

发酵法生产 α -酮戊二酸技术的研究

α -酮戊二酸(α -ketoglutarate,简称 α -KG)是一种重要的有机酸,在微生物细胞的代谢中起着重要的作用,也是合成多种氨基酸、蛋白质的重要前体物质,在食品、医药、化工和化妆品行业有广泛的应用。由于化学法合成 α -酮戊二酸过程中存在严重的安全问题,无法直接用于食品和化妆品中。因此,基于发酵法生产 α -酮戊二酸在食品和保健品行业具有广阔的应用前景。

发酵法生产 α -酮戊二酸的研究最早始于 1946 年,当时 Lockwood 和 Stodola 对利用细菌生物合成 α -酮戊二酸进行了初步的研究。之后 Asai 等人发现假单胞菌属、产气杆菌和粘质沙雷氏菌可以过量合成 α -酮戊二酸,并且提出过量合成 α -酮戊二酸的必要条件是培养基中碳源、氮源的浓度。目前对发酵法生产 α -酮戊二酸研究较多的是俄国的 Russian Acad Sci, Skryabin Inst Biochem & Physiol Microorganisms,其发现不同种属的硫胺素缺陷型酵母可能都有生产 α -酮戊二酸的能力,合成 α -酮戊二酸的主要条件就是硫胺素缺乏引起的生长限制。Chernyavskaya, O G(2000)分析影响解脂亚洛酵母菌株从乙醇合成生产 α -酮戊二酸的主要因素,包括硫胺素缺陷菌株的属与种,培养基与分子的中硫胺与氮和氧浓度、溶氧、pH 值等;Ilchenko, AP(2010)等研究了脂亚洛酵母突变菌株利用乙醇生产 α -酮戊二酸的代谢特征。

近年来,江南大学的陈坚教授及其课题组成员对发酵法生产 α -酮戊二酸技术进行了大量、深入的研究。CN20071030244.1 公开了一种 α -酮戊二酸高产菌及其筛选方法和用该菌株发酵法生产 α -酮戊二酸的技术,该发明菌株为一株解脂亚洛酵母(*Yarrowia lipolytica*) WSH-Z06,保藏编号 CCTCC NO:M207143。该菌株是从炼油厂附近的土壤中经在完全培养基、基本培养基和补充培养基平板上菌落生长情况的对照筛选出硫胺素营养缺陷型的菌株,然后对筛选出的硫胺素缺陷型菌株采用一级发酵逐一摇瓶培养初筛,发酵液利用硅胶层析方法分析,将保留有 α -酮戊二酸显色斑点的菌株再转接于装有发酵培养基的摇瓶中进行发酵复筛,发酵液经高效液相方法测定,比较 α -酮戊二酸产量高低而得到的高产 α -酮戊二酸的一株菌,通过对发酵培养基中重要组成成分进行优化,发酵 6 d 时 α -酮戊二酸产量可达到 39.3 g/L。CN201010578594.6 采用分子手段,将来源于小鼠中编码 ATP-柠檬酸裂解酶 ACL 基因过量表达于发酵法生产 α -酮戊二酸的菌株 *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 中,获得了一株 ATP-柠檬酸裂解酶活性提高的酵母工程菌 *Y. lipolytica* ACL。该基因工程菌能以甘油为唯一碳源,在胞内积累 0.89 mmol DCW 的乙酰辅酶 A,ACL 活性提高了 7.5 倍(3.56 U/mg protein); α -酮戊二酸产量达到 45.3 g/L,是出发菌株的 1.29 倍;丙酮酸产量降低到 17.2 g/L,是出发菌株的 68.8%,具有广阔的应用前景。CN200810020039.4 则公开了一种添加 α -酮戊二酸脱氢酶抑制剂实现 α -酮戊二酸过量积累的方法。该发明利用多重维生素营养缺陷型的光滑球拟酵母 CCTCC M202019 为生产菌株,通过在培养基中添加 α -酮戊二酸脱氢酶抑制剂:过氧化氢、甲氨蝶呤、次氯酸钠或羟基硫氨,调节 α -酮戊二酸脱氢酶活性,有目的地降低 α -酮戊二酸脱氢酶活性,减少代谢过程中 α -酮戊二酸的降解,达到过量积累 α -酮戊二酸的目的。该发明利用调控工业微生物中碳代谢和碳代谢流流向分布,使碳代谢流截止在 α -酮戊二酸这一节点上,其中 α -酮戊二酸最大产量达到 23.2 g/L,比对照提高了 12.2%。该发明为 TCA 循环中间代谢产物的发酵研究提供了一个新的思路。CN200710133155.2 采用在发酵过程中添加适量的维生素和金属离子等辅因子的方法,选择性增加 PDH 和 PC 途径流量,达到过量积累 α -KG 的目的,此策略对其它发酵产品的生产也有指导意义。

(江南大学图书馆 张群 供稿)