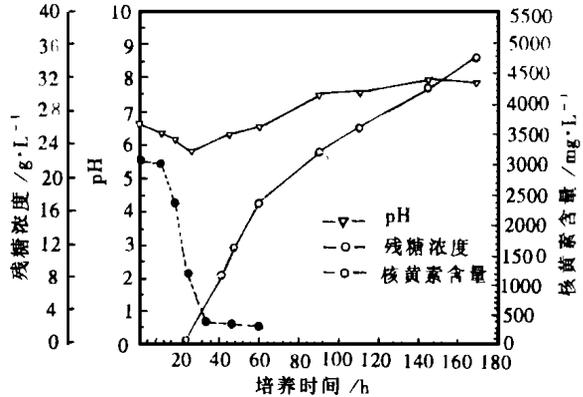


图 2 *E. ashbyii* T30 菌发酵过程曲线

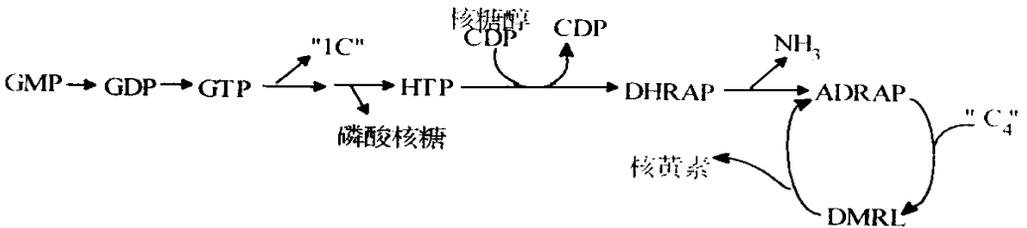


图 3 GMP 至核黄素的合成途径

HTP: 6-羟基-2,4,5-三氨基吡啶;

DHRAP: 2,5-二氨基-6-羟基-4-核糖基氨基吡啶

ADRAP: 5-氨基-2,6-二羟基-4-核糖基氨基吡啶;

DMRL: 6,7-二甲基-8-核糖基-2,4-二氧四氢嘧啶

丙酮酸处于代谢的中心位置,它不会无缘无故地在细胞和发酵液中累积。在核黄素发酵过程中,丙酮酸的累积与核黄素的合成有何关系见表 5 和图 4.

表 5 培养 *E. ashbyii* 时,丙酮酸和类脂酸对丙酮酸代谢和核黄素形成的影响<sup>[10]</sup>

组合	培养基	pH	生物量 (g/L)	核黄素		丙酮酸	
				mg/L	% 的对照比	mg/L	% 的对照比
1	基础培养基+乙酸(对照)	7.05	3.96	446	100	60	100
2	基础培养基+丙酮酸+乙酸	7.10	2.38	76	17	215	338
3	基础培养基+丙酮酸+类脂酸	7.30	3.60	286	64	160	267
4	基础培养基+乙酸+类脂酸	6.75	3.42	331	74	115	192

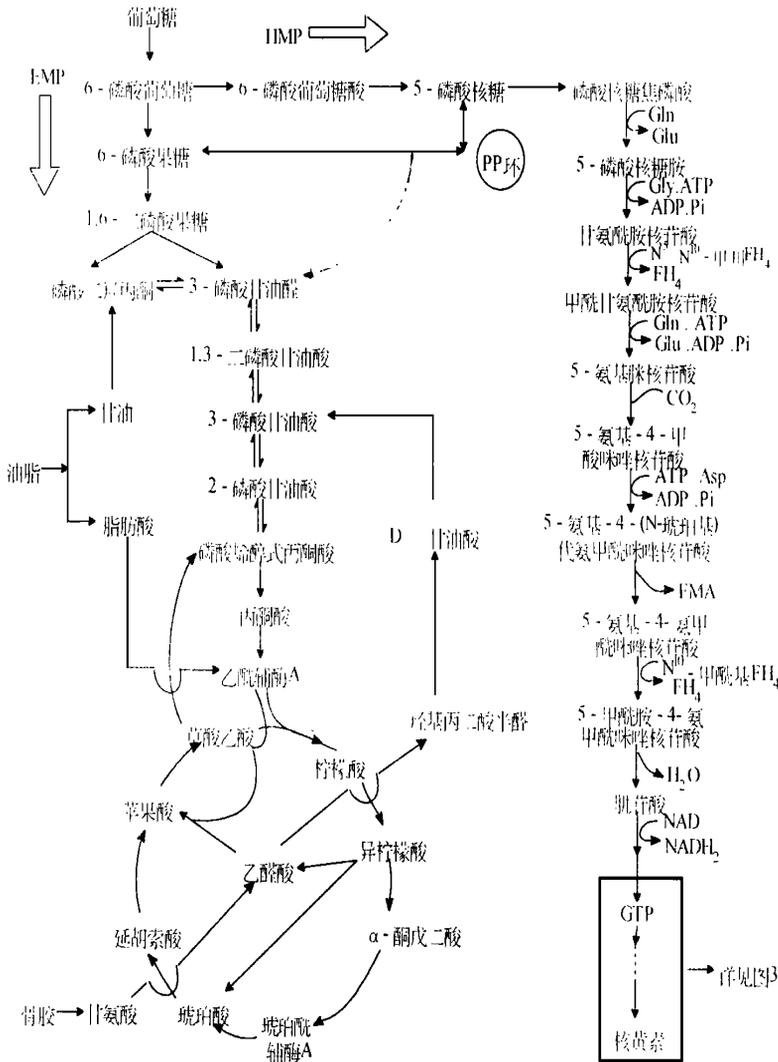


图 4 本研究实验条件下核黄素合成网络图

表 5 数据显示, 当向基础培养基加入乙酸时, 细胞量最多, 核黄素产量较高。这可能是因为乙酸的加入使原处于阻遏条件下的乙醛酸支路的酶解阻遏, 异柠檬酸裂合酶和苹果酸合成酶的酶水平上升, 造成主要靠氧化乙酸产能的局面, 基础培养基中的葡萄糖较多把流向 HMP 途径, 有利于磷酸核糖焦磷酸 PRPP 和戊糖的合成。当进一步向基础培养基中加入丙酮酸时, 由于丙酮酸与乙酸对辅酶 A 的竞争, 以及丙酰辅酶 A 对丙酮酸脱氢酶较强的抑制作用, 导致氧化产能的二羧酸循环受阻和丙酮酸的累积。生物量随之下降。由此可见, 丙酮酸的氧化与生物量、核黄素的合成有重大关系。如果菌体氧化丙酮酸能力受到抑制, 则丙酮酸累积。实际上当 T 30 在发酵培养基(一)中生长时, 由于油水解而成的脂肪酸的  $\beta$  氧化, 生成大量的乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 浓度上升, 会抑制丙酮酸的氧化, 导致丙酮酸、乙酸等的累积, 使发酵液的 pH 值下降。与此同时, 乙酰辅酶 A 在胞内被氧化而使胞内 ATP 浓度上升, ATP

的高浓度又影响到 EMP 途径的畅通, 进入细胞的葡萄糖只好较多地进入 HMP 途径代谢。因此在培养时适时添加葡萄糖。将有利菌体的适量生长和核黄素的过量合成。为了证实这一想法, 做了补糖实验。如表 4 所示, 24 h 补加 1% 葡萄糖核黄素产量根本没有提高; 48 h 补加的核黄素产量提高了 18.6%; 72 h 补加的核黄素产量提高了 3.7%, 效果并不明显。对照发酵过程曲线(图 2), 48 h 糖降已结束, 核黄素合成速率高, 所补的糖可能主要用于核黄素, 因而产量会提高。进一步的研究正在进行。

#### 参 考 文 献

- 1 张星元等. 阿舒假囊酵母过量合成核黄素性能的改良. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(3): 14 ~ 19
- 2 管郭仪. 啤酒工业手册(中册). 北京: 轻工业出版社, 1982
- 3 黄伟坤等. 食品检验与分析. 北京: 轻工业出版社, 1989
- 4 福建省建阳地区粮食学校主编. 粮食商品认识. 北京: 中国财经出版社, 1984
- 5 贝拉蒂 E. 油脂加工. 北京: 中国商业出版社, 1988
- 6 Quang Le Van. et al. Journal of Bacteriology. 1985, 162(3): 1280 ~ 1284
- 7 余俊红. Eaw 95.1 菌株核黄素发酵条件的研究. [学位论文]. 无锡轻工大学, 1996
- 8 Demain A L. Ann. Rev. Microbiol, 1972, 26: 369 ~ 388
- 9 陈 声. 近代工业微生物学(下册). 上海: 上海科学出版社, 1982

## Studies on Conditions of Riboflavin Fermentation under the Guidance of Metabolic Regulation Theory

Zhang Xingyuan Wang Qin

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract** The whole pathway of the biosynthesis from glucose to riboflavin is presented in this paper. According to the metabolic pathway and the result of conditional experiments of fermentation for mutant T 30, initiative discussions have been carried out: about carbon substretes distribution among EMP and HMP pathways in riboflavin biosynthesis operated by *Eremothecium ashbyii*, the different effects of oils and gelatin on riboflavin biosynthesis in the course of the cultivation and the relationship between the oxygenolysis ability of pyruvic acid and riboflavin overproduction.

**Key-words** *Eremothecium ashhg ii*; riboflavin biosynthesis; metabolic regulation

(责任编辑: 陈 娇)