



## 柠檬酸钠对 *L*-异亮氨酸发酵及代谢流量分布的影响

马 雷<sup>1,2</sup>, 程立坤<sup>2</sup>, 徐庆阳<sup>2</sup>, 陈 宁<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学电子信息与自动化学院, 天津 300222; 2. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 分析黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)中 *L*-异亮氨酸生物合成途径得知,添加柠檬酸钠利于 *L*-异亮氨酸发酵. 通过考察柠檬酸添加量对副产物含量、菌体生物量、菌体比生长速率及 *L*-异亮氨酸产量的影响,得出柠檬酸钠的最适添加量为 2.0 g/L. 应用代谢流分析方法研究了柠檬酸钠对 *L*-异亮氨酸发酵中后期细胞内代谢流分布的影响. 结果表明,在初始发酵培养基中添加 2.0 g/L 柠檬酸钠后,合成副产物的代谢流量明显减少,EMP 途径代谢流从 63.34 减弱至 46.54,而 *L*-异亮氨酸的生物合成代谢流增长至 23.28,较添加前提高了 5.91%,且产量提高了 7.87%. 因此,发酵过程中添加柠檬酸钠可有效减少副产物的生成,提高 *L*-异亮氨酸生物合成途径的代谢流量.

**关键词:** *L*-异亮氨酸; 柠檬酸钠; 黄色短杆菌; 代谢流分析

中图分类号: TQ922

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2010)03-0014-05

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

MA Lei<sup>1,2</sup>, CHENG Li-kun<sup>2</sup>, XU Qing-yang<sup>2</sup>, CHEN Ning<sup>2</sup>

(1. College of Electronic Information and Automation, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China;

2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The biosynthesis metabolism pathway of *L*-isoleucine in *Brevibacterium flavum* was analyzed, and the addition of sodium citrate was beneficial to *L*-isoleucine fermentation. The effects of sodium citrate on concentration of byproduct, biomass, specific growth rate and yield of *L*-isoleucine were studied. The optimal addition concentration of sodium citrate was 2.0 g/L. In order to study the effects of sodium citrate on the metabolic flux distributions in *Brevibacterium flavum* fermentation during the middle and late period, the metabolic flux analysis of the *L*-isoleucine production at pseudo steady state was conducted. The results show that the metabolic flux channeled to byproducts is decreased obviously when sodium citrate (2.0 g/L) is added to the fermentation medium. Moreover, with the addition of sodium citrate, the flux channeled to EMP decreases from 63.34 to 46.54. At the same time, the metabolic flux channeled to the *L*-isoleucine synthesis pathway increases 5.91% and becomes 23.28, and the yield of *L*-isoleucine increases 7.87%. All of these show that the addition of sodium citrate leads to the decrease of byproducts formation and strengthens the *L*-isoleucine biosynthesis.

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

*L*-异亮氨酸(Ile)是人体8种必需氨基酸之一,又是3种支链氨基酸之一,因其特殊的结构和功能而在人类生命代谢中具有特别重要的地位。*L*-异亮氨酸除用于一般营养型复合氨基酸输液,还大量用于配制治疗型特种氨基酸输液如肝安、肾安氨基酸输液,对治疗各种肝脏疾病具有显著疗效<sup>[1]</sup>。随着 *L*-异亮氨

酸市场需求量的增加,人们对发酵生产 *L*-异亮氨酸进行了深入研究. 代谢流分析(Metabolic Flux Analysis, MFA)定量地描述了代谢网络中各个支路的流量分配关系,有助于分析目的产物的合成过程的瓶颈,对于理解细胞的代谢调控机制有重要意义.

常高峰等<sup>[2]</sup>通过对黄色短杆菌生产 *L*-异亮氨酸

收稿日期: 2010-01-14; 修回日期: 2010-03-17

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划(08JCZDJC15400)

作者简介: 马 雷(1971—),男,天津人,副教授,博士研究生;通信作者: 陈 宁,教授,ningch@tust.edu.cn.

的发酵代谢分析得出,在L-异亮氨酸的发酵过程中有缬氨酸、丙氨酸、亮氨酸及乳酸等杂酸积累,副产物的生成造成了碳源的浪费.在生物合成过程中,当EMP途径通量超出TCA循环的代谢能力时,会使EMP途径生成的丙酮酸积累,则会导致酸及副产物的生成.有研究表明<sup>[3]</sup>,在发酵过程中添加柠檬酸钠,可适当减少EMP途径的代谢流量,降低副产物的生成.本文考察了添加不同浓度的柠檬酸钠对L-异亮氨酸发酵的影响,旨在确定柠檬酸钠最适的添加量;并采用代谢流分析方法,定量地描述了柠檬酸钠添加前后黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) WYJ1合成L-异亮氨酸代谢流的分布.这有利于采取相应措施,改造菌种及优化发酵过程控制,为进一步提高L-异亮氨酸的得率提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株与培养基

黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) WYJ1 (Met<sup>r</sup> + AEC<sup>r</sup> +  $\alpha$ -AB<sup>r</sup>) 为天津科技大学代谢工程研究室保藏菌种.

培养基组成参见文献[4].

#### 1.1.2 主要仪器

发酵罐(5 L、30 L全自动发酵罐),上海保兴生物设备工程有限公司;SBA-40C型生物传感仪,山东科学院生物研究所;pH电极和溶氧电极,Mettler Toledo;Agilent 1200型高效液相色谱仪,Agilent Technologies;DZF-6020型真空干燥箱,上海博迅实业有限公司;FA2204B型电子天平,上海精密科学仪器有限公司.

### 1.2 培养方法

斜面菌种活化培养:取斜面保藏菌种划线接种于活化斜面,31℃恒温培养24 h.

5 L种子罐培养:吸取适量无菌生理盐水于5支活化斜面中,将所有菌悬液接入5 L种子罐中.初始通气量1 L/min,搅拌转速300~600 r/min,通过自动流加氨水控制pH(7.0±0.2),培养温度31℃,以泡敌消泡,培养10 h后,按10%接种量接入发酵培养基中.

30 L发酵罐培养:按10%接种量将种子液接入30 L发酵罐中,初始通气量2 L/min,搅拌转速400~800 r/min,通过自动流加氨水控制pH(7.0±0.2),培养温度31℃,以泡敌消泡,发酵培养65 h.

### 1.3 分析方法

菌体生物量:菌体生物量以菌体干重(g/L)表示,

取10 mL发酵液,10 000 r/min离心20 min,将菌体用蒸馏水洗涤2次后置于真空干燥箱中,80℃干燥至恒质量,用分析天平称量.

溶氧及pH:在线测定.

葡萄糖和乳酸浓度:采用SBA-40C型生物传感仪测定.

L-异亮氨酸及其他氨基酸含量:L-异亮氨酸及其他氨基酸含量采用高效液相分析系统测定.色谱分离条件:Agilent C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm)为色谱分离柱,2,4-二硝基氟苯柱前衍生测定,乙腈与NaAc溶液进行梯度洗脱,流动相流量1 mL/min,检测波长360 nm.

## 1.4 数据处理

发酵过程中菌体比生长速率 $\mu$ 按照公式(1)计算:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

式中: $X$ 、 $x$ 均为菌体量; $t$ 为时间.用Origin绘图软件对实验数据进行微分计算,再用Excel软件求解不同时刻的 $\mu$ .

## 2 结果与分析

### 2.1 L-异亮氨酸生物合成途径分析

根据文献报道<sup>[5]</sup>,在黄色短杆菌中L-异亮氨酸生物合成的中心代谢途径包括EMP、TCA及HMP途径,而乙醛酸途径封闭或微弱.L-异亮氨酸生物合成的代谢网络如图1所示.由图1可知,由葡萄糖合成L-异亮氨酸的途径较长且复杂.王健等<sup>[6]</sup>通过对L-异亮氨酸的代谢途径分析得出:减弱TCA循环和乙醛酸支路,可以使更多的碳架流转向异亮氨酸的合成.并且宋文军等<sup>[7]</sup>研究表明,在L-异亮氨酸生物合成中,若TCA途径流量过大,会导致L-异亮氨酸的代谢流减少.故减弱TCA途径,可以提高发酵过程中L-异亮氨酸产酸水平.Majewski和Domach<sup>[8]</sup>用限制性网络分析和相关酶活相关联的代谢流,指出在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中EMP途径相对于TCA循环要过量,当EMP途径通量超出TCA循环的代谢能力时,致使EMP途径生成的丙酮酸积累,且会通过其他途径进行代谢以缓解持续的“溢流”,导致酸及副产物的生成.有研究表明<sup>[3]</sup>,在利用黄色短杆菌发酵生产L-亮氨酸过程中,当EMP途径流量超出TCA及L-亮氨酸生物合成的代谢能力时,丙酮酸代谢受阻,从而通过其他途径进一步代谢,导致副产物生成.因此,发酵生产L-异亮氨酸的过程中,减弱EMP

途径代谢流量,降低副产物的生成及控制 TCA 循环流量,是提高 *L*-异亮氨酸得率的关键. 刘新星等<sup>[9]</sup>通过研究柠檬酸钠对枯草芽孢杆菌生产肌苷的影响得出,添加柠檬酸钠可以显著降低丙酮酸激酶和磷酸果糖激酶的活力,从而减弱 EMP 途径通量. 同时,柠檬酸钠会竞争性抑制柠檬酸合成酶的活性. 因此,在 *L*-异亮氨酸发酵过程中添加柠檬酸钠,可有效减弱 EMP 途径及 TCA 循环的代谢流量.

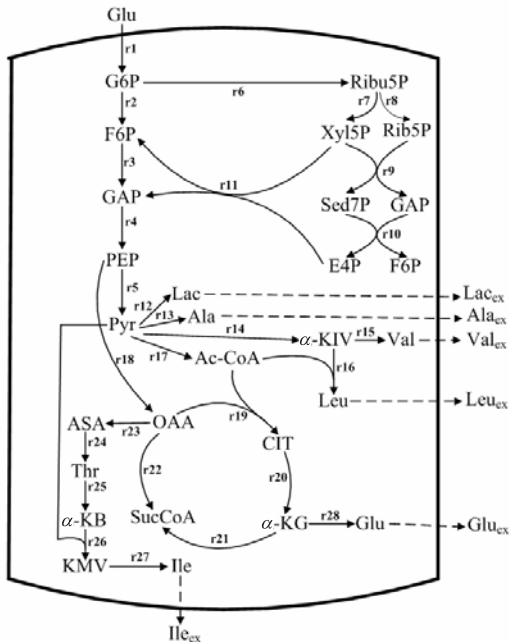


图1 黄色短杆菌 *L*-异亮氨酸生物合成代谢网络

Fig.1 Biosynthesis metabolism pathway of *L*-isoleucine in *Brevibacterium flavum*

### 2.2 柠檬酸钠对 *L*-异亮氨酸发酵的影响

#### 2.2.1 柠檬酸钠对发酵副产物的影响

宋翔等<sup>[10]</sup>研究表明,在谷氨酸发酵中添加柠檬酸钠可适当减少 EMP 途径的代谢流量,降低副产物乳酸、*L*-丙氨酸、*L*-赖氨酸的生成. *L*-异亮氨酸属天冬氨酸族,又是分支链氨基酸,其生物合成存在严格的细胞内反馈调节抑制,不可能过量积累,且复杂的调控机制使得 *L*-异亮氨酸发酵产物中存在有机酸及其他氨基酸等副产物. 发酵过程中副产物的生成造成了碳源的浪费及 *L*-异亮氨酸合成流量的减少. 因此,减少副产物的生成可有效提高 *L*-异亮氨酸产率. 分别向发酵培养基中添加 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0 g/L 的柠檬酸钠进行 *L*-异亮氨酸分批发酵,发酵过程中副产物含量如图 2 所示. 由图 2 可知,在 *L*-异亮氨酸发酵过程中添加柠檬酸钠可有效减少副产物的生成,且随着柠檬酸钠添加量的增加,副产物含量逐渐降低,但是降低幅度逐渐减小.

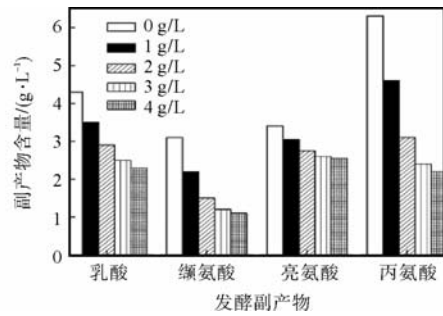
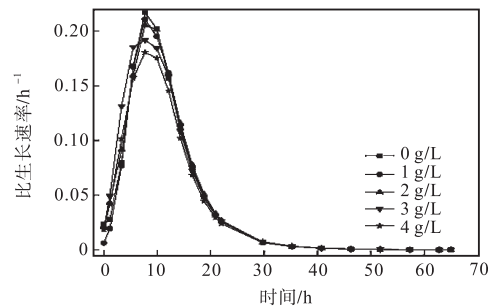


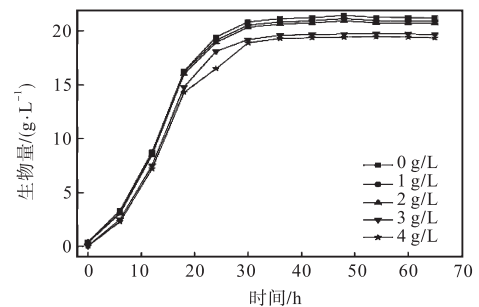
图2 柠檬酸钠对 *L*-异亮氨酸发酵副产物的影响  
Fig.2 Effect of sodium citrate on byproducts of *L*-isoleucine fermentation

#### 2.2.2 柠檬酸钠对菌体比生长速率及生物量的影响

柠檬酸钠对生物合成途径中关键酶如磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶及柠檬酸合成酶等存在抑制作用,则在发酵过程中添加柠檬酸钠会抑制菌体生长<sup>[9]</sup>. 在 *L*-异亮氨酸分批发酵中,柠檬酸钠对菌体生长的影响如图 3 所示.



(a) 比生长速率



(b) 生物量

图3 柠檬酸钠对菌体比生长速率及生物量的影响  
Fig.3 Effect of sodium citrate on the specific growth rate and biomass

由图 3 可知,柠檬酸钠添加量为 1.0、2.0 g/L 与未添加时,菌体比生长速率及生物量差异不大. 而添加量为 3.0 g/L 时,菌体比生长速率及生物量降低,且随着添加量的增加逐渐降低.

#### 2.2.3 柠檬酸钠对 *L*-异亮氨酸产量的影响

在发酵培养基中添加柠檬酸钠可减少副产物生成,即副产物的代谢流量减少可使 *L*-异亮氨酸的代

谢流量增加. 有研究表明<sup>[10]</sup>, 向L-谷氨酸发酵过程中添加柠檬酸钠, 可增加L-谷氨酸生物合成的代谢流, 提高L-谷氨酸产酸水平. 而谷氨酸是异亮氨酸合成的前体物, 则谷氨酸的增加利于L-异亮氨酸的合成. 发酵过程中添加柠檬酸钠对L-异亮氨酸产量的影响如图4所示.

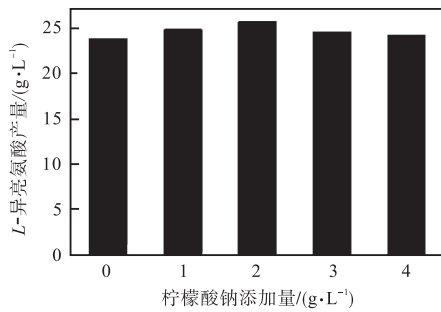


图4 柠檬酸钠对L-异亮氨酸产量的影响

Fig.4 Effect of sodium citrate on the yield of L-isoleucine

由图4可知, 当柠檬酸钠添加量为2.0 g/L时, 产酸

水平最高, 为25.63 g/L, 与未添加相比提高了7.87%. 但是柠檬酸钠添加量高于3.0 g/L时, L-异亮氨酸产酸水平逐渐下降, 这可能是柠檬酸钠对生物合成途径中关键酶的抑制作用造成的.

综上所述, 当柠檬酸钠添加量为2.0 g/L, 可有效减少发酵过程中副产物的生成, 且对L-异亮氨酸生产菌的生长影响较小, 同时使L-异亮氨酸的产量得到提高. 故在L-异亮氨酸发酵中, 柠檬酸钠的最适添加量为2.0 g/L.

### 2.3 柠檬酸钠添加前后代谢流量分析

在发酵培养基中添加或未添加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. 由图3可知, L-异亮氨酸发酵过程中36 h后菌体干重基本没有变化, 说明发酵进入中后期. 测定36~60 h葡萄糖、4种氨基酸(L-异亮氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-丙氨酸)和乳酸的含量, 并对其变化速率和代谢流进行计算, 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 without or with sodium citrate

代谢物	相对分子质量	生成或消耗速率/(g·(L·h) <sup>-1</sup> )		代谢流量	
		不添加	添加	不添加	添加
柠檬酸钠	249	0.000	0.088	0.00	5.40
L-异亮氨酸	131	0.830	0.920	21.98	23.28
L-缬氨酸	117	0.080	0.046	2.20	1.30
L-亮氨酸	113	0.086	0.071	2.10	1.80
L-丙氨酸	89	1.321	1.550	4.30	2.20
乳酸	90	0.107	0.076	1.14	1.04
葡萄糖	180	5.600	5.400	100.00	100.00

由表1可以看出, 添加柠檬酸钠后, 降低了副产物L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-丙氨酸及乳酸的代谢流量, 提高了L-异亮氨酸的代谢流量. 同时, 加入柠檬酸钠以后, 葡萄糖的消耗速率降低, 这与文献[9]所得出的结论“柠檬酸钠降低了枯草芽孢杆菌的耗糖速率”相一致. 但是, L-异亮氨酸的生成速率增加, 这说明加入柠檬酸钠可以提高L-异亮氨酸发酵中的糖酸转化率.

利用MATLAB软件中的Linprog函数计算得到柠檬酸钠添加前后L-异亮氨酸发酵中后期的代谢流量分布, 其结果分别如图5和图6所示.

由图5和图6可知, 添加柠檬酸后生成副产物Val、Leu、Ala及Lac的代谢流均有所降低, 分别降低了40.91%、14.26%、48.84%、8.78%. 而进入L-异亮氨酸生物合成途径的代谢流较未添加前提高了5.91%. 由于分支链氨基酸的合成需要谷氨酸提供氨基, 则谷氨

酸合成的代谢流量较大. 未添加柠檬酸钠时进入HMP、EMP的代谢流量分别为36.66、63.34, 添加后HMP途径的代谢流量为53.46, EMP代谢流量为46.54. 则可知, 添加柠檬酸钠可以减弱EMP途径代谢流量, 增加HMP途径代谢流量, 这与文献[3]报道的柠檬酸钠对产L-亮氨酸黄色短杆菌代谢流分布的影响作用一致. HMP途径的主要作用是L-异亮氨酸合成途径提供还原力NADPH. HMP途径流量增加, 从而还原力NADPH生成量增加, 有利于L-异亮氨酸的合成. 柠檬酸钠添加后, TCA循环的代谢流量有所降低, 由于柠檬酸钠合成酶是TCA循环的限速酶, 添加柠檬酸钠会对柠檬酸钠合成酶活性产生抑制作用. 因此, 在L-异亮氨酸发酵过程中添加柠檬酸钠, 可有效减弱EMP途径及TCA循环的代谢流量, 减少副产物的生成及提高L-异亮氨酸合成的代谢流量, 有利于L-异亮氨酸发酵.



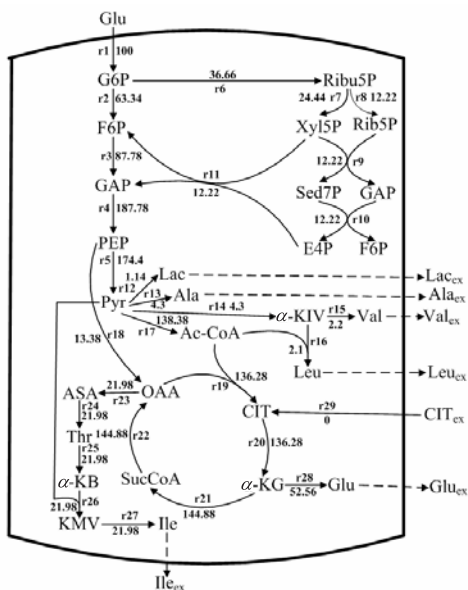


图5 未添加柠檬酸钠时 *L*-异亮氨酸合成代谢流量分布  
Fig.5 Metabolic flux distribution of *L*-isoleucine fermentation without addition of sodium citrate

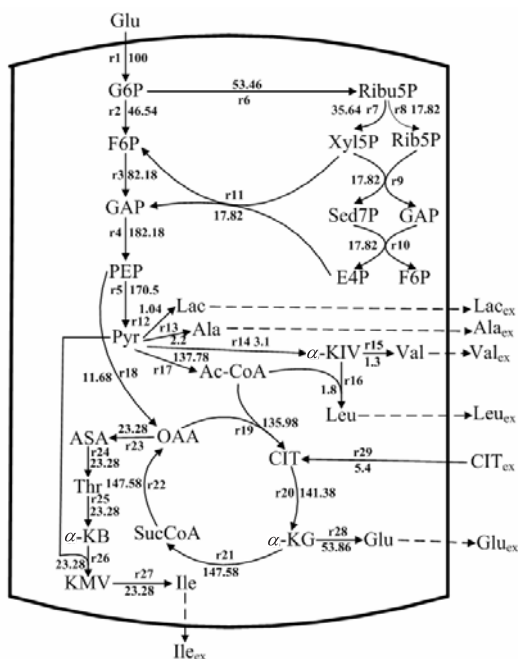


图6 添加柠檬酸钠后 *L*-异亮氨酸合成代谢流量分布  
Fig.6 Metabolic flux distribution of *L*-isoleucine fermentation with addition of sodium citrate

### 3 讨论

代谢网络是一个复杂的反应体系,要提高目的产物的产率,中心代谢途径与产物合成途径所组成的代谢网络的限速反应是关键. 王健等<sup>[6]</sup>对 *L*-异亮氨酸的代谢途径进行分析,通过对基本模型的分析,确定

了 *L*-异亮氨酸生物合成最优的代谢途径. 通过引导最优途径中各个关键酶成比例的过量表达,在不破坏整个代谢途径的情况下,可提高 *L*-异亮氨酸产率,防止碳源的浪费. 在代谢途径分析的指导下,通过优化培养基及控制工艺条件,使 *L*-异亮氨酸产酸水平得到提高. 经酶学性质研究表明<sup>[9]</sup>,柠檬酸钠的添加降低了 EMP 途径中关键酶 PFK 和 PK 的活力,从而引起糖酵解过程酶反应速率减慢,通量减少,同时 HMP 途径的关键酶 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活力有所增加. 则在 *L*-异亮氨酸发酵中添加柠檬酸钠可以减弱 EMP 途径,且可以增加还原力 NADPH 的供应,有利于提高 *L*-异亮氨酸的产率. 本文利用代谢流分析法分析 *L*-异亮氨酸发酵中后期的代谢流量分布,可为菌株构建及发酵工艺研究提供理论依据,对 *L*-异亮氨酸规模化生产有一定指导意义.

### 参考文献:

- [1] 宋文军,陈宁,魏春,等. 基于代谢流导向与分析的 *L*-异亮氨酸发酵条件优化[J]. 天津轻工业学院学报, 2003,18(2):15-19.
- [2] 常高峰,陈宁. *L*-异亮氨酸发酵代谢分析[J]. 生物技术通讯,2003,14(6):502-505.
- [3] 陈宁,刘辉. 柠檬酸钠对 *L*-亮氨酸发酵代谢流分布的影响[J]. 高校化学工程学报,2008,22(3):478-482.
- [4] 陈宁,常高峰,张克旭. *L*-异亮氨酸发酵培养基的响应面法优化[J]. 食品与发酵工业,2004,30(2):33-37.
- [5] Pharkya P, Burgard A P, Maranas C D. Exploring the overproduction of amino acid using the bilevel optimization framework opt knock[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84(7):887-899.
- [6] 王健,王志诚,田梁迺霞,等. 产生 *L*-异亮氨酸的黄色短杆菌的代谢途径分析[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4):593-596.
- [7] 宋文军,张克旭,张坤生,等. 不同供氧条件对 *L*-异亮氨酸合成代谢流的影响[J]. 中国食品学报, 2003, 3(1):1-6.
- [8] Majewski R A, Domach M M. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1990, 35(7):732-738.
- [9] 刘新星,陈双喜,储炬,等. 柠檬酸钠对枯草芽孢杆菌生长代谢及肌昔积累的影响[J]. 微生物学报, 2004, 44(5):627-630.
- [10] 宋翔,谢希贤,徐庆阳,等. 柠檬酸钠对 *L*-谷氨酸发酵代谢流迁移的影响[J]. 天津科技大学学报, 2009, 24(2):5-8.