



## 柠檬酸钠对 *L*-谷氨酸发酵代谢流迁移的影响

宋翔, 谢希贤, 徐庆阳, 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:** 为更全面深入地理解细胞内谷氨酸代谢的调控机制,以黄色短杆菌 GDK-9 为供试菌株,应用 MATLAB 软件和代谢流分析方法,定量研究了添加柠檬酸钠后 *L*-谷氨酸发酵中后期胞内的代谢流迁移. 在 *L*-谷氨酸发酵中后期添加 3.0 g/L 柠檬酸钠后,合成副产物 *L*-丙氨酸和乳酸的代谢流量明显减少,分别降低了 18.7%和 27.4%,EMP 途径和乙醛酸循环的代谢流分别减少了 0.88 和 2.12,HMP 途径的代谢流增加了 0.88,而 *L*-谷氨酸生物合成的代谢流从 73.59 增长至 76.47,较未添加前提高了 3.9%. 添加柠檬酸钠能使关键节点发生代谢流迁移,提高 *L*-谷氨酸合成中心代谢途径的代谢流量.

**关键词:** *L*-谷氨酸; 代谢流分析; 线性规划; 黄色短杆菌

中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)02-0005-04

## Effects of Sodium Citrate on Metabolic Flux Transfer of *L*-glutamic Acid Fermentation

SONG Xiang, XIE Xi-xian, XU Qing-yang, 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 understand the regulate mechanism of *L*-glutamic acid metabolism, the metabolic flux transfer during the middle and late period of fermentation with the addition of sodium citrate was studied using MATLAB software with *Brevibacterium flavum* GDK-9 as the test strain. When 3.0 g/L sodium citrate was added to the fermentation medium, the formation of byproducts, such as *L*-ala and Lac, decreased by 18.7% and 27.4%, respectively. At the same time, the flux channeled to EMP and glyoxyl circle decreased by 0.88 and 2.12, respectively, however, the flux channeled to HMP increased by 0.88. The metabolic flux channeled to the *L*-glutamic acid synthesis pathway increased by 3.9% (from 73.59 to 76.47). All of these showed that the addition of sodium citrate could change the metabolic flux distributions of the key nodes and strengthen the *L*-glutamic acid biosynthesis.

**Keywords:** *L*-glutamic acid; metabolic flux analysis; linear program; *Brevibacterium flavum*

*L*-谷氨酸在医药、食品、化妆品工业、农业及人造制革等领域中有着广泛应用. 针对目前我国整个氨基酸生产行业产酸水平和糖酸转化率与国际同行业先进水平(尤其是日本)尚有不小差距的现状<sup>[1-2]</sup>,有必要应用代谢工程等先进方法改造生产菌株并优化发酵过程控制工艺. 代谢流分析(Metabolic Flux Analysis, MFA)作为代谢网络定量分析的重要手段之

一,对于理解细胞谷氨酸代谢的调控机制具有十分重要的意义<sup>[3-5]</sup>. 已有基于途径分析和代谢流量分析的 *L*-谷氨酸发酵过程优化方面的相关研究<sup>[6-7]</sup>,但目前尚未有黄色短杆菌合成 *L*-谷氨酸过程中添加某物质引起代谢流迁移的相关报道. 本文旨在定量研究添加柠檬酸钠后 *L*-谷氨酸发酵中后期胞内的代谢流迁移,确定关键节点处代谢流量的分配变化对 *L*-谷氨

收稿日期: 2008-10-22; 修回日期: 2008-12-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863项目”(2006AA020301); 天津科技大学引进人才科研启动基金资助项目(20070441)

作者简介: 宋翔(1984—),男,山西太原人,硕士研究生.

酸生物合成的影响. 这对于进一步改造生产菌株, 优化发酵控制工艺, 提高 *L*-谷氨酸的糖酸转化率及产酸水平具有重要的指导意义.

### 1 材料与方

#### 1.1 菌种

黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) GDK-9, 天津科技大学代谢工程研究室保藏菌株.

#### 1.2 培养基与培养方法

培养基成分参见文献[6].

斜面活化培养: 32 °C 培养 20~24 h.

种子培养: 500 mL 三角瓶中装液量 20 mL, 9 层纱布封口, 于旋转式摇床上 32 °C、200 r/min 振荡培养 8~10 h.

10 L 罐发酵: 装液量 6 L, 接种量 600 mL, 34~39 °C, 通风比 1 : 1, 自动流加氨水控制 pH 7.0, 通过流加泡敌消泡, 搅拌转速依据所需设定, 发酵到一定时间开始流加 80% 葡萄糖补料液, 发酵 36 h.

#### 1.3 分析方法<sup>[6]</sup>

发酵液中氨基酸含量的测定: 采用 Elite-AAA 氨基酸分析仪进行柱前衍生测定 (色谱分离条件: 柱温 33 °C; 检测波长 360 nm; 流动相总流量 1 mL/min).

残糖、谷氨酸和乳酸的测定: 采用 SBA-40 C 生物传感仪测定.

#### 1.4 谷氨酸生物合成代谢流平衡模型的建立方法

谷氨酸生物合成代谢流平衡模型的建立见参考文献[6]. *L*-谷氨酸生物合成的代谢网络如图 1 所示.

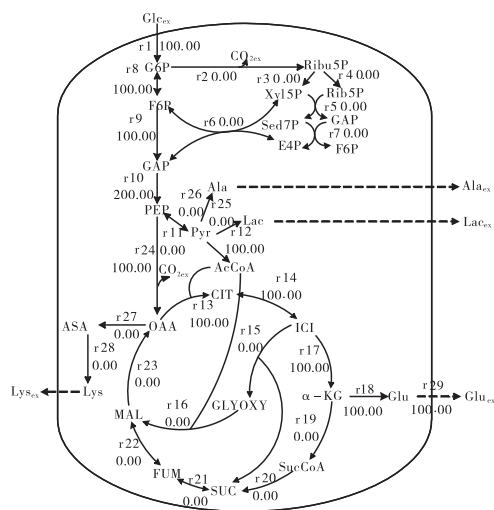


图 1 *L*-谷氨酸生物合成代谢网络及理想代谢流分布

Fig.1 Biosynthesis metabolism and ideal metabolic flux distribution of *L*-glutamic acid ermentation

## 2 结果与讨论

### 2.1 理想代谢流量分布

在前期研究工作<sup>[7]</sup>中, 已运用基元模型分析方法对 *L*-谷氨酸发酵过程进行了途径分析, 得到了 *L*-谷氨酸合成的理想代谢途径. 本文将计算出的 *L*-谷氨酸合成理想代谢流分布结果绘制成图 1. 由图 1 可知, 在理想代谢途径中, *L*-谷氨酸的最大理论摩尔得率为 100%, 而其相应的质量得率为 81.7%.

在 *L*-谷氨酸合成的理想代谢途径中, 丙酮酸向丙氨酸和乳酸转化的酶活性完全丧失, 反应完全被阻断, 这样可以使代谢流最大限度地流向合成 *L*-谷氨酸的方向. 因此, 丙酮酸是 *L*-谷氨酸合成的关键节点.

异柠檬酸既是 *L*-谷氨酸合成的直接前体, 亦是 *L*-谷氨酸合成的关键节点. 异柠檬酸合成所需的草酰乙酸是由乙醛酸循环和 CO<sub>2</sub> 固定反应所提供的. 而异柠檬酸本身又是从 TCA 循环转向乙醛酸循环的入口代谢物, 故异柠檬酸作为 *L*-谷氨酸合成的关键节点, 有着调节和平衡 TCA 循环与乙醛酸循环间流量分配比例的关键作用.

### 2.2 添加柠檬酸钠前后的代谢流迁移

6-磷酸葡萄糖、丙酮酸和异柠檬酸是黄色短杆菌 GDK-9 合成 *L*-谷氨酸代谢网络的关键节点. 当 EMP 途径的流量超过 TCA 循环的代谢能力时, 丙酮酸的进一步代谢受阻, 故通过其他途径进行代谢, 进而导致乳酸、*L*-丙氨酸等副产物的生成, 造成碳架的浪费. 因此, 在补料分批发酵生产 *L*-谷氨酸的过程中, 适当减少 EMP 途径的代谢流量, 降低副产物乳酸、*L*-丙氨酸、*L*-赖氨酸等的生成, 以及控制乙醛酸循环和 TCA 循环间的流量分配, 是提高 *L*-谷氨酸发酵产酸率和糖酸转化率的关键.

有关研究<sup>[8-9]</sup>表明, 添加柠檬酸钠能够使枯草芽孢杆菌代谢途径中磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的活力显著降低. 另有文献<sup>[10-11]</sup>报道, 有机酸等副产物的合成会受到葡萄糖和柠檬酸联合代谢的阻遏, 并由于葡萄糖的限制供应而相应减少.

本文拟对细胞的整体代谢网络进行代谢网络定量分析, 并以此为着手点, 着重对添加柠檬酸钠前后 *L*-谷氨酸生物合成中的关键节点所发生的代谢流迁移进行分析, 以期找到菌种改造和发酵过程控制优化的新突破点, 以实现 *L*-谷氨酸生物合成代谢流的进一步强化, 从而使 *L*-谷氨酸发酵产酸水平及糖酸转化率得以大幅度提高.

在发酵培养基中不添加或添加 3.0 g/L 柠檬酸钠,分别对其发酵中后期进行代谢流分析,并对其代谢流迁移进行研究.测定发酵中后期葡萄糖、3种氨基酸(L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-赖氨酸)和乳酸的产量,并对其变化速率及代谢流量进行计算,结果分别见表1、表2.运用MATLAB软件通过线性规划计算得到柠檬酸钠添加前后L-谷氨酸发酵中后期的代谢流分布,结果分别见图2、图3.由此可见,添加3.0 g/L

柠檬酸钠后生成L-丙氨酸的代谢流(r26)降低了18.7%,生成乳酸的代谢流(r25)降低了27.4%,生成L-赖氨酸的代谢流(r28)降低了12.9%,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限制葡萄糖的供应,且其与葡萄糖的联合代谢阻遏了副产物乳酸、L-丙氨酸和L-赖氨酸的生成和积累,使得由丙酮酸节点流向L-谷氨酸生物合成途径的代谢流明显增加,从而利于L-谷氨酸的大量积累.

表1 添加柠檬酸钠前后代谢产物的产量

Tab.1 Concentration of metabolites with or without sodium citrate

柠檬酸钠/(g·L <sup>-1</sup> )	时间/h	产量/(g·L <sup>-1</sup> )				
		葡萄糖	L-丙氨酸	乳酸	L-赖氨酸	L-谷氨酸
0.0	16	7	1.7	0.9	0.3	42
	32	10	2.3	3.6	1.3	122
3.0	16	8	1.3	0.6	0.2	46
	32	11	1.8	2.6	1.1	131

表2 添加柠檬酸钠前后代谢产物变化速率及代谢流量

Tab.2 Variation rate and metabolic flux of metabolites with or without sodium citrate

代谢物	M <sub>r</sub>	质量积累速率/(g/(L·h))		摩尔积累速率/(mol/(L·h))		代谢流量	
		不添加	添加	不添加	添加	不添加	添加
葡萄糖	180	8.3	8.5	0.046 11	0.047 22	100	100
L-丙氨酸	89.1	0.037 5	0.031 25	0.000 421	0.000 35	0.911	0.741
乳酸	90	0.169	0.125	0.001 88	0.001 39	4.05	2.944
L-赖氨酸	146.19	0.062 5	0.056 25	0.000 428	0.000 38	0.926	0.805
L-谷氨酸	147.13	5.0	5.312 5	0.033 98	0.036 11	73.59	76.47

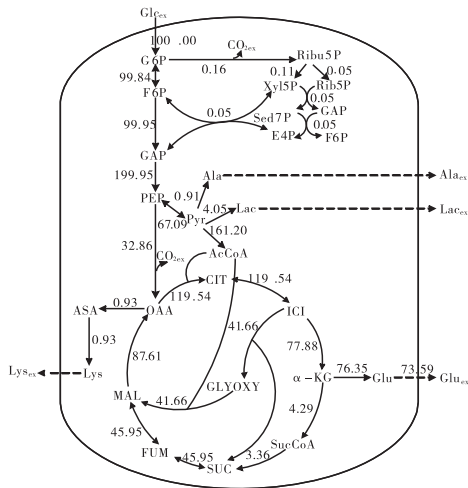


图2 未添加柠檬酸钠的L-谷氨酸合成代谢流分布  
Fig.2 Metabolic flux distribution of L-glutamic acid fermentation without sodium citrate

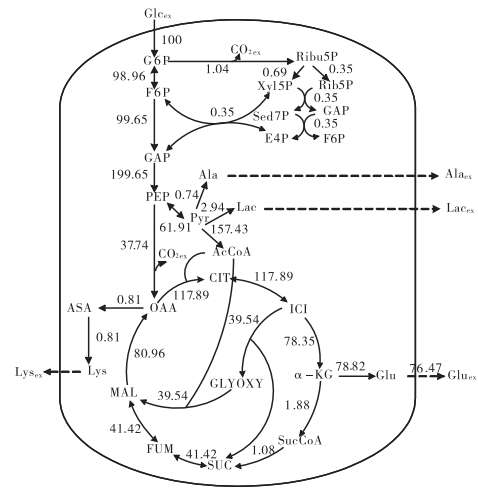


图3 添加柠檬酸钠后L-谷氨酸合成代谢流分布  
Fig.3 Metabolic flux distribution of L-glutamic acid fermentation with sodium citrate

2.3 添加柠檬酸钠前后 G6P 节点代谢流量变化

由图2、图3可知,未添加柠檬酸钠时,进入EMP的代谢流为99.84,进入HMP途径的代谢流为0.16.添加3.0 g/L柠檬酸钠后,进入EMP的代谢流为

98.96,进入HMP途径的代谢流为1.04.由此可知,添加柠檬酸钠可以增加HMP途径代谢流量,减弱EMP途径代谢流量,这与文献报道的枯草芽孢杆菌代谢流分布受柠檬酸钠的影响一致<sup>[12]</sup>.丙酮酸激酶

和磷酸果糖激酶作为 EMP 途径中的关键酶,同时受到了柠檬酸的强烈抑制作用. 而 EMP 途径向 HMP 途径发生的代谢流迁移,使 HMP 途径的流量增加,从而增加了作为 L-谷氨酸合成中心代谢途径中关键反应所需还原力的 NADPH 的量,从而使更多的代谢流流向 L-谷氨酸.

#### 2.4 添加柠檬酸钠前后 ICT 节点代谢流量变化

异柠檬酸是 L-谷氨酸生成途径中的关键节点,亦是 L-谷氨酸生物合成的直接前体. 由图 2、图 3 可知,未添加柠檬酸钠时进入乙醛酸循环的代谢流为 41.66,而继续进入 TCA 循环的代谢流为 77.88. 添加 3.0 g/L 柠檬酸钠后,进入乙醛酸循环的代谢流为 39.54,而继续进入 TCA 循环的代谢流为 78.35. 由此可见,柠檬酸钠的添加使一部分乙醛酸循环的代谢流向着继续 TCA 循环的方向迁移,使异柠檬酸更多地生成  $\alpha$ -KG,进而更多地生成 L-谷氨酸,而非合成乙醛酸和琥珀酸.

#### 2.5 添加柠檬酸钠前后 Pyr 节点代谢流量变化

丙酮酸也是 L-谷氨酸生成途径中的关键节点. TCA 循环以及有机酸、氨基酸的合成都需要丙酮酸的直接或间接参与. 由图 2、图 3 可知,未添加柠檬酸钠时,由 Pyr 生成乳酸和 L-丙氨酸的代谢流分别为 4.05 和 0.91. 在添加柠檬酸钠后,由 Pyr 生成乳酸和 L-丙氨酸的代谢流分别为 2.94 和 0.74. 柠檬酸钠的添加减弱了 EMP 途径,缓解了 EMP 途径和 TCA 循环之间存在的“碳源溢流”<sup>[13]</sup>,从而减少流向副产物(乳酸和 L-丙氨酸)代谢流并向 L-谷氨酸合成途径发生代谢流迁移. 另外,柠檬酸钠的添加会对作为 TCA 循环限速酶的柠檬酸合成酶的活性产生竞争性抑制,限制 TCA 循环的代谢流量,减少 CO<sub>2</sub> 的生成,避免碳架的大量浪费.

### 3 结 语

应用代谢流分析技术定量研究了添加适量柠檬酸钠对 L-谷氨酸发酵过程中后期细胞内代谢流迁移的影响. 柠檬酸钠的添加使合成副产物 L-丙氨酸、乳酸、L-赖氨酸的代谢流量分别减少了 18.7%、27.4%、12.9%,EMP 途径和乙醛酸循环的代谢流分别减少了 0.88 和 2.12,HMP 途径的代谢流增加了 0.88,而 L-

谷氨酸生物合成的代谢流从 73.59 增长至 76.47,较未添加前提高了 3.9%.

#### 参考文献:

- [1] 张蓓. 代谢工程[M]. 天津:天津大学出版社,2003:149-154.
- [2] 陈宁. 氨基酸工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:77-83.
- [3] Schuster S,Klamt S,Weckwerth W,et al. Use of network analysis of metabolic systems in bioengineering [J]. Bioprocess Biosys Eng,2002,24:363-372.
- [4] Goel A,Ferrance J,Jeong J, et al. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnol Bioeng,1993,42(4):686-696.
- [5] Vallino J J,Stephanopoulos G. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction [J]. Biotechnol Bioeng,1993,41(6):633-646.
- [6] 杜军,陈宁,刘辉,等. 基于代谢流量分析的 L-谷氨酸发酵过程优化[J]. 中国食品学报,2008,8(2):30-35.
- [7] 杜军,刘辉,徐庆阳,等. 基于途径分析的 L-谷氨酸发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业,2007,33(11):9-12.
- [8] 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):478-483.
- [9] 刘新星,陈双喜,储炬,等. 柠檬酸钠对枯草杆菌生长代谢及肌苷积累的影响[J]. 微生物学报,2004,44(5):627-630.
- [10] Goel A,Jinwoon L,Domach M M,et al. Metabolic fluxes,pool and enzyme measurements suggest a tighter coupling of energetics and biosynthetic reactions associated with reduced pyruvate kinase flux[J]. Biotechnol Bioeng,1999,64(2):129-134.
- [11] 唐军,蔡水洪,叶勤. 克鲁斯假丝酵母分批发酵生产甘油的代谢流分布[J]. 高校化学工程学报,2002,16(1):58-63.
- [12] 陈双喜,黄明志,储炬,等. 柠檬酸钠对肌苷发酵过程代谢流分布的调节[J]. 化工学报,2005,56(9):1731-1737.
- [13] Majewski R A,Domach M M. Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli* [J]. Biotechnol Bioeng,1990,35(7):732-738.