

文章编号 :1009-038X(2003)05-0015-04

L-色氨酸产生菌 TQ2223 的途径分析

王 健 , 张 蓓 , 张克旭 , 杨海军 , 陈 宁

(天津科技大学 食品科学与生物工程学院 ,天津 300222)

摘 要 :应用途径分析方法分析了在稳态时谷氨酸棒杆菌 TQ2223 菌株由葡萄糖发酵生产 L-色氨酸的途径 ,确定了 L-色氨酸合成的最佳途径及其代谢流分布和最大理论产率 .通过刺激所选途径的酶活来提高 L-色氨酸产率 .结果表明 ,经 NH_4^+ 调节后 ,代谢途径流量发生显著变化 ,可以使色氨酸的代谢流从 6 提高到 8.8.

关键词 :L-色氨酸 ;途径分析 ;谷氨酸棒杆菌

中图分类号 :TQ 922

文献标识码 :A

Pathway Analysis for Production of L-Tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* TQ2223

WANG Jian , ZHANG Bei , ZHANG Ke-xu , YANG Hai-jun , CHEN Ning

(College of Food Science and Bioengineering ,Tianjin University of Science and Technology ,Tianjin 300222 ,China)

Abstract :Pathway analysis for production of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* TQ2223 at steady state was conducted in this paper. Theoretical yield and flux distribution for optimal pathways were determined. The flux of tryptophan was increased from 6 to 8.8 by regulating the chemical regulative factors such as NH_4^+ .

Key words :L-tryptophan ;pathway analysis ;*Corynebacterium glutamicum*

L-色氨酸是人体和动物生命活动中 8 种必需氨基酸之一 ,对人和动物的生长、发育和新陈代谢起着重要作用 .近年来 ,随着色氨酸在医药、食品和饲料等方面应用的开拓 ,市场需求量不断增加 .目前 ,全世界年需求量在 10 000 t 以上 ,而实际产量仅有 1 000 t 左右 ,远远不能满足市场需求 .提高色氨酸发酵产率、降低生产成本已成为目前一个重要课题 .近年来 ,人们利用代谢工程方法改变细胞内部的代谢流分布 ,使其在一定环境下生成更多的产物 .代谢流分析(Metabolic Flux Analysis ,MFA)、途径分析(Pathway Analysis)等方法 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

基本方法 .代谢网络分析已从简单的分析代谢反应挂图发展到深入研究代谢网络结构^[1] .途径分析中的凸分析在代谢工程中广泛应用 ,一些线性程序的方法可用于计算最优产率等问题^[2~4] .作者应用该方法分析了谷氨酸棒杆菌由葡萄糖生产 L-色氨酸的途径 ,确定了 L-色氨酸合成的最佳途径及其代谢流分布和最大理论产率 ,并通过发酵过程优化 ,使目的产物 L-色氨酸的代谢流明显提高 .

1 材料与方法

1.1 供试菌株

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

收稿日期 2003-05-12 ; 修回日期 2003-06-12.

基金项目 天津市科委攻关项目(983113711)资助课题.

作者简介 王 健(1976-),女,吉林长春人,代谢控制发酵博士研究生.

TQ2223($\text{Phe}^- + \text{Tyr}^- + 5\text{MT}^+ + \text{SG}^+ + 5\text{FT}^+ + \text{CIN}^+$), 天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌种.

1.2 培养基

参见文献 [5].

1.3 培养方法

1.3.1 斜面活化培养 32 ℃ 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, 置于旋转式摇床上 (220 r/min), 32 ℃ 振荡培养 16 h.

1.3.3 5 L 自控发酵罐分批发酵 5 L 发酵罐中装液量 2.5 L, 接种量 250 mL, 32 ℃ 下通风比 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 68 h.

1.4 分析方法

1.4.1 发酵液中残糖测定 采用 SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所制造)测定.

1.4.2 OD 值测定 稀释一定倍数后, 在波长 620 nm 处用 752 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司制造)测定.

1.4.3 发酵液中色氨酸含量测定 采用比色法测定[6].

2 结果与讨论

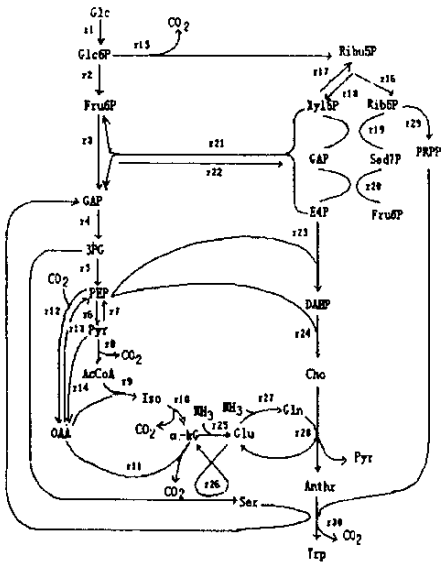
2.1 色氨酸生物合成途径分析

一个反应网络的动力学可用公式 $dX/dt = SV$ 表示. 式中 X 是细胞内代谢物浓度向量, S 是化学计量学矩阵, V 是通过反应的代谢流. 在细胞内, 一些反应是不可逆的, 为方便定义每个反应都是单向的, 将可逆反应定义为两个独立的反应. 这样在稳态时, 反应网络必须满足 $SV = 0 (V \geq 0)$. 由此, 若以向量 e_i 来代表一个基本反应模型, 则所有可能代谢流的向量 y 可定义为这些模型的非线性组合: $y = \sum a_i e_i (a_i \geq 0)$. 这些反应模型可由凸分析确定, 由计算机算得[7]. 从凸分析角度看, 反应的不可逆使网络中的代谢流处于一个凸圆锥中, 该圆锥可由一些矩阵方法计算出的向量确定. 这些向量在代谢系统环境中被看作是极端途径, 每一个射线向量对应着一个特殊的途径和约束系统的不等式. 代谢网络中的一个反应模型就是一个不能由其它基本模型的非负线性组合产生的反应序列. 因此, 这些反应模型中就有一个代表了最高的产率和代谢流的分布.

理想载流途径的改变开始于酶的确定、理论产率的计算和确定最优的代谢流分布.

谷氨酸棒杆菌由葡萄糖生产色氨酸的途径见图 1. 作者基于以下原则建立代谢网络 (1) 由于菌

体生长过程中代谢网络复杂, 同时主要考察葡萄糖到色氨酸的完全转化, 因此作者不考虑细胞生长代谢; (2) 在色氨酸合成过程中, ATP 产生的过程非常复杂, 所以在分析过程中并未考虑能量平衡; (3) 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; (4) 由于不同的酶可以催化同一个反应, 重复反应被去除. 为了简化化学计量学矩阵, 将从葡萄糖到色氨酸途径的多数反应看作不可逆的($\text{Rib}5\text{P} \rightarrow \text{Xyl}5\text{P}$, $\text{PEP} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}$, $\text{Fru}6\text{P} + \text{GAP} \rightarrow \text{Xyl}5\text{P} + \text{E4P}$ 除外), 包含可逆反应会产生反应模型的无效循环, 所以在途径组合过程中不允许选取可逆反应的两个方向进行组合. 由葡萄糖生成 L-色氨酸的化学计量学矩阵见表 1. 根据表 1 数据, 由计算机可计算出该代谢可分为 25 个模型, 见表 2. 反应模型中的每个元素代表相应反应的相对代谢流. 基本模型中的“0”代表不必要的反应或可以被敲除的基因. 每种模型色氨酸的产率可由模型中色氨酸与葡萄糖的摩尔比算出, 产率最高的基本模型代表了最优途径.



1 :Glc→Glc6P 2 :Glc6P→Fru6P 3 :Fru6P→2GAP 4 :GAP→3PG 5 :3PG→PEP 6 :PEP→Pyr 7 :Pyr→PEP 8 :Pyr→AcCoA + CO₂ 9 :AcCoA + OAA→Iso 10 :Iso→aKG + CO₂ 11 :aKG→OAA + CO₂ 12 :3EP + CO₂→OAA 13 :OAA→PEP + CO₂ 14 :Pyr + CO₂→OAA 15 :Glc6P→Rib5P 16 :Rib5P→Rib5P 17 :Rib5P→Xyl5P 18 :Xyl5P→Rib5P 19 :Xyl5P + Rib5P→GAP + Sed7P 20 :GAP + Sed7P→E4P + Fru6P 21 :Xyl5P + E4P→Fru6P + GAP 22 :Fru6P + GAP→Xyl5P + E4P 23 :PEP + E4P→DAHP 24 :PEP + DAHP→Cho 25 :aKG + NH₃→Glu 26 :Glu + 3PG→aKG + Ser 27 :Glu + NH₃→Gln 28 :Gln + Cho→Anthr + Pyr + Glu 29 :Rib5P→PRPP 30 :Anthr + Ser + PRPP→Trp + GAP + CO₂.

图 1 色氨酸生物合成代谢网络

Fig. 1 Metabolic network map for L-Trp synthesis

反应模型见表 2. 可以算出色氨酸的得率由高到低为 (24, 25) 0.5 (1, 2, 17, 18) 0.44 (21, 22) 0.43 (6, 7, 8, 13, 14, 15) 0.42 (23) 0.40 (4, 5) 0.39, (9, 10, 11, 12) 0.38 (16, 19, 20) 0.36 (3) 0.33.

表 1 由葡萄糖发酵生产色氨酸的化学计量学矩阵

Tab.1 The stoichiometric matrix for L-Trp production from glucose

节点	化学计量矩阵						节点	化学计量矩阵					
Glc6P	1-1000	00000	0000-1	00000	00000	00000	E4P	00000	00000	00000	00001	-11-100	00000
Fru6P	01-100	00000	00000	00001	1-1000	00000	DAHP	00000	00000	00000	00000	001-10	00000
GAP	002-10	00000	00000	0001-1	1-1000	00001	Chor	00000	00000	00000	00000	00010	00-100
3PG	0001-1	00000	00000	00000	00000	-10000	Glu	00000	00000	00000	00000	00001	-1-1100
PEP	00001	-11000	0-1100	00000	00-1-10	00000	Gln	00000	00000	00000	00000	00000	01-100
Pyr	00000	1-1-100	000-10	00000	00000	00100	Anth	00000	00000	00000	00000	00000	0010-1
AcCoA	00000	001-10	00000	00000	00000	00000	PRPP	00000	00000	00000	00000	00000	0001-1
OAA	00000	000-10	11-110	00000	00000	00000	Ser	00000	00000	00000	00000	00000	1000-1
Iso	00000	0001-1	00000	00000	00000	00000	Trp	00000	00000	00000	00000	00000	00001
αKG	00000	00001	-10000	00000	0000-1	10000	ATP	-10-110	1-2000	11-1-10	00000	000-10	0-10-10
Ribu5P	00000	00000	00001	-1-1100	00000	00000	NADH	00010	00101	20000	00000	0000-1	10000
Rib5P	00000	00000	00000	100-10	00000	000-10	NADPH	00000	00000	00002	00000	000-10	00000
Xyl5P	00000	00000	00000	01-1-10	-11000	00000	FADH ₂	00000	00000	10000	00000	00000	00000
Sed7P	00000	00000	00000	0001-1	00000	00000							

表 2 由葡萄糖发酵生产色氨酸的基本反应模型

Tab.2 The basic reaction models for L-Trp production from glucose

反应模型	代谢流分布							反应模型	代谢流分布						
e_1	93362	04000	00006	60022	02444	44444		e_{14}	2406155	05000	005524	186088	02101010	10101010	
e_2	93362	00000	00446	60022	02444	44444		e_{15}	2406155	00000	00101024	186088	02101010	10101010	
e_3	30121	00111	10003	21011	00111	11111		e_{16}	115584	00444	40006	60022	02444	44444	
e_4	3119208	08444	400030	22801010	02121212	12121212		e_{17}	93362	04000	00006	60022	02444	44444	
e_5	3119208	00444	408830	22801010	02121212	12121212		e_{18}	93362	00000	00446	60022	02444	44444	
e_6	1915124	08000	000018	144066	02888	88888		e_{19}	115584	00444	40006	60022	02444	44444	
e_7	1915124	04000	004418	144066	02888	88888		e_{20}	1456105	00555	50009	81033	02555	55555	
e_8	1915124	00000	008818	144066	02888	88888		e_{21}	2357155	010000	000018	162066	04101010	10101010	
e_9	2137146	04444	400018	144066	02888	88888		e_{22}	2357155	00000	00101018	162066	04101010	10101010	
e_{10}	2137146	00444	404418	144066	02888	88888		e_{23}	55342	00222	20000	20200	02222	22222	
e_{11}	390112510	010555	500039	281101313	02151515	15151515		e_{24}	44231	02000	00000	20200	02222	22222	
e_{12}	390112510	00555	50101039	281101313	02151515	15151515		e_{25}	44231	00000	00220	20200	02222	22222	
e_{13}	2406155	010000	000024	186088	02101010	10101010									

可以看出 ,PEP 生成 Pyr 后 ,在糖酵解中不能再生成 PEP ,而在其它途径中被消耗 ,导致 L-Trp 产率不高 ,模型 3 ,16 ,19 ,20 ,23 就是如此 ,其色氨酸的最高摩尔产率为 40%(模型 23)。如果能将 Pyr 重复利用 ,产率就会增加。模型 1 ,4 ,6 ,9 ,11 ,13 ,17 ,21 ,24 通过磷酸烯醇式丙酮酸合成酶 ,模型 2 ,5 ,8 ,10 ,12 ,15 ,18 ,22 ,25 通过丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 ,模型 7 和 14 在磷酸烯醇式丙酮酸合成酶和丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的共同作用下使 Pyr 再生为 PEP ,使产率提高。另外 ,模型 1~22 都是 6-磷酸葡萄糖通过 6-磷酸葡萄糖脱氢酶来生成核酮糖-5 磷酸 ,产生 1 mol 的 CO₂

也会导致碳源的浪费 ,所以最好不通过 6-磷酸葡萄糖脱氢酶来产生戊糖和四糖。产率最高的模型 24 和 25 由 4 mol 葡萄糖生成 2 mol 色氨酸 ,摩尔产率高达 50 % ,见图 2。其原因就是使 Pyr 再生为 PEP ,并且以 F6P 和 GAP 来生成戊糖和色氨酸的前体 E4P ,从而避免了碳源浪费。

2.2 扰动前后主要节点代谢流变化

色氨酸的生物合成具有许多不同的路径 ,确定其产率最大的路径具有重要意义。Niederberger 等的研究表明 ,调节酵母中从分支酸到色氨酸的 5 个酶中的任何一种酶 ,对色氨酸的积累率影响都很小 ,而同时过量表达所有的酶则会产生重要影响。

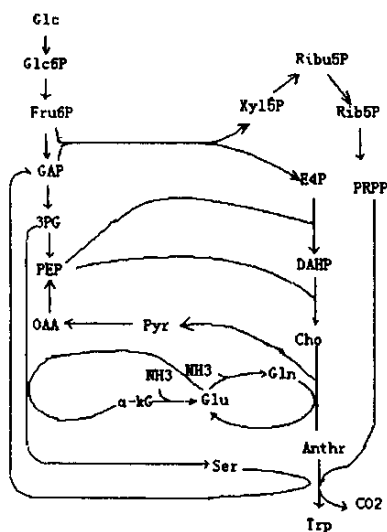


图 2 由葡萄糖合成色氨酸的最优途径

Fig.2 Optimal pathway for converting glucose to L-trp

经途径分析后,一个特殊的代谢路径的所有酶被过量表达时,编码不必要的酶的基因被敲除,就会构建出一个高产的路径.基本模型是理想化的情况,而在活细胞中,代谢流的分布是许多模型的重叠.通过对基本模型的分析,可以确定 L-Trp 生物合成最优的代谢途径(见图 2),调控该途径色氨酸生成的最重要的酶有己糖激酶、磷酸果糖激酶(PFK)、转酮酶(TktA)、DAHP 合成酶(DS)和氨茴酸合成酶(AS).PEP 是 PEP 羧化酶和丙酮酸激酶的竞争底物,为了避免 Pyr 的浪费,可以通过过量表达 Pps 基因来使 Pyr 再生为 PEP 或过量表达 Pck 基因通过 OAA 使 PEP 得以再生.转酮糖酶是无氧磷酸戊糖途径的关键酶,过量表达 TktA 基因会导致由 Fru6P 来生产戊糖和四糖从而提高产率.同时过量表达 DS 和 AS 必然导致色氨酸产量的增加.作者从改变细菌的生存环境来改变代谢流的分布,由于对应不同的外界环境刺激,细胞代谢会产生不同

的代谢流分布,因此在确定最优途径之后可以通过刺激所选途径的酶活来提高产率.TQ2223 具有苯丙氨酸和酪氨酸缺陷($\text{Phe}^- + \text{Tyr}^-$),所以不考虑其对 DS 的抑制作用.又由于该菌具有 5-氟色氨酸抗性,所以不考虑色氨酸对 AS 的反馈抑制.由于 NH_4^+ 的积累一方面导致丙氨酸的积累,从而抑制谷氨酰胺合成酶(GS),导致氨茴酸生成减少,另一方面使 HMP 途径减弱,TCA 循环增强,从而确定在发酵初期减少原培养基中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的量来增加色氨酸的代谢流.将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量浓度降到 20 g/L.扰动前后 PEP 节点处的代谢流量变化见图 3.

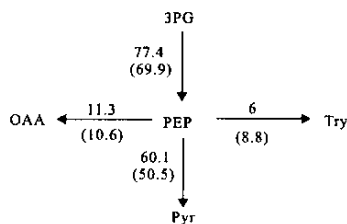


图 3 PEP 节点处的代谢流量变化

Fig.3 The metabolic flux alteration of PEP node

从图 3 可以看出,扰动前 PEP 的代谢流为 77.4, Pyr 的代谢流为 60.1,有 77.6% 的 PEP 生成了 Pyr,造成了碳源的浪费.扰动后 PEP 的代谢流为 69.9, Pyr 的代谢流为 50.5,有 72.2% 的 PEP 生成了 Pyr,减少了 Pyr 的流量,结果使发酵中后期 Trp 的代谢流从 6 增加到 8.8.

3 结 论

应用途径分析的方法分析了在稳态时谷氨酸棒杆菌由葡萄糖生产色氨酸的途径,确定色氨酸合成的最佳途径及此时的代谢流分布和产率.色氨酸的最大理论产率为 50%(摩尔比).经调节因子 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调节后,代谢途径流量可发生显著变化,结果使色氨酸的代谢流从 6 提高到 8.8.

参考文献:

- [1] 张蓓.代谢工程[M].天津:天津大学出版社,2003.
- [2] Schilling C H, Letscher D, Palsson B O. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective[J]. *J Theor Biol*, 2000, 203(2): 229-248.
- [3] Schilling C H, Palsson B O. Assessment of the metabolic capabilities of *H. influenzae* Rd through a genomic scale pathway analysis[J]. *J Theor Biol*, 2000, 203: 249-283.
- [4] Schuster S, Bandekar T, Fell D A. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering[J]. *Trend Biotechnol*, 1999, 17(2): 53-60.
- [5] 高景芝, 房华. 对二甲氨基苯甲醛缩合光度法测定色氨酸的研究[J]. 首都师范大学学报(自然版), 1999, 20(3): 48-52.
- [6] Schuster R, Schuster 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.