

文章编号:1009-038X(2003)02-0038-06

谷氨酰胺产生菌 NS611 的代谢流分析

杨艳, 陈奎发, 李春, 刘雨磊, 曹竹安

(清华大学 化学工程系, 北京 100084)

摘要: 建立并完善了谷氨酸棒杆菌 NS611 生产谷氨酰胺的中心碳代谢网络. 研究了菌体生长和生产阶段的代谢流分布, 结果说明该菌葡萄糖的代谢以糖酵解途径为主, 在产酸阶段丙酮酸羧化反应的代谢流量较大, NADPH 不是谷氨酸棒杆菌 NS611 代谢的限制性因素. 研究了氮饥饿处理对代谢流分布的影响, 提出要提高谷氨酰胺的产量必须适当保留 α -酮戊二酸的向下氧化的功能, 以保证能量供给.

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 代谢流分析; 谷氨酰胺; 谷氨酸

中图分类号: Q 591

文献标识码: A

The Metabolic Flux Analysis of *Corynebacterium Glutamicum* NS611

YANG Yan, CHEN Kui-fa, LI Chun, LIU Yu-lei, CAO Zhu-an

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In this paper, a metabolic network of the *Corynebacterium glutamicum* NS611 was established and modified. It showed that glucose was mainly metabolized through the EMP pathway. In the production phase, the metabolic flux of the pyruvate carboxylation was large. NADPH was not the limiting factor of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* NS611. The metabolic fluxes of the *Corynebacterium glutamicum* NS611 with and without nitrogen starvation were compared. It showed that the oxidation of the α -ketoglutarate should be properly retained to ensure the energy supply.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; metabolic flux analysis; glutamine; glutamate

谷氨酸棒杆菌是一种重要的微生物, 主要用于生产赖氨酸和谷氨酸, 经过基因改造或发酵条件的改变还可生成其它的氨基酸, 如苏氨酸^[1]和谷氨酰胺. 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, 如代谢反应计量关系的赖氨酸优化生产策略^[2]; 分子生物学实验回补途径的研究^[3]和核磁共振方法的不同碳源上生长的代谢流的比较^[4], 其目的都在于期望通过代谢网络分析来提高

氨基酸的生产. 但迄今为止, 谷氨酸棒杆菌生产谷氨酰胺的代谢流分析还未见报道.

谷氨酰胺是谷氨酸的 γ -羧基酰胺化的产物, 它不仅具有很高的营养价值, 而且具有显著的药理作用^[5]. 目前谷氨酰胺的生产主要采用发酵法, 在其发酵生产中, 谷氨酸向谷氨酰胺的转化是至关重要的步骤. 作者所在课题组采用的在线氮饥饿工艺处理提高了谷氨酰胺合成酶(GS)的活性, 成功地促进

收稿日期: 2002-06-21; 修回日期: 2002-09-05.

作者简介: 杨艳(1978-), 女, 湖北仙桃人, 工学硕士; * 为通信作者, E-mail: lichun@mail. tsinghua. edu. cn.

了谷氨酸向谷氨酰胺的转化,使谷氨酰胺的产量提高了 70%^[6]。但是从代谢工程角度考虑,要进一步提高谷氨酰胺的产量,应从谷氨酸棒杆菌的代谢网络分析出发,考察中心碳代谢和能量代谢的影响。

作者首先建立了适合于谷氨酸棒杆菌 NS611 的代谢网络,比较了菌在生长和生产阶段的代谢流分布,并研究了氮饥饿处理对谷氨酸和谷氨酰胺生产的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种及其元素分析

谷氨酸棒杆菌的突变株 NS611 (*Corynebacterium glutamicum* NS611); 由作者所在实验室筛选并保藏; 委托中科院化学所分析得到的菌体元素组成 (均为质量分数 %): N (12.60 ± 0.05); C (47.52 ± 0.08); H (6.66 ± 0.01); O (28.54 ± 0.07); 灰分 (4.68)。故该菌的化学式为 $C_{3.96}H_{6.66}O_{1.78}N_{0.90}$ 。

1.2 培养基和培养条件

摇瓶发酵培养基组成 (g/L): 葡萄糖 100, 玉米浆 10.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, $CaCO_3$ 50.0。pH 为 6.5。常规工艺下, 采用 1.6 g/L 脲 + 40.0 g/L 的 NH_4Cl 一次性加入作为氮源。在氮饥饿工艺下, 培养前期氮源 (1.6 g/L 脲) 耗尽 (pH 降至 6.5) 4~6 h 后再加入 40.0 g/L 的 NH_4Cl 。摇瓶培养的条件为: 1 000 mL 带挡板摇瓶装液 50 mL, 温度 33 ℃, 摇床转速 200 r/min。

1.3 菌体质量浓度的测定

发酵液用去离子水稀释 50 倍后测定 A_{600} 。

1.4 葡萄糖、乳酸、谷氨酸和谷氨酰胺的定量分析

发酵液在适当稀释并经离心处理 (4 000 r/min, 10 min) 后取上清液, 用 SBA-40C 生物传感器 (山东省科学院生物研究所) 测量葡萄糖、乳酸和谷氨酸。

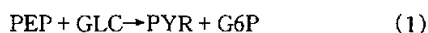
谷氨酰胺的定量分析采用酸解-酶膜联用法^[7]。

2 代谢网络的建立

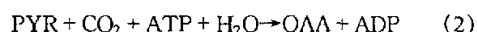
谷氨酸棒杆菌 NS611 较为完整的代谢网络是经查阅大量信息以及结合自身体系的特点和实验结果确定的。因此对谷氨酸棒杆菌 NS611 的代谢网络进行如下说明:

1) 葡萄糖 (GLC) 的运输和消耗是在磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 磷酸转移酶系统 (PEP-linked phototransferase system, 简称 PTS) 催化下的基团运

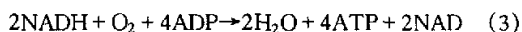
送^[8,9], 生成丙酮酸 (PYR) 和 6-磷酸葡萄糖 (G6P)。



2) 回补途径: 以葡萄糖为碳源时乙醛酸支路活性很低, 故不考虑乙醛酸循环^[10]; 丙酮酸羧化酶 (Pc) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPc) 为谷氨酸棒杆菌中最重要的两条回补途径, 其中 Pc 回补的代谢流占到回补流量的 90%^[11], 故回补途径中仅考虑丙酮酸的羧化, 其产物为草酰乙酸 (OAA)。



3) 在谷氨酸棒杆菌中只能找到两个能量释放位点, 认为其磷氧比 P:O 为 2^[12], 故有



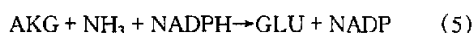
用于细胞维持的 ATP 消耗在模型中表现为向 ADP 的转化, 其中 NADH 为还原型辅酶 I, NAD 为氧化型辅酶 I。

4) 不少文献中通过代谢分析得出谷氨酸棒杆菌中应该存在转氢酶活性的结论, 但只有部分体系能从酶活上找到证据, 本文假定存在转氢酶活性^[13], 即存在反应

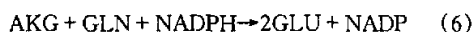


其中 NADPH 为还原型辅酶 II, NADP 为氧化型辅酶 II。

5) 前体消耗系数: 参考大肠杆菌的细胞组成并根据本菌株产物分泌和元素组成作适当修正, 其中由于谷氨酸 (GLU) 和谷氨酰胺 (GLN) 既是产物又是组成细胞的必要成份, 故将其作为前体物质计算。此外由于在谷氨酸棒杆菌的生长过程中, 氨几乎都是通过谷氨酸脱氢酶来固定的, 故将铵离子用相应的前体物质 α -酮戊二酸 (AKG)、谷氨酸和 NADPH 代替^[14]。



6) 谷氨酸的生成: 由于摇瓶工艺在产酸阶段铵盐质量浓度很高, 大大过量, 故谷氨酸的生成如 (5) 式, 而非 (6) 式^[15]。



7) 经氨基酸分析说明发酵液中除了谷氨酸和谷氨酰胺, 几乎没有其它氨基酸生成。

根据以上原则得到前体消耗系数如表 1 所示。

图 1 是 NS611 发酵培养的典型生长和产酸曲线。从图 1 可以看出, 谷氨酸棒杆菌的生长与产酸是同时进行的 (指数生长期产酸速率低, 进入静止期则产酸明显加快), 因此提出的代谢网络是一个能兼顾菌生长和生产的全面网络, 如图 2 所示。

表 1 产生 1 g 细胞所需前体物质量

Tab.1 Building blocks needed to produce 1g of protoplasm

前体 代谢物	产 1 g 细胞需前体物质量		前体 代谢物	产 1 g 细胞需前体物质量	
	$n/\mu\text{mol}$	$n(\text{C})\text{mmol}$		$n/\mu\text{mol}$	$n(\text{C})/\text{mmol}$
G6P	205	1.230	AKG	- 7672.1	- 38.360
F6P	70.9	0.4254	R5P	897.7	4.4885
GAP	129	0.387	E4P	361	1.444
G3P	1496	4.488	NADPH	8159	8.159
PEP	519.1	1.5573	NADH	- 3547	- 3.547
PYR	2430.8	7.2924	ATP	- 17516	- 17.516
ACCOA	3747.8	7.4956	GLU	8500	42.500
OAA	1786.7	7.1468	GLN	250	1.250
CO ₂	1750	1.75			

注:G6P:6-磷酸葡萄糖;F6P:6-磷酸果糖;GAP:3-磷酸甘油醛;G3P:3-磷酸甘油酸;PEP:磷酸烯醇式丙酮酸;PYR:丙酮酸;ACCOA:乙酰辅酶 A;OAA:草酰乙酸;AKG: α -酮戊二酸;R5P:5-磷酸核糖;E4P:4-磷酸赤藓糖

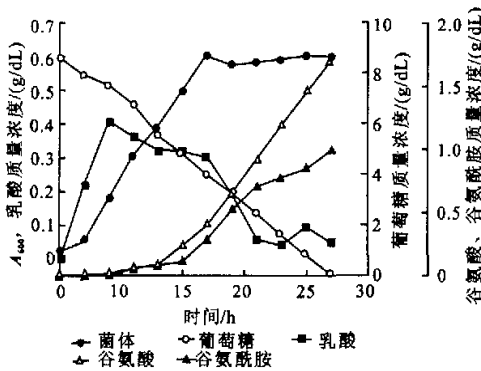


图 1 发酵培养中菌体、葡萄糖、乳酸、谷氨酸和谷氨酰胺质量浓度随时间的变化

Fig.1 Time course of cell, glucose, lactate and glutamine concentrations during fermentation

3 结果与讨论

3.1 生长期与产酸期代谢流分布的比较

如图 1,按菌的生长和代谢物浓度变化的趋势将培养时间分为 0~8 h(指数生长前期)、8~16 h(指数生长中期)、16~24 h(指数生长后期)、24~32 h(静止前期)、32~44 h(静止后期)5 个阶段。

图 2 中的 39 个变量,F21-F36 可根据比生长速率 μ 计算得到,F1,F7,F38,F39,此外通过拟稳态假设可得到 18 个方程,如表 2 所示(其中 F 表示的均为一个代谢反应的总碳流,如反应 $\text{PEP} + \text{GLC} \rightarrow \text{PYR} + \text{G6P}$ 中葡萄糖的消耗速率每小时每克干细胞为 1 毫摩尔,即 1 mmol/h(以每克干物细胞计),则该反应的每小时每克干细胞总碳流为 9 mmol/h(以每克干物细胞计),故求解体系是一个具有 1 个自由度的不定体系,需采用线性规划。常用的目标

函数有最小的 ATP 生成、最小的 NADPH 或 NADH 生成^[16],由于该体系考虑了转氢反应,故采用 Min (NADPH + NADH)作为目标函数。

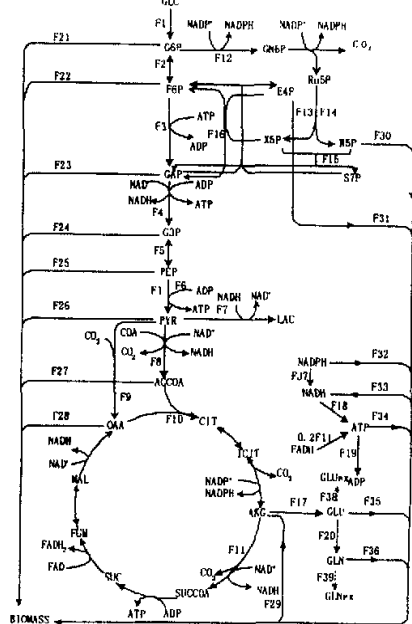


图 2 谷氨酸棒杆菌 NS611 的代谢网络

Fig.2 The metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* NS611

注:GN6P:6-磷酸葡萄糖酸;RUSP:5-磷酸核酮糖;X5P:5-磷酸木酮糖;S7P:7-磷酸景天庚酮糖;LAC:乳酸;COA:辅酶 A;CIT 柠檬酸;ICIT:异柠檬酸;SUCCOA:琥珀酰辅酶 A;SUC:琥珀酸;FUM:延胡索酸;MAL:苹果酸;FADH₂:还原型黄素腺嘌呤二核苷酸;FAD:黄素腺嘌呤二核苷酸。

对具有 1 个自由度的线性规划问题,用 Lingo 进行求解,得到主要代谢流如表 3 所示,表中的流量数据是把各时期对应的葡萄糖消耗速率作为

100,以此为基准得到的相对值,其中表 3 中各阶段 100 分别代表 44.64, 28.18, 13.15, 11.93, 11.26 mmol/h(以每克干细胞计)。

通过表 3 中的数据,可以发现葡萄糖主要通过糖酵解途径代谢;丙酮酸的羧化反应产生的草酰乙酸作为 TCA 循环的回补途径流量在产酸期增大,这也通过酶活的测定得到了验证。通过代谢流分析发现,如三羧酸循环中间代谢产物没有积累(有机酸分析结果显示实际上也是很少的),则在产酸期,α-酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶催化下生成谷氨酸的反应流量与丙酮酸羧化反应流量之间是存在一定关系的,即 $F17 = 1.25 \times F9$ 。故要想提高谷氨酰胺产量,必须首先强化丙酮酸羧化途径,没有酮戊二酸的适量积累就不可能大量生成产物;从 F37 的数据看来,菌体产酸所需的还原力是足够的,因此 NADPH 不是谷氨酸棒杆菌 NS611 代谢的限制性因素。

表 2 根据拟稳态假设得到的守恒方程
Tab.2 The equations derived under the pseudo-steady state assumption

编号	中间代谢物	守恒方程
1	G6P	$0.6667F1 - F2 - F12 - F21 = 0$
2	F6P	$F2 - F3 + 0.6F15 + 0.6667F16 - F22 = 0$
3	RU5P	$0.8333F12 - F13 - F14 = 0$
4	E4P	$0.4F15 - 0.4444F16 - F31 = 0$
5	X5P	$F13 - 0.5F15 - 0.5556F16 = 0$
6	R5P	$F14 - 0.5F15 - F30 = 0$
7	GAP	$F3 - F4 + 0.3333F16 - F23 = 0$
8	G3P	$F4 - F5 - F24 = 0$
9	PEP	$-0.3333F1 + F5 - F6 - F25 = 0$
10	PYR	$0.3333F1 + F6 - F7 - F8 - 0.75F9 - F26 = 0$
11	ACCOA	$0.6667F8 - 0.3333F10 - F27 = 0$
12	AKG	$0.8333F10 - F11 - F17 + F29 = 0$
13	OAA	$F9 - 0.6667F10 + 0.8F11 - F28 = 0$
14	NADPH	$0.1667F10 + 0.3333F12 - 0.2F17 - F32 - F37 = 0$
15	NADH	$0.3333F4 - 0.3333F7 + 0.3333F8 - 0.4F11 - F18 + F33 + F37 = 0$
16	ATP	$-0.1667F3 + 0.3333F4 + 0.3333F6 - 0.25F9 + 0.4F11 + 2F18 - F19 - 0.2F20 - F34 = 0$
17	GLU	$F17 - F20 - F35 - F38 = 0$
18	GLN	$F20 - F36 - F39 = 0$

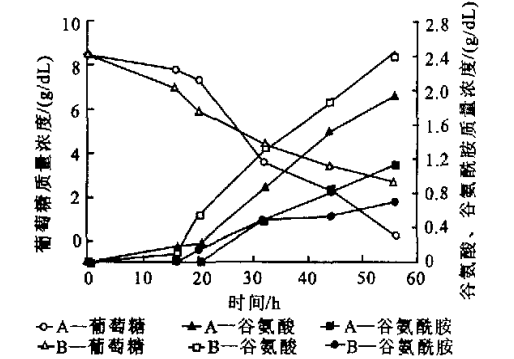
3.2 氮饥饿处理对代谢流分布的影响

提高谷氨酰胺产量的一个很关键的酶是谷氨酰胺合成酶(GS),而 GS 的表达受到高质量浓度铵盐的阻遏。提高谷氨酸棒杆菌中 GS 表达量的一种常用方法是进行氮饥饿处理,将菌体在氮源充足的条件下培养达到所需浓度,然后将菌体离心、洗涤后转入无氮源的培养基中继续培养 3~4 h。这种实验方法显然不能用于发酵生产中,本课题组提出了限制初始氮源的在线氮饥饿处理方法^[6]。

表 3 各阶段主要代谢流量
Tab.3 Key metabolic fluxes in each phase

变量	I (0~ 8 h)	II (8~ 16 h)	III (16~ 24 h)	IV (24~ 32 h)	V (32~ 44 h)
F2	95.47	96.65	95.63	100.01	100.01
F7	38.81	-4.42	-1.64	-15.19	-0.22
F9	4.75	11.18	31.43	49.01	36.80
F10	86.96	171.17	128.88	156.9	145.26
F17	18.12	22.97	51.03	61.25	45.99
F18	73.51	139.58	94.98	106.23	102.64
F19	197.05	353.82	231.58	255.8	256.93
F20	0.52	4.8	13.92	27.67	12.56
F37	8.83	22.43	9.31	13.9	15.01
F38	0	5.15	20.14	33.58	33.43
F39	0	4.42	13.42	27.67	12.56

如图 3 所示,A 组为经过氮饥饿处理的,即 20 h 加入 NH₄Cl,B 组为 NH₄Cl 和初始氮源一起加入的工艺。从图中可以看出,在产酸后期两组的耗糖和产酸具有很大差别,以 32~56 h 这一段区间为例,其代谢流分布如图 4 和图 5 所示。



A: 经氮饥饿处理, B: 未经氮饥饿处理
图 3 发酵培养中葡萄糖、谷氨酸和谷氨酰胺质量浓度随时间的变化
Fig.3 Time course of glucose, glutamate and glutamine concentrations during fermentation

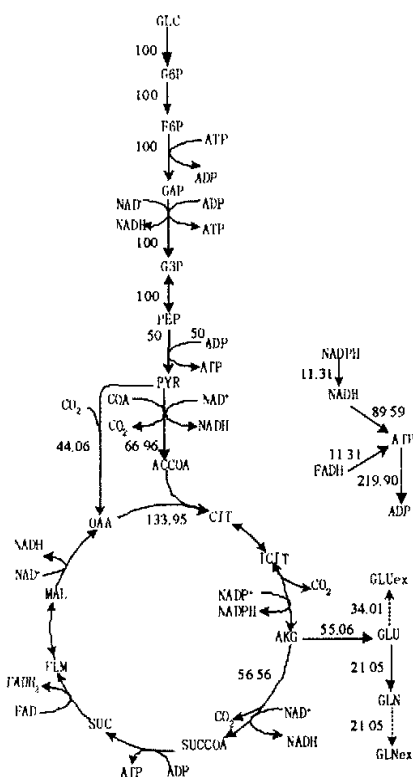


图4 经氮饥饿处理后的代谢流分布

Fig.4 The metabolic flux distribution under nitrogen starvation

从图4,图5的比较中可以看出,未经氮饥饿处理的B组中 α -酮戊二酸继续进行三羧酸循环的比例实际上大于A组,且生成谷氨酸的流量相当高(理论最大值为83.33),但实际上生成的谷氨酰胺很少.这除了与GS酶在高铵离子浓度下被阻遏有关,还与能量代谢的相对低迷有关.在A组中,有相对较高流量的 α -酮戊二酸继续氧化,并进一步生成ATP,为谷氨酸的酰胺化提供能量.从表3中也可以发现用于维持能量的ATP(F19)也是相当多的.因而作者认为文献[17]提出的“切断 α -酮戊二酸向下氧化的支路,使三羧酸循环到 α -酮戊二酸处不再继续向下氧化,而且完全转化成谷氨酸,进而完全生成

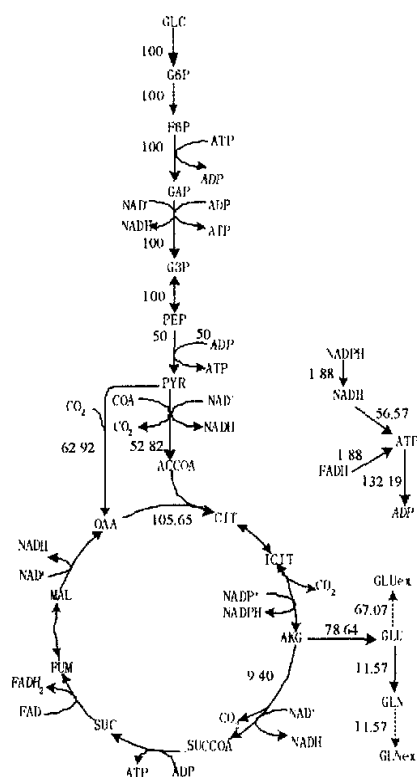


图5 未经氮饥饿处理的代谢流分布

Fig.5 The metabolic flux distribution without nitrogen starvation

谷氨酰胺”的说法是值得商榷的.因此有必要在今后的研究中从能量代谢的角度进一步研究其对谷氨酰胺生产的影响.

4 结 论

通过对谷氨酸棒杆菌 NS611 代谢网络的分析,提出了提高谷氨酰胺产量的代谢调控手段:促进碳流流向 α -酮戊二酸,强化 CO_2 固定反应(提高Pc酶或PEPc酶活性);控制 α -酮戊二酸向下进一步氧化的比例(能维持细胞高的能量状态);提高GS酶活性,促进谷氨酸向谷氨酰胺的转化.

参考文献:

- [1] Grace E.C. Metabolic engineering of amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*[D]. Cambridge MA: MIT, 1995.
- [2] Hiroshi Shimizu, Noboru Takiguchi, Hisaya Tanaka, et al. A maximum production strategy of lysine based on a simplified model derived from a metabolic reaction network[J]. *Metabolic Engineering*, 1999, 1: 299 - 308.
- [3] S Delaunay, D Uy, M F Baucher, et al. Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation[J]. *Metabolic Engineering*, 1999, 1: 334 - 343.

- [4] Volker F Wendisch, Albert A DE Graaf, Hermann Sahn, *et al.* Quantitative determination of metabolic fluxes during cointegration of two carbon sources: comparative analysis with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and glucose [J]. **Journal of Biotechnology**, 2000, 3088 - 3096.
- [5] Calder, Philip C. More good news about glutamine[J]. **Nutrition**, 2000, 16 (1): 71 - 73.
- [6] 陈奎发, 杨艳, 焦鹏, 等. 在线氮饥饿处理对谷氨酰胺合成的促进作用[J]. **食品与发酵工业**, 2002, 28(7):20 - 23.
- [7] 陈奎发, 蒋楠, 杨艳, 等. 酸解-酶膜联用法检测谷氨酰胺[J]. **食品与发酵工业**, 2002, 28(9): 26 - 28.
- [8] Serpil Takac, Giizide Calik. Metabolic flux distribution for the optimized production of L-glutamate[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998, 23: 286 - 300.
- [9] Gregory N Stephanopoulos, Aristos A Aristidou, Jens Nielsen. *Metabolic engineering: principles and methodologies*[M]. San Diego: Academic Press, 1998.
- [10] 张克旭, 陈宁, 张蓓, 等. 代谢控制发酵[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 277 - 287.
- [11] Davin Uy, Stephane Delaunay, Jean-Marc Engasser, *et al.* A method for the determination of pyruvate carboxylase activity during the glutamic acid fermentation with *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1999, 39: 91 - 96.
- [12] Joseph John Vallino. Identification of branch-point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbations[D]. Cambridge MA: MIT, 1991. 63 - 65.
- [13] S M Park, A J Sinskey, Gregory Stephanopoulos. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1997, 55(6): 864 - 879.
- [14] John L Ingraham, Ole Maaloe, Frederick C Neidhardt. *Growth of the bacterial cell*[M]. Sunderland Mass: Sinauer Associates, 1983.
- [15] Anton A Schulz, Helen J Collett, Sharon J Reid. Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2001, 205:361 - 367.
- [16] Sang Yup Lee, Eleftherios T Papoutsakis. *Metabolic engineering*[M]. New York: Marcel Dekker, 1999. 13 - 55.
- [17] 张永志. 谷氨酰胺生产菌的育种思路[J]. **天津微生物**, 1990, 4:17 - 20.

(责任编辑:杨萌)

(上接第37页)

- [2] Lee M T, Chen W C, Chou C C. Nutritional factors that affect the production of cholesterol oxidase by *Rhodococcus equi* no. 23 [J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 1997, 26: 159 - 162.
- [3] Bloch K. The biological synthesis of cholesterol[J]. **Science**, 1965, 150:19 - 25.
- [4] J P Slotte, L Gronberg. Oxidation of cholesterol oxidase in low and high density lipoproteins by cholesterol oxidase[J]. **J Lipid Res**, 1990, (31):2235 - 2242.
- [5] 韩振芳. 胆固醇氧化酶的发酵研究[J]. **无锡轻工大学学报**, 1998, 18(2):18 - 22.
- [6] J MacLachlan, A T L Wotherspoon. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications[J]. **Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2000, (72):169 - 195.

(责任编辑:李春丽)