

基于代谢网络模型的谷氨酸发酵产酸速率在线预测

张成燕 郜培 史仲平 毛忠贵

(江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

摘要 建立并简化了谷氨酸棒杆菌 S9114 生产谷氨酸的产酸期的中心碳代谢网络。利用已经在线测量的菌体的比 CO_2 生成速率(CER)和比氧消耗速率(OUR)在线预测谷氨酸的生成速率。并将速率进行积分,得到的值与离线测量值进行比较,得到谷氨酸的最终浓度比离线测量的值高 17%。

关键词 谷氨酸棒杆菌 S9114, 代谢反应模型, 在线预测, 谷氨酸

1990 年代以来,代谢流网络分析技术出现并取得了长足的发展。使用代谢网络技术建立的数学模型克服了传统建模方法中参数意义不明,输入输出关系难以解释等缺点,充分利用生物化学的知识和模型,具有很大的通用性和伸缩性^[1]。代谢流分析技术能够提供代谢网络的流量分配信息,了解代谢网络各个子路的流量分配关系,有利于分析目的产物流向中的颈瓶所在和计算最大理论产量等。但由于构造型代谢网络模型的复杂性,迄今为止人们对代谢网络技术的研究和应用几乎全部停留在分析发酵过程的不同阶段的代谢流上^[2~4]。近年来国外利用代谢网络模型在线预测发酵过程状态和进行过程优化的研究和报道开始出现^[5,6],但数量很少。

近年来,关于谷氨酸棒杆菌的代谢网络研究开展了很多工作,如谷氨酸发酵的代谢流分布^[4];分子生物学实验回补途径的研究^[7]和核磁共振方法的不同碳源上生长的代谢流的比较等等^[8]。文中利用简化的谷氨酸棒杆菌 S9114 代谢网络模型在线推定了谷氨酸发酵的在线产酸速率。

1 材料和方法

1.1 菌种

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamatum*) S9114, 本实验室保藏。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25, K_2HPO_4 1.5, MgSO_4 0.6, MnSO_4 5 mg/L, FeSO_4 5 mg/L, 玉米浆 25, 尿素 2.5(分消加入), pH 7.0~7.2。

发酵培养基(g/L): $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 140, K_2HPO_4 1, MgSO_4 0.6, MnSO_4 2 mg/L, FeSO_4 2 mg/L, 硫酸

素 50 $\mu\text{g/L}$, 玉米浆 15, 尿素 3(分消加入), pH 7.0~7.2。

1.3 培养条件

种子培养条件:从活化斜面接种 2 环于种子培养基中,在 32℃、200 r/min 条件下培养 8~10 h,镜检细胞生长正常,无杂菌。

发酵控制条件:在 5L 的发酵中,罐压保持在 0.07 MPa;通过与搅拌转速联动来控制溶氧;接种量为 8%,温度控制为 32℃,pH 控制为 7.2。发酵至第 12 h 流加 50% 的葡萄糖。

1.4 离线参数测定

葡萄糖的测定:用 SBA-40B 生物传感仪测定;谷氨酸的测定:用 SBA-40B 生物传感仪测定;菌浓测定:用分光光度计于 620 nm 下测定。

1.5 在线参数测定

CO_2 、 O_2 分压的测定:用 KLM2000 尾气分析仪测定。

1.6 在线测量的数字滤波

尾气中 CO_2 和 O_2 分压的在线测量的数字滤波采用低频的移动平均滤波^[10]:

$$y(k) = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} x(k-i) \quad k \geq N \quad (1)$$

式中, k 为当前的采样时刻; $y(k)$ 是当前时刻的滤波输出; $x(k)$ 为当前时刻的实际测量值(即尾气中 O_2 或 CO_2 的分压); N 是经时递推平均处理窗口的长度。这里取经时递推平均处理窗口的长度 N 为 10^[9]。

1.7 比氧消耗速率(OUR)和比 CO_2 生成速率(CER)的计算

$$\text{OUR} = \frac{F_{\text{in}}}{0.0224 V} \left[n_{\text{CO}_2, \text{in}} - \frac{n_{\text{O}_2, \text{out}} \times n_{\text{N}_2, \text{in}}}{1 - n_{\text{O}_2, \text{out}} - n_{\text{CO}_2, \text{out}}} \right] \quad (2)$$

第一作者:硕士研究生。

收稿日期:2004-10-20, 改回日期:2005-12-24

$$CER = \frac{Fin}{0.0224V} \left[\frac{n_{O_2,out} \times n_{N_2,in}}{1 - n_{O_2,out} - n_{CO_2,out}} - n_{CO_2,in} \right] \quad (3)$$

式中, F_{in} 为空气流量, m^3/h ; V 为发酵液体积, m^3 ; $n_{O_2,in}$ 为进入发酵液空气中 O_2 的体积分数; $n_{N_2,in}$ 为进入发酵液空气中 N_2 的体积分数; $n_{O_2,out}$ 为尾气中 O_2 的体积分数; $n_{CO_2,out}$ 为尾气中 CO_2 的体积分数; $n_{CO_2,in}$ 为进入发酵液中 CO_2 的体积分数。

2 谷氨酸棒杆菌代谢网络与谷氨酸速率方程的构建

谷氨酸发酵的菌体生长期和产酸期是不相偶联的。文中只考虑谷氨酸发酵的产酸期而不考虑菌体的生长期。以葡萄糖为唯一碳源培养时,谷氨酸棒杆菌 S9114 生物合成途径包括:糖酵解途径(EMP),三羧酸循环(TCA),磷酸己糖(HMP),伍德-沃克曼反应(CO_2 的固定反应)^[10]。整个代谢网络模型复杂,需要简化。假定如下:(1)中间产物处于拟稳态,在整个反应中不积累;(2)假定 P/O 比是 3;(3)合并单途径的反应,只考虑到分支途径的结点^[11]。通过简化得到代谢流程图(图 1)和 9 个独立的反应方程式。

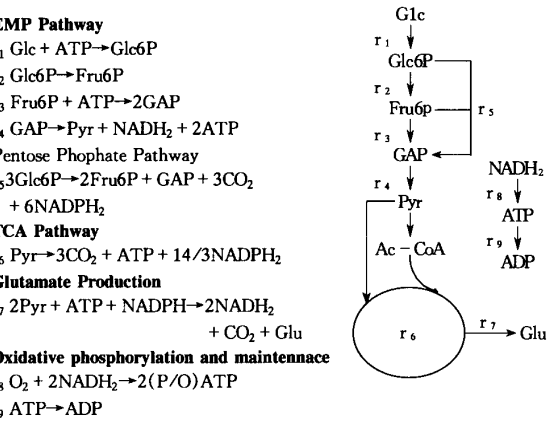


图 1 谷氨酸棒杆菌 S9114 的简化代谢网络

9 个简化的代谢反应方程式中包含了 11 个代谢物。物料平衡方程表达为:

$$Er = 0 \quad (4)$$

r 是包含 4 个代谢物和 9 个代谢反应的 (13×1) 的净转化速率的行向量。

$$r = [r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6, r_7, r_8, r_9, r_{Glu}, r_{Glu}, r_{O_2}, r_{CO_2}]^T, E \text{ 是 } (11 \times 13) \text{ 的物料平衡矩阵。}$$

根据拟稳态原理,7 个中间代谢产物(G6P, F6P,

G3P, Pyr, $NADH_2$ 和 $NADPH_2$)在代谢过程中既不增加也不减少,因此它们的净转化速率为 0。再加上 r_{O_2} 和 r_{CO_2} 即 OUR 和 CER 可以在线测得。得到已知的速率矩阵 $r^m = [r_{O_2}, r_{CO_2}]$ 。而未知速率矩阵 $r^c = [r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6, r_7, r_8, r_9, r_{Glu}, r_{Glc}]^T$ 可以通过矩阵运算得到。

$$r^c = -A^{-1}Br^m \quad (5)$$

矩阵 A (11×11) 对应于未知速率矩阵 r^c , 矩阵 B (11×2) 对应于已知速率矩阵 r^m 。

$$E = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 3 & 3 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & -1 & 2 & 0 & 1 & -1 & 4 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 2 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 6 & 4.67 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{matrix} \text{Glutamate} \\ \text{Glucose} \\ O_2 \\ CO_2 \\ G6P \\ F6P \\ G3P \\ Pyr \\ ATP \\ NADH_2 \\ NADPH_2 \end{matrix} \quad (6)$$

3 结果和讨论

图 2 是谷氨酸的发酵的离线参数曲线图。从图 2 可以看出,谷氨酸发酵的菌体生长期和产酸期是不相偶联的。在前 10 h 是菌体的生长期,谷氨酸略有增加。在第 10 h,菌体的 OD_{620} 已经不在增加了,菌体也进入了产酸期。因此就考虑发酵开始的第 10 h 代谢网络。

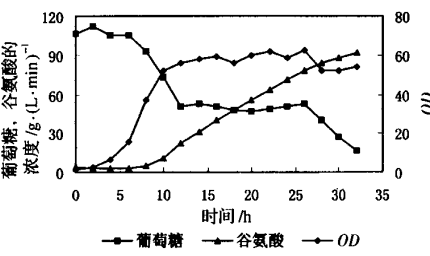


图 2 发酵培养中 OD_{620} , 葡萄糖, 谷氨酸浓度

从谷氨酸发酵的第 10 h 开始计算谷氨酸的生成速率,如图 3。从图 3 可以看出,谷氨酸发酵的产酸的速率变化不是很大,但到大约 1700 min 后有个明显的下降。从图 2 可以看出,到第 28 h 菌体开始部分自溶,谷氨酸产生的浓度增加速率在明显降低。

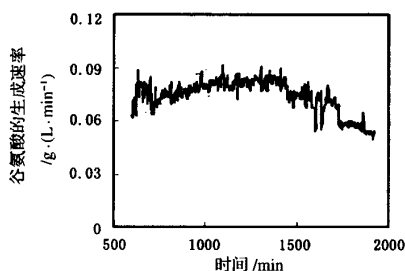


图3 利用代谢网络模型在线计算产酸期
谷氨酸的生成速率

图4中的曲线是将谷氨酸的生成速率对时间进行积分,得到谷氨酸的生成浓度随时间的时时变化,图4中的点是离线测得的谷氨酸的浓度。从第10 h开始算起,可以得到最终的谷氨酸的离线测量值是92g/L,而在线积分值是108g/L,偏离17%。这是因为我们在代谢网络图中只考虑了主要的代谢反应,而没有考虑少量的代谢副产物,如有机酸、氨基酸等^[12]。此外,还有少量的菌体的生长,从而把这部分也归入了谷氨酸的生成量中。

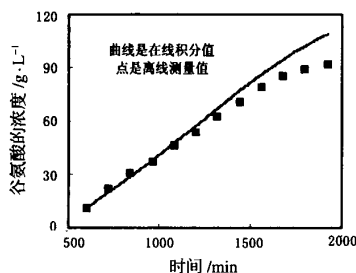


图4 在线积分计算和离线测量产酸期
谷氨酸的生成浓度

4 小 结

在合理简化代谢网络的基础上,利用物料平衡建立谷氨酸生成速率方程的数学模型。利用已经在线

测量的菌体的 *CER* 和 *OUR*, 在线预测谷氨酸的生成速率。通过在线积分值与离线测量值比较,其值比离线测量值低 17%, 分析其原因主要是只考虑了谷氨酸发酵的最主要的代谢流途径。

参 考 文 献

- Holms H. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli* [J]. FEMS Microbiol Reviews, 1996, 19: 85~116
- 李志敏, 叶 勤. 大肠杆菌乙酸钠耐受株的代谢流分析[J]. 华东理工大学报, 2002, 28: 248~2
- 杨 艳, 曹竹安, 李 春. 谷氨酰胺产生菌 NS611 的代谢流分析[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22: 70~75
- Takac S. J Chnhk, S Mivituau. Metabolic flux distribution for the optimized production of *L*-glutamate[J]. Enzyme & Microbial Tech, 1998, 23: 286~300
- N. Takiguchi, H Shianzu, S. Shioin. , An on-line physiological state recognition system for the lysine fermentation process based on a metabolic reaction model [J], Biotechnol Bioeng, 1997, 55: 170~181
- Tada K, Kishimoto M, T Omisi. , Constrained optimization of lysine production based metabolic flux using a mathematical programming method [J], Biosci & Bioeng, 2000, 91: 344~351
- Delaunary S, Uy D, Baucher M F, et al. Important of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation[J]. Metabolic Engineering, 199, 1: 334~343
- Volker F Wendisch, Albert A DE Graaf, Hermann Sahm, et al. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analysis with *Corynebacterium glutamicum* durin growth on acetate and glucose[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 3 088~3 096
- 王树青, 元英进. 生化过程自动化技术[M]. 北京: 化学工业出版社
- 于信令. 味精工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995. 3
- 陈 坚, 李 寅. 发酵过程优化原理与实践[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 7
- Guzide Calik. Product and by-product distributions in glutamic acid fermentation by *Brevibacterium flavum*: effects of the oxygen transfer[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9: 91~101

An On-line Glutamate Production Rate for the Glutamate Fermentation Process Based on a Metabolic Reaction Model

Zhang Chengyan Gao Pei Shi Zongping Mao Zhonggui

(The key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036, China)

ABSTRACT A metabolic network of the *Corynebacterium glutamicum* S9114 of glutamate production period was established and modified. Glutamate production rate was determined using measured on-line *CER* and *OUR* of the *Corynebacterium glutamicum* S9114. By comparing value of on-line rate integral and off-line measurement. It is found that glutamate concentration calculated on-line was 17% higher than measured off-line.

Key words *Corynebacterium glutamicum* S9114, metabolic reaction model, glutamate, on-line measurement