

第三章
发酵生物化学基础

本章主要内容

- 第一节 糖的微生物代谢（自学、复习）
- 第二节 脂类和脂肪酸的微生物代谢（自学、复习）
- 第三节 氨基酸和核酸的微生物代谢（自学、复习）
- 第四节 微生物的次级代谢
- 第五节 芳香族化合物的微生物代谢
- 第六节 H_2 和 CO_2 等的微生物代谢
- 第七节 微生物的光合作用
- 第八节 常见发酵产品的发酵机制（自学）

第四节 微生物的次级代谢

- ✓ 次级代谢的概念
- ✓ 次级代谢产物的类型
- ✓ 次级代谢产物的生物合成

一、次级代谢的概念

次级代谢：是指微生物在一定的生长时期(一般是稳定生长期)，以初级代谢产物为前体，合成一些对微生物的生命活动没有明确功能的物质的过程。微生物在这一过程产生的产物即为次级代谢产物。

二、次级代谢产物的类型

1, 根据产物合成途径区分类型

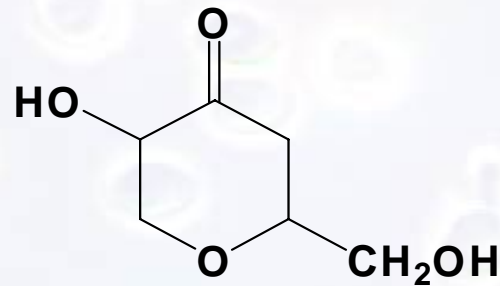
- ✓ 与糖代谢有关的类型
- ✓ 与脂肪酸代谢有关的类型
- ✓ 与萜烯和甾体化合物有关的类型
- ✓ 与TCA环有关的类型
- ✓ 与氨基酸代谢有关的类型

次级代谢产物的类型

(1) 与糖代谢有关的类型

➤ 以糖或糖代谢产物为前体合成次级代谢产物有三种情况：

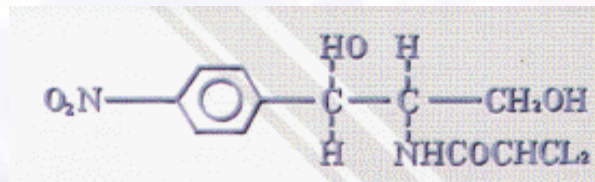
❖ 直接由葡萄糖合成次级代谢产物。例如，曲霉属 (*Aspergillus*) 产生的曲酸，放线菌产生的链霉素以及大环内酯抗生素中的糖苷等。



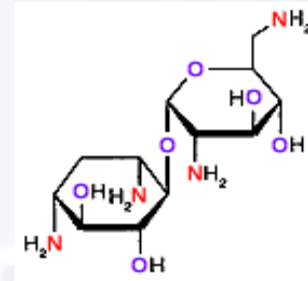
曲酸

次级代谢产物的类型

- ❖ 由预苯酸合成芳香族次级代谢产物，如放线菌产生的氯霉素（chloromycetin）、新霉素（neomycin）等。



氯霉素

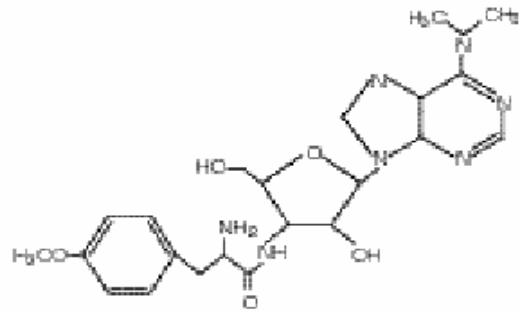


新霉素

次级代谢产物的类型

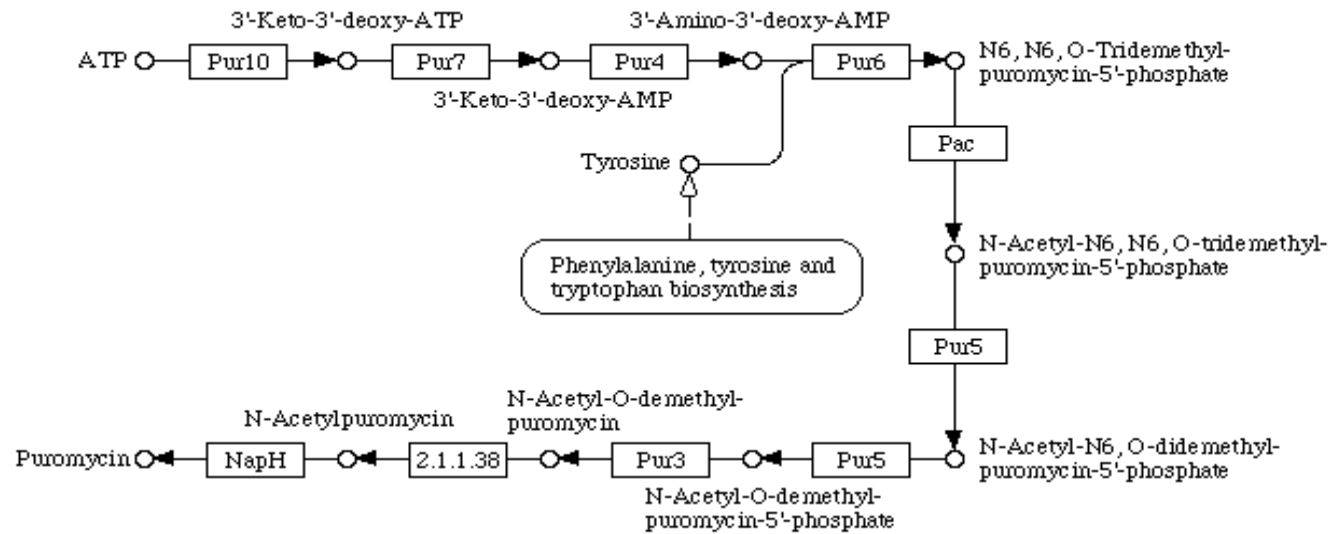
- ❖ 由磷酸戊糖合成的次级代谢产物。磷酸戊糖首先合成重要的初级代谢产物核苷类物质，进一步合成次级代谢产物，如嘌呤霉素、抗溃疡间型霉素、杀稻瘟菌素S以及多氧霉素等。

Structure :



嘌呤霉素
Puromycin

PUROMYCIN BIOSYNTHESIS



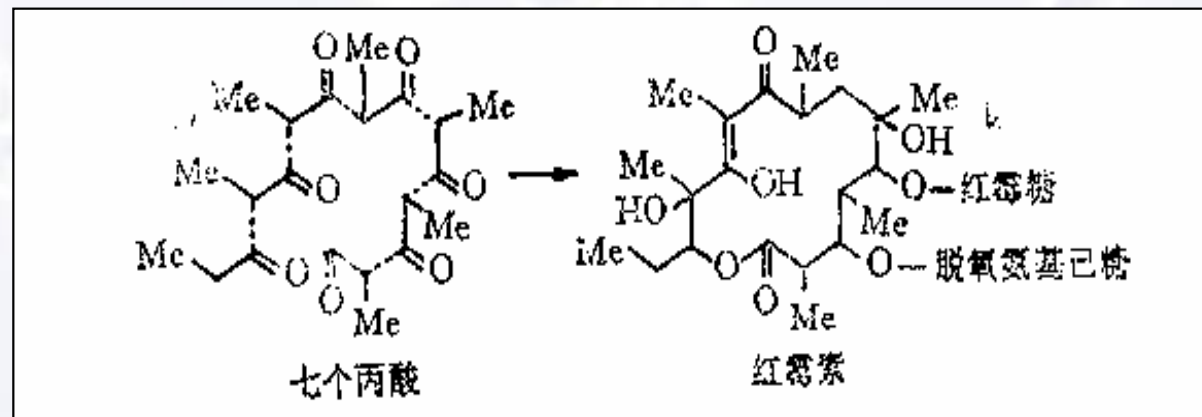
00231 4/17/01

(2) 与脂肪酸代谢有关的类型

- 此类型有两种情况：
 - ❖ 以脂肪酸为前体，经过几次脱氢、 β -氧化之后，生成比原来脂肪酸碳数少的聚乙炔(**polyacetylene**)脂肪酸。这种次级代谢物多在高等植物中存在。担子菌中也能见到。

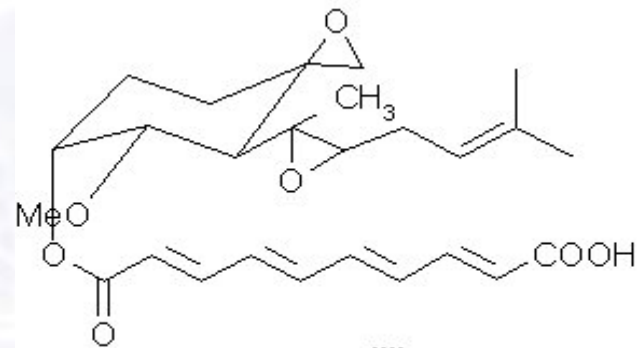
次级代谢产物的类型

❖ 次级代谢产物不经过脂肪酸，而是从丙酮酸开始生成乙酰CoA，再在羧化酶催化下生成丙二酰CoA。在初级代谢中由此进一步合成脂肪酸，而在次级代谢中所生成的丙二酰CoA等链中的羰基不被还原，而生成聚酮或 β -多酮次甲基链。由此进一步生成不同的次级代谢产物。例如四环素抗生素类。红霉素内酯是由聚丙酸型聚酮生成，即在丙酸上加上一个经脱羧的甲基丙二酸的C3单位，最后由七酮形成内酯环，再与红霉素糖、脱氧氨基己糖，以糖苷的形式结合而成为红霉素。



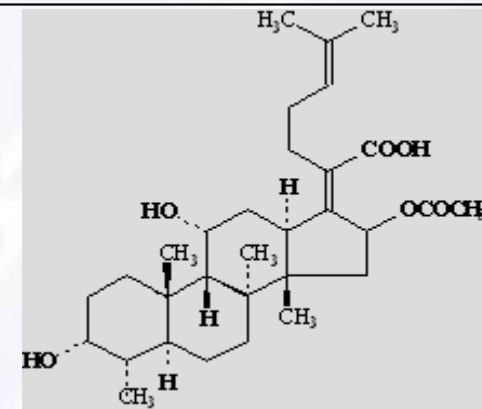
(3) 与萜烯和甾体化合物有关的类型

与萜烯和甾体化合物有关的次级代谢产物，主要是由霉菌产生的，例如烟曲霉素(三个异戊烯单位聚合而成)、赤霉素(四个异戊烯单位聚合而成)、梭链孢酸(由六个异戊烯单位聚合而成)及由八个异戊二烯单位聚合成的 β -胡萝卜素等。



Fumagillin

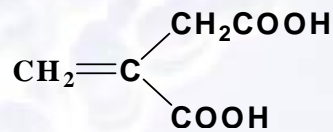
烟曲霉素



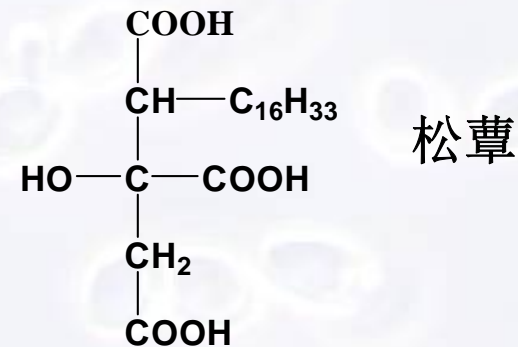
梭链孢酸

(4) 与TCA环有关的类型

- 一类是从TCA环得到的中间产物进一步合成次级产物，例如由 α -酮戊二酸还原生成戊烯酸，由乌头酸脱羧生成衣康酸。
- 另一类是由乙酸得到的有机酸与TCA环上的中间产物缩合生成次级产物，例如，脂肪酸 α -亚甲基与草酰乙酸或 α -酮戊二酸羧基或羰基缩合。担子菌产生的松蕈(三)酸(α -十六烷基柠檬酸)就是由十八烷酸($C_{17}H_{33}\cdot COOH$)的 α -亚甲基与草酰乙酸的羰基缩合而成。

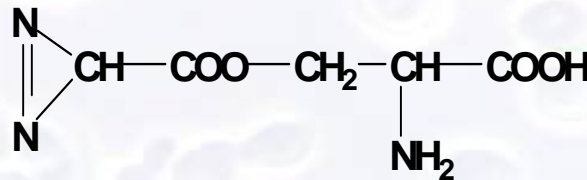


衣康酸

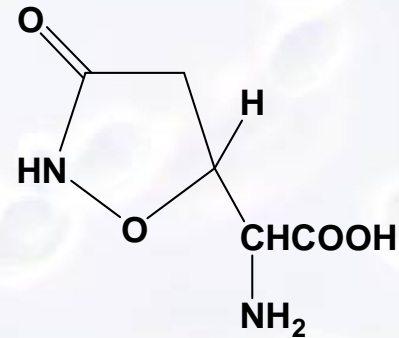


(5) 与氨基酸代谢有关的类型

- 由一个氨基酸形成的次级代谢产物，如放线菌产生的环丝氨酸、氮丝氨酸；担子菌由色氨酸合成口蘑氨酸。



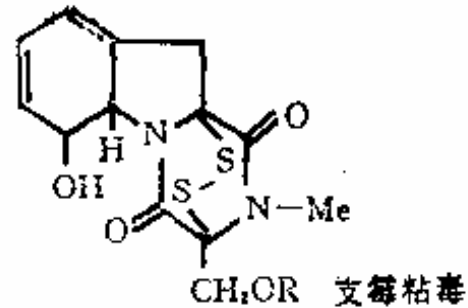
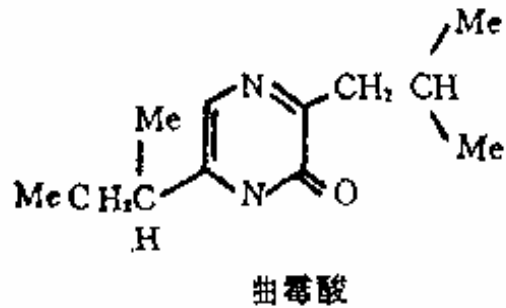
氮丝氨酸



口蘑氨酸

次级代谢产物的类型

- 由二个氨基酸形成的曲霉酸、支霉粘毒(gliotoxin)。是由二个氨基酸先以肽键结合，闭环生成二酮吡嗪(diketopiperazine)进一步形成的。



2, 根据产物的作用区分类型

- 抗生素
- 激素
- 生物碱
- 毒素
- 维生素

次级代谢产物的类型

- 抗生素：这是微生物所产生的，具有特异抗菌作用的一类次级产物。日前发现的抗生素已有**2500-3000**种，青霉素、链霉素、四环素类、红霉素、新生霉素、新霉素、多粘霉素、利福平、放线菌素(更生霉素)、博莱霉素(争光霉素)等几十种抗生素已进行工业生产。

次级代谢产物的类型

- 激素：微生物产生的一些可以刺激动、植物生长或性器官发育的一类次级物质。例如赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)产生的赤霉素。
- 生物碱：大部分生物碱是由植物产生的。麦角菌(*Claviceps purpurea*)可以产生麦角生物碱。

次级代谢产物的类型

- 毒素：大部分细菌产生的毒素是蛋白质类的物质。如破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)产生的破伤风毒素，白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)产生的白喉毒素，肉毒梭菌(*C. botulinum*)产生的肉毒素及苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)产生的伴孢晶体等。放线菌，真菌也产生毒素。例如黄曲霉(*Aspergillus flavus*)产生的黄曲霉毒素。担子菌产生的各种蘑菇毒素等。

次级代谢产物的类型

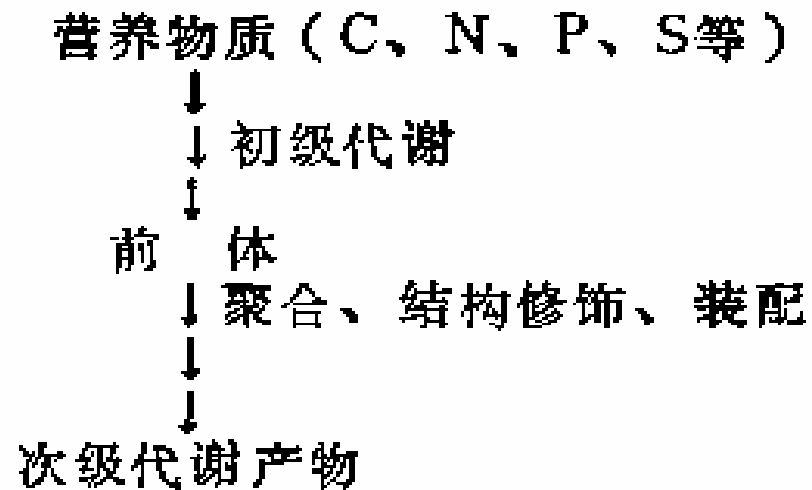
- 色素：不少微生物在代谢过程中产生各种有色的产物。例如由粘质赛氏杆菌(*Serratia marcescens*)产生灵菌红素，在细胞内积累，使菌落呈红色。有的微生物将产生的色素分泌到细胞外，使培养基呈现颜色。

次级代谢产物的类型

- 维生素：作为次生物质，是指在特定条件下，微生物产生的远远超过自身需要量的那些维生素，例如丙酸细菌(*Propionibacterium* sp.)产生维生素B₁₂，分枝杆菌(*Mycobacterium*)产生吡哆素和烟酰胺，假单胞菌产生生物素，以及霉菌产生的核黄素和β-胡萝卜素等。

三、次级代谢产物的生物合成

次级代谢产物的合成过程可以概括为如下模式：



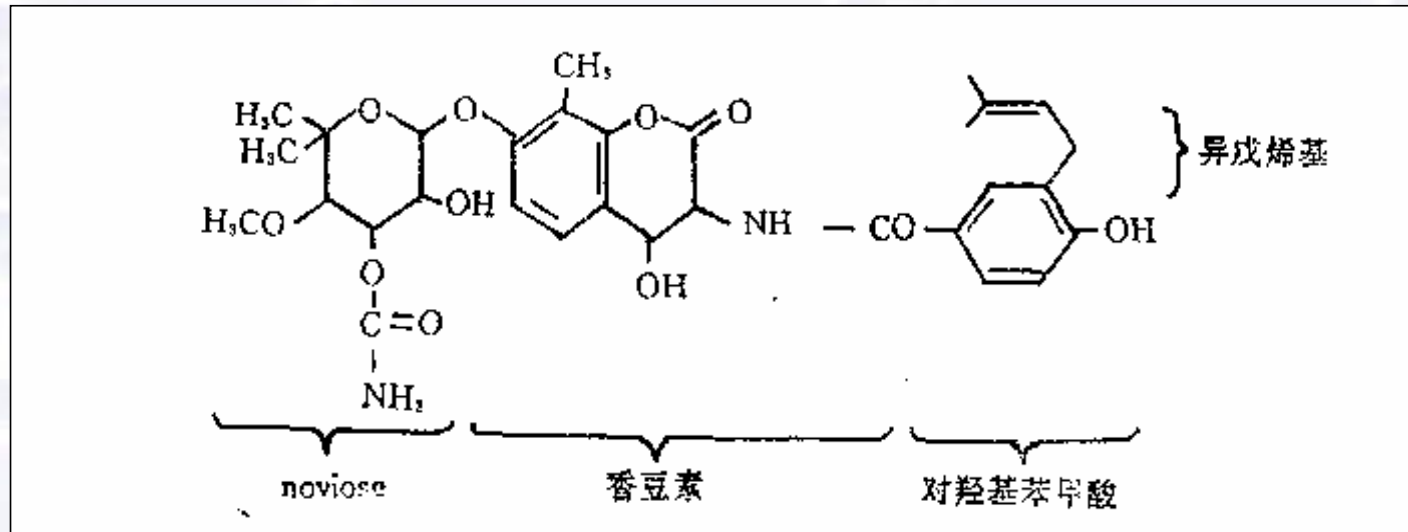
次级代谢产物的生物合成

次级代谢产物的合成是以初级代谢产物为前体，进入次级代谢产物合成途径后，大约经过三个步骤，合成次级代谢产物。

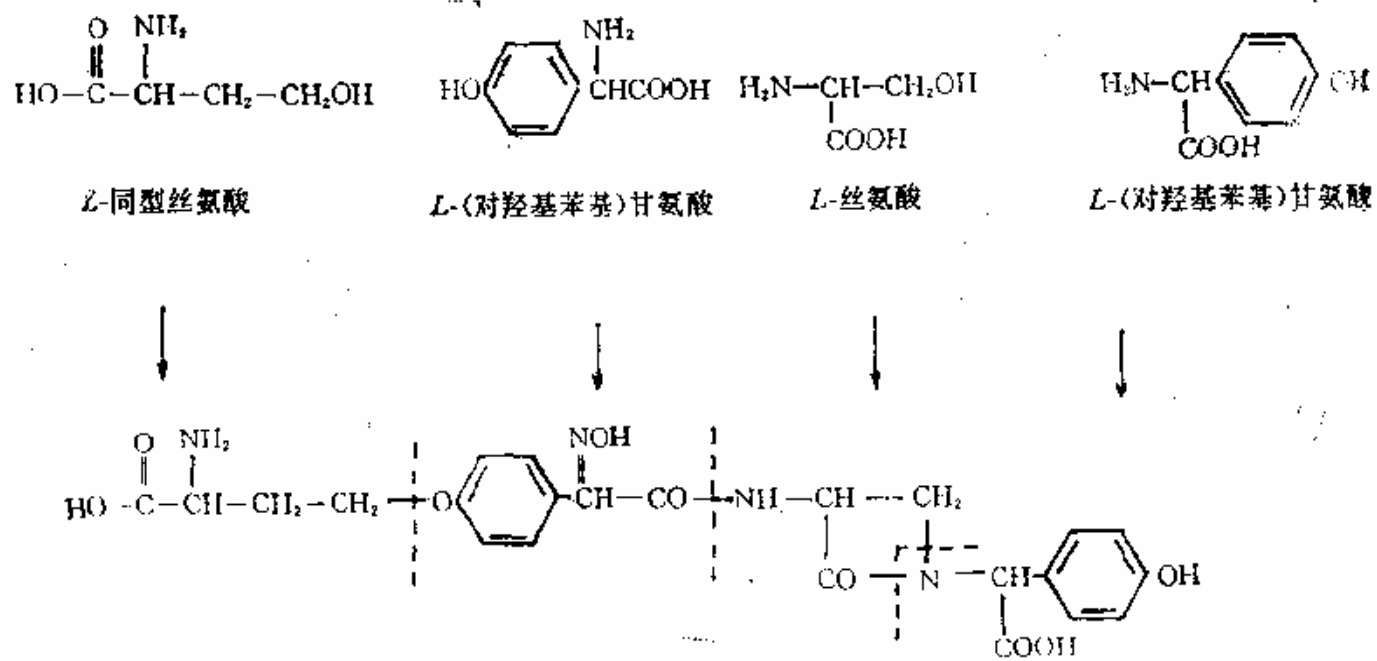
- 前体聚合：前体单元在合成酶催化下进行聚合。
- 结构修饰：聚合后的产物再经过修饰反应如环化、氧化、甲基化、氯化等。
 - 氧化作用 $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{NADPH}_2 \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}$
 - 氯化反应 $\text{RH} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{RCl} + 2\text{H}_2\text{O}$

次级代谢产物的生物合成

- 不同组分的装配：如新生霉素



次级代谢产物的生物合成



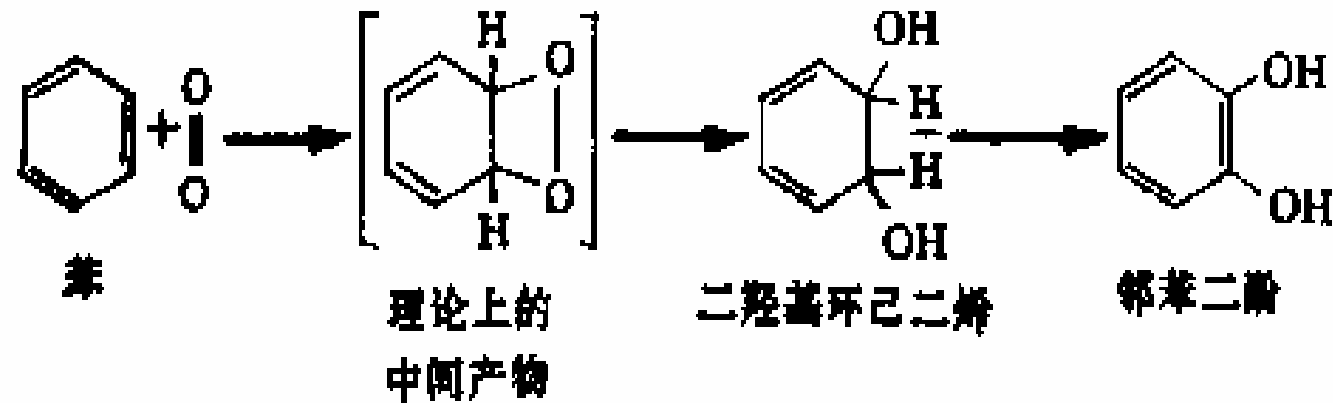
诺卡霉素A(nocardicinA)分子装配

第五节 芳香族化合物的微生物代谢

- ✓ 芳香烃的分解
- ✓ 甲苯的分解
- ✓ 邻苯二酚的降解
- ✓ 原儿茶酸的降解

一、芳香烃的分解

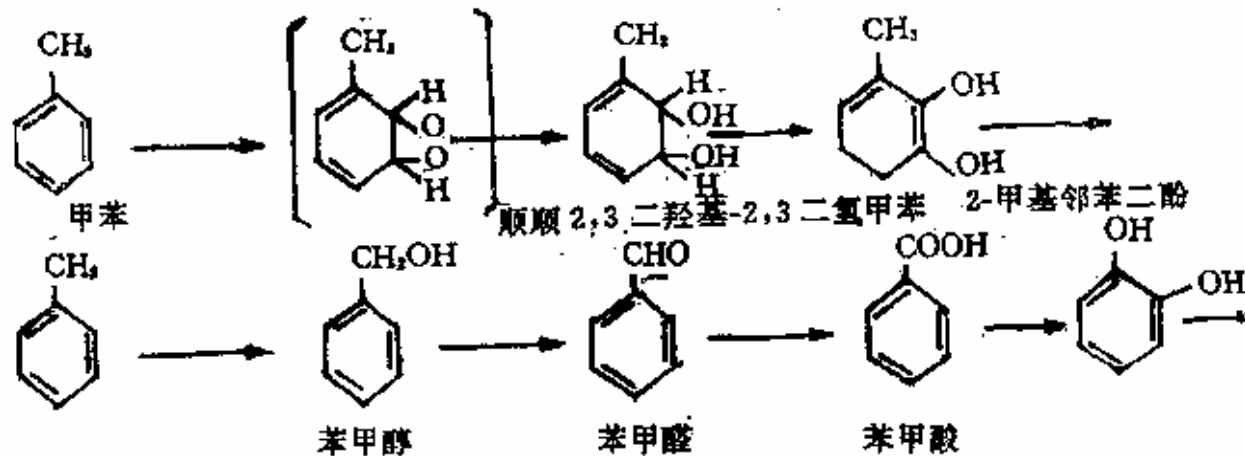
微生物对芳香烃的分解是在有氧条件下进行的，首先以形成二元酚如邻苯二酚、原儿茶酸等作为环裂解底物，再进一步氧化分解。苯的氧化首先是生成二羟基己二烯，再转化为邻苯二酚。



- 苯转化成邻苯二酚的酶系是由三个组分构成的：
 - ❖ 分子量为60000含有FAD的蛋白质；
 - ❖ 分子量为21000含有非血红素铁的蛋白质
 - ❖ 分子量为186000含有非血红素铁的红色蛋白质

二、甲苯转化成邻苯二酚的途径

- Kitagawa用(*P. aeruginosa*)试验指出该菌分解甲苯是将甲基氧化成羧基，再将苯甲酸转化为邻苯二酚，甲苯与苯甲酸之间的中间产物是苯甲醇和苯甲醛，
- Walker用*Pseudomonas*菌试验证明甲苯分解存在另一条途径，即二羟化反应将甲苯转化成3-甲基邻苯二酚作为裂解底物。

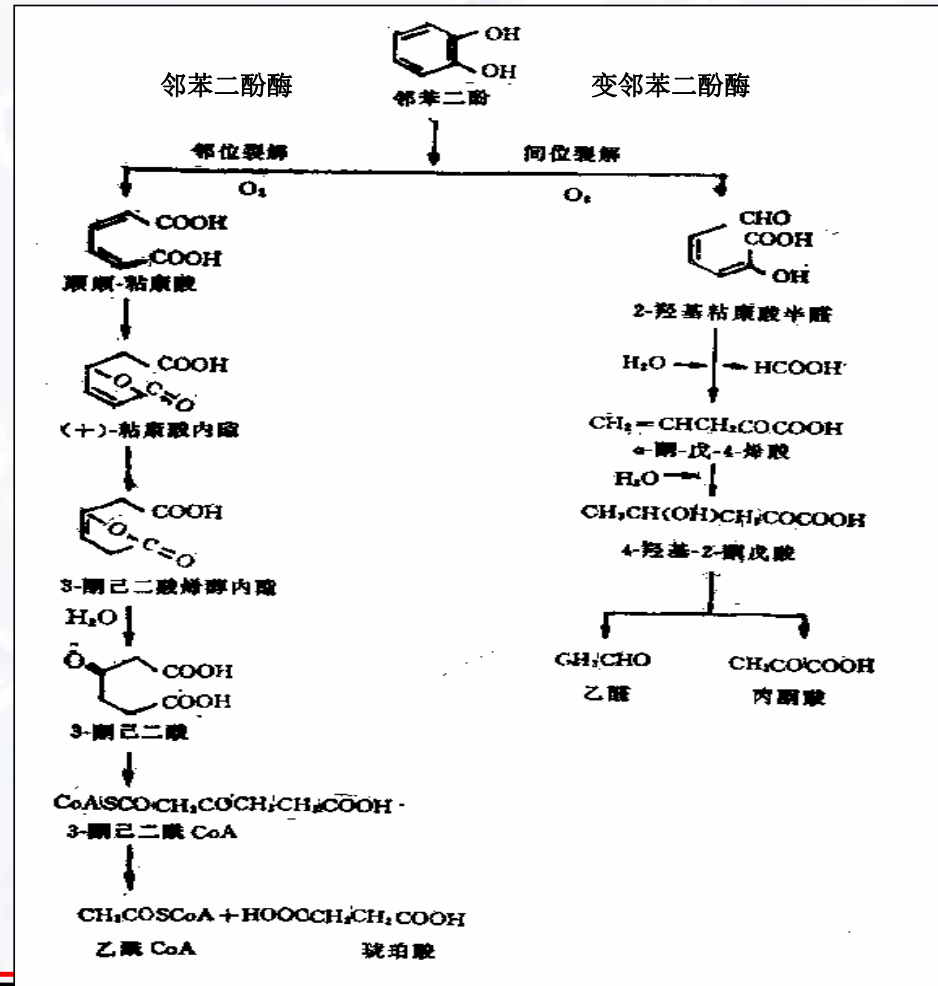


三、邻苯二酚环裂解及其降解

- 邻苯二酚通过两种途径之一进行降解

❖ 在两个羟基之间裂解(邻位裂解)

❖ 在羟基旁裂解(间位裂解)。



原儿茶酸的降解

- 邻位裂解，终产物是琥珀酸
- 间位裂解，终产物是两分子丙酮酸。

第六节 H_2 和 CO_2 的微生物代谢

✓ H_2 的微生物代谢

✓ CO_2 的微生物代谢

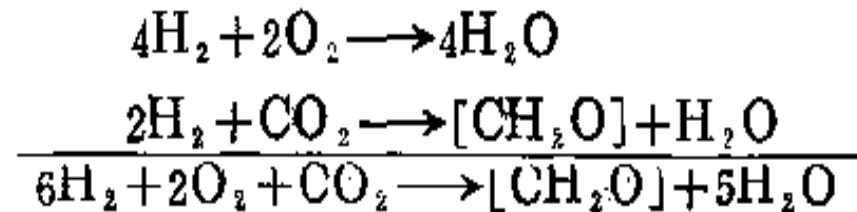
一、H₂的微生物代谢

1, 分解代谢

- 氢细菌都是一些呈革兰氏阴性的兼性化能自养菌。它们能利用分子氢氧化产生的能量同化CO₂，也能利用其它有机物进行生长。

H₂的微生物代谢

- 在有分子氢和氧的条件下，氢细菌在生长过程中实际上包括两个过程：
 - ❖ 分子氢氧化成水，放出能量；
 - ❖ 分子氢还原CO₂成为细胞物质，总的结果是以6: 2: 1的比例消耗H₂，O₂和CO₂，
- 四分子氢氧化成水所放出的能量可产生一分子ATP，用于还原CO₂构成细胞物质和维持细菌的生长。



氢化酶

- 氢化酶是氢细菌进行无机化能营养方式生长的关键酶，在多数氢细菌中，有两种氢化酶，其结构和功能各不相同
 - ❖ 颗粒状氢化酶(particulate hydrogenase)
 - 结构：结合在细胞质膜上，直接与呼吸链偶联。
 - 功能：不经过依赖于NAD⁺的脱氢酶作中间体，催化氢的氧化，并把电子直接传给呼吸链产生ATP。

❖ 可溶性氢化酶(soluble hydrogenase)

- 结构：存在于细胞质中，由四聚体复合组成，还含有黄素单核苷酸和FeS中心。
- 功能：可溶性氢化酶催化氢的氧化，它的主要功能是为菌体生长提供固定CO₂的还原力。另外，它可直接运送电子进入呼吸链。

H₂的微生物代谢

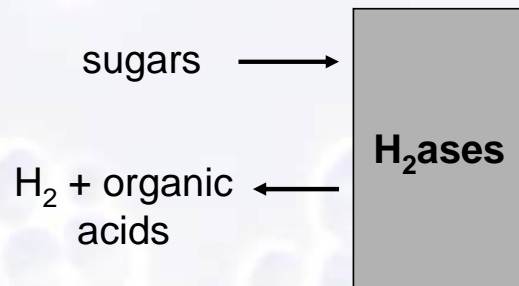
- 氢细菌是一类兼性化能自养菌，在有O₂无H₂时，可利用糖或有机酸或氨基酸而生长。有的还可利用嘌呤和嘧啶进行生长。

氢效应

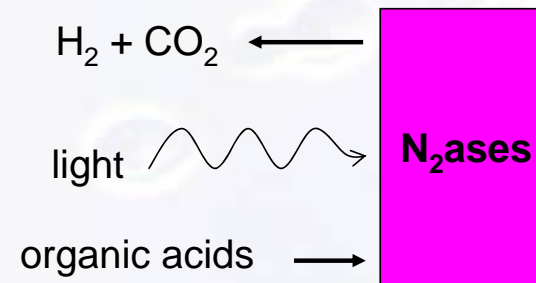
- 当氢细菌以无机化能营养方式生长时，H₂的存在能阻抑菌体对有机物(如对果糖)的利用，这种现象称为氢效应。其原因有两方面：
 - 果糖的利用是通过ED途径进行的。当有氢存在时，分子氢使ED途径中酶合成的诱导受到抑制，因而不能利用ED途径分解有机物，包括果糖。
 - 果糖经ED途径分解的关键是进行脱氢氧化。在氢细菌体内NAD(P)⁺是有限的，当有O₂和H₂时，氢化酶催化生成NAD(P)H，菌体内NAD(P)⁺减少。由于果糖分解脱下的氢不能交给NAD(P)⁺(因消耗于环境中氢的还原)故在这种情况下不能利用果糖等有机物。其实质是氢细菌中的氢化酶与ED途径的关键酶，脱氢酶争夺体内有限的NAD(P)⁺，而使生长停止。

2, 合成代谢

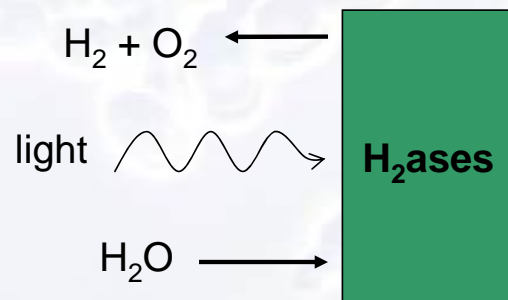
I. Dark fermentative bacteria



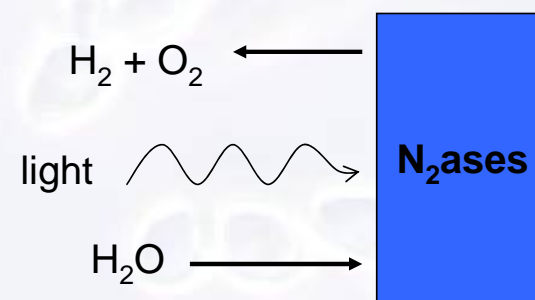
II. Photosynthetic anoxygenic bacteria



III. Photosynthetic oxygenic green algae



IV. Photosynthetic oxygenic cyanobacteria



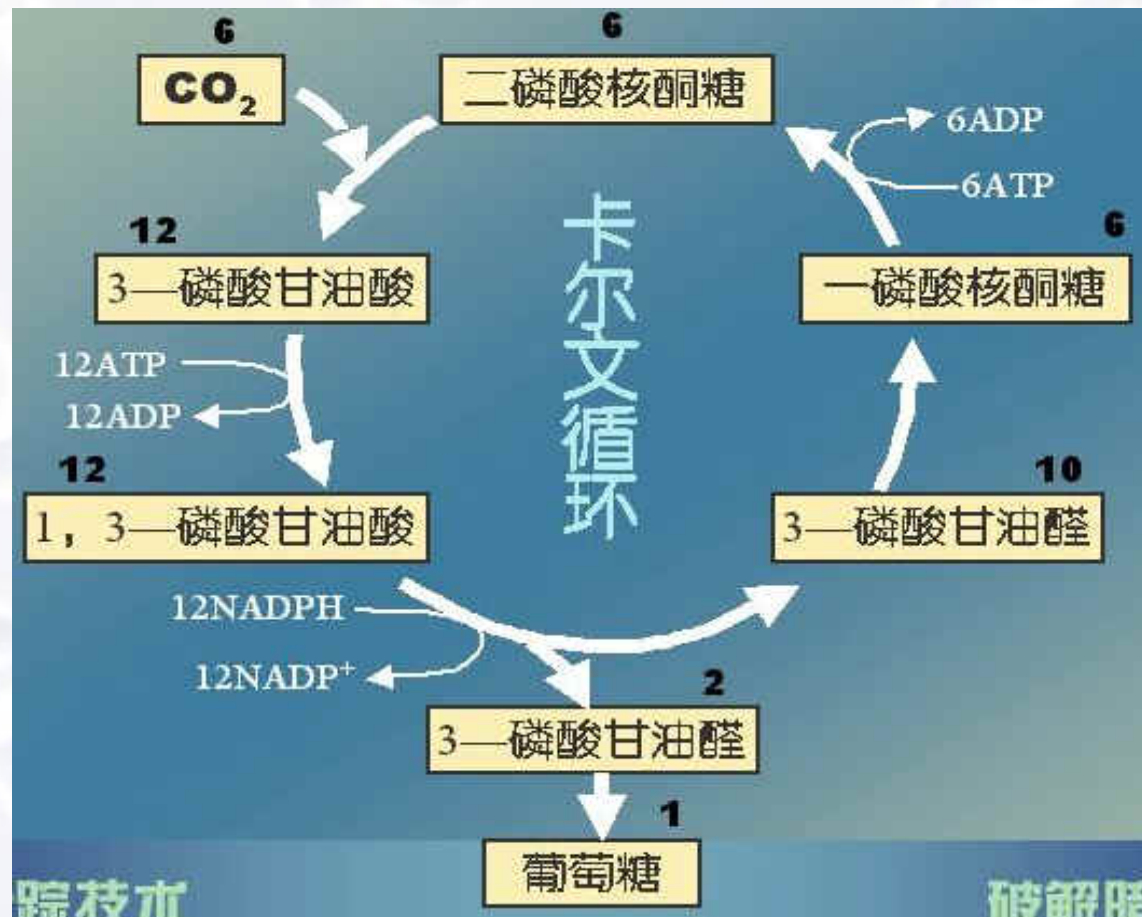
CO₂的微生物代谢

- CO₂是自养微生物的唯一碳源。异养微生物也能利用CO₂作为补助的碳源。
- 将空气中的CO₂同化成细胞物质的过程称为CO₂固定作用。
- CO₂的固定方式有自养型和异养型两种。

自养型CO₂固定

- 自养微生物（包括光能自养和化能自养）固定CO₂的途径：
 - 二磷酸核酮糖环 这个途径最初是由卡尔文(Calvin)等研究绿藻的光合作用时查明的，所以又称为卡尔文环。二磷酸核酮糖环是所有光能自养和化能自养微生物所共有的途径。
 - 经卡尔文循环固定CO₂的过程可分为三个阶段：羧化、还原、再生。

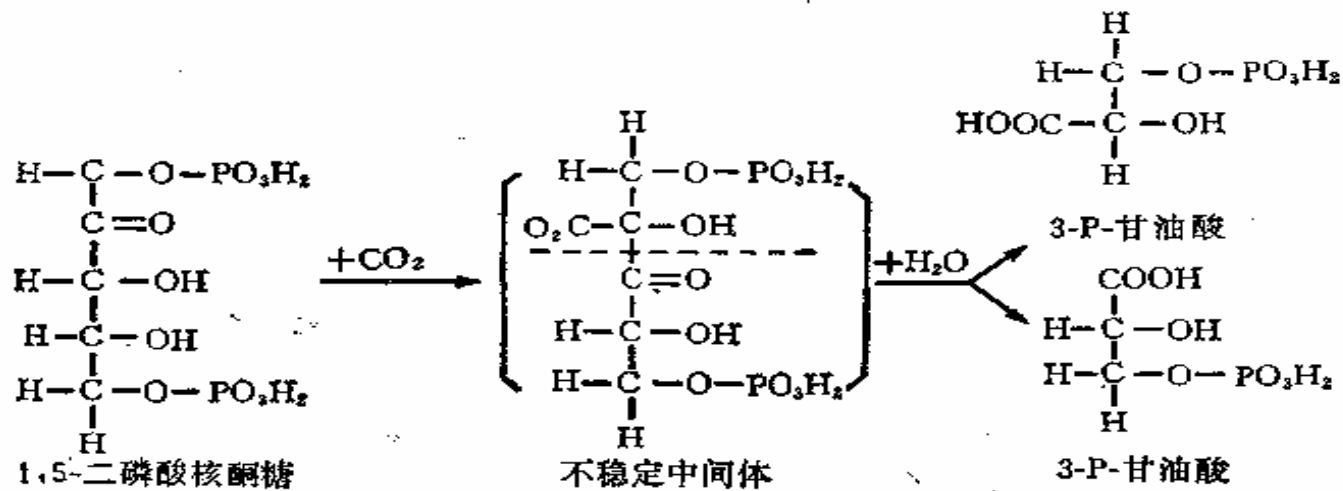
CO₂的微生物代谢



CO₂的微生物代谢

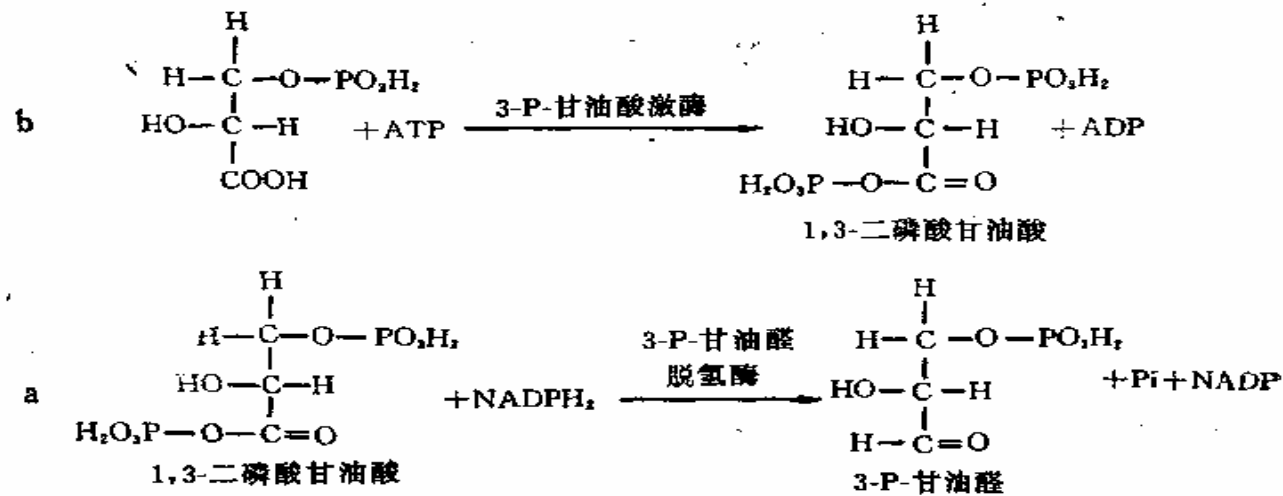
羧化阶段

也就是CO₂的固定阶段，该反应是在二磷酸核酮糖羧化酶催化下，以1, 5-二磷酸核酮糖作为CO₂的受体，生成一个6碳的中间化合物，此化合物不稳定，随即水解成二分子3-磷酸甘油酸。



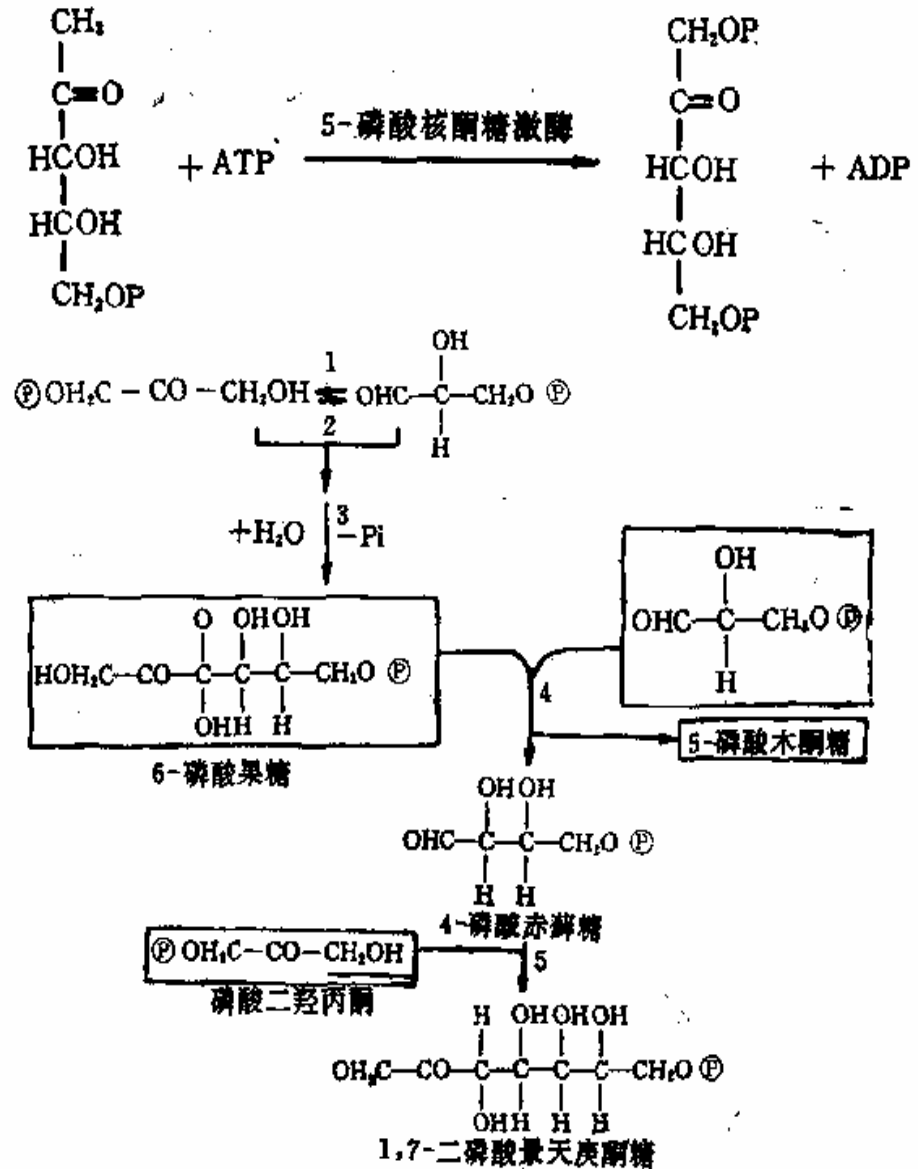
还原阶段

被固定在3-P-甘油酸分子中的碳原子与CO₂中的碳原子一样，具有同样的氧化水平，只有经过还原阶段，才能使来自CO₂的碳原子还原到碳水化合物的氧化水平。还原过程包括两步反应：

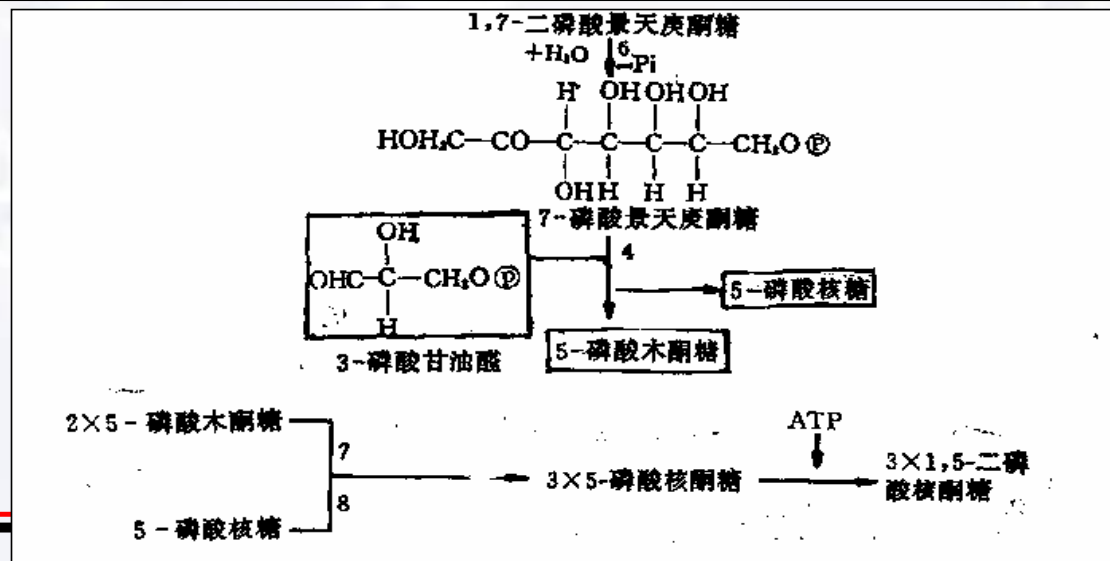


再生阶段

- CO₂ 固定所生成的3-磷酸甘油醛，一部分被用于代谢活动或合成己糖。另一部分则转化(异构)为磷酸二羟丙酮，后者再与另一分子3-磷酸甘油醛缩合成1, 6-二磷酸果糖，并经水解脱磷酸生成6-磷酸果糖。所生成的6-磷酸果糖又和另一分子3-磷酸甘油醛经转酮酶催化，生成5-磷酸木酮糖和4-磷酸赤藓糖。所生成的4-磷酸赤藓糖，在醛缩酶催化下，与另一分子磷酸二羟丙酮缩合成1, 7-二磷酸景天庚酮糖。后者经磷酸酯酶催化，水解掉C-1位上的磷酸基团，而生成7-磷酸景天庚酮糖，这是一个不可逆反应，保证卡尔文环沿合成方向进行
- 1, 5-二磷酸核酮糖的再生，是卡尔文环的特有反应，它的再生需要能量，是不可逆反应，需要5-磷酸核酮糖激酶催化。



- 由上述一系列反应所生成的7-磷酸景天庚酮糖在转酮酶催化下与另一分子3-磷酸甘油醛反应，生成5-磷酸木酮糖和5-磷酸核糖，5-磷酸核糖经异构化生成5-磷酸核酮糖，5-磷酸木酮糖经表异构化也生成5-磷酸核酮糖。这些5-磷酸核酮糖在5-磷酸核酮糖激酶的催化下，都形成1, 5-二磷酸核酮糖，因而CO₂受体得以再生，又可接受CO₂，重复上述一系列的反应，最终结局是将CO₂同化成为己糖，在此过程中消耗了大量的ATP和NADPH₂。

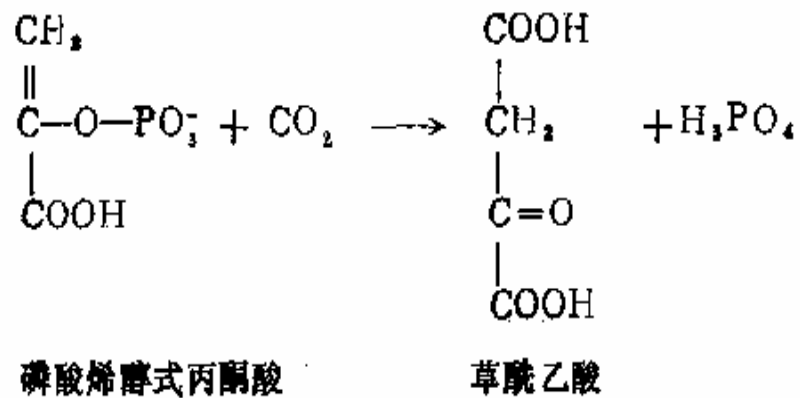


- 综上所述，卡尔文环中包括了EMP和HMP途径中的某些反应，但是卡尔文环有自身的关键酶系，而且这些酶系所催化的反应都是不可逆的，它们是1,5-二磷酸核酮糖羧化酶，1,7-二磷酸景天庚酮糖磷酸酯酶和5-磷酸核酮糖激酶。由于这些酶存在，保证卡尔文环能沿合成方向运行。

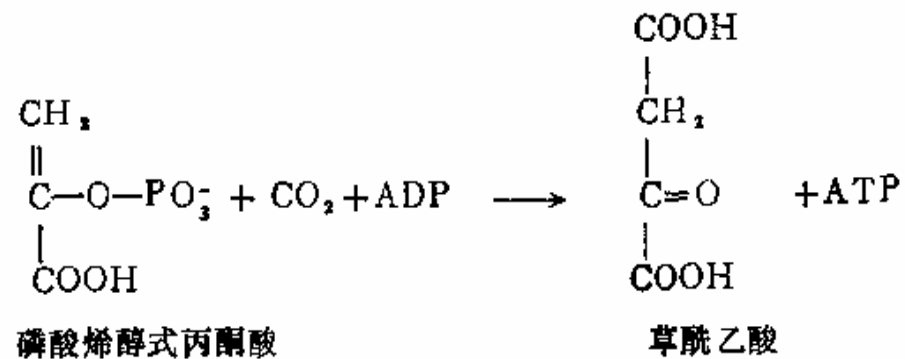
异养型CO₂固定

- 异养型CO₂的固定主要是合成TCA环的中间产物。从理论上讲，利用1分子草酰乙酸就可以不断地推动TCA环的运行(因为草酰乙酸可通过TCA环再生)。异养微生物依靠固定CO₂生成四碳二羧酸，补充TCA环的中间产物。催化这类反应的酶有以下几种：

- ①磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 它催化磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸并产生无机磷酸。

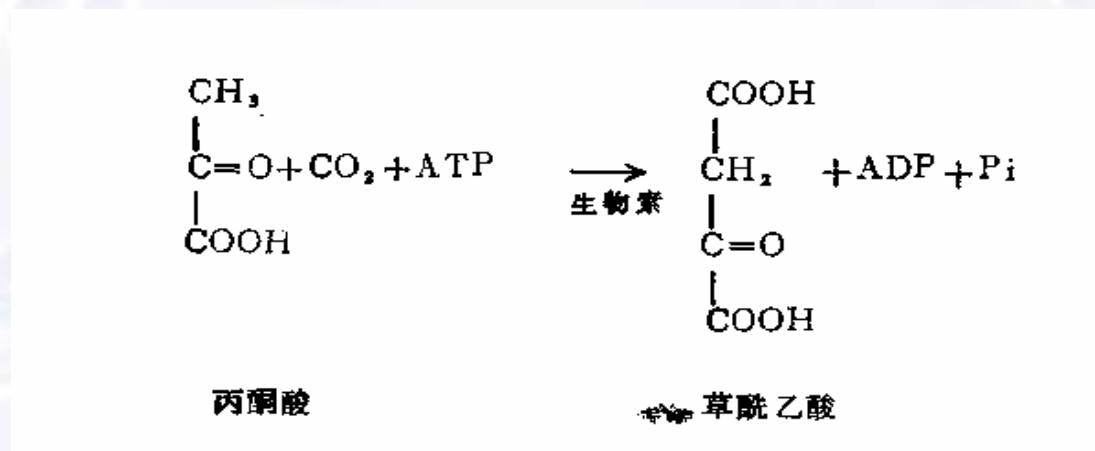


- ②磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶 它催化磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸，同时使ADP转为ATP

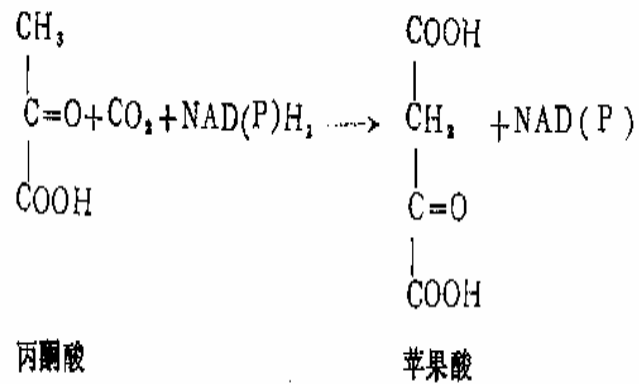


- ③磷酸烯醇式丙酮酸羧基转磷酸化酶
它所催化的反应与②相同，但需要二碳酸和无机磷酸，后者本身能变成焦磷酸。

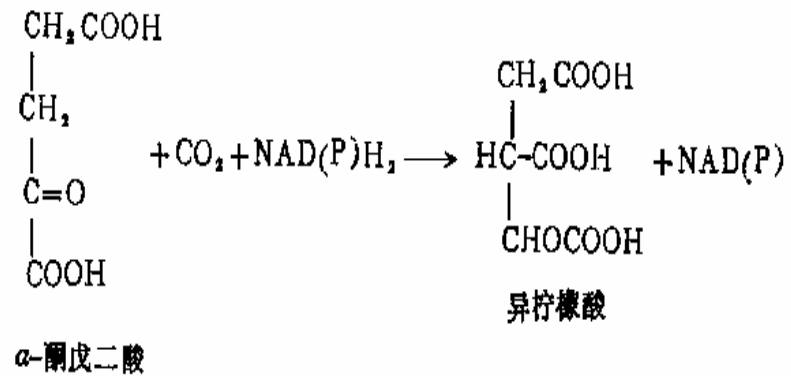
- ④丙酮酸羧化酶 它催化丙酮酸羧化成草酰乙酸，并使ATP转化成ADP和Pi，反应中还需要生物素。



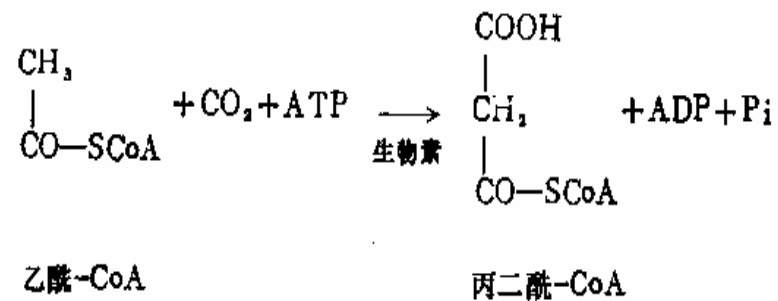
- ⑤苹果酸酶 它催化丙酮酸还原羧化成苹果酸，以NAD(P)H₂为供氢体。



- ⑥异柠檬酸脱氢酶 它催化 α -酮戊二酸还原羧化成异柠檬酸，需要NAD(P)H₂。



- 此外，在脂肪酸合成中也有固定CO₂的反应，如乙酰-CoA在乙酰-CoA羧化酶的催化下生成丙二酰-CoA，此反应得要生物素和ATP。



第七节 微生物的光合作用

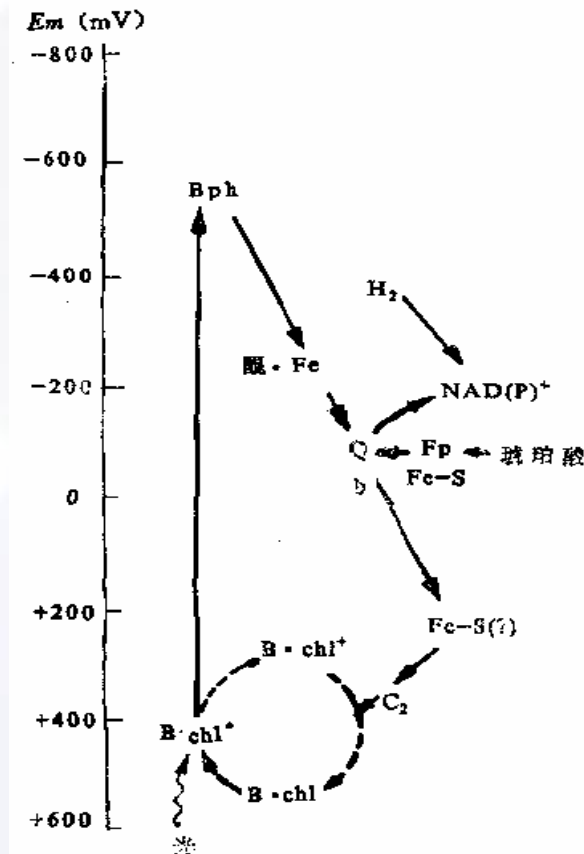
光合作用是自然界一个极其重要的生物学过程，在植物、藻类和蓝细菌的光合作用中，还原 CO_2 的电子是来自水的光解，并有氧的释放。把这类光合作用称为放氧型光合作用。在光合细菌中，光合作用还原 CO_2 的电子是来自还原型无机硫、氢或有机物，没有氧的释放，把这种类型的光合作用称为非放氧型光合作用。

光合作用的本质是指生物(包括植物、藻类和光合细菌)将光能转变为化学能，并以稳定形式贮藏的过程。前者是指光化反应阶段，后者是指暗反应阶段。

紫色细菌的光能转化

紫色细菌是以环式电子传递方式进行的。其过程可分为五步：

- ①光的吸收，紫色细菌通过光捕获复合体(Bchl + 类胡萝卜素 + B_{870})；
- ②使反应中心叶绿素(P_{870})处于激发态 (P^*_{870})；
- ③电荷分离， P^*_{870} 失去一个电子为 P^+_{870} ，高能电子跃升到电子受体细菌脱镁叶绿素(Bph)形成 Bph^- ；
- ④电子沿醌铁蛋白(QFe)，Q细胞色素b到 C_2 顺序移动，电子在细胞色素b至 C_2 时偶联磷酸化产生ATP；
- ⑤低能电子返回到 P^+_{870} 形成 P_{870} ，然后整个系统又接受光量子重复上述过程。



- 紫色细菌光能转化的特点是：
 - 紫色细菌能利用长波光，Bchl吸收光的峰值为870nm；
 - 紫色细菌是环式电子传递方式进行的；
 - 在异养生长时一般不能直接还原NAD⁺为NADH。

第八节 常见发酵产品的发酵机制

- 酒精
- 甘油
- 乳酸
- 柠檬酸
- 氨基酸
- 核苷酸
- 抗生素