



柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸发酵及代谢流量分布的影响

秦永锋, 徐庆阳, 谢希贤, 陈 宁

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以黄色短杆菌 XV0505 为供试菌, 研究柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸发酵的影响, 同时应用 MATLAB 软件和代谢流量分析方法, 定量研究柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸发酵中后期胞内代谢流量分布的影响. 结果表明, 添加 2.0 g/L 柠檬酸钠可提高 *L*-缬氨酸产量, 同时不影响菌体生长. 添加柠檬酸钠后, *L*-缬氨酸生物合成的代谢流从 41.42 增长至 45.87, 较未添加前提高了 10.74%. 合成副产物 *L*-丙氨酸和 HAc 的代谢流明显减少, 分别降低了 21.10% 和 32.47%. 因此, 添加柠檬酸钠能够扰动 *L*-缬氨酸生物合成途径关键节点代谢流量分布, 有利于减少副产物的生成, 提高 *L*-缬氨酸生物合成途径的代谢流量.

关键词: *L*-缬氨酸; 黄色短杆菌; 代谢流分析; 柠檬酸钠

中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)02-0009-04

Effects of Sodium Citrate on Metabolic Flux Distributions of *L*-Valine Fermentation

QIN Yong-feng, XU Qing-yang, XIE Xi-xian, CHEN Ning

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to quantitatively analyze the effects of sodium citrate on the metabolic flux distributions in *Brevibacterium flavum* XV0505 during the middle and late period, the metabolic flux analysis and MATLAB software were conducted, based on researches in effects of sodium citrate on fermentation. It was revealed that a increase of the formation of *L*-valine can be observed with the fermentation medium supplemented sodium citrate (2.0 g/L). The metabolic flux channeled to the *L*-valine synthesis pathway increased by 10.74% (from 41.42 to 45.87). Moreover, the formation of byproducts, such as *L*-Ala and HAc, decreases 21.10% and 32.47% respectively. All of these show that the addition of sodium citrate can change the metabolic flux distributions of the key nodes, lead to the decrease of byproducts formation and strengthen the *L*-valine biosynthesis.

Keywords: *L*-valine; *Brevibacterium flavum*; metabolic flux analysis; sodium citrate

随着 *L*-缬氨酸市场需求日益增加, 微生物发酵生产 *L*-缬氨酸已逐渐实现工业化, 取代了传统的化学合成法和提取法. 代谢流分析是基于物料质量守恒和中间代谢物的拟态假设, 对实验数据进行化学计量学分析的一种代谢网络分析, 可获得大量的细胞内部代谢信息. 通过比较不同条件下所得到的代谢流图, 可以充分评价环境扰动的影响, 这对于理解特定条件下代谢产物合成的调节机制具有十分重要的意义^[1-2].

据报道^[3], 降低磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶有利于 *L*-缬氨酸的合成. 且有研究表明^[4], 添加柠檬酸钠能显著降低枯草芽胞杆菌代谢途径中磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的活力. 柠檬酸和葡萄糖的联合代谢会阻遏有机酸的生成, 减弱 EMP 途径. 本文在对柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸发酵影响研究的基础上, 采用代谢流量分析方法, 定量研究了柠檬酸钠添加前后黄色短杆菌 XV0505 合成 *L*-缬氨酸代谢流量分布的变

收稿日期: 2009-08-04; 修回日期: 2009-12-23

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目 (08JCZDJ15400); 天津市科技支撑计划重点项目 (08ZCKFSH01900)

作者简介: 秦永锋 (1982—), 男, 山西吕梁人, 硕士研究生; 通信作者: 陈 宁, 教授, ningch@tust.edu.cn.

化,揭示了添加柠檬酸钠对主要代谢节点处代谢流量变化的影响机理,并与理论代谢流进行比较,以期为进行定向改造菌种和进一步提高 *L*-缬氨酸的得率提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌种

黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)XV0505 ($\text{Leu}^- + \text{Ile}^- + 2\text{-TA}^+ + \alpha\text{-AB}^+ + \text{SG}^+$),天津科技大学代谢工程研究室保藏菌种。

1.2 培养基

活化培养基(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉膏 10.0,酵母膏 5.0,氯化钠 2.5,琼脂条 25.0,葡萄糖 1.0, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa, 20 min。

种子培养基(g/L):葡萄糖 25.0,玉米浆 20 mL,豆饼水解液 15 mL,酵母粉 4.0,尿素 0.6, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, VB_1 0.3 mg,生物素 0.2 mg, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa, 20 min。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 80.0,玉米浆 20 mL,豆饼水解液 25 mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015, Ile 0.06, Leu 0.2, Met 0.5, VB_1 0.3 mg,生物素 0.2 mg, pH 7.0~7.2, 0.75 MPa, 20 min。

1.3 培养方法

斜面活化培养:32 °C培养 20 h。

摇瓶种子培养:接菌于装液量为 40 mL 的圆底摇瓶中,旋转式摇床 32 °C、200 r/min 振荡培养 15 h。

摇瓶发酵:装液量为 30 mL,接种量为 10%,旋转式摇床 32 °C、200 r/min 振荡培养 72 h。

种子培养:500 mL 挡板三角瓶装液量 50 mL,9 层纱布,旋转式摇床 180 r/min、32 °C 振荡培养 17 h。

5 L 发酵罐分批补料发酵:装液量 3 L,接种量 400 mL,32 °C,自动流加 25%氨水控制 pH 7.0,通风量为 3 L/min,搅拌转速依据溶氧所需设定,发酵到一定时间开始流加 80%葡萄糖溶液,发酵 60 h。

1.4 分析方法

菌体浓度测定:发酵液经蒸馏水稀释 20 倍后,用 V-1200 型分光光度计于 620 nm 下测定其吸光度。

发酵液中氨基酸含量测定:色谱分离柱 Agilent C₁₈ (3.5 μm , 150 mm \times 4.6 mm),进行柱前衍生测定,柱温 33 °C,检测波长 360 nm,流动相流量 1 mL/min。

有机酸测定:参见文献[4]。

残糖测定:采用 SBA-40C 生物传感仪测定。

1.5 *L*-缬氨酸生物合成代谢流平衡模型的建立

L-缬氨酸生物合成代谢流平衡模式及代谢流量的计算参见文献[5]。

2 结果与讨论

2.1 柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸发酵过程的影响

2.1.1 柠檬酸钠对菌体生长和 *L*-缬氨酸产量的影响

在 1 组摇瓶发酵培养基中添加 3.0 g/L 的柠檬酸钠,对照组不添加,每隔 4 h 取 3 个平行样,研究柠檬酸钠对菌体生长和 *L*-缬氨酸产量的影响。图 1 为柠檬酸钠添加前后菌体生长和 *L*-缬氨酸产量在各个时间段的对比。由图 1 可知,在发酵过程中,柠檬酸钠添加前后菌体浓度变化不大;且添加柠檬酸钠时,发酵 40 h 以后,*L*-缬氨酸产量明显高于未添加时。因此,添加柠檬酸钠可提高 *L*-缬氨酸产量,同时不影响菌体生长。

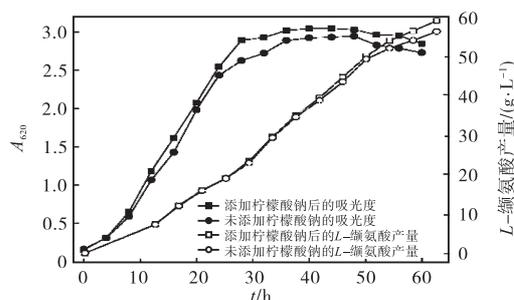


图 1 柠檬酸钠对菌体生长和 *L*-缬氨酸产量的影响

Fig.1 Effect of sodium citrate on the cell growth and *L*-valine production

2.1.2 柠檬酸钠添加量对 *L*-缬氨酸发酵的影响

分别在初始摇瓶发酵培养基中添加 1、2、3、4 g/L 的柠檬酸钠,发酵 12 h 后开始取样,测其 *L*-缬氨酸产量,其结果见图 2。由图 2 可知,添加 1 g/L 柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸产量的影响较小,添加 2、3、4 g/L 的柠檬酸钠对 *L*-缬氨酸产量差别不大,故本实验选择 2 g/L 为添加柠檬酸钠的量。

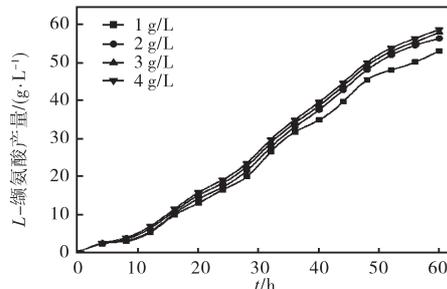


图 2 柠檬酸钠的添加量对 *L*-缬氨酸发酵的影响

Fig.2 Effect of different amounts of supplemented sodium citrate on *L*-valine fermentation

2.2 理想代谢流量分布

黄色短杆菌细胞内主要由 EMP 和 HMP 途径进入 TCA. 研究资料^[5]表明,在以葡萄糖为底物发酵时,乙醛酸循环并未出现,且 L-缬氨酸生产菌黄色短杆菌 XV0505 菌株是亮氨酸和异亮氨酸双重缺陷突变株,故代谢途径中无亮氨酸、异亮氨酸和乙醛酸循环.

以葡萄糖的摩尔消耗速率为 100,利用 MATLAB 软件线性规划法分析得到 L-缬氨酸生物合成的理想代谢流分布,结果如图 3 所示.由图 3 可知,L-缬氨酸理论摩尔得率为 85.71%,相应的质量转化率为 55.71%.

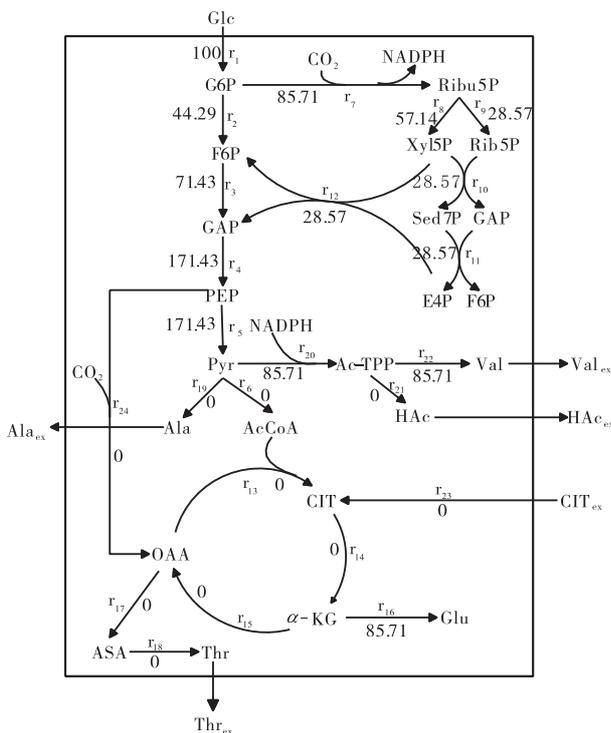


图 3 L-缬氨酸生物合成代谢网络

Fig.3 Biosynthesis metabolism pathway of L-valine

据报道^[6],EMP 途径的减弱,缓解了 EMP 途径和 TCA 循环之间存在的“碳源溢流”,可有效减少乙酸等有机酸的生成.在 L-缬氨酸合成的理想代谢流分布中,进入 EMP 和 HMP 途径的代谢流量分别为 44.29 和 85.7,且 HMP 途径代谢流量所占比例较大,同时副产物合成途径中的代谢流量为 0.可见减弱 EMP 途径代谢流,提高 HMP 途径代谢流有利于缓解过量碳的溢流,抑制杂酸和有机酸的生成,同时为 L-缬氨酸的积累提供更多的 NADPH,该推论与文献^[2]报道一致.

2.3 柠檬酸钠添加前后代谢流分析

黄色短杆菌 XV0505 合成 L-缬氨酸代谢网络的主要节点是 G6P·PEP·Pyr·α-KG^[5].生成 1 mol L-

缬氨酸需 2 mol 丙酮酸、1 mol NADPH(由 HMP 途径产生)和 1 mol 谷氨酸.在 L-缬氨酸发酵过程中,L-丙氨酸的含量能达到 10 g/L,可以通过减少主要副产物 L-丙氨酸合成的代谢流量,增加 NADPH 的量,以增加 L-缬氨酸生物合成途径中代谢流量.从代谢流分配角度来看,当 EMP 流量超过 TCA 和 L-缬氨酸生物合成途径的代谢能力时,就会出现过量碳的溢流,且会通过其他途径进行代谢以减缓持续的“溢流”,导致 L-丙氨酸和 HAc 等副产物的生成.因此分批补料发酵生成 L-缬氨酸的过程中,增强 HMP 途径代谢流量,控制 TCA 循环流量,降低 L-丙氨酸和 HAc 等副产物,以提高 L-缬氨酸得率.

在初始发酵培养基中添加或不添加 2.0 g/L 柠檬酸钠,分别对其发酵中后期进行代谢流量分析.由 5 L 发酵罐 L-缬氨酸的发酵数据得知,36 h 后菌体干重基本没有变化,说明发酵进入中后期.故本实验测定了 36~56 h 葡萄糖、3 种氨基酸(L-缬氨酸、L-丙氨酸、L-苏氨酸)和乙酸的含量,并对其变化速率和代谢流量进行计算,结果见表 1.

表 1 柠檬酸钠添加前后代谢产物变化速率及代谢流量
Tab.1 Variation rate and metabolic flux of metabolites with or with sodium citrate

代谢物	M _r	生成或消耗速率/(g·(L·h) ⁻¹)		代谢流量	
		不添加	添加	不添加	添加
柠檬酸钠	249	0.000	0.014	0.00	0.42
L-苏氨酸	119	0.024	0.023	0.73	0.67
L-丙氨酸	89	0.453	0.379	18.67	14.73
L-缬氨酸	117	1.321	1.550	41.42	45.87
乙酸	60	0.107	0.076	6.53	4.41
葡萄糖	180	4.900	5.200	100.00	100.00

利用 MATLAB 软件中的 Linprog 函数计算得到柠檬酸钠添加前后 L-缬氨酸发酵中后期的代谢流量分布,其结果如图 4 和图 5 所示.由图 4、5 可知,添加柠檬酸钠后生成 L-丙氨酸、HAc 和 L-苏氨酸的代谢流量分别降低了 21.10%、32.47%和 8.22%,均较未添加时有明显的减少.说明柠檬酸钠的添加可以有效地抑制副产物的积累,使得代谢流由丙酮酸节点进入 L-缬氨酸合成途径的量明显增加.

2.3.1 添加前后 PEP 节点代谢流分析

PEP 通过 CO₂ 固定反应生成 OAA(草酰乙酸),而 OAA 是合成 L-苏氨酸等杂酸的前体.从图 4、5 中得知,未添加柠檬酸钠时进入 CO₂ 固定反应的代谢流量为 0.73,添加后进入 CO₂ 固定反应的代谢流量为 0.25.由此可见,添加柠檬酸钠可以有效减少这一 TCA 循环的回补反应,以使更多的 PEP 参与 L-缬氨酸

酸的合成,同时减少 *L*-苏氨酸等杂酸积累,实验结果和推论与文献[5]报道一致.

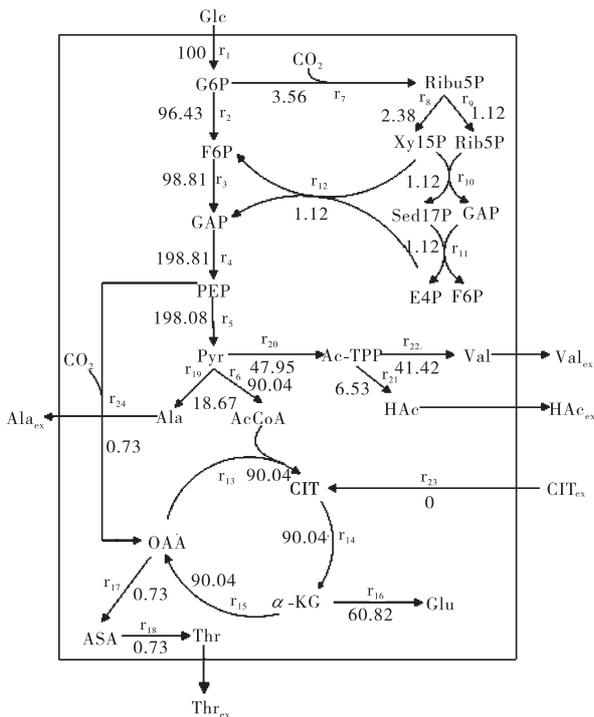


图4 未添加柠檬酸钠时 *L*-缬氨酸合成代谢流量分布

Fig.4 Metabolic flux distribution of *L*-valine fermentation without addition of sodium citrat

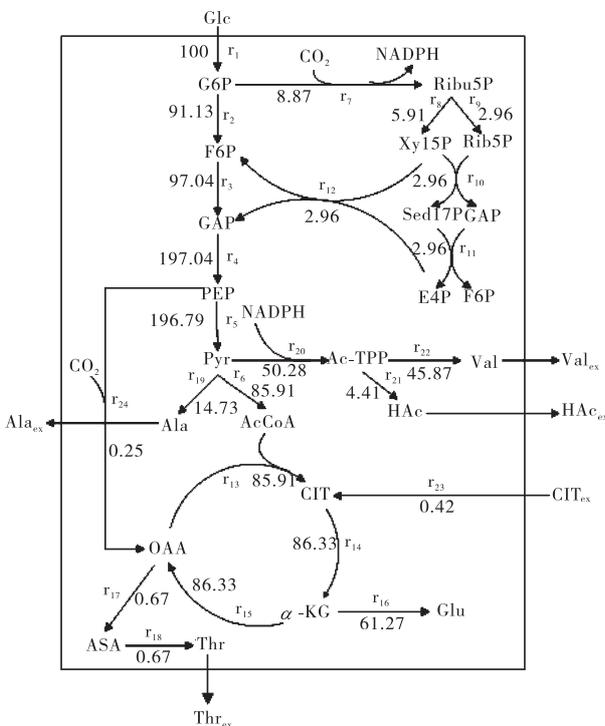


图5 添加 2.0 g/L 柠檬酸钠后 *L*-缬氨酸合成代谢流量分布

Fig.5 Metabolic flux distribution of *L*-valine fermentation with additon of sodium citrat

2.3.2 添加前后 Pyr 节点代谢流分析

丙酮酸是 *L*-缬氨酸合成的一个关键节点. 丙酮

酸是 *L*-缬氨酸生物合成的直接前体,同时副产物(*L*-丙氨酸和 HA_c)的合成和 TCA 均需要丙酮酸直接或间接参与. 由图 4、5 可知,添加柠檬酸钠时由 Pyr 生成 *L*-丙氨酸和 HA_c 的代谢流量分别减少了 3.94 和 2.12,同时进入 TCA 循环的代谢流量也减少了 4.13. 表明柠檬酸钠的添加缓解了 EMP 途径和 TCA 循环之间存在的“碳源溢流”,从而减少流向副产物(*L*-丙氨酸和 HA_c)的代谢流量. 另外,在添加柠檬酸钠时进入 *L*-缬氨酸合成途径的流量增至 45.87,较未添加时提高了 10.74%,但在理想代谢流中,该途径的流量为 85.71,说明 *L*-缬氨酸合成途径的流量仍未达到最佳,还可以增加,可通过克隆基因 *ilvBN*,使 *L*-缬氨酸合成途径中的关键酶乙酰乳酸合成酶过量表达,达到该途径代谢流量增加的目的,该推论与文献 [7-9]报道一致.

2.3.3 添加前后 α-KG 节点代谢流分析

α-KG 以谷氨酸脱氢酶作用生成谷氨酸或以氧化脱羧反应生成琥珀酰辅酶 A 进而合成 OAA,而 *L*-谷氨酸为生成 *L*-缬氨酸途径中的转氨作用提供氨基. 从图 4、5 可以看出,未添加柠檬酸钠时生成 *L*-谷氨酸和进入 TCA 循环的代谢流量分别是 60.82 和 90.04,在添加柠檬酸钠时生成 *L*-谷氨酸和继续进入 TCA 循环的代谢流量分别是 61.27 和 86.33. 上述结果表明,添加适量柠檬酸钠可以提高合成谷氨酸的代谢流量,该结论与文献[10]一致. 但在理想代谢流中,合成谷氨酸的代谢流量为 85.71,继续进入 TCA 循环的代谢流量为 0,说明在该节点处,代谢流分配仍未达到最佳,TCA 流量还可以减少,可以通过限量添加谷氨酸^[11]的形式达到 TCA 循环相对减少的目的.

3 结论

应用 MATLAB 线性规划获得 *L*-缬氨酸理想代谢流量分布,依据黄色短杆菌细胞内生成 *L*-缬氨酸的代谢网络及代谢流量分析方法,结合在未添加柠檬酸钠和添加柠檬酸钠时发酵中后期的胞外分泌产物情况,获得各自的代谢流量分布. 在初始发酵培养基中添加 2.0 g/L 柠檬酸钠,EMP 途径的代谢流量从 96.43 减少至 91.13,HMP 途径代谢流量从 3.56 增至 8.87,缓解了 EMP 途径和 TCA 循环之间存在的“碳源溢流”,从而减少流向副产物(*L*-丙氨酸和 HA_c)的代谢流量,而 *L*-缬氨酸生物合成途径的代谢流量较添加前提高了 10.74%. 而且可以通过克隆基因

(下转第 33 页)