

文章编号 :1009 - 038X(2002)01 - 0038 - 05

乳酸发酵短杆菌中碳架流向赖氨酸的导向与分析

潘军华 , 潘中明 , 曾嵘涓 , 张星元

(江南大学 生物工程学院 , 江苏 无锡 214036)

摘 要 :对乳酸发酵短杆菌生物合成赖氨酸的代谢途径及其代谢流量从理论上进行了分析 , 计算了乳糖发酵短杆菌合成赖氨酸的最大理论转化率 . 对代谢途径及其遗传调控进行了分析 , 通过 NTG 诱变育成了一株带有 FP^s 、 AEC^r 、 MA^r 和 Leu^- 4 种遗传标记的赖氨酸高产菌株 , 使赖氨酸的产量提高到 54.6 g/L , 并分析了这些标记对代谢流量改变的影响 .

关键词 :赖氨酸 ; 乳酸发酵短杆菌 ; 氟代丙酮酸 ; 代谢流 ; 代谢控制发酵

中图分类号 :TQ 92

文献标识码 :A

Redirection and Analysis of the Carbon Flux to the Biosynthetic Pathway of Lysine in *Brevibacterium lactofermentum*

PAN Jun-hua , PAN Zhong-ming , ZENG Mei-juan , ZHANG Xing-yuan

(School of Biotechnology , Southern Yangtze University , Wuxi 214036 , China)

Abstract : In this paper , the biosynthesis of lysine and the theoretical distribution of its metabolic flux were analyzed , and the theoretical yield of lysine in *Brevibacterium lactofermentum* was calculated to be 0.76 . Based on the pathway analysis and the knowledge of its metabolic regulation , a lysine producer was obtained by mutagenesis with N-methyl-N-nitronitrosoguanidine of strain 1230 with four genetic markers , FP^s , AEC^r , MA^r and Leu^- . After optimization of the fermentation conditions , the lysine production was increased to above 54.6 g/L , however , the emphasis of this work was put on the analysis of the effects of these genetic markers on the redirection of metabolic flux .

Key words : Lysine ; *Brevibacterium lactofermentum* ; fluoropyruvate ; metabolic flux ; metabolic control fermentation

赖氨酸和其它氨基酸一样是细胞合成蛋白质的材料 , 是中间代谢产物 . 在正常的细胞中 , 由于细胞所具有的自我调节作用 , 不能过量积累赖氨酸 . 要使细胞在发酵中过量积累赖氨酸 , 最有效的方法是根据菌种的代谢特性 , 人为地改变菌种的代谢及代谢调节特性 , 使代谢流按照预定方向流动 .

菌种不同 , 赖氨酸生物合成的调节机制不同 ,

作者选取乳酸发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*) 作为出发菌株 , 采用亚硝基胍和紫外诱变筛选具有 S-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC) 抗性、亮氨酸(Leu^-) 缺陷、氟丙酮酸(FP) 敏感型及甲基天冬氨酸(α -MA) 抗性型的突变株 , 对其赖氨酸生物合成途径和代谢调节机制进行了进一步的研究和探讨 .

收稿日期 2001 - 09 - 10 ; 修订日期 2001 - 12 - 06 .

作者简介 : 潘军华 (1976 -) 男 , 湖北武汉人 , 生物工程硕士研究生 .

万方数据

1 材料与方法

1.1 出发菌株

乳酸发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*) 1230.

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 CM 牛肉膏 0.3 g/dL, 蛋白胨 1 g/dL, NaCl 0.5 g/dL, 固体培养基另加 2 g/L 的琼脂, pH 7.2~7.4, 0.1 MPa 下灭菌 30 min.

1.2.2 基本培养基 MM 葡萄糖 2 g/dL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/dL, 尿素 0.25 g/dL, K_2HPO_4 0.1 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/dL, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dL, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mg/dL, 生物素 5 $\mu\text{g}/\text{dL}$, VB_1 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$, 琼脂 1.5 g/dL, pH 7.0, 0.1 MPa 下灭菌 15 min.

1.2.3 发酵培养基) 葡萄糖 14 g/dL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g/dL, K_2HPO_4 0.1 g/dL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/dL, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/dL, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.8 mg/dL, 生物素 5 $\mu\text{g}/\text{dL}$, VB_1 20 $\mu\text{g}/\text{dL}$, 豆饼水解液 5 g/dL, CaCO_3 2 g/dL, pH 7.0, 0.07 MPa 下灭菌 7 min.

1.3 培养条件

1.3.1 斜面菌种 30 °C 下培养 36 h, 冰箱冷藏, 每两个月移接一次.

1.3.2 种子活化 往复式摇床上 90 r/min, 30 °C 培养 8~12 h, 装液量 50 mL (500 mL 的三角瓶中).

1.3.3 摇瓶发酵 往复式摇床, 110 r/min, 30 °C 培养 72 h, 按种量 5 g/dL, 装液量 30 mL (500 mL 的三角瓶中).

1.4 分析方法

1.4.1 还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法^[1], 待测液适当稀释后加 DNS 于 520 nm 比色.

1.4.2 赖氨酸的定性 0.5 μL 样液点于三号滤纸, 纸层析. 展开剂展开后, 干燥箱中于 100 °C 烘 3 min, 喷显色剂, 于 100 °C 显色 5 min, 根据标准样斑点判断. 展开剂中 V(正丙醇):V(浓氨水)=5:2, 显色剂为含茚三酮 0.5 g/dL 的丙酮溶液.

1.4.3 赖氨酸的定量 茚三酮法^[1].

1.4.4 菌浓的测定 取 0.5 mL 样液加入到 10 mL 0.25 mol/L 的盐酸中, 620 nm 下比色.

1.4.5 pH 值的测定 直接用酸度计测定.

1.5 诱变方法

取对数生长前期的菌液 5 mL, 移入带塞无菌离心管内, 3 000 r/min 离心 10 min, 用无菌生理盐水洗涤, 离心, 再次洗涤, 离心, 用 5 mL pH 6.98 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液^[2]制成单细胞菌悬液(约

10^8 mL^{-1}).

称取少量 NTG, 用少量丙酮先将其溶解(处理质量体积比为 10:1)^[3], 然后用 pH 6.98 的缓冲液配成 1 mg/mL 的 NTG 溶液.

移取适量 NTG 溶液, 加入到单细胞悬液中, 使 NTG 质量浓度为 0.25 mg/mL. 30 °C 水浴中振荡, 分别取处理时间为 15、30、45 min 的菌液, 用缓冲液离心洗涤 3 次, 制成单细胞悬液, 涂布于筛选平板.

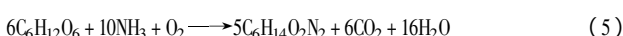
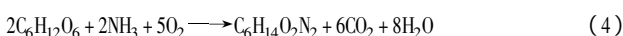
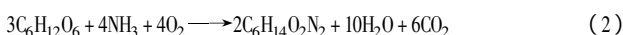
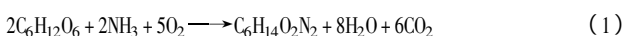
1.6 筛选方法

通过实验确定 AEC 的抗性质量浓度为 2 mg/mL, 而含 5 mg/mL $\alpha\text{-KG}$ 的 $\alpha\text{-MA}$ 的抗性质量浓度为 0.2 mg/mL, 诱变后将适当质量浓度的菌液分别涂布于含有高于抗性质量浓度的药物平板即可筛选出 AEC^r、MA^r 突变菌株.

FP 敏感型菌株的筛选方法如下: 使 MM + Leu (0.2 mg/mL) 培养基中 FP 浓度分别为 100、20、4、0.8 $\mu\text{mol/L}$, 将浓缩富集后的菌液涂于 CM 平板, 长出的单菌落——对应点种于不同 FP 浓度的平板上, 30 °C 培养 24 h 观察生长情况. 0.8、4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的平板上对应菌落均长出, 20 $\mu\text{mol/L}$ 中极少数未长出, 100 $\mu\text{mol/L}$ 中极少数长出. 继续培养 12 h, 生长情况依旧. 将 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 上均未长出的菌落在浓度为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 的平板挑出, 进一步用同样方法检验敏感型.

2 乳酸发酵短杆菌合成赖氨酸代谢流量的理论分析及最大转化率的计算

式(1)~(5)为文献中发表的赖氨酸发酵的定量反应方程式. J Shvinka 等^[4]指出赖氨酸合成中间产物草酰乙酸可由三羧酸循环或 PEP 羧化途径获得: 当草酰乙酸通过三羧酸循环合成时, 赖氨酸合成的理论转化率为 0.51(式 1); 当草酰乙酸由 PEP 合成时, 赖氨酸合成的理论转化率为 0.86(式 3); 而宫衡^[5]则认为, 通过这两条途径的赖氨酸理论转化率分别为 0.51(式 4)和 0.85(式 5); 式(2)是张克旭给出的一个发酵反应方程式^[7], 按此式得赖氨酸的理论转化率为 0.68.



综上所述, 赖氨酸发酵理论转化率的研究很多, 但结果不一, 目前较为广泛接受的是 J Shvinka 的观点, 即赖氨酸合成的中间产物由 PEP 合成时赖

氨酸发酵的最大理论转化率为 0.86.看来对赖氨酸发酵的最大理论转化率的问题有必要进行更加深入地讨论.

作者在前人研究的基础上,通过对乳酸发酵短杆菌赖氨酸合成途径进行定量的质、能衡算,就赖氨酸发酵过程的最大理论转化率问题作了进一步的研究.

2.1 乳酸发酵短杆菌赖氨酸的合成途径

在短杆菌属的细菌中,赖氨酸是由天冬氨酸经 α - ϵ -二氨基庚二酸途径合成.中间代谢产物丙酮酸、草酰乙酸、天冬氨酸产生途径如图 1 所示.

- ① 在以葡萄糖为唯一碳源时,丙酮酸主要由磷酸烯醇式丙酮酸经丙酮酸激酶催化产生.
- ② 草酰乙酸的合成可以有 3 条途径:a)由乙酰 CoA 经三羧酸、乙醛酸循环产生;b)由磷酸烯醇式丙酮酸经磷酸烯醇式丙酮酸羧化(PEPC)催化产生;c)由丙酮酸经丙酮酸羧化酶催化产生.
- ③ 天冬氨酸的合成主要由天冬氨酸氨基转移酶催化草酰乙酸而产生.

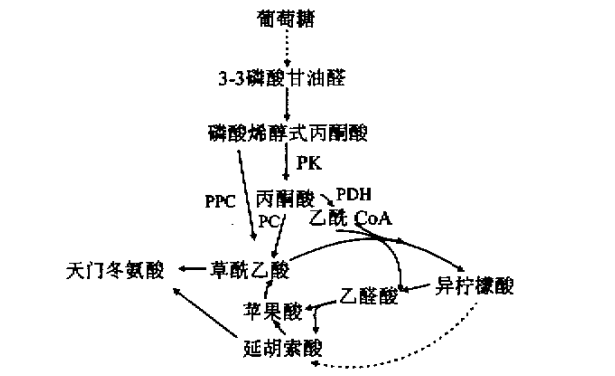


图 1 中间代谢产物的形成图
Fig.1 Formation of intermediate metabolites
因此,对于乳酸发酵短杆菌,由葡萄糖合成赖氨酸的途径有 3 条:

- ①或②通过三羧酸循环或丙酮酸羧化反应
- 葡萄糖 → 丙酮酸 $\xrightarrow{\text{PDH或PC}}$ 草酰乙酸 → 天冬氨酸 → 赖氨酸
- ③ 通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应
- 葡萄糖 → 磷酸烯醇式丙酮酸 → 草酰乙酸 → 天冬氨酸 → 赖氨酸
- 磷酸烯醇式丙酮酸 → 丙酮酸 → 赖氨酸

2.2 乳酸发酵短杆菌中赖氨酸合成的 3 条途径的质、能反应平衡式

按照以上 3 条途径对赖氨酸的合成进行分析,可以写出反应的物质与能量平衡式.

在途径①中,2 mol 的葡萄糖生成 4 mol 的丙酮

酸.其中 1 mol 的丙酮酸直接用于赖氨酸的合成,1 mol 的丙酮酸在三羧酸循环中被完全氧化,另 2 mol 的丙酮酸经乙醛酸循环合成草酰乙酸.这样 2 mol 的葡萄糖合成 1 mol 的赖氨酸.

在途径②中 1 mol 的葡萄糖生成 2 mol 的磷酸烯醇式丙酮酸.其中 1 mol 的磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸直接用于赖氨酸的合成并形成 2 α -二氢吡啶二羧酸,另 1 mol 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化形成草酰乙酸,用于赖氨酸的合成.这样 1 mol 的葡萄糖生成 1 mol 的赖氨酸.

在途径③中 1 mol 的葡萄糖生成 2 mol 的丙酮酸.其中 1 mol 的丙酮酸直接用于赖氨酸的合成,另 1 mol 的丙酮酸羧化形成草酰乙酸,用于赖氨酸的合成.这样 1 mol 的葡萄糖生成 1 mol 的赖氨酸.

表 1 反映了 3 条途径中的能量平衡.在计算能量平衡时采用以下两个假设:

- 1) 葡萄糖通过主动运输进入细胞内,每输送 1 mol 的葡萄糖,消耗 1 mol 的 ATP.
- 2) 赖氨酸形成期,菌体的浓度和组成不变.

表 1 各代谢途径的能量平衡
Tab.1 Energetic balance of the motabolic pathways

反应	反应号		
	1	2	3
ADP/ATP 偶联			
葡萄糖主动运输	-2	-1	-1
Glc→G6P	-2	-1	-1
F6P→FDP	-2	-1	-1
1,3-2P-GA→3-P-GA	4	2	2
PEP→PYR	4	1	2
PEP→OAA	0	1	0
PYR→OAA	0	0	-1
ScCoA→ScA	1	0	0
Asp→Asp-P	-1	-1	-1
ScA→ScCoA	-1	-1	-1
共计	1	-1	-2
NAD/NADH ₂ 偶联			
GA-3-P→1,3-2P-GA	4	2	2
PYR→AcCoA	3	0	0
α -KG→ScCoA	1	0	0
MLA→OAA	3	0	0
共计	11	2	2
FAD/FADH ₂ 偶联			
ScA→FMA	2	0	0
共计	2	0	0
NADP/NADPH ₂ 偶联			
ICA→ α -KG	1	0	0
Asp-P→ASA	-1	-1	-1
DDP→H4D	-1	-1	-1
NH ₃ 固定			
共计	-2	-2	-2
共计	-3	-4	-4

注:Glc:葡萄糖;G6P:6-磷酸-葡萄糖;F6P:6-磷酸-果糖;FDP:1,6-二磷酸-果糖;GA-3-P:3-磷酸-甘油醛;1,3-2P-GA:

1-3-二磷酸-甘油酸 ; 3-P-GA 3-磷酸-甘油酸 ; PEP : 磷酸烯醇式丙酮酸 ; PYR : 丙酮酸 ; OAA : 草酰乙酸 ; ScCoA : 琥珀酰辅酶 A ; ScA : 琥珀酸 ; Asp : 天门冬氨酸 ; Asp-P : 天门冬氨酸磷酸 ; ICA : 异柠檬酸 ; α -KG : α -酮戊二酸 ; FMA : 延胡羧酸 ; ASA : 天门冬氨酸- β -半酸 ; DDP : 2,3-二氨基吡二羧酸 ; H4D : Δ^1 -吡啶-2,6-二羧酸 .

由上表可得出 3 条途径的质能平衡式分别为 :

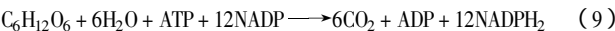
① $2C_6H_{12}O_6 + 2NH_3 + 2H_2O + ADP + 11NAD + 2FAD + 3NADPH_2 \longrightarrow C_6H_{14}O_2N_2 + 6CO_2 + ATP + 11NADH_2 + 2FADH_2 + 3NADP$ (6)

② $C_6H_{12}O_6 + 2NH_3 + ATP + 2NAD + 4NADPH_2 \longrightarrow C_6H_{14}O_2N_2 + 4H_2O + ADP + 2NADH_2 + 4NADP$ (7)

③ $C_6H_{12}O_6 + 2NH_3 + 2ATP + 2NAD + 4NADPH_2 \longrightarrow C_6H_{14}O_2N_2 + 4H_2O + 2ADP + 2NADH_2 + 4NADP$ (8)

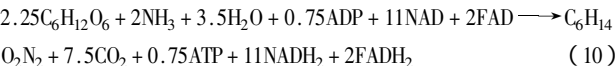
2.3 NADPH₂ 的供应

从式 (6)~(8) 可以看出 , 3 条途径合成赖氨酸都必须供应足够的 NADPH₂ , 以满足大量合成的需要 . 而在细菌中除 1 mol 的丙酮酸在三羧酸循环中能够产生 1 mol 的 NADPH₂ 外 , 其余的 NADPH₂ 均要由磷酸戊糖途径(HMP) 供给 . 而在 HMP 途径中供应 NADPH₂ 的反应方程式为 :

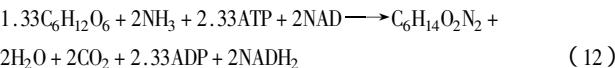
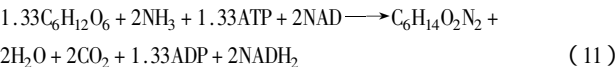


2.4 最大理论转化率

对于途径 ① , 产生 1 mol 的赖氨酸需 3 mol NADPH₂ , 由式 (9) 可得产生 1 mol 赖氨酸需 0.25 mol 葡萄糖由 HMP 途径完全氧化 , 反应虽需供给能量 , 但在有分子氧的情况下 , 反应产生的 NADH₂ 经电子传递链产生的 ATP 足够维持反应继续进行 . 因此由式 (6) 和 (9) 可得途径 ① 的总反应式为 :



同样 , 由式 (7) 和 (9) , 式 (8) 和 (9) 分别得途径 ② ③ 的总反应式为 :



可见途径 ② ③ 反应的 理论转化率相同 . 以式 (10) 和式 (11) 进行计算可得 : 途径 ① 合成赖氨酸的理论转化率为 0.45 ; 途径 ② 或 ③ 合成赖氨酸时 , 转化率达最大值 0.76 .

3 结果与分析

菌种选育路线如图 2 所示 , 经过两次 NTG 诱变 , 一次紫外诱变 , 筛得的突变株依次带上 AEC^r、Leu^r、F^r、 α^- - MA^r 四种遗传标记 , 每一阶段所筛得的菌株经摇瓶发酵并分析 , 结果见表 2 .

3.1 AEC^r 标记对碳架流的导向

天冬氨酸激酶(AK) 分别受赖氨酸和苏氨酸的单独反馈抑制 , 也受赖氨酸和苏氨酸的增效反馈抑制 . 1 mmol 苏氨酸抑制酶活力 41 % , 1 mmol 赖氨酸抑制酶活力 45 % , 而两者均存在 1 mmol 时抑制酶活力 82 %^[7] .

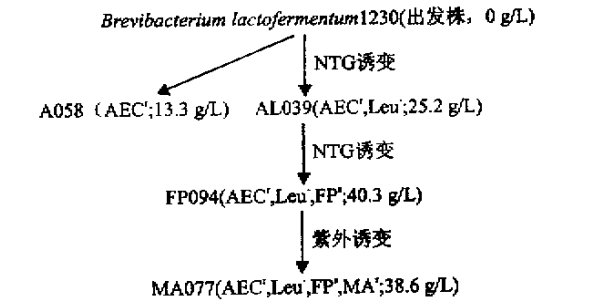


图 2 菌种选育路线

Fig.2 Breeding procedure from strain 1230

表 2 各性状菌株摇瓶发酵结果

Tab.2 Comparison of strains fermenting in shaking flasks				
菌株	菌浓 OD 值 (620 nm)	残糖质量 分数/ %	产酸量/ (g/L)	耗糖转化率/ %
1230	5.22	2.88	—	—
A058	5.20	3.6	13.30	20.5
AL039	5.25	3.5	25.74	24.5
FP094	1.36	2.74	41.46	36.8
MA077	1.27	2.54	39.84	34.8

赖氨酸的结构类似物 S-(β -aminoethyl)-L-Cys (AEC) 与苏氨酸一起在天冬氨酸激酶的变构部位结合 , 抑制酶的活性 . 利用 AEC 抗性平板筛选得到的菌株 , 其天冬氨酸激酶调节部位编码的结构基因发生突变 , 赖氨酸对其合成途径的反馈调节被解除 . 这样 , 赖氨酸合成途径上的限速步骤变得通畅 , 该分支流量也必增大 . A058 菌株的发酵结果也显示 , 这一标记的作用显著 .

3.2 Leu^r 标记对碳架流的影响

在乳酸发酵短杆菌中 , 赖氨酸的生物合成与亮氨酸的生物合成之间存在代谢互锁 . 在赖氨酸合成的分支途径上的第一个酶即 DDP 合成酶的合成受亮氨酸的阻遏 , 在此情况下 , 副产物丙氨酸、缬氨酸生成量显著增加 . 这是因为 DDP 合成酶的合成受到阻遏 , 酶水平显著下降 , 使丙酮酸流向赖氨酸的代谢受阻 , 导致丙酮酸流向丙氨酸、缬氨酸 . 为了提高赖氨酸产量 , 筛选亮氨酸缺陷型以解除亮氨酸对 DDP 合成酶的阻遏 . 发酵结果也显示 , AL039 比 A058 产酸高出近一倍 .

3.3 FP^s 标记对丙酮酸去向的影响

草酰乙酸是赖氨酸合成的前体物,草酰乙酸可以由三羧酸循环生成,也可由磷酸烯醇式丙酮酸或丙酮酸经二氧化碳固定生成.草酰乙酸的合成方式不同,赖氨酸对糖的收率有较大差异.根据草酰乙酸的合成方式,乳酸发酵短杆菌中赖氨酸合成中间代谢有 2.2 所谈及的 3 条途径.

途径①每消耗 2 mol 葡萄糖生成 1 mol 赖氨酸.途径②/③每消耗 1 mol 葡萄糖生成 1 mol 赖氨酸.但作者希望菌体的碳代谢以途径②/③为主,以途径①为辅,亦即具有适宜的 PDH/PC 活力比,这样就可以使碳架物质较多地流向草酰乙酸而又能适当流向 TCA 环,以提供菌体生长所需的能量与中间代谢产物,从而大大提高赖氨酸的产率.

氟代丙酮酸与丙酮酸结构相似,由于竞争性抑制,氟代丙酮酸能够抑制 PDH 对丙酮酸的利用,从而直接影响生长.通过筛选 FP^s 突变株,可弱化 PDH^[8],获得 PDH/PC 活力比适于赖氨酸合成的菌种.这由表 2 的结果可见一斑.

3.4 MA^r 对碳架流流向的影响

在乳酸发酵短杆菌中,谷氨酸和草酰乙酸之间由于氨基转移产生天冬氨酸,赖氨酸的产量也就依赖于天冬氨酸生成的量.这暗示天冬氨酸是限制赖氨酸生成的前体物.

在黄色短杆菌中,天冬氨酸对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶有反馈抑制作用,这种抑制作用由于 α -酮戊二酸的存在而增加^[9].抗天冬氨酸结构类似物突变株中天冬氨酸对自身合成途径中酶的反馈抑制已被解除,通往赖氨酸合成途径的碳架流也就增加.

甲基天冬氨酸是天冬氨酸的衍生物,对乳酸发酵短杆菌的生长有拮抗作用,但本研究所得的抗性菌株赖氨酸产量并未提高,而甲基天冬氨酸是否能和天冬氨酸一样抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶并未见报导,因而,可推测甲基天冬氨酸在抑制细胞生长时并不一定是对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶起作用.当然,赖氨酸产量未提高也可能是由于细胞生长较差的缘故.

参考文献：

[1] 蔡武成,彭积厚.生物物质常用化学分析法[M].北京:科学出版社,1982.
[2] 罗明典.L-赖氨酸的微生物生产[J].工业微生物,1986(1):39-43.
[3] 章名春.工业微生物诱变育种[M].北京:科学出版社,1984.
[4] SHVINKA J, VIESTURS U, RUKLISHA M. Yield Regulation If Lysine Biosynthesis in *Brevibacterium flavum*[J]. **Biotech Bioeng**, 1980, 22(4): 897-910.
[5] 宫衡. 赖氨酸发酵优化控制的研究[D]. 无锡: 无锡轻工业学院, 1994.
[6] 张克旭. 氨基酸工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
[7] TOSAKA O, TAKINAMI K, HIROSE Y. L-Lysine Production by s-(2-Aminoethyl)-L-Cysteine and α -Amino- β -hydroxy valeric Acid Resistant Mutants of *Brevibacterium lactofermentum*[J]. **Agric Biol Chem**, 1978, 42(4): 745-752.
[8] 陶文沂, 张星元, 丁友彤, 等. 微生物遗传与生理育种学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
[9] SHIIO I, Ujigawa-Takeda K. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by synergistic Action of Aspartate and 2-Oxoglutarate[J]. **Agric Biol Chem**, 1979, 43(12): 2479-2485.

(责任编辑:李春丽,朱明)