



## 基于途径分析的 *L*-苏氨酸发酵过程优化

陈 宁, 朱晓光, 徐庆阳, 黄 金

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 以 *L*-苏氨酸生产菌株 TRFC 为供试菌株, 在拟稳态下基于途径分析对发酵过程作出理论分析, 并对发酵过程进行优化. 通过途径分析方法确定 *L*-苏氨酸合成代谢途径的 11 种基本模型, 其中模型 1、3、4、6、9、11 最高理论产率为 86%. 根据途径分析结果, 提出 *L*-苏氨酸产生菌的发酵控制策略, 并进行摇瓶及发酵罐实验验证. 结果表明: 在添加葡萄糖酸钠发酵过程中, *L*-苏氨酸产量与葡萄糖为唯一碳源时相比反而降低; 且充分供氧达 20% 时, 代谢流大量涌入目的产物, *L*-苏氨酸产率最大.

**关键词:** *L*-苏氨酸; 途径分析; 葡萄糖酸钠; 代谢工程; 溶氧

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 03-0001-04

## Optimization of the Fermentation Progress of *L*-threonine by Pathway Analysis

CHEN Ning, ZHU Xiao-guang, XU Qing-yang, HUANG Jin

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

**Abstract:** According to the pathway analysis, fermentation progress of *L*-threonine was eventually optimized. There are 11 basic models to be estimated. The productivity of model 1, 3, 4, 6, 9, 11 had achieved 86%. According to the result of pathway analysis, the optimized metabolic control strategy was instituted and testified through actual fermentation experiments. It was concluded that merely compared with glucose, adding sodium gluconate almost serves to decrease the productivity of *L*-threonine. In addition, 20% dissolved oxygen effectively allows metabolic flux into the biosynthesis pathway of *L*-threonine, thereby maximizing the productivity of *L*-threonine.

**Keywords:** *L*-threonine; pathway analysis; sodium gluconate; metabolic engineering; dissolved oxygen

途径分析是代谢工程中用以指导遗传操作的理论基础, 是代谢网络分析的重要方法之一<sup>[1]</sup>. 途径分析可以确定产物生成的所有可能代谢途径和基本反应模型. 这些反应模型可由凸分析确定, 由计算机算得<sup>[2]</sup>. 细胞内代谢网络是由基本反应模型的非负线性组合产生的, 在这些基本反应模型中, 有一个代表最高的产率和代谢流分布的理想载流途径<sup>[3]</sup>. 理想载流途径的构建开始于酶的确 定、理论产率的计算和确定

最优的代谢流分布, 因此, 途径分析对于目的产物理想载流途径的构建具有重要的意义.

近年来, 途径分析在生物技术领域得到了广泛的应用, 目前已被成功地应用于大肠杆菌中芳香族氨基酸等物质合成的理论产率和最优代谢途径的确定<sup>[4]</sup>. 本文通过途径分析方法, 得到了 *L*-苏氨酸的生物合成途径, 提出了 *L*-苏氨酸产生菌的发酵控制策略, 并进行了摇瓶及发酵罐实验验证.

收稿日期: 2007-11-12; 修回日期: 2008-01-17

基金项目: 国家 863 项目 (2006AA02Z216)

作者简介: 陈 宁 (1963—), 男, 天津人, 教授, ningch@tust.edu.cn.

## 1 材料及方法

### 1.1 菌种

*L*-苏氨酸生产菌 *Escherichia coli* (TCCC 11262) TRFC, 天津科技大学工业微生物菌种保藏室提供。

### 1.2 培养方法

#### 1.2.1 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 ~ 700 r/min, 通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0, 培养温度 37 °C。

#### 1.2.2 10 L 罐发酵

按 1% 接种量将种子液接入 10 L 发酵罐中; 初始通风量 2 L/min; 搅拌转速 500 ~ 800 r/min; 通过自动流加氨水控制 pH 在 7.0; 培养温度 37 °C; 以泡敌消泡; 发酵到一定时间流加补料液。发酵过程中每隔一定时间取样进行各项参数测定。

### 1.3 分析方法

(1) pH: 采用酸度计测定。

(2) 菌体生长: 吸取样品菌液, 用蒸馏水稀释一定倍数, 以蒸馏水作为空白对照, 采用 752 分光光度计于 1 cm 光程测定  $A_{600}$ 。

(3) 葡萄糖: 生物传感仪测定。

(4) *L*-苏氨酸含量: 采用 Elite-AAA 氨基酸分析系统测定。

(5) 数学计算: 矩阵计算及矩阵方程求解采用 MATLAB 软件。

## 2 *L*-苏氨酸合成的途径分析

基于以下假设建立代谢网络:

(1) 由于菌体生长代谢网络复杂, 同时考虑葡萄糖到 *L*-苏氨酸的完全转化, 不考虑细胞的生长代谢。

(2) 在苏氨酸生物合成过程中, ATP 的产生及消耗复杂, 因此不考虑能量平衡。

(3) 许多固定比例的反应及无分支点的反应都可认为是一步反应。

(4) 由于同工酶可催化不同反应, 因此不考虑重复反应及乙醛酸循环等许多无效反应。

由葡萄糖生物合成 *L*-苏氨酸途径如图 1 所示。

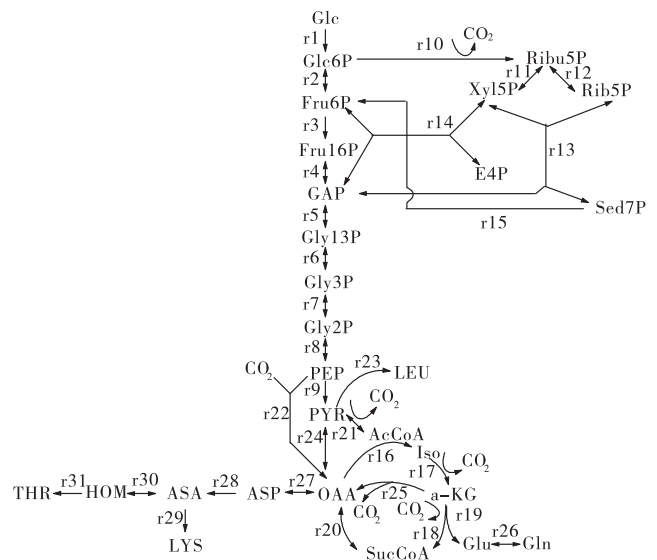


图 1 *L*-苏氨酸生物合成途径

Fig. 1 Metabolic pathway of *L*-threonine biosynthesis

(1) Glc: Glucose, (2) l6P: D-Glucose-6-phosphate, (3) Fru6P: Fructose-6-phosphate, (4) Fru16P: Fructose-1, 6-bisphosphate (5) GAP: Glyceraldehyde-3P, (6) Gly13P: Glycerate-1, 3P2, (7) Gly3P: Glycerate-3P, (8) Gly2P: Glycerate-2P, (9) PEP: Phosphoenolpyruvate, (10) Pyr: Pyruvate, (11) AcCoA: Acetyl-CoA, (12) OAA: Oxaloacetate, (13) Iso: Isocitrate, (14)  $\alpha$ -KG: alpha-Ketoglutaricacid, (15) SucCoA: Succinyl-CoA, (16) Glu: Glutamate; (17) Gln: Glutamine, (18) Rib5P: Ribulose-5-phosphate, (19) Xyl5P: Xylulose-5-phosphate, (20) Rib5P: Ribose-5-phosphate, (21) Sed7P: Sedoheptulose-7-phosphate, (22) E4P: Erythrose-4-phosphate, (23) Leu: Leucine, (24) ASP: Asparticacid, (25) ASA: Aspartate-4-semialdehyde, (26) Lys: Lysine, (27) HOM: Homoserine, (28) THR: Threonine.

Reactions: r1:  $\text{Glc} + \text{ATP} = \text{Glc6P} + \text{ADP}$ , r2:  $\text{Glc6P} = \text{Fru6P}$ , r3:  $\text{ATP} + \text{Fru6P} = \text{ADP} + \text{Fru16P}$ , r4:  $\text{Fru16P} = 2 \text{ GAP}$ , r5:  $\text{GAP} + \text{Pi} + \text{NAD} = \text{Gly13P} + \text{NADH}$ , r6:  $\text{Gly13P} + \text{ADP} = \text{Gly3P} + \text{ATP}$ , r7:  $\text{Gly3P} = \text{Gly2P}$ , r8:  $\text{Gly2P} = \text{PEP} + \text{H}_2\text{O}$ , r9:  $\text{ADP} + \text{PEP} = \text{ATP} + \text{Pyr}$ , r10:  $\text{Glc6P} + 2 \text{ NADP} + \text{H}_2\text{O} = 2 \text{ NADPH} + \text{H} + \text{Rib5P} + \text{CO}_2$ , r11:  $\text{Rib5P} = \text{Xyl5P}$ , r12:  $\text{Rib5P} = \text{Rib5P}$ , r13:  $\text{Rib5P} + \text{Xyl5P} = \text{Sed7P} + \text{GAP}$ , r14:  $\text{E4P} + \text{Xyl5P} = \text{Fru6P} + \text{GAP}$ , r15:  $\text{Sed7P} + \text{GAP} = \text{E4P} + \text{Fru6P}$ , r16:  $\text{AcCoA} + \text{OAA} + \text{H}_2\text{O} = \text{Iso} + \text{CoA}$ , r17:  $\text{Iso} + \text{NADP} = \alpha\text{-KG} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$ ,

r18:  $\alpha$ -KG + NAD + CoA = SucCoA + NADH + CO<sub>2</sub>,  
 r19:  $\alpha$ -KG + NH<sub>3</sub> + NADPH = Glu + NADP + H<sub>2</sub>O,  
 r20: SucCoA + ADP + Pi + FAD + H<sub>2</sub>O + NAD = CoA + ATP + FADH + OAA + NADH, r21: Pyr + NAD + CoA = AcCoA + CO<sub>2</sub> + NADH, r22: PEP + CO<sub>2</sub> = OAA, r23: 2 Pyr + AcCoA + NAD + Glu = 2 CO<sub>2</sub> + CoA + NADH +  $\alpha$ -KG + LEU, r24: Pyr + CO<sub>2</sub> + ATP + H<sub>2</sub>O = OAA + ADP + Pi + 2 H, r25:  $\alpha$ -KG + H<sub>2</sub>O + FAD + 2 NAD + ADP = OAA + FADH + 2 NADH +

CO<sub>2</sub> + ATP, r26: Glu + NH<sub>3</sub> + ATP = Gln + ADP + Pi, r27: OAA + ATP + NADPH = ASP + ADP + NADP + 2 H, r28: ATP + ASP + NADPH + H = ADP + ASA + Pi + NADP, r29: ASA + Pyr + NADPH + SucCoA + Glu + 2 H<sub>2</sub>O + H = LYS + NADP + Suc + CoA +  $\alpha$ -KG + CO<sub>2</sub>, r30: ASA + NADP + H = HOM + NADP, r31: ATP + HOM + H<sub>2</sub>O = ADP + THR + Pi.

运用 MATLAB 软件进行途径分析,获得的反应模型如表 1 所示.

表 1 葡萄糖生物合成 L-苏氨酸的基本反应模型  
 Tab. 1 Elementary models of L-threonine biosynthesis

模型	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9	e10	e11
r1	1.87	1.87	1.87	1.87	2.17	2.33	1.87	2.63	1.87	2.17	2.33
r2	0.27	0.27	0.27	0.27	1.17	0.33	0.27	0.38	0.27	1.17	0.33
r3	1.33	1.33	1.33	1.33	1.83	1.67	1.33	1.88	1.33	1.83	1.67
r4	1.33	1.33	1.33	1.33	1.83	1.67	1.33	1.88	1.33	1.83	1.67
r5	3.20	3.20	3.20	3.20	4.00	4.00	3.20	4.50	3.20	4.00	4.00
r6	3.20	3.20	3.20	3.20	4.00	4.00	3.20	4.50	3.20	4.00	4.00
r7	3.20	3.20	3.20	3.20	4.00	4.00	3.20	4.50	3.20	4.00	4.00
r8	3.20	3.20	3.20	3.20	4.00	4.00	3.20	4.50	3.20	4.00	4.00
r9	0	0	0	3.20	4.00	2.00	3.20	1.50	3.20	4.00	2.00
r10	1.60	1.60	1.60	1.60	1.00	2.00	1.60	2.30	1.60	1.00	2.00
r11	1.07	1.07	1.07	1.07	0.67	1.33	1.07	1.50	1.07	0.67	1.33
r12	1.60	1.60	1.60	1.60	1.00	2.00	1.60	2.30	1.60	1.00	2.00
r13	0.53	0.53	0.53	0.53	0.33	0.67	0.53	0.75	0.53	0.33	0.67
r14	0.53	0.53	0.53	0.53	0.33	0.67	0.53	0.75	0.53	0.33	0.67
r15	0.53	0.53	0.53	0.53	0.33	0.67	0.53	0.75	0.53	0.33	0.67
r16	1.60	1.07	1.60	1.60	1.00	2.00	1.07	1.50	1.60	1.00	2.00
r17	1.60	1.07	1.60	1.60	1.00	2.00	1.07	1.50	1.60	1.00	2.00
r18	0	0	1.60	0	0	0	0	0	1.60	2.00	2.00
r19	0	1.07	0	0	0	0	1.07	1.50	0	0	0
r20	0	0	1.60	0	0	0	0	0	1.60	2.00	2.00
r21	1.60	1.07	1.60	1.60	2.00	2.00	1.07	1.50	1.60	2.00	2.00
r22	3.20	3.20	3.20	0	0	2.00	0	3.00	0	0	2.00
r23	0	0	0	0	1.00	0	0	0	0	1.00	0
r24	-1.60	-1.07	-1.60	1.60	0	0	2.13	0	1.60	0	0
r25	1.60	0	0	1.60	2.00	2.00	0	0	0	0	0
r26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r27	1.60	1.07	1.60	1.60	1.00	2.00	1.07	1.50	1.60	1.00	2.00
r28	1.60	1.07	1.60	1.60	1.00	2.00	1.07	1.50	1.60	1.00	2.00
r29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r30	1.60	1.07	1.60	1.60	1.00	2.00	1.07	1.50	1.60	1.00	2.00
r31	1.60	1.07	1.60	1.60	1.00	2.00	1.07	1.50	1.60	1.00	2.00

由表 1 可以看出,草酰乙酸是进入天冬氨酸族代谢,最终生成苏氨酸的关键节点<sup>[5]</sup>. 丙酮酸进入亮氨酸合成及乙醛酸循环中被大量消耗,菌体通过丙酮酸激酶由磷酸烯醇式丙酮酸合成满足自身代谢需要,导致苏氨酸糖酸转化率降低,模型 e2、e7、e8 仅为 57%. 乙醛酸循环消耗大量的 ATP 及造成碳源的浪费,模型 e5、e10 转化率仅为 46%. 在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化下,磷酸烯醇式丙酮酸与一分子 CO<sub>2</sub> 生成草酰乙酸,减少进入乙醛酸循环代谢流量,苏氨酸

酸产率增加,模型 e1、e3、e4、e6、e9、e11 转化率为 86%. 由于 6-磷酸葡萄糖通过 6-磷酸葡萄糖脱氢酶生成核酮糖-5-磷酸及戊糖、四糖,造成产率不能进一步提高.

### 3 基于途径分析结果发酵条件优化

#### 3.1 葡萄糖酸钠对 L-苏氨酸发酵的影响

葡萄糖酸钠对 L-苏氨酸生物合成途径的影响分

析结果见图 2. 葡萄糖酸是戊糖磷酸途径中间产物, 作为前体物葡萄糖酸生成核酮糖-5-磷酸、核糖等戊糖、四糖; 且使得葡萄糖进一步通过 6-磷酸葡萄糖脱氢酶积累代谢副产物, 造成苏氨酸产量下降 [6].

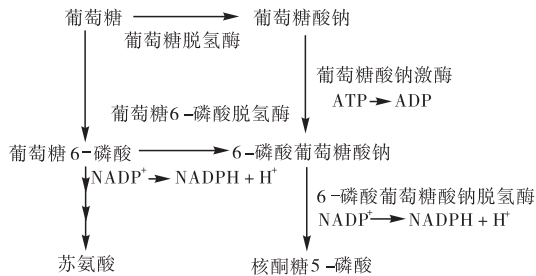


图 2 葡萄糖酸钠对 L-苏氨酸糖代谢途径的影响

Fig. 2 Glucose pathway of L-threonine fermentation with sodium gluconate

葡萄糖酸钠对 L-苏氨酸产量的影响见图 3. 以葡萄糖为发酵唯一碳源, 初糖浓度 70 g/L 时, L-苏氨酸最高产量达到 107 g/L, 糖酸转化率达 20%. 分别添加 5%、10%葡萄糖酸钠后, 产量明显降低, 最高仅为 94 g/L. 说明在发酵过程中添加葡萄糖酸钠, 导致 L-苏氨酸产量与葡萄糖为唯一碳源时相比反而降低. 这与途径分析结果相符.

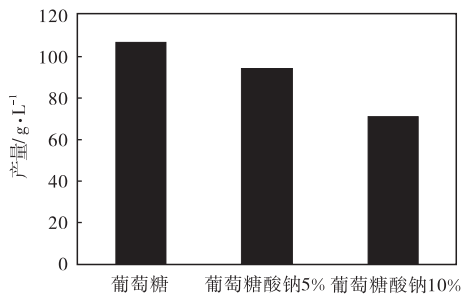


图 3 葡萄糖酸钠对 L-苏氨酸发酵的影响

Fig. 3 Productivity of L-threonine fermentation with sodium gluconate

### 3.2 溶氧对 L-苏氨酸发酵的影响

测定了溶氧对 L-苏氨酸发酵的影响, 结果如图 4 所示. 由图可见, 控制溶氧为 20%, 菌体生长旺盛, 菌体浓度高, L-苏氨酸产量达 106.6 g/L. 而控制溶氧 50%、5%, 菌体生长较慢, 发酵周期延长, 产量降低. 说明充分供氧有利于碳架更多地流入目的产物, 有利于产酸和糖酸转化. 溶氧过高、过低则会对菌体产生抑制作用或导致乙醛酸无效循环, 与途径分析结果中模型 5、7、10 一致.

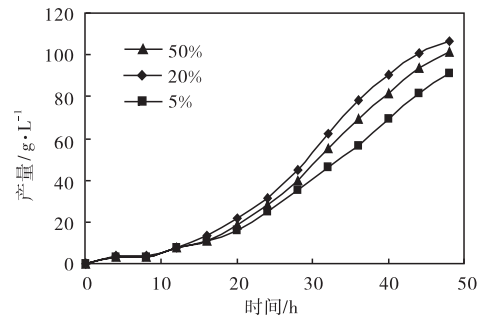


图 4 溶氧对 L-苏氨酸发酵的影响

Fig. 4 Production curve of L-threonine with various dissolved oxygen

## 4 结 论

利用途径分析方法, 得到 L-苏氨酸的生物合成途径. 通过分析其 6-磷酸葡萄糖、草酰乙酸等关键节点, 提出了发酵过程中减少戊糖磷酸途径及乙醛酸循环消耗的优化策略. 经实验验证, 葡萄糖作为唯一碳源, L-苏氨酸最高产量达到 107 g/L. 添加葡萄糖酸钠后, 戊糖磷酸途径得到加强, L-苏氨酸产量明显降低. 维持溶氧 20%最利于产物积累, 溶氧过高、过低则会对菌体产生抑制作用或导致乙醛酸无效循环.

## 参 考 文 献:

- [1] Klamt S, Stelling J. Two approaches for metabolic pathway analysis [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21: 64—69.
- [2] Schilling C H, Palsson B O. Assessment of metabolic capabilities of Haemophilus influenzae Rd through a genomic scale pathway analysis [J]. Theor Biol, 2000, 203 (3): 249—283.
- [3] Schuster S, Fell D A, Dandekar T. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18 (3): 326—332.
- [4] Schuster S, Klamt S, Weckwerth W, et al. Use of network analysis of metabolic systems in bioengineering [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2002, 24: 363—372.
- [5] Christophe C, David A, Badr R, et al. Control of the threonine-synthesis pathway in Escherichia coli: a theoretical and experimental approach [J]. Biochem, 2001, 356: 433—444.
- [6] 魏少军, 刘淑云, 陈 宁, 等. D-葡萄糖酸钠对 D-核糖发酵的影响 [J]. 天津轻工业学院学报, 2002, 17 (2): 4—6.