



细菌纤维素生物合成网络的构建及代谢通量分析

李飞¹, 谢中华², 汤卫华¹, 贾士儒¹

(1. 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;
2. 天津科技大学理学院, 天津 300457)

摘要: 构建了木醋杆菌合成细菌纤维素(Bacterial Cellulose,简称 BC)的代谢网络. 基于流量平衡模型,通过物料衡算和 Lingo 线性规划,得到发酵前期和后期 BC 合成的代谢通量分布. 代谢通量分析结果表明,葡萄糖进入磷酸戊糖途径(PPP)和三羧酸(TCA)循环,前期菌体大量合成,BC 产量较高;后期形成大量无效循环,BC 产量降低. 由于部分代谢流向副产物和无效循环,减少了合成 BC 的代谢流,造成了碳源的浪费,所以需通过遗传改造、诱变或改变发酵条件等方法,减少副产物生成,提高 BC 的产率.

关键词: 细菌纤维素; 代谢通量分析; 线性规划

中图分类号: Q591.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)03-0006-04

Construction of the Bacterial Cellulose Biosynthesis Network and Metabolic Flux Analysis

LI Fei¹, XIE Zhong-hua², TANG Wei-hua¹, JIA Shi-ru¹

(1. Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The metabolic network of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose(abbr. BC)biosynthesis was constructed. Based on the metabolic flux balance model, the metabolic flux distribution of BC synthesis was calculated by material balances and linear programming(Lingo). The results of metabolic flux analysis indicate that the glucose enters PPP and TCA cycle. In fermentation earlier stage, the biomass are synthesized and BC has a high yield; while in the later stage, a quantity of futile cycles appears and BC yield decreases. The metabolic fluxes entering the by-product and futile cycle result in the waste of carbon source. Therefore, it is necessary to use the genetic manipulation, mutation or change fermentation condition to reduce the by-product formation and improve BC yield.

Keywords: bacterial cellulose(BC); metabolic flux analysis(MFA); linear programming

近年来,细菌纤维素被应用于医学材料等方面,国内外均有相关报道^[1-2],然而,要实现工业化生产和应用主要在于合成生物量的提高. 代谢工程概念的出现,为分析细菌纤维素生物合成代谢途径以及了解特定条件下细胞代谢行为提供了理论基础,便于利用基因工程或物理、化学诱变的方法对代谢网络进行有目的地修饰^[3],促使基本代谢途径适合特定代谢物的生产. 近期关于细菌纤维素生产菌木醋杆菌(*Aceto-*

bacter xylinum)代谢方面的报道较少,仅有 Hugo-Velasco-Bedrán 和 Felipe López-Isunza^[4]关于木醋杆菌代谢的简单分析,但未将菌体合成对代谢通量的影响考虑在内. 故本研究根据物料平衡、已知代谢途径以及菌体合成前体物需求,利用 Lingo 软件进行线性规划,计算并对比了木醋杆菌发酵前期和后期的代谢通量分布,以期对高产细菌纤维素菌种的选育及发酵控制提供理论指导.

收稿日期: 2008-10-23; 修回日期: 2008-12-15

基金项目: 973项目(2007CB714305); 天津科技大学引进人才基金资助项目(20070443)

作者简介: 李飞(1983—),男,天津人,硕士研究生, nisida2888@yahoo.com.cn.

1 材料与方法

1.1 菌株

木醋杆菌 (*A.xylinum*) TCCC 12003, 由天津科技大学工业微生物菌种保藏室保藏.

1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 蛋白胨 5, 酵母粉 5, 柠檬酸 1, 葡萄糖 20, Na_2HPO_4 5, pH 6.0, 121 °C 灭菌 20 min.

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 25, Na_2HPO_4 3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, 乙醇 10, 乙酸 1, 对氨基苯甲酸 0.015, pH 6.0, 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 培养方法

取一环经活化的斜面种子接入液体培养基, 30 °C、160 r/min 振荡培养 24 h, 作为种子. 以 8% 的接种量接种到液体培养基, 接种时需充分振荡, 以使菌液均匀, 30 °C 恒温静置培养 8 d.

1.4 分析方法

1.4.1 残糖的测定

通过 SBA-40C 型生物传感分析仪对发酵液中的葡萄糖浓度进行测定.

1.4.2 菌体量的测定

用 0.85% 的生理盐水配制 pH 4.6 ~ 4.8 的 0.1 mol/L 的醋酸钾-醋酸缓冲溶液 100 mL, 取纤维素酶 2 g 放入缓冲溶液中活化, 置冰箱备用. 测定时, 每次取已活化的纤维素酶溶液 2 mL 在 50 °C、pH 5.0 条件下充分水解 2 h. 取水解液 10 mL, 适当稀释后, 于波长 600 nm 下测吸光度. 再取水解液 10 mL, 使用蒸馏水多次洗涤、离心, 弃上清液, 剩余物 80 °C 烘干至恒重, 称量并记录^[5].

1.4.3 细菌纤维素的测定

恒温静置培养 6 d 后生成的细菌纤维素膜浮于液面. 膜取出后用水多次冲洗, 除去膜表面培养基及杂质. 再将膜浸泡于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 100 °C 煮沸 20 min, 去除液膜中的菌体和残留培养基, 膜呈乳白色半透明; 然后用蒸馏水多次冲洗, 用 pH 试纸轻压膜测 pH, 约 7.2; 80 °C 干燥至恒重, 称重并记录.

纤维素的产量 = 纤维素质量 / 培养基体积

1.4.4 乙酸的测定

乙酸使用 HPLC 检测. 色谱条件: 反相 C_{18} (250 mm × 4.6 mm); 流动相 0.05 mol/L KH_2PO_4 ; 流量 1 mL/min; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μL .

2 木醋杆菌合成细菌纤维素的代谢流平衡模型的建立

2.1 代谢通量分析的计算方法

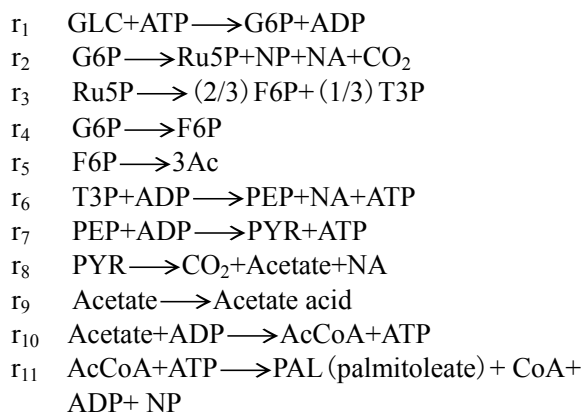
代谢通量计算采用 Joseph J. Vallino 的方法^[6], 以拟稳态假设为基础, 假设细胞内的中间代谢物均处于拟稳态, 即其浓度变化速率为 0. 本文通过测定发酵液中胞外代谢产物的浓度, 结合生化反应途径, 估算出胞内的代谢通量分布.

2.2 木醋杆菌合成细菌纤维素代谢网络的构建

在木醋杆菌的代谢途径中, 缺乏 EMP 途径的关键酶 6-磷酸果糖激酶 (PFK) 或 PFK 的活性很低. 其糖类分解代谢可能以 PPP 为主, 并通过 TCA 产能, 故 PPP 在构建细菌纤维素生物合成途径中应保留. 将菌体合成网络简化为对中心代谢系统中的前体物以及能量和还原力的需求速率, 可以通过实验测定出细胞的蛋白质、核酸、脂类及多糖等大分子含量, 再测定其中的单体如氨基酸、核苷酸等的组成, 就可求得合成菌体对各前体物的需求系数, 得到较完整的细胞代谢平衡矩阵.

为了降低代谢网络的复杂性和减少代谢通量平衡方程的数目, 构建木醋杆菌代谢网络时作了以下假设和简化: PPP 和 TCA 循环中的异柠檬酸脱氢酶反应是产生 NADPH 的主要途径, 产生的 NADPH 全部用于生物氧化; 为减少代谢网络中的反应数目, 将直线性反应 (无代谢分支的反应) 归为一个代谢库 (Metabolic Pool); 对于相互转化的两种物质 A 和 B (没有第三种物质参与) 模型中用一种物质 C 表示, 例如 DHAP 和 G3P 用 T3P 表示. 由于在木醋杆菌中 PFK 缺乏或 PFK 活性很低, 在构建代谢网络时不考虑 $\text{F6P} \rightarrow \text{T3P}$ 反应.

由上述分析可得到细菌纤维素生物合成的代谢网络 (见图 1) 和以下各步反应化学计量方程式:



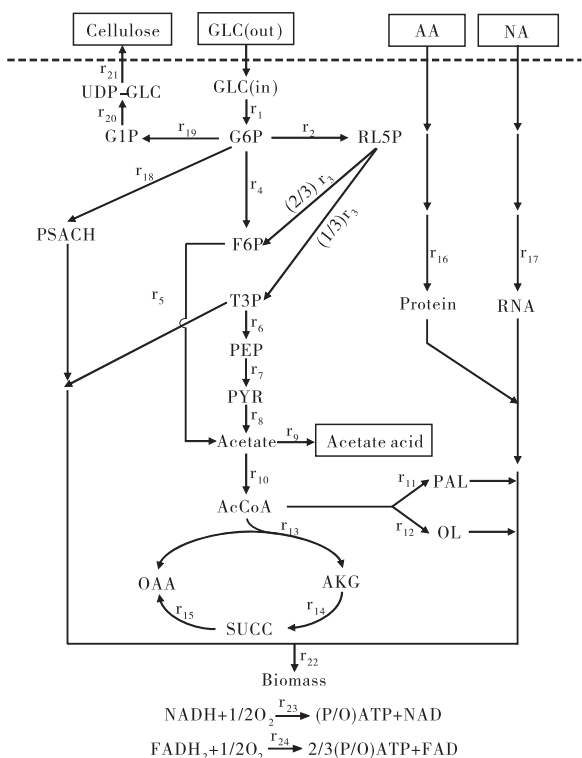
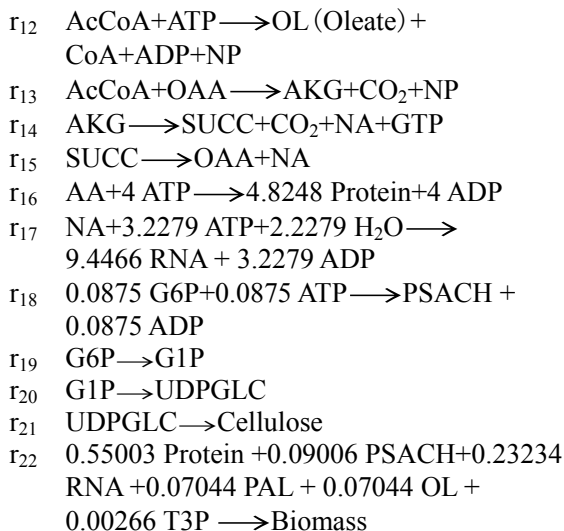


图1 细菌纤维素生物合成的代谢网络

Fig.1 Metabolic network of BC biosynthesis

代谢网络中的每一个组分都符合质量守恒定律. 采用代谢通量分析(MFA)计算通量, 必须对系统作拟稳态假设, 即假设胞内中间代谢产物均处于拟稳态. 矩阵中未知数有 24 个, 方程数为 20 个, 方程自由度为 24-20=4, 即需测定 4 个速率(见表 1)可确定代谢网络中的代谢通量分布.

表 1 发酵过程主要参数

Tab.1 Main parameters during the fermentation mmol/(g·h)

发酵过程	葡萄糖(r_1)	细菌纤维素(r_{21})	生物量(r_{22})	醋酸(r_9)
前期	10	1.83	1.560	0.073
后期	4	0.30	0.076	0.300

3 结果与讨论

3.1 代谢通量计算

葡萄糖摄入量以 100 计, 利用 Lingo 进行线性规划, 分别计算出细菌纤维素发酵前期和后期的代谢通量分布, 结果见表 2.

表 2 细菌纤维素生物合成的代谢通量分布

Tab.2 Metabolic flux distribution of BC biosynthesis

反应	前期	后期	反应	前期	后期
1	100.00	100.00	13	77.30	84.56
2	80.30	92.33	14	77.30	84.56
3	80.30	92.33	15	77.30	84.56
4	0.00	0.00	16	1.78	0.22
5	53.53	61.56	17	0.38	0.05
6	26.72	30.76	18	1.40	0.17
7	26.72	30.76	19	18.30	7.50
8	26.72	30.76	20	18.30	7.50
9	0.76	7.50	21	18.30	7.50
10	79.49	84.82	22	15.60	1.90
11	1.10	0.13	23	211.03	238.42
12	1.10	0.13	24	154.59	169.11

3.2 代谢通量分析

分批发酵生产 BC 的实验结果见图 2.

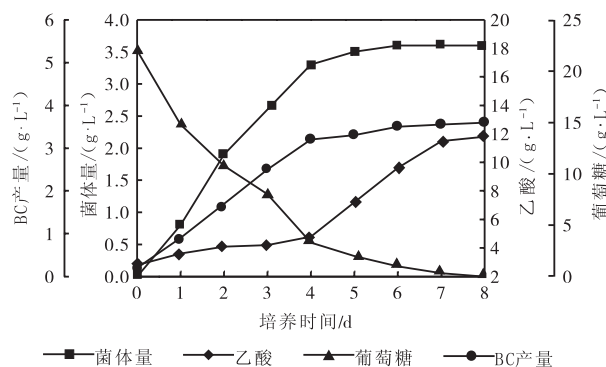


图 2 分批发酵生产 BC

Fig.2 Time course of batch BC fermentation

第一阶段, 发酵前期(0~4d)是菌体和细菌纤维素的大量合成时期, 15.60%的葡萄糖用于合成菌体, 18.30%用于合成细菌纤维素, 菌体生长需要大量核酸、蛋白质、脂肪、一些小分子中间代谢物、还原力 NADPH 和主要由 TCA 循环提供的 NADH 及 FADH₂, 此时细菌纤维素生物合成速率较快. 纤维素的生物合成以消耗葡萄糖为前提, 与菌体的生长密切相关. 因此, 提高细菌纤维素产率的同时必须考虑菌株的生长. 此结论与 Atsushi Ishikawa^[7]的研究报道相同.

第二阶段, 发酵后期(4~8 d)由于菌体生长速率和细菌纤维素合成速率粗略成正比^[1], 因此, 菌体生长速率减慢, 细菌纤维素合成速率减慢. 其中, 1.9%

的葡萄糖用于合成菌体,7.50%用于合成细菌纤维素.此时已发生代谢流迁移现象即代谢流重新分配,更多的代谢流向副产物.后期 PPP 和 TCA 循环的代谢流大于发酵前期,在这个阶段可能有大量的无效循环产生,其具体能量和代谢通量分布有待进一步研究和探讨.要减少副产物的生成,达到代谢流迁移的目的,需从遗传和发酵控制对菌株和培养条件进行改造和优化,增大流向合成细菌纤维素的代谢流.

PPP 中,从 G6P 到 RL5P 的反应是不可逆反应, TCA 循环中柠檬酸合成酶和 α -酮戊二酸脱氢酶催化的反应也是不可逆的,得到的代谢通量分布图中没有出现负值,因此,计算得到的代谢通量分布没有违背热力学条件,所构建的代谢网络较为合理.

3.3 节点代谢通量分析

在一般生长环境下,代谢网络中的基本代谢物和能量是按照一定比例合成的^[8].而细胞能够对不同环境的刺激作出反映,使细胞代谢流发生变化,但这种改变仅是反馈调节的结果,目的是为了细胞在不同环境下合成生存所需的物质,因此,其本身的代谢流分配不适于某一特定代谢物超量生产.而代谢工程是通过基因工程手段,对某些生化反应关键酶的表达进行调控,使代谢流分配发生较大改变,达到某种代谢物超量生产,提高产率的目的^[9].因此,对发酵前期和后期细菌纤维素生物合成的主要节点 G6P 和 Acetate 的代谢通量进行对比,结果见图 3 和图 4.

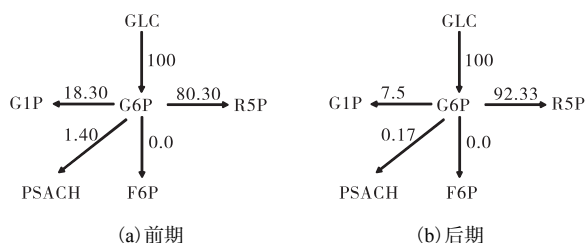


图 3 G6P 节点通量分析

Fig.3 Flux analysis of G6P principal node

由图 3 可知,葡萄糖有 4 个流向:PPP、不完整的 EMP 途径、细胞多糖的合成和细菌纤维素的合成.发酵前期进入 PPP 的代谢通量为 80.30,EMP 为 0,BC 合成为 18.30,细胞多糖为 1.40.该阶段是细胞大量合成和细菌纤维素快速增长时期,所需能量主要是通过 PPP 代谢葡萄糖,进而通过 TCA 循环产生的.这与文献[10]报道的观点一致,即细菌在以葡萄糖为底物的培养基中生长时主要依靠 PPP 和 TCA 循环提供生产菌体的前体物和能量.发酵后期进入 PPP 的代谢通量为 92.33,EMP 为 0,BC 合成为 7.5,细胞多糖为 0.17.该阶段是菌体生长的稳定期及衰亡期的开

始,菌体和纤维素的合成速度减慢,通过 PPP 和 TCA 循环产生较多无效循环,较多的代谢流向副产物,使合成 BC 的代谢流减少,同时菌体生长前体物的合成也有所减少,导致后期 BC 产量不再增加.

控制 r_2 和 r_{20} 两步反应的比值,在满足菌体所需能量、还原力、核酸、蛋白质、脂肪和小分子中间代谢物的同时,使较多的代谢流向 BC 的合成.据文献报道^[11],在培养基中添加乙醇、乳酸等物质可提高 BC 的产量,原因是所添加的物质可直接进入 TCA 循环用于能量的生成,使较少碳流通过 PPP 流向 TCA 产能,更多地流向 BC.

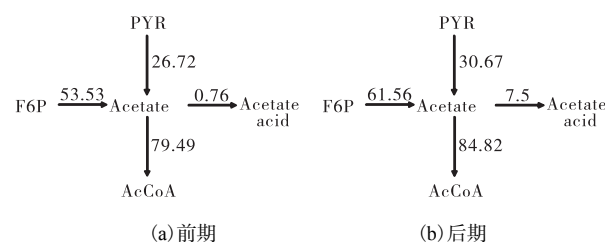


图 4 Acetate 节点通量分析

Fig.4 Flux analysis of Acetate principal node

由图 4 可知,对于 Acetate 节点,葡萄糖流入和流出分别有两个通量,流入:F6P 和 PYR 生成 Acetate;流出:进一步生成 AcCoA 和生成副产物乙酸.发酵后期由 PYR 生成的 Acetate 的通量多于发酵前期,后期生成乙酸和 AcCoA 的通量也多于前期的通量,而此时 BC 产量减少,说明发酵后期较多的代谢流向无效循环和副产物,流向合成 BC 方向的代谢流减少.从 F6P 到 Acetate 涉及一系列生化反应,与 PPP 中间产物有关^[12],它是替代 EMP 途径使代谢流入 TCA 循环的途径.通过诱变或基因工程手段对合成乙酸基因的表达进行调控,减少流向胞外乙酸的流量.

在 BC 合成过程中,除产生乙酸外,葡萄糖酸的产生也使培养基的 pH 迅速下降.虽然木醋杆菌可以抵抗较低的 pH,但根据实验可知,当 $\text{pH} < 2$ 时纤维素几乎不产生.为了减少葡萄糖酸和乙酸的产生,可通过基因敲除或复合诱变使葡萄糖酸和乙酸合成酶消除或削弱表达,从而减少生成副产物方向的代谢流,增加流向合成 BC 方向的代谢流,达到高产 BC 的目的.同时也可以通过优化培养的方法高产 BC.如:发酵过程中通过 NaOH 进行恒定 pH 培养,使菌体一直处于最适 pH 下生产 BC;以果糖或甘油为碳源可减少副产物葡萄糖酸的产生.因此,可根据菌的生长情况,先利用葡萄糖生长菌体,再流加果糖或甘油达到高产 BC.

(下转第 21 页)