

# L-色氨酸生物合成的代谢流量分析

王 健 陈 宁\* 张 蓓 谭青乔 张克旭

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

**摘 要** 建立了谷氨酸棒杆菌合成 L-色氨酸(L-Try)的代谢流量平衡模型,应用该模型计算出发酵中后期的代谢流分布并通过 MATLAB 软件线性规划得到 Try 理想代谢流分布。结果表明 75.15% 的碳架进入糖酵解,24.85% 的碳架进入 HMP 途径,但与理想代谢流相比,应从遗传改造和发酵控制方面降低 TCA 循环的代谢流,减少副产氨基酸的生成,摸索最适的溶氧控制对提高 Try 产率至关重要。

**关键词** L-色氨酸,代谢流平衡模型,代谢流分析,线性规划

**中图分类号** :TQ922 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2003)04-0473-08

L-色氨酸是人体和动物生命活动中 8 种必需氨基酸之一,对人和动物的生长、发育和新陈代谢起着重要的作用,广泛应用于医药、食品和饲料等方面。如何提高色氨酸发酵产率是目前一个重要课题。近年来,人们通过代谢工程方法改变细胞内部的代谢流分布,使其生成更多的产物。代谢流分析(Metabolic flux analysis, MFA)<sup>[1,2]</sup>是代谢工程中用以指导遗传操作的重要工作,是代谢网络分析的基本方法。MFA 围绕胞内代谢反应,使用物料衡算方法,对所有主要的胞内反应建立一个基于化学计量的代谢流平衡模型(Metabolic flux balance model, MFB),并利用该模型计算不同途径的代谢流分布。本文通过建立色氨酸生物合成的代谢流平衡模型,对代谢网络进行了定量分析和网络优化分析,并计算出色氨酸分批发酵中后期的代谢流分布,以期对色氨酸产生菌的遗传操作和发酵控制提供指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) TQ2223 (Phe<sup>-</sup> + Tyr<sup>-</sup> + 5MT<sup>+</sup> + SGr<sup>+</sup> 5FT<sup>+</sup> + CIN<sup>+</sup>),天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌种。

### 1.2 培养基

活化培养基、种子培养基和发酵培养基的成份见文献[3]。

### 1.3 培养方法

**1.3.1 斜面活化培养** 32℃培养 20~24h。

**1.3.2 种子培养** 500mL 三角瓶装液量 30mL,9 层纱布封口,于旋转式摇床上(220r/min),

基金项目 天津市科委攻关项目(983113711)

\* 通讯作者。Tel 86-22-28193579 Fax 86-22-28179094 E-mail :cncps@263.net

作者简介 王 健(1976-)女,吉林长春人,博士研究生,研究方向为代谢控制发酵。E-mail :wxy8958@eyou.com

收稿日期 2002-11-12,修回日期:2003-04-28

32℃振荡培养 16h。

**1.3.3 5L 自控发酵罐分批发酵** 5L 发酵罐中装液量 2.5L ,接种量 250mL ,32℃ ,通风比 1:1 ,流加氨水控制 pH 在 7.0 ,通过流加泡敌消泡 ,搅拌转速 500r/min ,发酵 68 h。

**1.4 分析方法**

**1.4.1 残糖测定** 采用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所制造)测定。

**1.4.2 OD 值测定** 稀释 50 倍后 ,在波长 620nm 处用 752 分光光度计(购自上海精密科学仪器有限公司)测定。

**1.4.3 氨基酸含量测定** 采用日立 835-50 高速氨基酸分析仪测定。

**1.5 谷氨酸棒杆菌合成 L-色氨酸的代谢流平衡模型的建立**

**1.5.1 代谢流计算** MFA 以拟稳态假设为基础 ,假设细胞内的中间代谢物均处于拟稳态 ,即其浓度变化速率为 0。本文采用 Vallino 的方法<sup>[4]</sup> ,根据物料平衡计算代谢物的积累速率 ,有

$$r_i(t) = \sum \alpha_j x_j(t) - \sum \alpha_k x_k(t) \tag{1}$$

式中 , $x_j(t)$  :第  $j$  步反应的反应速率[ mmol( L·h )] ; $x_k(t)$  :第  $k$  步反应的反应速率[ mmol( L·h )] ; $\alpha_j$  :第  $j$  步反应的反应计量系数 ; $\alpha_k$  :第  $k$  步反应的反应计量系数 ; $r_i(t)$  :中间代谢物  $i$  的积累速率[ mmol( L·h )]

由拟稳态假定可得  $r_i(t) = 0$ 。代谢网络中的  $m$  个中间代谢物构成  $m$  个代谢流平衡方程式 ,可写成如下矩阵形式 :

$$Ax(t) = 0 \tag{2}$$

式中 , $A$  : $m \times n$  维矩阵 ; $x(t)$  : $n \times 1$  维矩阵 ; $n$  选定的速率总数目。

这样由  $m$  个中间代谢物即可得到  $m$  个关于速率的约束条件 ,待解问题的自由度为 : $F = n - m$  ,通过实验测出  $F$  个不相关速率即可确定胞内整体流量分布 ,从而对其生理行为进行定量的描述。

**1.5.2 代谢网络的建立** 由文献资料<sup>[4~6]</sup>可知 ,在 L-色氨酸生产菌谷氨酸棒杆菌中 ,存在 EMP、TCA 和 HMP 途径。Vallino 的研究表明 ,TCA 循环是谷氨酸菌属发酵过程中的主要氧化途径 ,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化的反应是 TCA 循环的主要回补反应。本文中所用菌种为苯丙氨酸和酪氨酸缺陷型 ,因此代谢途径中不考虑 Phe 和 Tyr 合成支路。由于我们的主要考察对象为氨基酸的合成 ,因此本文中可不考虑细胞生长代谢。

根据以上分析 ,综合各种文献资料<sup>[4~8]</sup> ,本文基于以下原则或假设建立代谢网络 (1) 细胞处于非生长时期或细胞浓度变化不大可以忽略 (2) 细胞代谢过程中不存在乙醛酸循环 (3) NADPH 供需平衡 ,即反应途径中消耗的 NADPH 与 HMP 途径、TCA 循环产生的 NADPH 总数相等 (4) 在细胞生长不旺盛阶段 ,由于大量无效循环的存在 ,ATP 的消耗量和细胞维持能总量并不相等 ,因此本文不考虑 ATP 总量的平衡 (5) 按照固定比例进行的反应以及无分支点的中间反应 ,可简化为一个反应方程。

**1.5.3 代谢流平衡模型的建立** 根据文献报道以及以上分析 ,L-Trp 生物合成的代谢网络见图 1 ,各步反应的化学计量平衡式见表 1 ,各反应速率的计量关系如下 :



表 1 化学计量平衡式

Table 1 The stoichiometric equation

Reaction No.	Stoichiometric equation
r1	$\text{Glc} + \text{ATP} = \text{Glc6P} + \text{ADP} + \text{H}$
r2	$\text{Glc6P} = \text{Fru6P}$
r3	$\text{Fru6P} + \text{ATP} = 2\text{GAP} + \text{ADP}$
r4	$\text{GAP} + \text{ADP} + \text{NAD} = 3\text{PG} + \text{NADH} + \text{ATP}$
r5	$3\text{PG} = \text{PEP} + \text{H}_2\text{O}$
r6	$\text{PEP} + \text{ADP} = \text{ATP} + \text{Pyr}$
r7	$\text{Pyr} + \text{CoA} + \text{NAD} = \text{AcCoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$
r8	$\text{Glc6P} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NADP} = \text{Rib5P} + \text{CO}_2 + 2\text{NADPH}$
r9	$\text{Rib5P} = \text{Xyl5P}$
r10	$\text{Rib5P} = \text{Rib5P}$
r11	$\text{Xyl5P} + \text{Rib5P} = \text{Sed7P} + \text{GAP}$
r12	$\text{Xyl5P} + \text{E4P} = \text{Fru6P} + \text{GAP}$
r13	$\text{GAP} + \text{Sed7P} = \text{Fru6P} + \text{E4P}$
r14	$\text{AcCoA} + \text{OAA} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP} = \alpha\text{KG} + \text{CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$
r15	$\text{NH}_3 + \alpha\text{KG} + \text{NADPH} = \text{Glu} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}$
r16	$\alpha\text{KG} + \text{H}_2\text{O} + \text{FAD} + 2\text{NAD} + \text{ADP} = \text{OAA} + \text{FADH}_2 + 2\text{NADH} + \text{CO}_2 + \text{ATP}$
r17	$\text{PEP} + \text{CO}_2 + \text{GDP} = \text{OAA} + \text{GTP}$
r18	$2\text{PEP} + \text{E4P} + \text{NADPH} + \text{ATP} = \text{Cho} + 3\text{HPO}_4^{2-} + \text{NADP} + \text{ADP}$
r19	$\text{Cho} + \text{Gln} + \text{PRPP} + \text{Ser} = \text{Try} + \text{Glu} + \text{Pyr} + \text{H}^+ + \text{PPi} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{GAP}$
r20	$3\text{PG} + \text{NAD}^+ + \text{Glu} + \text{H}_2\text{O} = \text{Ser} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \alpha\text{KG} + \text{Pi}$
r21	$\text{Ser} + \text{FH}_4 = \text{Gly} + \text{H}_2\text{O}$
r22	$\text{Ser} + \text{AcCoA} + \text{H}_2\text{S} = \text{CoASH} + \text{AC} + \text{Cys}$
r23	$\text{Rib5P} + \text{ATP} = \text{PRPP} + \text{AMP}$
r24	$\text{PRPP} + \text{ATP} + \text{Gln} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD} = \text{His} + \alpha\text{KG} + \text{Pi} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$
r25	$\text{Pyr} + \text{Glu} = \text{Ala} + \alpha\text{KG}$
r26	$\text{Glu} + \text{ATP} + \text{NH}_4^+ = \text{Gln} + \text{ADP}$
r27	$\text{Pyr} + \text{NADPH} = \alpha\text{KIV} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$
r28	$\alpha\text{KIV} + \text{Glu} = \text{Val} + \alpha\text{KG}$
r29	$\text{AcCoA} + \alpha\text{KIV} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD} + \text{Glu} = \text{CO}_2 + \text{CoA} + \text{NADH} + \alpha\text{KG} + \text{Leu}$
r30	$\text{Glu} + \text{ATP} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ = \text{Pro} + \text{ADP} + 2\text{NADP}^+ + \text{Pi} + \text{H}_2\text{O}$
r31	$\text{OAA} + \text{Glu} + \text{ATP} + \text{NADPH} = \alpha\text{KG} + \text{ADP} + \text{NADP} + \text{Asp}$
r32	$\text{Asp} + 2\text{NADPH} + 2\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} = \text{Thr} + 2\text{NADP} + 2\text{ADP} + \text{Pi}$
r33	$\text{Asp} + \text{ATP} + 2\text{NADPH} + \text{Cys} = \text{Met} + \text{Pyr} + 2\text{NADP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
r34	$\text{Pyr} + \text{Thr} + \text{NADPH} + \text{Glu} = \text{Ile} + \text{NH}_4^+ + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O} + \alpha\text{KG} + \text{CO}_2$

可以看出方程数为 23 ,未知数为 34 ,方程自由度为 11 ,即需测定 11 个速率方可确定代谢网络中的流量分配。本文选取葡萄糖和 10 种氨基酸为已知参量 ,在色氨酸发酵中后期通过离线分析测出葡萄糖和 10 种氨基酸的浓度 ,对其进行数值微分即可求得糖消耗速率和 10 种氨基酸的积累速率 ,代入上述代谢流平衡模型 ,利用 MATLAB 软件即可求得代谢流分布。同时 ,利用建立的代谢流平衡模型还可以通过线性规划来优化代谢网络<sup>[9,10]</sup> ,并求出极端情况下的代谢流分布。

## 2 结果和讨论

### 2.1 代谢流分布

测定了 5L 自控发酵罐 L-色氨酸发酵过程数据 ,结果见表 2 ,在 44h 以后菌体量已没有明显变化 ,所以认为此后细胞处于非生长时期。测定发酵中后期葡萄糖的消耗速率为 1.83g( L·h ) ,用氨基酸分析仪测定 L-Try 的积累速率为 0.12g( L·h )及主要副产氨基酸的积累速率分别为 Gly 0.026 g( L·h )、His 0.063 g( L·h )、Val 0.057 g( L·h )、Leu 0.053 g( L·h )、Ala 0.027 g( L·h )、Met 0.062 g( L·h )、Ile 0.052 g( L·h )、Cys 0.039 g( L·h )和 Pro 0.039 g( L·h )。以葡萄糖的代谢流为 100 ,根据前述几种氨基酸的积累速率 ,可以求得 10 种氨基酸代谢流为 Try 6.0 、Cys 3.2、Gly 3.4、His 4、Val 4.8、Leu 4、Ala 3、Met 4.1 和 Ile3.9 ,利用 MATLAB 软件可计算 L-色氨酸发酵中后期代谢流分布 ,同时利用 MATLAB 线性规划得到 L-色氨酸合成的理想代谢流分布 ,结果见表 3。

表 2 L-色氨酸发酵过程数据			
Table 2 The batch fermentation results of L-tryptophan			
Time/h	OD	L-Tryptophan accumulation( g/L )	Residual glucose( g/L )
0	0.010	0	127
4	0.017	0.11	125
8	0.042	0.28	123
12	0.071	0.57	118
16	0.102	0.94	111
20	0.143	1.52	103
24	0.257	2.14	96
28	0.342	2.68	88
32	0.480	3.22	80
36	0.614	3.71	71
40	0.720	4.23	62
44	0.736	4.68	52
48	0.734	5.20	44
52	0.740	5.71	35
56	0.735	6.19	28
60	0.729	6.72	22
64	0.727	7.22	15
68	0.728	7.67	8

表 3 L-色氨酸合成的代谢流分布

Table 3 Metabolic flux distribution of L-tryptophan fermentation

Reaction No.	Flux distribution caculated	Theoretic flux distribution	Reaction No.	Flux distribution caculated	Theoretic flux distribution
r1	100.00	100.00	r18	6.00	33.33
r2	75.15	0.00	r19	6.00	33.33
r3	83.05	33.33	r20	12.60	33.33
r4	90.00	66.67	r21	3.40	0.00
r5	77.40	33.33	r22	3.20	0.00
r6	60.10	0.00	r23	10.00	33.33
r7	50.40	33.33	r24	4.00	0.00
r8	24.85	100.0	r25	3.00	0.00
r9	7.90	33.33	r26	10.00	33.33
r10	16.95	6.67	r27	8.80	0.00
r11	6.95	33.33	r28	4.80	0.00
r12	0.95	0.00	r29	4.00	0.00
r13	6.95	33.33	r30	3.30	0.00
r14	43.20	33.33	r31	8.00	0.00
r15	43.60	33.33	r32	3.90	0.00
r16	39.90	33.33	r33	4.10	0.00
r17	11.30	0.00	r34	3.90	0.00

2.2 Try 发酵中后期的代谢流分析

在进行代谢流分析时,本文主要对发酵中后期这段时间进行,主要原因是:这段时间接近细胞的平衡生长阶段,关于细胞内代谢产物积累的拟稳态假设更接近成立。

HMP 途径中 Glc6P 到 Ribu5P 的反应是不可逆反应,TCA 循环中  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶和柠檬酸合成酶催化的反应也是不可逆的,由于得到的代谢流分布图中并没有出现负值,因此计算得到的代谢流量没有违背生化热力学条件。

2.2.1 Glc6P 节点代谢流分析:从代谢流分布图(图 1)中可以看出,葡萄糖主要经 3 条途径代谢:EMP、HMP 和 TCA 途径。其中进入 HMP 途径的代谢流为 24.85%,进入 EMP 的代谢流为 75.15%,可见 EMP 途径活跃(图 2)。从理想代谢流分布可以看出,HMP 途径的代谢流为 100,EMP 代谢流为 0,但是生物体需通过 EMP 途径和 TCA 循环产生的能量维持自身生长,所以不能为 0,应尽量减弱。因 HMP 途径不但为色氨酸的合成提供了还原力 NADPH 而且为氨基酸的合成提供了大量前体物质 E4P 和 PRPP,应在发酵中后期严格控制溶氧来增加其流量。

2.2.2 PEP 节点代谢流分析:实际流向 PEP 的代谢流量为 77.4%,其中大部分流向形成丙酮酸和草酰乙酸,只有 6%的代谢流形成色氨酸的前体物—分支酸,将实际情况与理想情况(33%代谢流流向分支酸)比较可知(图 3),PEP 节点在色氨酸的生成中起非常重要的作用,如何使其代谢流更多地转向分支酸是代谢控制发酵中必须加以考虑的问题。因为合成一分子的分支酸需要两分子 PEP(r18),所以 PEP 供应量多少决定了 Try 的生物合成,为了积累更多的 PEP,防止生成大量 Pyr 和 OAA,可选育磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮

酸激酶活力低的菌株。另据报道<sup>[11]</sup>,在过量表达 PEP 合成酶时,此酶利用 ATP 水解释放的能量把丙酮酸转变为 PEP,从而增加芳香族氨基酸的代谢流量。

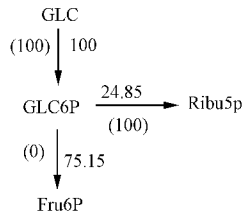


图 2 GLC6P 节点代谢流分析

Fig. 2 Metabolic flux analysis of GLC6P branch point

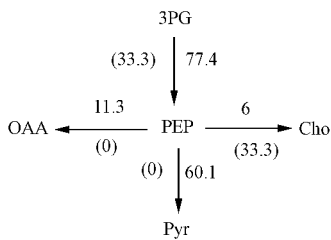


图 3 PEP 节点代谢流分析

Fig. 3 Metabolic flux analysis of PEP branch point

2.2.3 估算代谢流与理想代谢流比较 在发酵中后期,L-色氨酸的代谢流量为 6,但是与理想的代谢流 33.3% 相比,在几乎没有菌体生长的情况下,仍然没有达到极大值。形成这一现象的原因是副产物的形成和 TCA 循环的损失。

代谢网络是一个十分复杂的多酶同步催化反应体系,仅仅改变其中的一步限速反应,对产物合成的影响往往不会很大,因此要优化某一代谢网络,必须同时调节对产物有影响的主要节点,使代谢流量重新获得分配,以利于目的产物的积累。通过上述对色氨酸生物合成代谢流的分析可知,必须进一步判断主要节点 GLC6P、PEP 的节点类型,尤其是刚性节点的判断,然后利用基因工程技术和化学调节因素减轻或消除节点的刚性,使代谢流量的分配更有利于色氨酸的合成。

2.2.4 副产氨基酸分析 根据主要副产氨基酸的积累速率可求得其代谢流为 Cys 3.2、Gly 3.4、His 4、Val 4.8、Leu 4、Ala 3、Met 4.1 和 Ile3.9。副产氨基酸的代谢流较大,导致色氨酸的产量较低。因此如能从遗传角度和发酵控制方面使副产氨基酸的生成减少,就能达到代谢流迁移的目的,从而增大合成色氨酸的代谢流。

TCA 循环的代谢流为 43.2,而理想代谢流的 TCA 循环为 33.3,说明 TCA 的流量尚未达到最佳,TCA 流量还可以减少,使碳架流转向 HMP 途径,从而减少 Ile 和 Met 的产生,发酵中后期保持较高溶氧有利于抑制 Val、Leu、Ala 等副产物的生成,但过高溶氧使 HMP 途径流量不充足,因此发酵中后期控制溶氧对色氨酸发酵具有重要意义。

参 考 文 献

[ 1 ] Bonarius H P J, Schmid G, Tramper J. Flux analysis of underdetermined metabolic networks the quest for the missing constraints. *Trends Biotechnol*, 1997, **15** 308 ~ 314.

[ 2 ] Van Gulik W M, Heijnen J J. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation. *Biotechnol and Bioeng*, 1995, **48** 681 ~ 698.

[ 3 ] 朱文军,陈 宁,王 健,等. L-色氨酸产生菌分批发酵动力学模型. 无锡轻工大学学报, 2002 **21** 340 ~ 356.

[ 4 ] Vallino J J, Stephanopoulos G. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and Lysine overproduction. *Biotechnol and Bioeng*, 1993, **41** 633 ~ 646.

[ 5 ] 张克旭,陈 宁,张 蓓,等. 氨基酸发酵工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1992 319 ~ 333

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 6 ] 沈 同. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1994. 78 ~ 278.
- [ 7 ] 应汉杰, 欧阳平凯. 应用代谢途径流量模型探讨 FDP 合成机理. 化工学报, 2000, 31: 313 ~ 319.
- [ 8 ] 高红亮, 丛 威. 杂交瘤细胞的代谢流分析. 生物工程学报, 2000, 11: 740 ~ 746.
- [ 9 ] 刘丽霞, 谭立扬. 最优化方法在确定微生物反应代谢途径中的应用. 计算机与应用化学, 1999, 2: 153 ~ 156.
- [ 10 ] 王沫然. MATLAB 5. X 与科学计算. 北京: 清华大学出版社, 2000.
- [ 11 ] Patnaik R, Liao J C. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Env Microbiol*, 1994, 60: 3903 ~ 3010.

## Metabolic Flux Analysis of L-Tryptophan Biosynthesis

Wang Jian Chen Ning\* Zhang Bei Tan Qingqiao Zhang Kexu

( College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China )

**Abstract :** The metabolic flux balance model of L-Try synthesis by *Corynebacterium glutamicum* was constructed in this paper. Using this model, the metabolic flux distribution during the middle and late period were determined and the optimal flux distribution were calculated by linear program of MATLAB software. The analysis results indicate that 24.85% metabolic flux entered the HMP pathway and 75.15% entered the EMP cycle. But comparing to the optimal flux distributions, the production of L-Try should be improved from the genetic manipulation and fermentation control through reducing byproduct of amino acid and decreasing the metabolic flux of TCA and EMP.

**Key words** L-Try, The metabolic flux distribution, Metabolic flux analysis, Linear program

Foundation item: Project Granted by Science and Technology Committee of Tianjin( 983113711 )

\* Corresponding author. Tel 86-22-28193579 ;Fax 86-22-28179094 ;E-mail :cncps@263.net

Received date 2002-11-12

## 《微生物学报》2004 年征稿计划

为了适应我国生物科技飞速发展的需要,促进国内外学术交流,本刊 2004 年征稿的主要内容如下:

1. 国家高技术研究发展计划项目(即国家“863 计划”)和国家基础研究发展规划项目(即国家“973 项目”)
2. 国家自然科学基金资助的重点基金项目、青年基金资助项目、杰出青年基金项目、地区基金项目和面上资助项目以及省部级基金资助项目。
3. 国家科技攻关项目及省部级科技攻关项目。
4. 国际合作项目。
5. 具创新性或有重大突破的基础和应用基础研究成果,对我国西部大开发具有重要学术价值和应用价值的研究成果。

**对于高水平的论文本刊将优先发表。欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!**