

聚苹果酸的微生物合成及其应用研究进展

李佳逸¹, 康建平^{1,2*}, 谭昕^{1,2}, 何雨静^{1,2}, 王燕来¹, 何勇¹

(1.四川省纺织科学研究院有限公司, 四川 成都 610000;

2.高技术有机纤维四川省重点实验室, 四川 成都 610000)

摘要:聚苹果酸是一种以L-苹果酸为唯一单体的具有优良可生物降解性、生物相容性、易修饰的高分子聚合物。介绍出芽短梗霉生物发酵制备聚苹果酸的代谢途径、培养基优化、发酵条件优化及其在生物医药、食品等领域的应用价值,以及在纺织品应用领域的推测,为后续深入研究出芽短梗霉发酵产聚苹果酸工业化提供策略。

关键词:聚苹果酸;出芽短梗霉;应用

中图分类号:TQ 921

文献标志码:A

文章编号:1673-0356(2023)12-0004-05

聚苹果酸(Poly Malic acid, PMLA)又名聚羟基丁二酸酯,是一种具有良好生物相容性及生物降解性的水溶性脂肪族聚酯类化合物。PMLA是以重复的L-苹果酸为单体,通过—OH和 α -或 β -COOH形成的酯键聚合而成,主要有3种构型: α 型、 β 型、 γ 型,如图1^[1]所示。由于PMLA侧链存在大量游离的羧基,容易被修饰或改性,与具有功能分子的活性基团相结合,从而使其附有特殊功能^[2],因此在生物医药、食品、化妆品等领域具有广泛的应用前景^[3]。

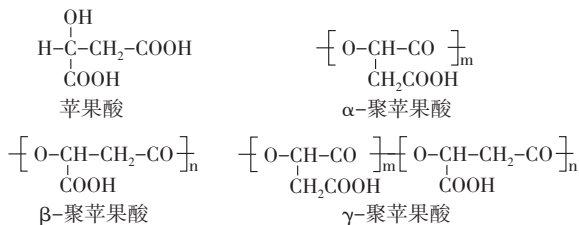


图1 苹果酸和PMLA的3种构型

目前,聚苹果酸的合成方法主要分为化学合成法和生物合成法。化学合成法主要有开环聚合法和直接聚合法,可以得到3种构型的PMLA,其中开环聚合技术较为成熟。但与生物合成法相比,化学法合成的PMLA分子量较小,合成步骤长,提纯工艺复杂,严重制约了其规模化发展。微生物合成法是由微生物体内通过三羧酸循环代谢仅存有 β -型,能得到相对分子量较大的PMLA,且具有较高的化学纯度和光学纯度,性

能优异,成为当前的研究热点。总结国内外近年来关于微生物合成 β -PMLA及其应用的相关研究,为更加深入利用生物法合成PMLA提供策略。

1 微生物法合成聚苹果酸

微生物发酵可以持续产生PMLA,Shimada等^[4]在1969年首次发现了从圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)中分离得到的以苹果酸为结构单元的一种聚合物对蛋白酶具有抑制作用,这种聚合物后来被证实为PMLA。随后,Fischer等^[5]从多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)中分离到PMLA,发现其可抑制 α 型DNA聚合酶活性。到目前为止,生物法合成PMLA的研究菌株主要存在于黏菌科多头绒泡菌和短梗霉属。多头绒泡菌是一种多形态真菌,PMLA主要产生于其原质团时期,多核原质团以L-苹果酸为前体,在聚合酶的催化下才能合成分子量为10~300 kDa的PMLA,且产量较低,难以满足工业应用。目前对多头绒泡菌合成聚苹果酸的研究多集中在合成及代谢调控方面^[6],由于其产量较低,在发酵法合成方面的研究较少。出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)是一种具有酵母型和菌丝形态的多型真菌,其形态较黏菌相对稳定,合成PMLA的能力也相对较强^[7]。

1.1 出芽短梗霉发酵产 β -聚苹果酸

Nagata等^[8]筛选鉴定了一株出芽短梗霉在以甘露糖为碳源的选择培养基中产生了一种来源于葡萄糖的 β 型胞外聚酯,后被证实其单体为L-苹果酸。出芽短梗霉合成的PMLA分为两部分,其中一部分以 β -PMLA-葡聚糖结合体的形式分泌,另一部分被分解为分子量5~10 kDa的自由 β -PMLA,分泌到细胞外。徐

收稿日期:2023-11-02;修回日期:2023-11-21

基金项目:高技术有机纤维四川省重点实验室开放基金资助项目(PLN2022-17)

第一作者:李佳逸(1998—),女,硕士,主要研究方向为生物基材料,E-mail:1062162486@qq.com。

*通信作者:康建平,男,教授级高级工程师,E-mail:1204484142@qq.com。

玲芬等^[9]从自然界中的树皮、树叶等样本中分离得到一株高产 PMLA 菌株,经鉴定属于出芽短梗霉菌,以葡萄糖为碳源,发酵产量达到 26.23 g/L。Xia 等^[10]通过添加 1% (w/v)大豆油使 *A. pullulans* 发酵产生的 PMLA 浓度和产率分别提高了 34.2%和 80%。

1.2 出芽短梗霉合成 PMLA 代谢途径

出芽短梗霉合成 PMLA 主要途径包括 TCA 循环和乙醛酸途径,L-苹果酸作为 PMLA 唯一单体,与 PMLA 合成效率有着密切的关系。苹果酸是 TCA 循环中的关键中间体,经延胡索酸酶催化生成,随后在线

粒体内经苹果酸脱氢酶(mMDH)催化转化为草酰乙酸。在乙醛酸循环中,苹果酸合成酶(MSE)能够催化乙醛酸和乙酰辅酶 A 缩合成苹果酸,如图 2 所示^[11]。

L-苹果酸能够在添加外源性碳酸盐时,通过细胞质中的还原途径产生,丙酮酸会被丙酮酸羧化酶先一步羧化为草酰乙酸,然后再被苹果酸脱氢酶进一步还原成苹果酸。因此,在出芽短梗霉发酵培养基中通常会添加 CaCO_3 以提高 PMLA 产量。值得注意的是, CaCO_3 的缺失或不足会导致出芽短梗霉能够合成其他多种胞外产物,如普鲁兰多糖、淀粉酶等。

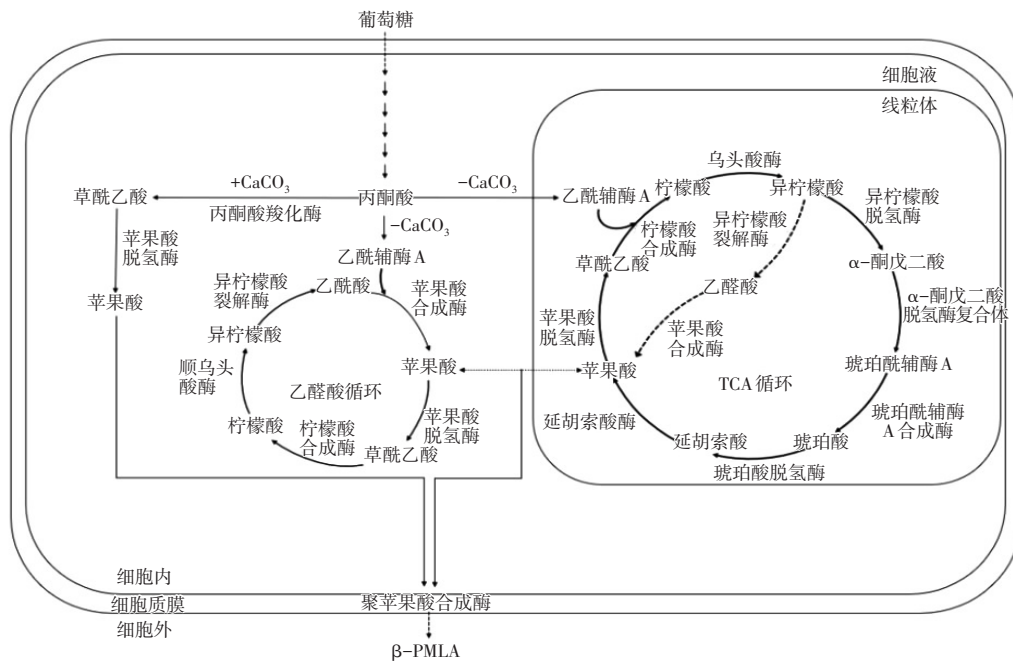


图 2 出芽短梗霉 PMLA 合成途径

2 聚苹果酸的发酵调控

2.1 培养基成分

PMLA 发酵培养基的主要成分有碳源、氮源、无机盐和有机酸,碳源和氮源是微生物生长代谢的主要营养物质,低浓度的无机盐能够促进细胞的生长和产物合成。常用的碳源有葡萄糖、淀粉、蔗糖等,除此之外也有不少学者通过利用生物质作为碳源发酵产生 PMLA,以降低发酵原料的成本,从而降低聚苹果酸的生产成本。Timothy 等^[12]使用 H_2O_2 预处理小麦秸秆,当在含有 5% 的小麦秸秆发酵液中加入 3% CaCO_3 时,获得 23.5 g/L 的聚苹果酸产量。Wei 等^[13]通过在 5 L 发酵罐中分批补料发酵,以稀释后的甘蔗糖蜜作为营养物质,不添加其他额外的成分,即可满足发酵需求,

PMLA,产量达到 1 163 g/L。Liu 等^[14]通过出芽短梗霉 ZD-3d 以分批补料的发酵方式,在木薯原料水解液中生成 PMLA,产量达到 101.9 g/L。

几乎所有的氮源都能促进 PMLA 发酵,但发酵产量有所差异,靳挺等^[15]研究以硫酸铵、尿素、丁二酸胺作为氮源发酵产 PMLA,结果表明这 3 种氮源均能提高 PMLA 产量,其中丁二酸作为氮源时产量最高。吴艳丽等^[16]通过单因素实验研究了最佳碳源、氮源和碳酸钙添加量,并进行 Box-Benhken 实验,得到最优发酵培养基成分为 120 g/L 葡萄糖,3.02 g/L 丁二酸胺,30 g/L CaCO_3 ,pH 值 4.68 时 PMLA 产量最大达到 17.48 g/L。

2.2 添加酶抑制剂、辅因子

通过平衡 TCA 循环和乙醛酸途径之间的代谢流

量,并调控中间代谢产物的量,可以提高菌株利用碳源合成 β -PMLA的效率。Liu等^[17]在研究中发现,向发酵培养基中添加马来酸、丙二酸、苹果酸和琥珀酸可促进PMLA的合成,在添加三氟乙酸的情况下则有抑制作用。相比对照组,添加20 g/L琥珀酸可以使PMLA产量提高44%。推测原因是丙二酸竞争性抑制琥珀酸脱氢酶,导致TCA循环的代谢通量流经乙醛酸循环,从而能够提高PMLA合成产量。Zuo等^[18]研究发现向培养基中补充TCA还原途径的辅助因子生物素和CO₂供体可以提高PMLA的产量。乔长晟等^[19]比较野生出芽短梗霉菌株TKPM00006和诱变菌株CGM-CC30007在相同发酵条件下的关键酶活,结果表明CGMCC30007的丙酮酸羧化酶和苹果酸脱羧酶活力分别提高了29%和18%。与Liu等的研究结果一致的是,添加三氟乙酸会抑制TCA循环和乙醛酸循环,导致PMA的合成产量下降25.7%。

2.3 发酵条件

提高PMLA发酵产量除了筛选高产菌株外,菌株发酵培养条件,如温度、pH值、搅拌转速和不同补料方式对发酵产量的影响也十分重要。

发酵温度是影响微生物生长和代谢产物产量的重要因素。对于出芽短梗霉来说,一般在适宜的温度范围内进行发酵,通常在25~30℃之间。陈曦等^[20]通过单因素实验优化出芽短梗霉BK-10培养条件,得出结论:最佳发酵温度26℃,250 mL摇瓶装液量50 mL时,生产强度达到0.89 g/(L·h)。

pH值是另一个重要的因素,直接影响微生物的生长和代谢产物的产量。对于出芽短梗霉来说,适宜的pH值范围一般在4.5~6.5之间。王丽燕等^[21]通过摇瓶实验研究了*A. pullulans* BS02最优培养条件为:以葡萄糖为碳源,添加50 g/L CaCO₃,在pH值4.0~5.0、温度24℃下发酵培养10 d,其产量达到30 g/L。

发酵罐发酵时搅拌器的作用是改善通气效率,改变溶氧。出芽短梗霉作为强好氧菌,发酵过程中溶氧越高越有利于菌体生长。Cao等^[22]发现通过调节不同发酵阶段溶氧可以提升出芽短梗霉ipe-1合成PMLA的产量。

微生物的生长繁殖离不开养分的供给,但过量的碳源、氮源会导致菌体过量繁殖,过早衰老、自溶,致使目标产物合成效率降低。合理的补料方式可以提供适当的养分供给,促进发酵过程的稳定和高效进行,从而

提高发酵产物的质量和产量。咎占全^[23]在研究出芽短梗霉*A. pullulan* FMT1801发酵甘薯淀粉水解液产PMLA时发现在发酵过程中随着底物的不断消耗,发酵72 h时残糖较低,不足以供应发酵菌株合成PMLA,所以考虑补料培养,通过分批补料的方式,PMLA产量提高了42.4%。

3 聚苹果酸的应用

3.1 药物载体

PMLA具有较高的溶解性、生物相容性和优良的生物可降解性,能够包裹药物与特性的组织特异性标记物共价结合,从而控制药物释放的时间和部位。Abdellai等^[24]通过酰胺键链接PMLA与抗癌药物Dox,形成稳定的靶向给药系统,使载体在渗透进髓细胞K562细胞核后才将药物释放。乔友备^[25]通过在 β -聚苹果酸主链上引入酰胺键修饰羟基喜树碱,得到聚苹果酸-羟基喜树碱衍生物,该衍生物能够有效改善羟基喜树碱的溶解性能。

3.2 生物医学材料

PMLA及其衍生物优异的可降解性和生物可吸收性使其可以用于制备手术缝合线、固体药物包装、骨骼修复等生物医学材料。Michel^[26]通过研究PMLA改性制备的透析袋性能,发现其具有较高的胶体渗透压,能够代替具有毒性的传统聚硅酮膜透析袋。李世普等^[27]利用PMLA作为主链,通过接枝导电基团和可降解基团的改造,研发了一种既可降解又导电的生物医用高分子材料。这种材料可以用于生产导管、缝合线、薄膜及组织工程支架等多种生物医学材料。Viviane等^[28]研究发现以PMLA保护的肝素结合生长因子具有高效诱导骨生成能力。

3.3 食品添加剂

PMLA热水解产物L-苹果酸是一种天然有机酸,其风味与苹果酸味相似,较为柔和,因此可以被用于酸味剂。同时,L-苹果酸作为三羧酸循环和乙醛酸循环的中间代谢产物,可以被人体直接吸收,从而为机体供能,被用于食品保健领域。

4 展望

4.1 PMLA具有优良特性,开发潜力巨大

目前PMLA供应量较少,因此关于其应用研究也较少。但是PMLA具有优良的可生物降解性、生物相

容性及易修饰性质,在生物医药、生物材料、纺织等领域有着巨大的应用潜力。Qiu等^[29]通过采用环保疏水的二元醇1,8-辛二醇作为交联剂,在PMLA中构建无定形网络,提高PMLA力学性能的同时,也赋予了PMLA形状记忆效应。因此推测后续可应用于形状记忆纺织品中,填补PMLA在纺织品领域应用的空白。

4.2 PMLA合成存在技术瓶颈,规模化生产难度极大

目前聚苹果酸的生产能力仍然较低,化学法生产成本高,环境污染大;生物法发酵菌株出芽短梗霉生长繁殖速度慢,发酵周期长,产物提纯难,导致PMLA还没有大规模应用。

4.3 PMLA微生物合成法潜力大,研究前景广阔

在PMLA微生物合成法后续的研究中,如优化代谢途径、诱变选育稳定高产菌株、优化发酵条件,进一步提高菌株微生物合成PMLA的能力及分子量,减少反应中副产物的合成成为主要研究方向。相信随着研究的不断深入,微生物法合成聚苹果酸工业化指日可待。

参考文献:

- [1] 余文兵,周华,韦萍. 生物降解材料聚苹果酸的合成方法及应用进展[J]. 化工进展,2004,23(10):1086-1090.
- [2] 李睿颖,许勤虎,刘晓娟,等. 聚苹果酸及其衍生物的研究与发展[J]. 食品工程,2009(2):6-9.
- [3] 丁锐,李光吉. 生物高分子聚苹果酸及其衍生物的合成与应用前景[J]. 高分子通报,2005(2):47-56.
- [4] SHIMADA K, MATSUSHIMA K, FUKUMOTO J, et al. Poly-(L)-malic acid; A new protease inhibitor from *Penicillium cyclopium*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1969, 35(5): 619-624.
- [5] FISCHER H, ERDMANN S, HOLLER E. An unusual polyanion from *Physarum polycephalum* that inhibits homologous DNA polymerase alpha in vitro[J]. *Biochemistry*, 1989, 28(12): 5219-5226.
- [6] 陈珊,黄艳玲,张乐,等. 微生物发酵生产聚苹果酸的测定研究[J]. 农产品加工,2017(10):49-50,53.
- [7] ZOU X, ZHOU Y, YANG S T. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(8): 2105-2113.
- [8] NAGATA N, NAKAHARA T, TABUCHI T. Fermentative production of poly (β -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium sp*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(4): 638-642.
- [9] 徐玲芬,陈忠华,赵婧,等. β -聚苹果酸高产菌株的筛选及鉴定[J]. 浙江大学学报(医学版),2012,41(4):434-440.
- [10] XIA J, LIU S, JIAO J, et al. Evaluation of enhancing effect of soybean oil on polymalic acid production by *Aureobasidium pullulans* HA-4D[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(10): 1673-1682.
- [11] ZENG W, ZHANG B, LIU Q, et al. Analysis of the L-malate biosynthesis pathway involved in poly (β -L-malic acid) production in *Aureobasidium melanogenum* GXZ-6 by addition of metabolic intermediates and inhibitors [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57: 281-287.
- [12] LEATHERS T D, MANITCHOTPISIT P. Production of poly (β -L-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by *Aureobasidium pullulans*[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35: 83-89.
- [13] WEI P, CHENG C, LIN M, et al. Production of poly (malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and process economics [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 581-589.
- [14] LIU W, SI Z, ZHANG H, et al. Efficient poly (β -L-malic acid) production from cassava hydrolysate by cell recycle of *Aureobasidium pullulans*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(8): 2855-2868.
- [15] 靳挺,武玉学,陈真,等. 出芽短梗霉发酵生产聚苹果酸的研究[J]. 中国食品学报,2012,12(10):125-130.
- [16] 吴艳丽,马霞,刘长虹. 聚苹果酸发酵条件的优化[J]. 中国酿造,2012,31(9):46-50.
- [17] LIU S J, STEINBUCHER A. Production of poly (malic acid) from different carbon-sources and its regulation in *Aureobasidium-pullulans* [J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(1): 11-14.
- [18] ZOU X, TU G, ZAN Z. Cofactor and CO₂ donor regulation involved in reductive routes for polymalic acid production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37: 2131-2136.
- [19] 乔长晟,郑志达,孟迪,等. 出芽短梗霉发酵生产聚苹果酸的代谢通量及关键酶活性分析[J]. 现代食品科技,2014, 30(7):74-80.
- [20] 陈曦,鲍文娜,黄美娟,等. 出芽短梗霉产聚苹果酸发酵条件的优化[J]. 微生物学通报,2018,45(2):231-237.
- [21] 王丽燕,郑谊丰,刘婷婷,等. 聚苹果酸的发酵培养条件优化[J]. 生物加工过程,2010,8(2):41-45.
- [22] CAO W, QI B, ZHAO J, et al. Control strategy of pH,

- dissolved oxygen concentration and stirring speed for enhancing β -poly (malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* ipe-1[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2013, 88(5): 808-817.
- [23] 管占全. 生物质资源发酵生产药用高分子材料聚苹果酸的研究[D]. 重庆:西南大学, 2014.
- [24] ABDELLAOUI K, BOUSTTA M, VERT M, et al. Metabolite-derived artificial polymers designed for drug targeting, cell penetration and bioresorption[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, 6(1): 61-73.
- [25] 乔友备. 聚苹果酸-羟基喜树碱复合物的合成和性质研究[D]. 西安:第四军医大学, 2013.
- [26] VERT M. Chemical routes to poly (β -malic acid) and potential applications of this water-soluble bioresorbable poly (β -hydroxy alkanooate) [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59(1-3): 169-175.
- [27] 李世普, 闫玉平, 张青松. 可降解导电生物医用高分子材料: 20081019769[P]. 2008-11-19.
- [28] JEANBAT-MIMAUD V, BARBAUD C, CARUELLE J P, et al. Functionalized and degradable polymers of malic acid stimulate bone repair [J]. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, 1999, 2(7-8): 393-401.
- [29] QIU Y, WANYAN Q, XIE W, et al. Green and biomass-derived materials with controllable shape memory transition temperatures based on cross-linked Poly (L-malic acid)[J]. *Polymer*, 2019, 180: 121733.

Progress on Biosynthesis and Application of Polymalic Acid

LI Jiayi¹, KANG Jianping^{1,2*}, TAN Xin^{1,2}, HE Yujing^{1,2}, WANG Yanlai¹, HE Yong¹

(1. Sichuan Textile Scientific Research Institute Co., Ltd., Chengdu 610000, China;

2. High-tech Organic Fibers Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610000, China)

Abstract: Poly(malic acid) is a kind of polymer with excellent biodegradability, biocompatibility and easy modification with L-malic acid as the only monomer. The metabolic pathway, medium optimisation, fermentation condition optimisation and its application value in the fields of biomedicine and foodstuffs in the preparation of polymalic acid by biofermentation of *Aureobasidium pullulans* were systematically introduced, which would provide strategies for in-depth research on the industrialisation of polymalic acid production by fermentation of *Aureobasidium pullulans*.

Key words: poly malic acid; *Aureobasidium pullulans*; application

(上接第 3 页)

Research Progress on Application Technology of Water-based Pigment Dispersion Used in Spun-dyed Viscose Fiber

MEI Chengguo, ZHOU Wei, DU Changsen, LIANG Dong

(Suzhou Sunmun Technology Co., Ltd., Kunshan 215337, China)

Abstract: The technology of spun-dyed viscose fiber is widely concerned in recent years for its advantage of energy saving and emission reduction compared with the traditional dyeing process. However, after adding water-based pigment dispersion to the viscose solution, because of the interaction between the pigment particles and the viscose solution, there are certain risks in the spinnability, coloring effect and quality of the spun-dyed viscose fiber. Based on the research and application experience of water-based pigment dispersion used in spun-dyed viscose fibers, and combined with literature analysis about the spinning technology of the spun-dyed viscose fiber, the performance requirements of water-based pigment dispersion used in spun-dyed viscose fibers were analyzed, and the research direction for technology of spun-dyed viscose fibers were also prospected.

Key words: spun-dyed viscose fiber; water-based pigment dispersion; spinning technology; spinnability