

不同溶氧条件下 L-苏氨酸生物合成菌株的代谢流量分析

黄金¹, 徐庆阳¹, 温廷益^{1,2}, 陈宁^{1*}

¹天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

²中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要:【目的】探索 L-苏氨酸生物合成机理及影响因素。【方法】建立了大肠杆菌 L-苏氨酸的代谢流平衡模型,应用 MATLAB 软件计算出不同溶氧条件下发酵中后期代谢网络的代谢流分布及理想代谢流分布。【结果】5%溶氧条件下,25.5%碳架进入 HMP 途径,74.5%碳架进入糖酵解途径,获得 33.9%质量转化率;20%溶氧条件下,58.08%碳架进入 HMP 途径,41.92%碳架进入糖酵解途径,获得 46.5%质量转化率;【结论】与理想代谢流(88.23%质量转化率)相比,应从菌种改造和发酵控制方面通过改变 6-磷酸葡萄糖异构酶借以增加 HMP 途径代谢流量,通过增加磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应代谢流提高天冬氨酸族合成代谢流,减少 TCA 循环代谢流量,从而达到减少副产物生成,增加 L-苏氨酸生物合成的目的。

关键词: L-苏氨酸; 溶氧; 代谢流分析; 大肠杆菌

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1056-05

L-苏氨酸是人与动物体内所必需的一种氨基酸,自身不能合成,必须从食物中摄取,被广泛应用于饲料工业、保健食品和医药工业^[1,2]。微生物发酵法生产苏氨酸是目前主要的工业生产方法,国际上苏氨酸发酵产酸最高水平可稳定达到 100 g/L 左右^[3]。2005 年苏氨酸全球产量达到 7 万吨,继谷氨酸、赖氨酸后成为年产量第三的氨基酸。但是随着产量的增加,其价格呈现出逐年下滑的趋势。而工业化生产中发酵产酸水平提高缓慢^[4]。为了提高苏氨酸的产率,必须对其生物合成及代谢流量分布进行研究,了解苏氨酸合成代谢途径在环境因子扰动情况下所表现出的行为和特征,通过代谢工程方法改变代谢网络中代谢流分布,提高目的产物的产率。

代谢流分析 (Metabolic flux analysis, MFA) 是在物料质量守恒基础上对实验数据进行化学计量学分析的一种代谢网络分析方法,运用代谢流分析可获得大量的细胞内部代谢信息。与核磁共振 (Nuclear

magnetic resonance, NMR) 方法相比,该方法不需要具体的酶促动力学信息,且避免了昂贵的实验费用,已成功运用于多种氨基酸生物合成代谢分析的研究中^[5~7]。前期研究^[8]表明:溶氧浓度是苏氨酸合成的关键性限制因素,发酵中后期(苏氨酸大量生成期)提供 20%溶氧,可有效地提高苏氨酸的产量和糖酸转化率。本文围绕胞内代谢已知途径,运用化学计量学方法建立了苏氨酸生物合成代谢流平衡模型,利用 MATLAB 软件计算出苏氨酸分批发酵中后期不同溶氧条件下的代谢流分布,揭示代谢节点处代谢流分配对溶氧条件变化的响应机理,以期对苏氨酸发酵过程优化提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 大肠杆菌 *Escherichia coli* TRFC (Ile⁻+AHV^r), 天津科技大学代谢控制发酵研究室保

基金项目: 国家高技术研究发展计划——“863 项目”(2006AA02Z216)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-22-60272182; E-mail: ningch@tust.edu.cn

作者简介: 黄金(1979-), 男, 安徽亳州人, 博士研究生, 研究方向为代谢工程。E-mail: huangjin_979@163.com

收稿日期: 2008-03-20; 修回日期: 2008-05-09

藏菌株。种子培养基及发酵培养基配方参照文献[9]。

1.1.2 主要试剂和仪器：浓硫酸；氨基酸标准溶液；乙腈；氨水；NaOH；生物传感仪（SBA-40C，山东科学院生物研究所）；溶氧电极（OXYFERM 225，HAMILTON，瑞士）；pH 电极（EASYFERM PLUS 225，HAMILTON，瑞士）；5L 自控式发酵罐（BIOTECH-5BG，上海）。

1.2 培养方法

种子培养：吸取适量无菌生理盐水于 1 支活化斜面中，将所有菌悬液全部接入 5 L 种子罐中，搅拌转速 300~800 r/min，自动流加氨水控制 pH 在 7.0，37 培养。

5 L 罐发酵：按 3%接种量将种子液接入 5 L 发酵罐中；初始通风量 2 L/min；搅拌转速 500~900 r/min；通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0；培养温度 37 ；以泡敌消泡；发酵到一定时间流加 80%葡萄糖补料液。

1.3 生长指标的测定

1.3.1 菌体生长：吸取 0.5 mL 样品菌液到 10 mL 蒸馏水中，摇匀，采用 752 分光光度计，1 cm 光程，600 nm 下测定 OD 值，所得 OD 值与吸光度-菌体干重曲线对照，计算出菌体浓度。

1.3.2 蔗糖和葡萄糖浓度：分别采用蒽酮硫酸法和生物传感仪测定。

1.3.3 溶氧及 pH：在线测定。

1.3.4 乙酸、苏氨酸及副产氨基酸浓度：乙酸浓度参照文献[10]进行测定；氨基酸含量采用高效液相分析系统柱前衍生测定，色谱分离条件：柱温：33 ；检测波长：360 nm；流动相总流量：1 mL/min。

1.4 苏氨酸生物合成代谢流平衡模型的建立

1.4.1 代谢网络建立:据文献资料^[11,12]报道，在大肠杆菌中，存在 EMP、TCA、HMP、回补途径及磷酸转移酶系统（PTS）。HMP 途径能为氨基酸合成提供大量的 NADPH，在苏氨酸合成中意义重大，因此在构建苏氨酸生物合成途径中应保留完整途径。研究表明大肠杆菌在以葡萄糖为底物的培养基中生长时，乙醛酸支路并未出现，这说明 TCA 循环仍是大肠杆菌发酵过程中的主要氧化途径；同时认为 PPC(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。

本文试验发酵液中仅检出丙氨酸、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸、乙酸，因此代谢途径中不考虑其他合成支路。结合上述分析及文献^[13]，基于以下原则建立代谢网络：(1) 代谢流分析是基于拟稳态假设基础上的

分析方法，发酵中后期细胞处于非生长时期或浓度变化不大，可以忽略；(2) 反应途径中消耗的 NADPH 与 TCA 循环、HMP 途径产生的 NADPH 总数相等，即 NADPH 供需平衡；(3) 乙醛酸循环在细胞代谢过程中不存在；(4) 按固定比例进行的反应以及无分支点的中间反应，尽量简化为一个反应方程；(5) 细胞生长停滞阶段，由于大量无效循环的存在，细胞维持能总量与 ATP 的消耗量并不相等，所以不考虑 ATP 总量的平衡；苏氨酸生物合成代谢网络如图 1 所示。

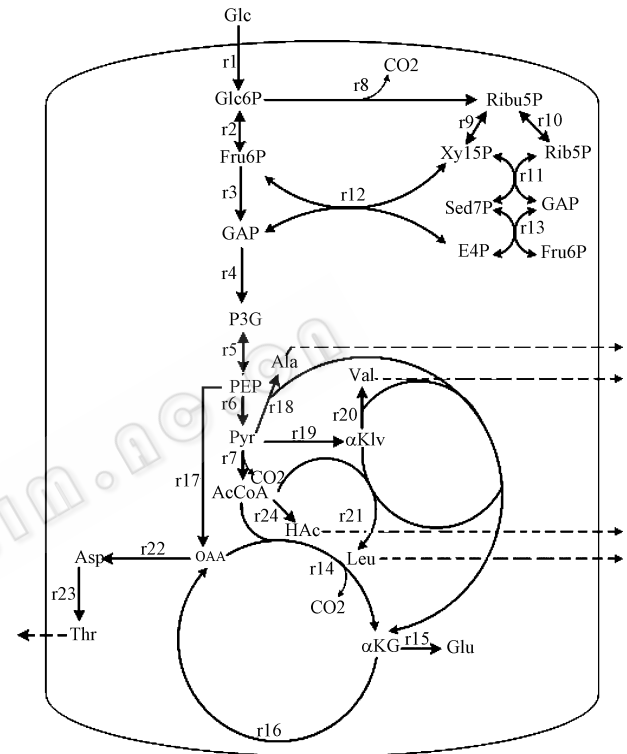


图 1 苏氨酸生物合成代谢网络图

Fig. 1 Metabolic network of threonine synthesis (1) Glc: Glucose; (2) Glc6P: Glucose-6-phosphate; (3) PEP: Phosphoenolpyruvate; (4) Pyr: Pyruvate; (5) Fru6P: Fructose-6-phosphate; (6) GAP: Glyceradehyde-3-phosphate; (7) P3G: 3-phosphoglycerate; (8) AcCoA: AcetylcoenzymeA; (9) Ribu5P: Ribulose-5-phosphate; (10) Xyl5P: Xylulose-5-phosphate; (11) Rib5P: Ribose-5-phosphate; (12) Sed7P: Sedoheptulose-7-phosphate; (13) E4P: Erythrose-4-phosphate; (14) OAA: Qxaloacetate; (15) αKG: α-ketoglutarate; (16) NADPH: Nicotinamide adenine dinu-cleotide phosphate; (17) Glu: Glutamate; (18) αKiv: α-ketoisovalerate; (19) Asp: Aspartate.

1.4.2 流量平衡方程计算 :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。根据物料质量守恒定律计算代谢物的积累速率^[14]，有

$$r_i(t) = \sum_{j=1}^M \alpha_{ij} r_j(t) - \sum_{k=1}^N \alpha_{ik} r_k(t)$$

式中， $r_i(t)$:中间代谢物 i 的积累速率[mmol/(L · h)]；

$r_j(t)$:合成 i 第 j 步反应的反应速率[mmol/(L·h)]; $r_k(t)$:代谢 i 第 k 步反应的反应速率[mmol/(L·h)]; α_{ij} :第 j 步反应的反应计量系数; α_{ik} :第 k 步反应的反应计量系数;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 n 个反应,构成 m 个代谢流平衡方程式,写成矩阵形式为: $Ar(t)=0$,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,从而对细胞内部代谢信息进行描述。

1.4.3 代谢流平衡模型的建立:依据文献报道及以上

分析,代谢节点处反应速率方程如表 1 所示:

方程组由 18 个方程构成,24 个未知数,自由度为 6,即需测定 6 步反应速率就可确定代谢网络的流量分配,在苏氨酸发酵中后期离线测定葡萄糖、苏氨酸、丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸及乙酸的浓度,对其进行数值微分求得 r_1 和各种副产物和目的产物的积累速率 r_{18} 、 r_{20} 、 r_{21} 、 r_{23} 、 r_{24} ,以此为已知参量,代入上述代谢速率平衡方程组,利用 MATLAB 软件 linprog 函数求得代谢流分布。

表 1 代谢节点反应速率方程

Table 1 Reaction rate equation of metabolic nodes

Metabolic node	Reaction rate equation	Metabolic node	Reaction rate equation
Glc6P	$r_1-r_2-r_8=0$	Rib5P	$r_{10}-r_{11}=0$
PEP	$r_5-r_1-r_6-r_{17}=0$	Sed7P	$r_{11}-r_{13}=0$
Pyr	$r_1+r_6-r_7-r_{18}-r_{19}=0$	E4P	$r_{13}-r_{12}=0$
Fru6P	$r_2-r_3+r_{12}+r_{13}=0$	OAA	$r_{16}-r_{14}+r_{17}-r_{22}=0$
GAP	$2r_3-r_4+r_{11}+r_{12}-r_{13}=0$	α KG	$r_{14}-r_{15}-r_{16}+r_{18}+r_{20}+r_{21}+r_{22}=0$
P3G	$r_4-r_5=0$	NADPH	$2r_8+r_{14}-r_{15}-r_{19}-2r_{23}-r_{22}=0$
AcCoA	$r_7-r_{14}-r_{21}-r_{24}=0$	Glu	$r_{15}-r_{18}-r_{20}-r_{21}-r_{22}=0$
Ribu5P	$r_8-r_9-r_{10}=0$	α KIV	$r_{19}-r_{20}-r_{21}=0$
Xyl5P	$r_9-r_{11}-r_{12}=0$	Asp	$r_{22}-r_{23}=0$

2 结果和讨论

2.1 不同溶氧条件下代谢流计算

前期研究^[8]证明:在 5%和 20%溶氧条件下,发酵中后期菌体浓度变化均不大,符合拟稳态假设理论。分别测定苏氨酸生产菌 5 L 发酵罐在 5%和 20%溶氧条件下,发酵中后期(34 h 和 36 h)发酵液中的葡萄糖、苏氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸及乙酸的胞外浓度,计算各自的消耗或积累速率如表 2 所示,为便于计算,葡萄糖摩尔消耗速率假定为 100 mmol/(L·h)。研究代谢网络中在该阶段的代谢流分布状况。同时运用 METATOOL 软件进行最大理论代谢流计算^[15],经线性规划得到苏氨酸生物合成的理想代谢流分布如表 3 所示。

2.2 不同溶氧条件下代谢节点分析

代谢网络是一个多酶同步催化的复杂反应体系,仅改变某一限速反应,对产物合成的影响往往不会很

大。因此要优化苏氨酸代谢网络,在进行环境扰动或者基因操作时,必须同时考虑产物合成的主要节点,对节点处的代谢流分配有充分的认识,进而利用环境调节因子或基因工程技术消除节点的刚性,达到代谢流迁移的目的,使其更有利于苏氨酸的合成。

2.2.1 Glc6P 节点分析:HMP 途径作为提供 NADPH 的主要途径,增大 HMP 途径的代谢流是维持和提高天冬氨酸族氨基酸生物合成所必需的^[14],从图 2 可以看出:随着溶氧浓度的增加,通往 HMP 途径的 r_8 流量由 25.5 增加至 58.08,而 r_2 流量由 74.5 减至 41.92,与理想代谢流(-100)相比,可以推断溶氧条件的改变可以增加 HMP 途径的代谢流量,使目的代谢流 r_{23} 增加。结合表 3,在此过程质量转化率从 33.9%(51.2 × 119.12/100 × 180)增加至 46.5%(70.2 × 119.12/100 × 180),而要进一步达到理想代谢流 88.23%质量转化率,应从减弱 6-磷酸葡萄糖异构酶的活性方面着手。

表 2 代谢产物变化速率及代谢流量

Table 2 Variation rate and metabolic flux of metabolites

Extracellular substance	Molecular weight	Accumulation/Consumption rate/[g/(L·h)]		Metabolic flux	
		5% DO	20% DO	5% DO	20% DO
Val	117	0.10	0.05	1.9	0.9
Leu	131	0.25	0.13	4.3	2.0
HAc	60	0.15	0.07	5.6	2.3
Thr	119	2.70	4.00	51.2	70.2
Glc	180	8.00	8.60	100	100
Ala	89	0.18	0.10	4.6	1.5

表 3 苏氨酸生物合成代谢流分布
Table 3 Metabolic flux distribution of threonine biosynthesis

Reaction No.	Metabolic flux distribution calculated		Theoretical metabolic flux distribution	Reaction No.	Metabolic flux distribution calculated		Theoretical metabolic flux distribution
	5% DO	20% DO			5% DO	20% DO	
r1	100	100	100	r13	8.5	19.4	66.7
r2	74.5	41.9	-100	r14	119.6	101.7	0
r3	91.5	80.6	33.3	r15	62	74.6	133.3
r4	191.5	180.6	133.3	r16	119.6	101.7	0
r5	191.5	180.6	133.3	r17	51.2	70.2	133.3
r6	140.3	110.4	0	r18	4.6	1.5	0
r7	129.5	106.0	0	r19	6.2	2.9	0
r8	25.5	58.1	200	r20	1.9	0.9	0
r9	17	38.7	133.3	r21	4.3	2	0
r10	8.5	19.4	66.7	r22	51.2	70.2	133.3
r11	8.5	19.4	66.7	r23	51.2	70.2	133.3
r12	8.5	19.4	66.7	r24	5.6	2.3	0

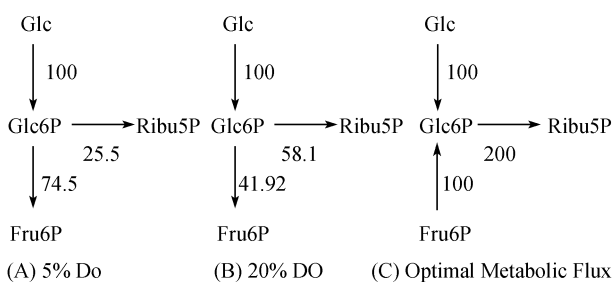


图 2 不同条件下 Glc6P 节点处的流量分配
Fig. 2 Flux distribution at the Glc6P node under different conditions.

另外,磷酸葡萄糖异构酶活力降低的菌株将会由于 NADPH 的大量合成而对菌体生长产生毒性^[16], NADPH 通过电子传递链将电子传递至电子受体 O₂, 溶氧浓度过低,将会使在电子传递链中的氢传递至其他有机和无机物,从而使副产物增加,因此应尽可能使菌体积累的 NADPH 进行氧化。

2.2.2 PEP 节点分析:大肠杆菌中 CO₂ 固定反应是提供苏氨酸前体物草酰乙酸的主要途径。从图 3 可看出:

在溶氧浓度为 5%和 20%条件下,分别约有 26.74%和 38.86%的 PEP 在 PPC 的催化下形成 OAA (以形成 PEP 的流量为 100%) 剩余 73.26%和 61.14%

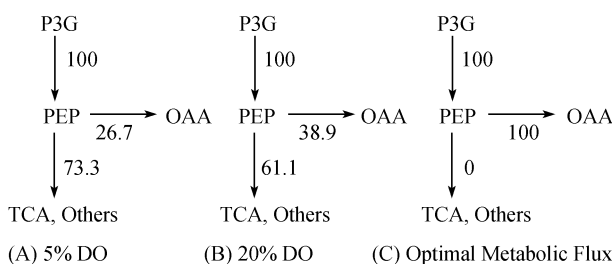


图 3 不同条件下 PEP 节点处的流量分配
Fig. 3 Flux distribution at the PEP node under different conditions.

PEP 进入 TCA 循环或副产物(如乙酸)生物合成代谢支路。理想代谢流在此节点处的所有 PEP 全部用来生成 OAA, TCA 循环流量为 0,说明实际 TCA 的流量尚未达到最佳, TCA 流量还可以减少;但菌体必须依靠 TCA 循环产生的能量维持自身生长,故不能为 0,应尽量减弱。实验结果和推论与文献^[11]报道一致。

2.2.3 αKG 节点分析:由表 1 和表 2 可知在 αKG 节点处,分别通过 r14、r18、r20、r21 和 r22 步骤生成,而后以谷氨酸脱氢酶作用生成谷氨酸(r15)或以氧化脱羧反应生成琥珀酸辅酶 A 进而合成 OAA(r14)。从图 4 看出,在溶氧浓度为 5%和 20%操作条件下,分别约有 34.14%和 42.30%的 αKG 在谷氨酸脱氢酶催化下形成谷氨酸(以形成 αKG 的流量为 100%), 剩余 65.86%和 57.70%αKG 进入 TCA 循环。理想代谢流在此节点处,αKG 全用来生成谷氨酸以提供足够的底物供应代谢网络天冬氨酸族氨基酸合成所需的转氨基作用(r22), TCA 循环为 0,说明 TCA 的流量亦未达到最佳, TCA 流量还可以减少,可通过限量添加谷氨酸(盐)^[17]的形式来达到 TCA 循环相对减少,苏氨酸合成增加的目的。

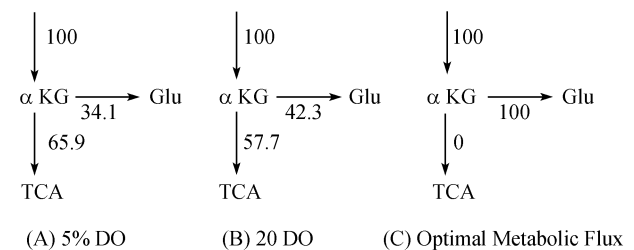


图 4 不同条件下 αKG 节点处的流量分配
Fig. 4 Flux distribution at the αKG node under different conditions.

3 结论

应用 MATLAB 线性规划获得了苏氨酸理想代谢流分布,依据苏氨酸生物合成代谢网络及代谢流平衡模型,结合 5%和 20%溶氧条件下发酵中后期的胞外分泌产物情况,获得了各自的代谢流分布。增加 HMP 循环代谢流量,减少 EMP 和 TCA 循环途径流量,将大大减少碳架物质流的损失。确定发酵中后期增加溶氧有利于苏氨酸的生成,同时可以抑制副产物的生成,在苏氨酸发酵工艺控制中,溶氧是关键因素。发酵中后期流加谷氨酸(钠),从化学计量学的角度推测出减少代谢副产物的生成,将达到代谢流迁移的目的,从而减少副产物的生成。

参 考 文 献

- [1] Vladimir G. Debabov. The threonine story. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2003, 79, 113–136.
- [2] Vladimir G. Debabov. Method for preparing strains which produce amino acids. USA: 4278765, 1981.
- [3] Okamoto K, Ikeda M. Development of an industrially stable process for L-Threonine Fermentation by an L-Methionine-Auxotrophic Mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2000, 89(1): 87–89.
- [4] Mechthild Rieping, Thomas Hermann. L-threonine. *Microbiol Monogr.* 2006, 5: 71–92.
- [5] Takac S, Calik G, Mavituna F, *et al.* Metabolic flux distribution for the optimized production of L-glutamate. *Enzyme and Microbial Technology.* 1998, 23: 286–300.
- [6] Hua Q, Shimizu K. Effect of dissolved oxygen concentration on the intracellular flux distribution for pyruvate fermentation. *Journal of Biotechnology.* 1999, 68: 135–147.
- [7] Hua Q, Fu PC, Yang C, *et al.* Microaerobic lysine fermentations and metabolic flux analysis. *Biochemical Engineering Journal.* 1998, 2: 89–100.
- [8] 徐庆阳, 冯志彬, 孙玉华, 等. 溶氧对 L-苏氨酸发酵的影响. *中国生物工程杂志(Journal of Chinese Biotechnology).* 2007, 34(2): 120–122.
- [9] 黄金, 黄磊, 谢希贤, 等. 基于响应面法优化 L-苏氨酸发酵条件. *食品与发酵工业(Food and Fermentation Industries).* 2008, 34(1): 104–108.
- [10] 辛梅华, 李明春, 蓝心仁, 等. 反相 HPLC 快速测定调味品中有机酸. *中国调味品(China Condiment).* 2003, 4: 36–39.
- [11] Farmer WR, Liao JC. Reduction of Aerobic Acetate Production by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental microbiology.* 1997, 63(8), 3205–3210.
- [12] Kromer JO, Wittmann C, Schroder H, *et al.* Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering.* 2006, 8(4): 353–369.
- [13] 王健, 陈宁, 张蓓等. L-色氨酸生物合成的代谢流量分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica).* 2003, 43(4): 473–480.
- [14] 张蓓. 代谢工程. 天津: 天津大学出版社, 2003, 133–134.
- [15] Pfeiffer T, Sanchez VI, Nuno JC, *et al.* Metatool: For studying metabolic networks. *Bioinformatics.* 1999, 15(3): 251–257.
- [16] Canonaco F, Hess TA, Heri S, *et al.* Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock out *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett.* 2001, 204(2): 247–252.
- [17] 刘辉, 陈宁, 温廷益. 黄色短杆菌 TK0303 合成 L-亮氨酸的途径分析. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica).* 2007, 47(2): 249–253.

Metabolic Flux Analysis of L-Threonine Biosynthesis Strain under Diverse Dissolved Oxygen Conditions

Jin Huang¹, Qingyang Xu¹, Tingyi Wen^{1,2}, Ning Chen^{1*}

(¹School of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457)

(²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: [Objective] The mechanism of L-threonine biosynthesis and its impact factors were explored by metabolic flux analysis. [Methods] The metabolic flux balance model of L-threonine synthesis by *Escherichia coli* was established. Based on this model, the practical and optimal metabolic flux distribution in the middle and late period under different dissolved oxygen concentrations were determined with the linear program planted in MATLAB software. [Results] Data indicated that 25.5% of carbon sources were consumed by HMP pathway, resulting in a conversion rate of 33.9% to L-threonine with a 5% dissolved oxygen concentration. With dissolved oxygen concentration of 20%, 58.08% carbon resources entered HMP pathway, giving rise to a 46.5% conversion rate. [Conclusion] Compared to the optimal metabolic flux with a carbon conversion rate of 88.23%, glucose-6-phosphate isomerase should be activated by genetic manipulation and fermentation control in order to elevate the HMP pathway flux, and flux towards aspartate amino acids family could be enhanced by increasing phosphoenolpyruvate carboxylase reaction rate. These may lead to a decrease in TCA flux and byproducts, and consequently the L-threonine biosynthesis would be promoted.

Keywords: L-threonine; dissolved oxygen; metabolic flux analysis; *Escherichia coli*

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z216)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-60272182; E-mail: ningch@tust.edu.cn

Received: 20 March 2008/ Revised: 9 May 2008