

基于代谢流量分析的黄色短杆菌 TK0303 合成 L-亮氨酸发酵过程的优化*

刘 辉, 徐庆阳, 陈 宁

(天津科技大学生物工程学院, 天津, 300457)

摘 要 测定并计算了在发酵中后期 L-亮氨酸等代谢物的胞外浓度和积累(或消耗)的速率。应用代谢流分析方法, 通过 MATLAB 软件线性规划得到发酵中后期胞内代谢流分布及 L-亮氨酸合成的理想代谢流分布。结果表明, 在 L-亮氨酸分批发酵过程中, 有 98.73% 的葡萄糖进入糖酵解途径, 仅 1.27% 进入 HMP 途径, 55.10% 的碳架进入 TCA 循环, 25.21% 用于合成 L-亮氨酸。实验测定的合成 L-亮氨酸的代谢流远低于理想代谢流(66.67)。根据代谢流分析结论, 文中通过优化发酵过程控制如流加方式、溶氧水平等方面来减少副产物的生成, 控制 TCA 循环代谢流, 从而提高 L-亮氨酸的产率。实验采用脉冲补料方式, 控制溶氧浓度在 20% 左右, L-亮氨酸最高产酸达到 38g/L。

关键词 L-亮氨酸, 代谢流分析, 线性规划, 黄色短杆菌

L-亮氨酸是人和动物生命活动中 8 种必需氨基酸之一, 广泛应用于医药、食品和饲料等方面^[1]。1960 年代, 关于 L-亮氨酸生物合成以及其代谢调节机制相继被阐明, 这为微生物发酵法生产 L-亮氨酸提供了理论基础。目前国外(如日本)发酵法生产 L-亮氨酸已形成一定规模的工业生产能力, 2000 年, 世界 L-亮氨酸年产量已达 500 t, 其中日本占到了 2/3。国内仅无锡晶海氨基酸公司采用发酵法生产, 产酸水平为 25g/L, 远不能满足国内市场需求。

代谢流分析(Metabolic Flux Analysis, MFA)是代谢工程中用以指导遗传操作的重要工具, 是代谢网络分析的基本方法之一^[1]。MFA 根据胞内主要反应构建的代谢网络模型和胞内代谢产物的质量平衡来计算物质代谢流分布情况, 这对于理解细胞的代谢调控机制有重要意义^[2], 但是目前尚未有关于黄色短杆菌合成 L-亮氨酸的代谢流分析的相关报道。

实验通过建立 L-亮氨酸生物合成的代谢网络模型, 对其进行定量分析得到 L-亮氨酸分批发酵中后期的代谢流分布。在此基础上, 优化发酵过程控制, 使得 L-亮氨酸的产量达到 38g/L。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) TK0303 (Met⁻ + Ile⁺ + 2-TA⁺ + α-AB⁺ + β-HL⁺ + Rif⁺ + SG⁺), 天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌种。

第一作者: 博士研究生(陈宁为通讯作者)。

*天津市高等学校科技重点研究项目(20041014)

收稿日期: 2006-10-23, 改回日期: 2006-12-15

1.2 培养基

见参考文献[3]。

1.3 培养方法

1.3.1 斜面活化培养

28℃ 培养 20~24 h。

1.3.2 种子培养

500 mL 三角瓶装液量 30 mL, 9 层纱布封口, 于旋转式摇床上(200 r/min), 28℃ 振荡培养 20 h。

1.3.3 5 L 自控发酵罐分批发酵

5 L 发酵罐中装液量 3 L, 接种量 300 mL, 28℃, 通风比 1:1, 流加氨水控制 pH 在 7.0, 通过流加泡敌消泡。搅拌转速为 500 r/min, 发酵 64 h。

1.4 分析方法

1.4.1 OD 值测定

发酵液稀释一定倍数后, 在波长 620 nm 处用 752 分光光度计测定。

1.4.2 发酵液中氨基酸含量测定

采用 Elite-AAA 氨基酸分析仪测定。

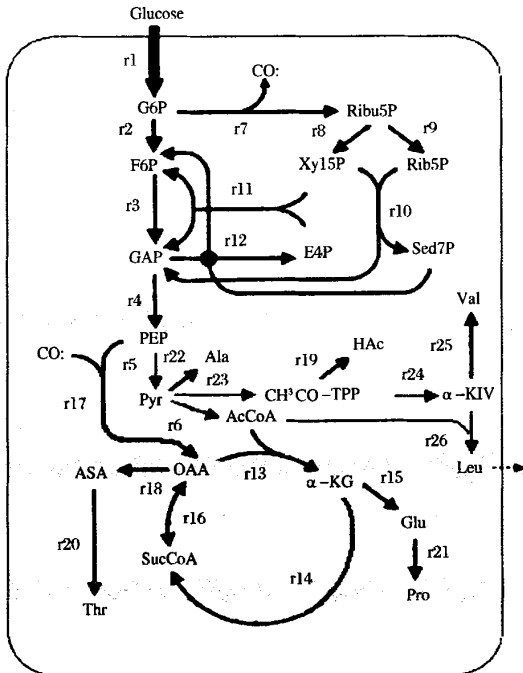
1.4.3 醋酸的测定^[4]

1.5 代谢流平衡模型的建立

由文献资料^[5-7]可知, 在 L-亮氨酸生产菌黄色短杆菌中, 中心代谢途径包括 EMP、TCA、HMP 途径以及 TCA 循环的主要回补反应——磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化的反应。乙醛酸途径封闭或微弱。本文基于以下原则或假设建立代谢网络: (1) 发酵过程中后期, 细胞处于非生长时期或细胞浓度变化不大, 忽略菌体细胞的生长代谢; (2) 细胞代谢过程中不存在乙醛酸循环; (3) NADPH 供需平衡, 即反应途径中消耗的 NADPH 与 HMP 途径、TCA 循环产生的

NADPH 总数相等; (4) 在细胞生长不旺盛阶段, 由于大量无效循环的存在, ATP 的消耗量和细胞维持能总量并不相等, 因此本文不考虑 ATP 总量的平衡; (5) 按照固定比例进行的反应以及无分支点的中间反应, 可简化为一个反应方程。 (6) 由同功酶催化的反应作为同一反应处理, 不进行区分。

L-亮氨酸生物合成的代谢网络如图 1 所示, 反应速率方程组见附录 1。各步反应的化学计量方程式见附录 2。



(1) AcCoA: Acetyl coenzyme A; (2) α -KIV: α -ketoisovalerate; (3) E4P: Erythrose-4-phosphate; (4) F6P: Fructose-6-phosphate; (5) GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; (6) G6P: Glucose-6-phosphate; (7) OAA: Oxaloacetate; (8) PEP: Phosphoenolpyruvate; (9) Rib5P: Ribose-5-phosphate; (10) Ribul5P: Ribulose-5-phosphate; (11) Sed7P: Sedoheptulose-7-phosphate; (12) Xyl5P: Xylulose-5-phosphate; (13) SucCoA: succinyl coenzyme A; (14) ASA: aspartate-semialdehyde; (15) $\text{CH}_3\text{CO-TPP}$: acetyl phosphate;

图 1 *L*-亮氨酸生物合成代谢网络

方程数为 19, 未知数为 26, 方程自由度为 7, 即需测定 7 个速率方可确定代谢网络中的流量分配。本文选取葡萄糖、5 种氨基酸 (*L*-亮氨酸、*L*-脯氨酸、*L*-苏氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-缬氨酸) 和 HAc 为已知参量, 通过离线分析测其浓度, 并进行数值微分求得糖消耗速率、5 种氨基酸和 HAc 的积累速率, 将此作为已知参量, 代入代谢速率平衡方程, 利用线性规划求得代谢流分布。另外通过线性规划可求出极端情况下的代谢流分布^[8]。

2 结果与讨论

2.1 代谢流分布

5L 自控发酵罐 *L*-亮氨酸分批发酵过程曲线如图 2 所示。44h 后, 菌体量已无明显变化, 细胞处于非生长时期, 胞内代谢处于拟稳态。测定发酵中后期 (44~60 h) 葡萄糖的消耗速率、5 种氨基酸 (*L*-亮氨酸、*L*-脯氨酸、*L*-苏氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-缬氨酸) 的积累速率以及 HAc 的积累速率如表 1 所示。文中对该过程 (44 h~60 h) 进行了代谢流分析。

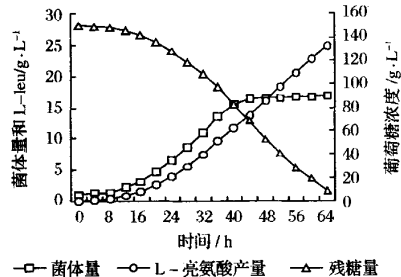


图 2 优化前分批发酵过程曲线

表 1 发酵中后期 (44~60 h) 物质浓度及其变化速率

检测物质	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		消耗或生成速率 $/\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$
	44 h	60 h	
葡萄糖	68.0	19.8	3.0
<i>L</i> -亮氨酸	13.77	22.60	0.55
<i>L</i> -脯氨酸	0.07	0.71	0.04
<i>L</i> -苏氨酸	0.10	0.42	0.02
<i>L</i> -丙氨酸	0.86	3.9	0.19
<i>L</i> -缬氨酸	1.58	8.30	0.42
HAc	0.30	1.90	0.10

利用 MATLAB 软件线性规划计算得到 *L*-亮氨酸发酵中后期代谢流分布, 以及 *L*-亮氨酸合成的理想代谢流分布, 结果见表 2。

2.2 *L*-亮氨酸发酵中后期主要节点代谢流分析

2.2.1 G6P 节点代谢流分析

G6P 节点实际与理想代谢流分布如表 2 所示。葡萄糖主要经 3 条途径代谢: EMP、HMP 和 TCA 途径。实际进入 HMP 途径的代谢流为 1.27, 进入 EMP 的代谢流为 98.73, 可见 EMP 途径活跃。理想代谢流分布的 HMP 途径的代谢流为 24.95, EMP 代谢流为 75.05。相较而言, HMP 的实际代谢流量远小于理想代谢流, EMP 的实际代谢流量大于理想代谢流。这说明虽然大量的碳架进入 EMP 途径, 但并未成功导入 *L*-亮氨酸合成途径。主要是副产物 HAc、缬氨酸和丙氨酸的生成造成了碳架浪费。另

外 HMP 途径的主要作用是为氨基酸的生物合成提供 NADPH, 而发酵产生的亮氨酸、缬氨酸等对

NADPH 的实际需求不大, 因此 HMP 实际途径流量偏小。

表 2 发酵中后期 L-亮氨酸合成的代谢流分布

序号	实际代谢流分布	理想代谢流分布	序号	实际代谢流分布	理想代谢流分布
r ₁	100.00	100.00	r ₁₄	53.08	0.00
r ₂	98.73	75.05	r ₁₅	62.38	66.67
r ₃	99.58	95.06	r ₁₆	53.08	0.00
r ₄	199.58	200.01	r ₁₇	2.87	0.00
r ₅	196.70	200.01	r ₁₈	0.86	0.00
r ₆	80.31	66.67	r ₁₉	10.49	0.00
r ₇	1.27	24.95	r ₂₀	0.86	0.00
r ₈	0.85	14.95	r ₂₁	2.02	0.00
r ₉	0.42	10.00	r ₂₂	13.11	0.00
r ₁₀	0.42	10.00	r ₂₃	56.88	66.67
r ₁₁	0.42	10.00	r ₂₄	46.39	66.67
r ₁₂	0.42	10.00	r ₂₅	21.18	0.00
r ₁₃	55.10	0.00	r ₂₆	25.21	66.67

2.2.2 乙酰辅酶 A 节点代谢流分析

乙酰辅酶 A 是 L-亮氨酸合成的重要节点。乙酰辅酶 A 直接参与 L-亮氨酸的合成, 另外还通过 TCA 循环进一步代谢生成谷氨酸, 从而为 L-亮氨酸的合成提供足量的氨基来源。因此乙酰辅酶 A 节点的代谢流分布能够极大地影响 L-亮氨酸的合成。由表 2 可知, 实际进入乙酰辅酶 A 节点的代谢流为 80.31, 而由此进入 TCA 循环和 L-亮氨酸生物合成途径的代谢流分别为 55.10 和 25.21。与之相比, 理想代谢流分布中 TCA 循环和 L-亮氨酸生物合成途径的代谢流分别为 0 和 66.67。由此可见 TCA 循环活跃。因此在发酵过程中严格控制溶氧水平显得尤为重要。溶氧水平过高, TCA 循环流量增加, 乙酰辅酶 A 生成 L-亮氨酸的代谢流减弱, 而造成碳架的浪费; 溶氧水平过低又会造成其他副产物生成。

2.3 基于代谢流分析的 L-亮氨酸发酵优化

上述代谢流分析结果表明分批发酵生产 L-亮氨酸的过程中, 减少副产物 HAc、缬氨酸和丙氨酸的生成以及适当减少 TCA 循环流量是提高 L-亮氨酸得率的关键。研究表明在发酵过程中限制葡萄糖的供应, 可以减少副产物特别是有机酸的生成^[9]。因此改进实验方案, 设定初糖浓度 60 g/L, 采用脉冲补料方式控制残糖浓度在 1.0 g/L 左右, 同时进一步降低溶氧水平, 控制溶氧在 20% 左右, 从而有效地减少了副产物的生成, 提高了 L-亮氨酸的产酸水平。改进工艺前后, 60 h L-亮氨酸及副产物浓度见图 3。采用优化后的工艺, 5 L 发酵罐分批补料发酵 60 h, L-亮氨酸产酸可达 38 g/L。

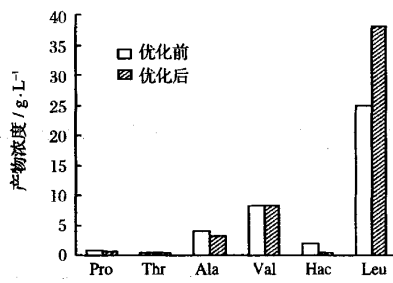


图 3 优化前后 60 h 发酵产物浓度变化

3 结 论

在发酵中后期 L-亮氨酸代谢流为 25.21, 与理想的代谢流 66.67 相比, 在几乎没有菌体生长的情况下, 远没有达到理论转化率。主要原因是副产物的形成和 TCA 循环的损失。要进一步提高 L-亮氨酸的转化率, 必须判断 L-亮氨酸合成途径中的主要节点 G6P 和乙酰辅酶 A 的节点类型, 尤其是节点刚柔性的判断, 利用基因工程技术和发酵过程控制技术(如化学调节因子或溶氧水平控制等)减轻或消除节点的刚性, 使代谢流量的分配更有利于 L-亮氨酸的合成。本文依据代谢流分析结果, 优化发酵过程控制, 大大提高了产酸水平, L-亮氨酸的产量达到 38 g/L。

参 考 文 献

1 张 蓓. 代谢工程[M]. 天津: 天津大学出版社, 2003
2 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
3 姚志湘, 伍时华, 陈 宁, 等. L-亮氨酸分批发酵动力学研究[J]. 广西工学院学报, 2003, 14(3): 5~7

- 4 辛梅华,李明春,篮心仁,徐金瑞. 反相 HPLC 快速测定调味品中有机酸[J]. 中国调味品, 2003,4:36~39
- 5 Vallino J J, Stephanopoulos G. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and Lysine overproduction[J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 41: 633~646
- 6 Kroemer J O, Wittmann C, Schroeder H, et al. Metabolic Pathway Analysis for Rational Design of *L*-methionine Production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[J]. Metabolic Engineering, 2006, 8: 353~369
- 7 Pharkya P, Burgard A P, Maranas C D. Exploring the Overproduction of Amino Acids Using the Bilevel Optimization Framework OptKnock[J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84(7): 887~899
- 8 Schuster R, Seeholzer S. Refined algorithm and computer program for calculating all nonnegative fluxes admissible in steady states of biochemical reaction systems with or without some flux rates fixed[J]. Comp Appl Biosci, 1993, 9: 79~85
- 9 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

Application of Metabolic Flux Analysis for Optimization of *L*-leucine Production by *Brevibacterium flavum* TK0303

Liu Hui, Xu Qingyang, Chen Ning

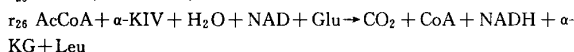
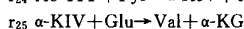
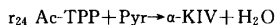
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT Metabolic flux analysis for the *L*-leucine production by *Brevibacterium flavum* TK0303 at steady state during the middle and late periods was conducted by linear program of MATLAB software in this paper. And the optimal flux distribution of *L*-leucine production was also determined. According to the metabolic flux analysis, the metabolic flux of 98.73% entered the EMP pathway, only 1.27% entered HMP pathway and 55.10% entered TCA cycle. And the metabolic flux of 25.21% was finally channeled to the *L*-leucine biosynthesis, which was much lower than 66.67% in the optimal flux distribution. The results indicate that the yield of metabolite is ultimately limited by the ability of both the central metabolism and the desired biosynthesis pathway. Therefore the production of *L*-leucine should be further improved by genetic manipulations and fermentation optimizations through reducing the byproducts and controlling of the metabolic flux of TCA. The *L*-leucine production was finally raised to 38g/L by applying the pulsed fed-batch cultivation and controlling the dissolved oxygen level of 20%.

Key words *L*-leucine, metabolic flux analysis, linear program, *Brevibacterium flavum*

附录 1

- r_1 $\text{GLC} + \text{ATP} \rightarrow \text{G6P} + \text{ADP} + \text{Pi} + \text{H}$
- r_2 $\text{G6P} \rightarrow \text{F6P}$
- r_3 $\text{F6P} + \text{ATP} \rightarrow 2\text{GAP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
- r_4 $\text{GAP} + \text{NAD} + \text{Pi} + \text{ADP} \rightarrow \text{PEP} + \text{NADH} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
- r_5 $\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pyr} + \text{ATP}$
- r_6 $\text{Pyr} + \text{NAD} + \text{CoA} \rightarrow \text{AcCoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$
- r_7 $\text{G6P} + 2\text{NADP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Rib5P} + 2\text{NADPH} + \text{CO}_2$
- r_8 $\text{Rib5P} \rightarrow \text{Xyl5P}$
- r_9 $\text{Rib5P} \rightarrow \text{Rib5P}$
- r_{10} $\text{Xyl5P} + \text{Rib5P} \rightarrow \text{Sed7P} + \text{GAP}$
- r_{11} $\text{Xyl5P} + \text{E4P} \rightarrow \text{F6P} + \text{GAP}$
- r_{12} $\text{Sed7P} + \text{GAP} \rightarrow \text{E4P} + \text{F6P}$
- r_{13} $\text{AcCoA} + \text{OAA} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP} \rightarrow \alpha\text{-KG} + \text{NADPH} + \text{CO}_2 + \text{CoA}$
- r_{14} $\alpha\text{-KG} + \text{CoA} + \text{NAD} \rightarrow \text{SucCoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$
- r_{15} $\alpha\text{-KG} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} \rightarrow \text{Glu} + \text{NADP}$
- r_{16} $\text{SucCoA} + \text{ADP} + \text{H}_2\text{O} + \text{FAD} + \text{NAD} + \text{Pi} \rightarrow \text{FADH}_2 + \text{OAA} + \text{NADH} + \text{CoA} + \text{ATP}$
- r_{17} $\text{ADP} + \text{PEP} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA} + \text{ATP}$
- r_{18} $\text{OAA} + \text{Glu} + \text{ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \alpha\text{-KG} + \text{ASA} + \text{NADP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
- r_{19} $\text{Ac-TPP} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HAc} + \text{NADPH} + 2\text{H}$
- r_{20} $\text{ASA} + \text{NADPH} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Thr} + \text{NADP} + \text{ADP} + \text{Pi}$
- r_{21} $\text{Glu} + \text{ATP} + 2\text{NADPH} + 2\text{H} \rightarrow \text{Pro} + \text{ADP} + 2\text{NADP} + \text{Pi} + \text{H}_2\text{O}$
- r_{22} $\text{Pyr} + \text{Glu} \rightarrow \text{Ala} + \alpha\text{-KG}$
- r_{23} $\text{Pyr} \rightarrow \text{Ac-TPP} + \text{CO}_2$



附录 2

- (1) $\text{G6P}; r_1 - r_2 - r_7 = 0;$
- (2) $\text{Rib5P}; r_7 - r_8 - r_9 = 0;$
- (3) $\text{Xyl5P}; r_8 - r_{10} - r_{11} = 0;$
- (4) $\text{Rib5P}; r_9 - r_{10} = 0;$
- (5) $\text{E4P}; r_{12} - r_{11} = 0;$
- (6) $\text{Sed7P}; r_{10} - r_{12} = 0;$
- (7) $\text{Fru6P}; r_2 - r_3 + r_{11} + r_{12} = 0;$
- (8) $\text{GAP}; 2r_3 - r_4 + r_{10} + r_{11} - r_{12} = 0;$
- (9) $\text{PEP}; r_4 - r_5 - r_{17} = 0;$
- (10) $\text{Pyr}; r_5 - r_6 - r_{22} - r_{23} - r_{24} = 0;$
- (11) $\text{AcCoA}; r_6 - r_{13} - r_{26} = 0;$
- (12) $\alpha\text{-KG}; r_{13} - r_{14} - r_{15} + r_{18} + r_{22} + r_{25} + r_{26} = 0;$
- (13) $\text{Glu}; r_{15} - r_{18} - r_{21} - r_{22} - r_{25} - r_{26} = 0;$
- (14) $\text{SucCoA}; r_{14} - r_{16} = 0;$
- (15) $\text{OAA}; r_{16} + r_{17} - r_{13} - r_{18} = 0;$
- (16) $\text{ASA}; r_{18} - r_{20} = 0;$
- (17) $\text{Ac-TPP}; r_{23} - r_{24} - r_{19} = 0;$
- (18) $\alpha\text{-KIV}; r_{24} - r_{25} - r_{26} = 0;$
- (19) $\text{NADPH}; 2r_7 + r_{13} - r_{15} - r_{18} + r_{19} - r_{20} - 2r_{21} = 0$