

文章编号:1673-1689(2009)03-0366-05

小球藻异养合成叶黄素的代谢流量分析

吴正云^{1,2}, 施春雷², 史贤明^{*2}

(1. 四川大学 食品工程系, 四川 成都 610065; 2. 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 构建了小球藻在异养培养条件下合成叶黄素的代谢网络, 并进行了代谢流量分析。分析结果显示, 目前用于叶黄素合成的代谢流量较低, 如果将其流量增加数倍并不会对小球藻的主要代谢产生明显影响; 叶黄素对葡萄糖的最高理论得率远高于目前的实际得率, 显示在小球藻异养合成叶黄素的得率方面还有很大的优化提高空间。对关键代谢节点流量分配的分析结果表明, 在乙酰辅酶 A 节点, 绝大部分代谢流量进入了三羧酸循环和细胞物质合成途径, 该节点的刚性可能是限制叶黄素产率提高的主要因素。

关键词: 小球藻; 异养培养; 叶黄素; 代谢流分析

中图分类号: TS 2

文献标识码: A

Metabolic Flux Analysis of Lutein Production by Heterotrophic *Chlorella*

WU Zheng-yun^{1,2}, SHI Chun-lei², SHI Xian-ming^{*2}

(1. Department of Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The metabolic network for lutein production by heterotrophic *C. pyrenoidosa* was constructed referring to related literatures and experimental data obtained in our lab, based on which metabolic flux analyses (MFA) was carried out. Analysis results show that the flux for lutein formation is rather low and several-fold increase of the flux will not affect the main metabolism of *Chlorella* significantly; the theoretical maximum yield of lutein on glucose is much higher than the actual experimental results at present, thus large space for the optimization of lutein yield remains. Analyses of the flux distribution over the key branch node show that predominant flux from AcCoA flows to the citric acid cycle and the pathway forming cell macromolecules. The rigidity of AcCoA node is possibly the main factor limiting the elevation of lutein yield.

Key words: *Chlorella pyrenoidosa*, heterotrophic cultivation, lutein, metabolic flux analysis

叶黄素 (lutein) 是一种重要的天然色素, 具有 增加免疫力、抗氧化、抗肿瘤、防止心脑血管疾病及

收稿日期: 2008-04-10

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA02Z226).

作者简介: 吴正云 (1970-), 男, 湖北宜昌人, 工程师, 工学博士, 主要从事食品生物技术方面的研究。

Email: wzy5607@sina.com

* 通讯作者: 史贤明 (1961-), 男, 湖北监利人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品安全和食品生物技术方面的研究。Email: xmshi@sjtu.edu.cn

预防视黄斑退化所引起的视力下降等多种功能^[1-2]。与目前作为叶黄素源的万寿菊等相比,小球藻具有生长迅速,可在发酵罐中规模化培养等优点^[3]。因此,在高效异养培养小球藻的基础上提取叶黄素,是一种极具潜力的生产方式^[4]。

尽管小球藻细胞中叶黄素含量较高,但与目前已实现商业化生产的其它类胡萝卜素源(如杜氏藻等)细胞中的β胡萝卜素含量相比,尚有相当差距^[5]。作者根据有关文献报道以及作者所在实验室的研究结果,构建了小球藻异养合成叶黄素的代谢网络,并进行了代谢流分析计算,以期对叶黄素生产优化控制及代谢网络改造提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 藻株与培养条件

小球藻藻株为 *Chlorella pyrenoidosa* 15-2070。小球藻的异养培养在 19-L 发酵罐 (Bioengineering AG, Wald, Switzerland) 中进行,采用改良的 Basal 培养基^[6],添加起始质量浓度为 38 g/L 的葡萄糖和 7.6 g/L 的 KNO₃。培养控制参数为:培养基装量 12 L,接种体积分数 10%,pH 6.5,温度 28 ℃。溶解氧 50% 饱和浓度,搅拌转速与溶解氧关联,最低搅拌转速设定为 200 r/min。

1.2 分析测定方法

小球藻生物量采用细胞干重法测定^[6],葡萄糖质量浓度用二硝基水杨酸法测定^[7],小球藻中的叶黄素采用高效液相法测定^[8]。

1.3 小球藻异养合成叶黄素的代谢通量模型

根据生物化学理论及文献报道^[9-10],构建小球藻在异养培养条件下合成叶黄素的主要代谢网络,包括糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径、氧化磷酸化、合成细胞主要组分及叶黄素的反应,见图 1。

参考 Yang et al. (2000) 的报道^[11]作如下假设: 1) 三羧酸循环中的乙醛酸回补途径可忽略; 2) NADH 和 NADPH 之间不能相互转化; 3) 用于细胞生长所需的 NADPH 全部来自磷酸己糖途径,且 NADPH 不能通过氧化磷酸化生成 ATP; 4) NADH 的 P/O 值为 2.5, FADH₂ 的 P/O 值为 1.5。在三羧酸循环中生成的大量 NADH 和 FADH₂, 通过氧化磷酸化生成 ATP 为细胞代谢提供能量; 5) 细胞代谢中存在过量的 ATP; 6) 目前尚无关于小球藻类胡萝卜素合成途径的研究报道,假定其类胡萝卜素合成采用真核生物的甲羟戊酸途径(计算结果显示,以甲羟戊酸途径和非甲羟戊酸途径构建网络的代谢流分布大体相近,详细结果略); 7) 小球藻生物量

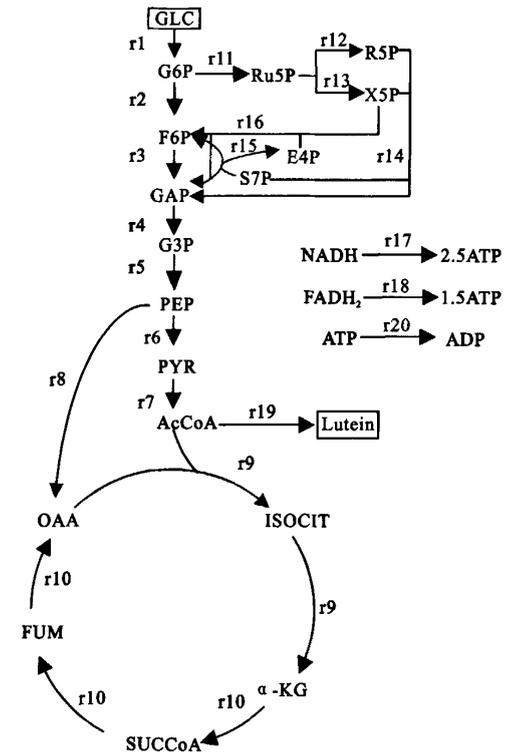
万方数据

由单体物质合成,其单体物质需要量根据生物大分子合成所需单体数^[12]进行计算。

在拟稳态条件下,根据物料平衡原理,代谢网络可以用如下方程表示:

$$A \cdot r = X \tag{1}$$

式中, A 为化学计量系数矩阵,其中元素 A_{ij} 代表第 i 种代谢物在第 j 个代谢反应方程中的化学计量系数。确定计量系数时根据“反应为负,生成为正”的原则; r 为代谢反应的速率矩阵; X 为代谢物的净转化速率矩阵。



GLC—葡萄糖; 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; ISOCIT—异柠檬酸; α-KG—α-酮戊二酸; SUCCoA—琥珀酰辅酶 A; FUM—延胡索酸; OAA—草酰乙酸; Ru5P—5-磷酸核酮糖; R5P—5-磷酸核糖; X5P—5-磷酸木酮糖; E4P—4-磷酸赤藓糖; S7P—7-磷酸景天庚酮糖

图 1 小球藻异养生长和叶黄素合成的代谢网络
Fig. 1 Metabolic network of cell growth and lutein production by heterotrophic *C. pyrenoidosa*

计算结果表明,化学计量系数矩阵 $A(20 \times 20)$ 的秩为 20,故矩阵 A 为满秩矩阵。在代谢物净转化速率矩阵 X 和化学计量系数矩阵 A 均已确定的前提下,求解方程(1),可以计算出代谢反应的速率矩阵 r 。

1.4 软件

代谢通量分析中的计算采用 Matlab 6.5

(Mathworks, USA)实现。

2 结果与分析

2.1 代谢流分布及叶黄素理论得率的计算

19-L 发酵罐中小球藻异养培养的试验结果见图 2。当小球藻迅速生长时,叶黄素质量浓度也随之迅速增加;当培养基中的葡萄糖耗尽后,细胞质量浓度不再增加,叶黄素质量浓度继续升高但增长减慢。由于葡萄糖耗尽后,叶黄素的增加不是来源于葡萄糖,而是来源于细胞内成分的消耗,其代谢相对比较复杂,难以通过代谢物流平衡分析进行估算,因此以下主要对小球藻生长期进行代谢流分析。根据作者所在实验室前期对异养小球藻细胞成分的测定结果^[13],设葡萄糖的消耗速率为 100 mmol/(L·h),计算小球藻生长期的代谢流分布,同时采用线性规划计算叶黄素合成的理想代谢流分布,见表 1。

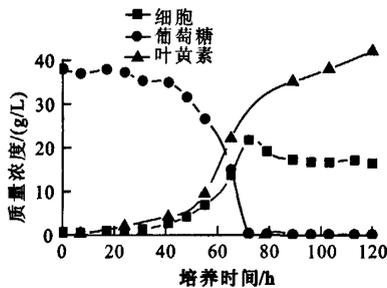


图 2 小球藻异养合成叶黄素的过程

Fig. 2 Time course of lutein production by heterotrophic *C. pyrenoidosa*

表 1 小球藻异养合成叶黄素的代谢流分布

Tab. 1 The metabolic flux distribution of lutein production by heterotrophic *C. pyrenoidosa*

反应速率	实际代谢流/ mmol/ (L·h)	理想代谢流/ mmol/ (L·h)	反应速率	实际代谢流/ mmol/ (L·h)	理想代谢流/ mmol/ (L·h)
r_1	100	100	r_{11}	45.87	60
r_2	34.61	40	r_{12}	17.90	20
r_3	62.58	80	r_{13}	27.97	40
r_4	137.57	180	r_{14}	14.30	20
r_5	131.90	180	r_{15}	14.30	20
r_6	118.87	180	r_{16}	13.67	20
r_7	109.91	180	r_{17}	419.16	306.14
r_8	11.77	0	r_{18}	74.11	7.65
r_9	82.29	0	r_{19}	0.041	7.5
r_{10}	74.03	0	r_{20}	1247.57	388.42

由于小球藻细胞中的叶黄素含量较低,用于叶黄素合成的代谢流量也相对较小。为探讨细胞中万方数据

叶黄素含量提高对小球藻主要代谢的影响,表 2 计算了假定小球藻细胞中叶黄素含量提高 4 倍(接近目前已商业化生产的杜氏藻等细胞中的类胡萝卜素含量^[5],同时细胞比生长速率保持不变时的代谢流分布。由表 2 可见,除叶黄素合成代谢流量外,其它代谢途径的流量改变均不大,其中变化幅度最大的三羧酸循环流量(r_{10})也仅减少了 5.89%。考虑到生物代谢中多余能量耗散的存在^[12],细胞中叶黄素含量提高数倍并不足以对小球藻的细胞生长及主要代谢造成很大影响。

表 2 假定小球藻细胞中叶黄素含量提高 4 倍时的代谢流分布及其变化幅度

Tab. 2 Metabolic flux distribution of lutein production by heterotrophic *C. pyrenoidosa* supposing the cellular content of lutein was quintupled and its variation

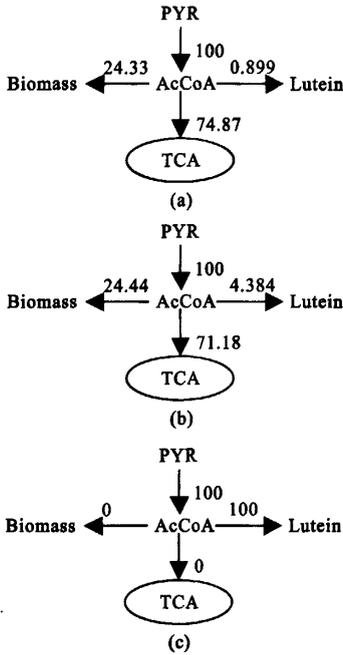
反应速率	代谢流量/ (mol/ (L·h))	变化幅度/ %	反应速率	代谢流量/ (mmol/ (L·h))	变化幅度/ %
r_1	100.00	0	r_{11}	47.18	+2.85
r_2	33.30	-3.78	r_{12}	18.33	+2.44
r_3	62.15	-0.70	r_{13}	28.85	+3.12
r_4	137.13	-0.32	r_{14}	14.74	+3.05
r_5	131.46	-0.33	r_{15}	14.74	+3.05
r_6	118.43	-0.37	r_{16}	14.11	+3.19
r_7	109.47	-0.40	r_{17}	409.56	-2.29
r_8	11.77	0	r_{18}	70.08	-5.44
r_9	77.92	-5.30	r_{19}	0.20	+400
r_{10}	69.67	-5.89	r_{20}	1208.81	-3.11

根据理想代谢流分布,叶黄素对葡萄糖的最高理论得率 = $(7.5 \times 589) / (100 \times 180) = 0.24$ (g/g),即每克葡萄糖在理论上最多可转化为 0.24 g 叶黄素,这一数值远高于目前实际的叶黄素得率(0.001~0.002 g/g)。从理想代谢流与实际代谢流分布之间的比较看,其主要差异体现在三羧酸循环和氧化磷酸化途径的流量上。

2.2 主要节点的代谢流量分析

对叶黄素代谢合成来说,AcCoA 是一个重要的分支节点,在该节点处 AcCoA 分别进入三羧酸循环、细胞物质合成及叶黄素的合成,其流量分配决定了叶黄素的产率。根据表 1~2 中的数据计算,在小球藻生长期,AcCoA 节点处绝大部分的代谢流量进入三羧酸循环,见图 3。其次是用于细胞物质的合成,只有极少部分用于叶黄素的合成,见图 3A;假定小球藻细胞中的叶黄素含量提高 4 倍(比生长速率不变),则用于细胞物质合成的流量基本不变,而 AcCoA 转化为叶黄素的流量增加,同时三羧酸循环流量略有降低,见图 3B;在理想代谢流分

布下,AcCoA 节点处的全部代谢流量被用于叶黄素合成,而用于三羧酸循环和细胞物质合成的流量均为零,见图 3C。然而,这一理论代谢流分布难以实现,原因是:1)细胞需要维持能量,即使在细胞生长停止的情况下,三羧酸循环的流量也不可能为零;2)由于叶黄素是小球藻的细胞内组分,它的合成及贮存在很大程度上是以细胞物质的合成(即细胞生长)为前提的,而且实验结果也显示,当小球藻细胞生长停止后,叶黄素的增加有限^[4]。尽管如此,理论得率与实际得率之间存在巨大差距,这提示在叶黄素对葡萄糖得率方面还有很大的优化提高空间。



(a) 小球藻生长期;(b) 假定小球藻叶黄素含量提高 4 倍;(c) 理想代谢流分布

图 3 AcCoA 节点的代谢流量分配

Fig. 3 Metabolic flux distribution of AcCoA node

2.3 提高叶黄素产率的可能方式

通过与叶黄素合成理想代谢流分布的比较分析,可以对叶黄素产率提高及代谢网络改造提出初步构想。由表 1 和图 2 可以看出,要提高叶黄素对葡萄糖的得率,首先应尽可能减小三羧酸循环和用于细胞物质合成的流量,其次是适当提高磷酸己糖途径流量以保证还原力(NADPH)的供应。

限制通气量是减少三羧酸循环流量的常用方式之一。然而研究结果显示^[14],当限制培养过程中的通气量时,小球藻细胞中叶黄素的积累显著减少,表明充足的通气量为小球藻合成叶黄素所必需,尽管其机理有待进一步研究,但这至少说明减少通气量并无助于提高叶黄素的产率。从小细万方数据

胞物质合成的流量的角度看,实验结果^[4]表明,当小球藻生长减慢时,细胞中的叶黄素含量的确略有增加,但幅度不大,从综合效应来看,叶黄素的合成效率降低,因此通过抑制小球藻细胞生长来提高叶黄素的产率也不是可取的优化方式。

综合以上讨论,AcCoA 节点的流量分配是决定小球藻叶黄素产率的关键因素。根据目前的试验结果,在大多数不同的异养培养条件下,小球藻细胞中叶黄素含量变化范围为 2~4 mg/g^[14],改变幅度很小。这说明改变工艺条件很难影响 AcCoA 节点的流量分配,也就是 AcCoA 节点具有较强的刚性。分析限制小球藻细胞代谢中叶黄素合成流量提高的原因,可能有以下两方面:

1) 催化 AcCoA 向类胡萝卜素转化的酶,尤其是起始步骤中的酶活力(或表达水平)较低。这一假设同文献^[15-16]报道一致。在这些研究中,增加 IPP 和 GGPP(均为由 AcCoA 转化为类胡萝卜素的中间物质)对类胡萝卜素合成具有明显的促进作用。

2) 类胡萝卜素在小球藻细胞中的积累存在反馈抑制。这种抑制的存在可能是由于叶黄素贮存场所的限制,或是保证细胞代谢平衡的需要。支持这一假设的现象有:在基因工程构建的类胡萝卜素合成载体中,大肠杆菌的类胡萝卜素承载能力较低;而酵母则因类胡萝卜素合成代谢的分流造成代谢紊乱并影响其生长^[9]。

进一步深入探讨造成代谢中 AcCoA 节点刚性的原因并设法加以改变,是今后提高小球藻叶黄素生产效率的关键所在。

3 结 语

1) 根据有关文献报道和作者所在实验室的测定结果,构建了小球藻在异养培养条件下合成叶黄素的代谢网络。

2) 代谢流量分析的结果显示,在目前的条件下,用于叶黄素合成的代谢流量较低,叶黄素合成的流量增加数倍并不足以对小球藻的主要代谢产生明显影响。

3) 代谢流量分析的结果说明,叶黄素对葡萄糖的最高理论得率为 0.24 g/L,远高于目前的实际得率(0.001~0.002 g/L),表明在小球藻异养合成叶黄素的得率方面还有很大的优化提高空间。

4) 对关键代谢节点流量分配的分析结果表明,在乙酰辅酶 A 节点,绝大部分代谢流量进入了三羧酸循环和细胞物质合成途径,而且这种流量分配方

式难以通过改变工艺条件而改变,提示该节点具有较强的刚性。

5) 限制小球藻细胞代谢中叶黄素合成流量提高的可能原因是催化 AcCoA 向类胡萝卜素转化的

酶活较低和反馈机制的存在。叶黄素生产效率的进一步提高依赖于对 AcCoA 节点刚性的深入探讨及改变。

参考文献(References):

- [1] Olmedilla B, Granado F, Blanco I, et al. Lutein, but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts; a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study [J]. **Nutrition**, 2003, 19 (1): 21–24.
- [2] Cardinaut N, Gorrard J M, Tyssandier V, et al. Short-term supplementation with lutein affects biomarkers of lutein status similarly in young and elderly subjects[J]. **Experimental Gerontology**, 2003, 38 (5): 573–582.
- [3] WU Z Y, SHI X M. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2007, 44 (1): 13–18.
- [4] Wu ZY, SHI C L, Shi XM. Modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* in batch and fed-batch cultures[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2007, 23 (9): 1233–1238.
- [5] 陈峰,姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [6] Chen F, Zhang Y, Guo S Y. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina plantensis* in photoheterotrophic culture [J]. **Biotechnology Letters**, 1996, 18 (5): 603–608.
- [7] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1997.
- [8] 桂林,史贤明,李琳,等. 高效液相色谱法测定蛋白核小球藻中的叶黄素[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31 (11): 95–97.
- GUI Lin, SHI Xian-ming, LI Lin, et al. Determination of lutein in *Chlorella pyrenoidosa* by high performance liquid chromatography[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2005, 31 (11): 95–97. (in Chinese)
- [9] Lee P C, Schmidt-Dannert C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 60 (1–2): 1–11.
- [10] 赵文恩,李艳杰,崔艳红,等. 类胡萝卜素生物合成途径及其控制与遗传操作[J]. 西北植物学报, 2004, 24 (5): 930–942.
- ZHAO Wen-en, LI Yan-jie, CUI Yan-hong, et al. Carotenoid biosynthetic pathway and its control, and genetic manipulation[J]. **Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica**, 2004, 24 (5): 930–942. (in Chinese)
- [11] Yang C, Hua Q, Shimizu K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2000, 6 (2): 87–102.
- [12] Cortassa S, Avon M A, Iglesias A A, et al. An introduction to metabolic and cellular engineering [M]. 北京:科学出版社, 2004.
- [13] 胡月薇,史贤明. 异养蛋白核小球藻营养成分分析和免疫活性功能评价[D]. 武汉:华中农业大学,2003.
- [14] 吴正云,曲春波,史贤明. 小球藻异养生长及叶黄素合成量影响因子的优化研究[J]. 上海交通大学学报:农业科学版, 2007, 25 (1): 6–11.
- WU Zheng-yun, QU Chun-bo, SHI Xian-ming, Optimization of culture parameters for heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* and lutein production[J]. **Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science**, 2007, 25 (1): 6–11. (In Chinese)
- [15] WANG C W, OH M K, LIAO J C. Directed evolution of metabolically engineered *Escherichia coli* for carotenoid production[J]. **Biotechnology Progress**, 2000, 16 (8): 922–926.
- [16] FARMER W R, LIAO J C. Precursor balancing for the biocatalytic synthesis of lycopene in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnology Progress**, 2001, 17 (1): 57–61.

(责任编辑:李春丽)