

鸟苷发酵过程代谢流迁移的分析

蔡显鹏 陈双喜 储 炬 庄英萍 张嗣良*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 国家生化工程技术研究中心 上海 200237)

摘 要 以典型的代谢控制发酵产品鸟苷为例说明了一种基于过程参数的相关分析来研究发酵过程中代谢流迁移的方法。通过对发酵过程多参数的相关性分析,结合生物合成代谢途径、氨基酸和有机酸积累的分析,确认了发酵过程代谢流向 EMP 途径的迁移,认为造成这种代谢流迁移的原因可能是过程铵离子积累。在此基础上,通过对过程参数实时检测分析和及时调整 EMP 和 HMP 代谢通量使产率提高了 35%。

关键词 鸟苷,代谢流,迁移,相关分析

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0622-04

发酵过程是一个多参数、多水平的综合过程,涉及到分子水平的菌体遗传特性、细胞水平的代谢调节、反应器水平的传递混和特性及微生物细胞自身对外界环境的适应和调整能力,此外,培养条件包括在反应器水平的三传(动量、热量和质量传递)对细胞内因调控的影响,该过程中内因和外因往往综合作用,导致了过程分析的异常复杂性,通常的发酵过程优化研究仍然仅仅局限于最佳温度、最佳 pH 等的静态操作,从某种意义上忽略了作为发酵主体的活体细胞在发酵过程中的变化对发酵影响的重要性。

在许多发酵过程中可以很明显看到后期产物生成速率下降的现象,尤其是初级代谢产物发酵,这种情况往往被认为是菌体生产能力不够高或者是产物抑制效应造成的。而实际上,这种现象很可能由于发酵过程中的代谢流迁移引起,究其原因很可能是随着发酵过程的进行,常规的最佳操作点的控制方式导致某种中间代谢物积累,引起菌体在细胞水平,甚至分子水平调控的改变,因而发生代谢失衡,打破了正常形成产物的动态平衡。如果能够通过宏观反映出来的各种过程参数、结合代谢途径分析、将生理调控的工艺控制和生物合成过程中的代谢流分布相联系,及时发现这种代谢流迁移造成的紊乱,并进行动态调整优化,菌体的前期优良性状还是可以继续保持的。本文即以在食品和医药领域具有广泛用途

的核苷产品——鸟苷为例,说明如何通过发酵过程的参数相关性来分析代谢流迁移,从而实现发酵过程的动态优化。

1 材料及方法

1.1.1 菌种:枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)754 # (A⁻, 8-Ag^f)

1.1.2 培养基:含葡萄糖、酵母粉、(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄、KCl 等^[1]。

1.1.3 FUS501(A)全自动发酵罐(华东理工大学生化工程技术研究中心),配备有 BIORADAR 软件包,提供 14 个直接与间接参数的在线检测与控制。酶电极分析仪 SBA-40B(山东省科学院生物研究所)。

1.2 参数测定方法

1.2.1 鸟苷的测定:用纸层析法^[2];葡萄糖的测定用葡萄糖分析仪,氨氮测定用甲萘法。

1.2.2 NH₄⁺-N 测定:取 5mL 发酵液于凯氏定氮仪蒸馏瓶中按文献^[3]蒸馏并滴定。

1.2.3 氨基酸检测:色谱柱:symmetry shield RP18 (5 μ m, 3.9 \times 150mm);流动相 0.01mol/L 硫酸流速:1.0mL/min;进样量:20 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C;检测波长:210nm。以乙酸、丙酮酸、柠檬酸为标准品。样品 10000r/min 离心 10min,上清液用 0.22 μ m 的膜过滤后进样分析。

1.2.4 有机酸检测:AccQ-Tag 法^[4],样品预处理同氨基酸测定。

2 现象与分析

鸟苷发酵后期(48h左右)有一个典型的产苷速率下降的过程,同时表现出摄氧率(OUR)开始下降,这表征的是菌体的氧化能力正在下降,即对氧的消耗降低,与此对应CO₂释放速率(CER)同步下降,而其相关值呼吸熵(RQ)基本维持不变(图1),常规分析认为这是由于菌体活力下降所致,即用于菌体维持所需的碳源或能量消耗下降。但是在产苷速率下降的同时,伴随有糖耗速率增加和氨水加入速率同步增长。如果氨水在发酵过程中仅起平衡pH的作用,那么这应该是有机酸积累时酸碱平衡的物理过程造成,但是也有可能是氨基酸等含氮有机化合物中间体积生的生物过程造成。另文报道的研究结果^[5]表明,的确有氨基酸等中间化合物的积累,并初步分析认为该过程中代谢流的迁移与NH₄⁺积累有关。

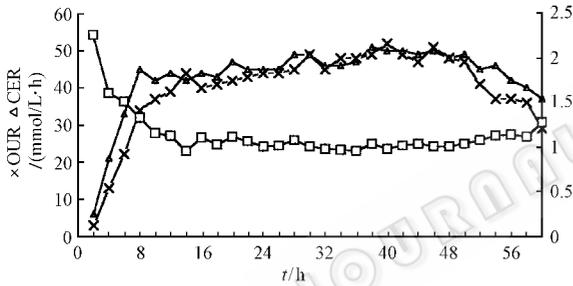


图1 发酵过程菌体生理参数变化趋势
Fig.1 Process profile of physiological parameter

2.1 发酵过程分析

从发酵过程变化曲线(图2)可以看到,随着后期产苷速率的下降,[NH₄⁺]和[NH₂-N]都表现出了上升趋势,并且表现为[NH₄⁺]的上升先于实际氮氮([NH₂-N]_{true})的上升,据此推测是由于[NH₄⁺]上升引起含氮中间代谢物如氨基酸等的积累。发酵过程中由于葡萄糖的分解代谢势必会产生一些有机酸类物质,而发酵过程中是通过氨水调节维持pH在设定范围内,因而引入了一定量的[NH₄⁺],可以看到初始12h左右,随着培养基中初始氮源的降低,有部分的[NH₄⁺]被细胞同化,表现为浓度的下降。随后的产苷过程中尽管持续有氨水的加入但[NH₄⁺]积累并不明显,这应该是被细胞持续同化所致,在一定程度上被用于合成产物鸟苷。

氮同化的方式已有大量的研究^[6],除通过谷氨

酸脱氢酶(GDH)途径外,菌体还有另一条氮同化途径:即谷氨酰胺合成酶(GS)和依赖NADPH的谷氨酸-α酮戊二酸转移酶(GOGAT)(即谷氨酸合成酶)途径合成谷氨酸,并且谷氨酸合成酶只有在氨处于低水平时表达,在氨充足时则主要通过谷氨酸脱氢酶起作用;限制氮的条件则会导致GS基因的去阻遏和GS活性的激活(对NH₃有较高的亲和性),而氨升高时则与此相反。那么,发酵后期产苷速率的下降就有可能是高的[NH₄⁺]抑制了谷氨酰胺的合成所致,因为谷氨酰胺是嘌呤核苷分子结构中嘌呤环的直接前体。

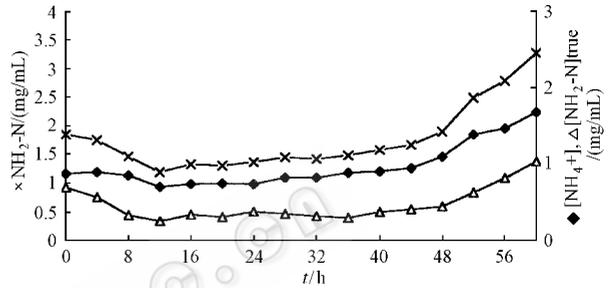


图2 发酵过程无机氮浓度变化曲线
Fig.2 Profile of inorganic nitrogen during fermentation process
注:[NH₂-N]_{true}代表检测到的NH₂-N与NH₄⁺-N的差值

2.1.1 有机酸的积累:如果氨水的加入是由于细胞代谢产酸的结果,那么[NH₄⁺]的积累应该是代谢过程过量产酸所致;而在正常代谢情况下,细胞通过EMP途径和TCA循环的产酸过程是为细胞合成提供前体和能量的,从细胞经济学^[7]的原则讲一般情况下不会供过于求,即不会出现有机酸的积累,而在后期随有机酸积累引起[NH₄⁺]积累,相应出现产苷速率下降等一系列特征,这必然是合成鸟苷的代谢流出现了异常。为了从代谢途径角度分析,就有必要测定过程所积累的有机酸的种类,初步分析可以明显能看到丙酮酸特征性地出现积累,并且其积累过程伴随柠檬酸的降低(图3),整个过程乙酸浓度则基本无变化。

2.1.2 发酵过程氨基酸的变化:进一步通过HPLC测定发酵过程中不同时间发酵液中积累的氨基酸,结果发现总氨基酸浓度变化与纸层析结果^[5]完全一致(图4),表现出相应的积累,并且其积累晚于有机酸和[NH₄⁺]的积累,因此这应该是代谢途径改变导致的代谢流迁移所致。氨基酸成份分析(数据未列出)表明,初始发酵液中谷氨酸浓度比较高,其它氨基酸浓度都较低,随着发酵过程的进行,谷氨酸很快被用于菌体合成,在8h之前已经降到很低水平,并

始终维持在低水平,而在 48h 左右丙氨酸开始出现明显的积累,发酵液中积累量达到初始量的 12.6 倍之多,其它 10 余种氨基酸浓度则变化不大,并且在整个发酵过程中都维持在较低水平。

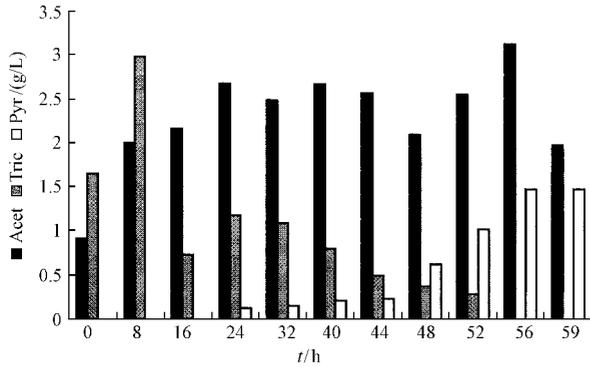


图 3 发酵液中有机的变化趋势

Fig.3 Profile of organic acid variety

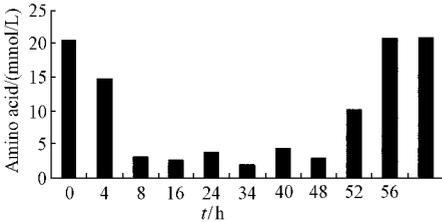


图 4 发酵过程总氨基酸的变化

Fig.4 Profile of total amino acid

综合考虑发酵过程中氨基酸和有机酸的时序变化过程可以发现,积累的氨基酸主要是丙氨酸,而丙氨酸的合成过程可以直接由丙酮酸转化而来^[8],这样就很容易理解由于 EMP 途径代谢流的增加造成了丙酮酸的积累,丙酮酸随后转化成丙氨酸,而丙氨酸本身又会对 GS 造成反馈抑制,该过程进一步造成用于合成产物鸟苷的 HMP 途径通量的减少,使产苷速率降低。进一步分析初始丙酮酸开始积累的原因可能是过程[NH₄⁺]的积累,随着发酵过程的进行,细胞中积累的[NH₄⁺]达到阈值(约 1.30mg/mL)后即出现明显的[NH₄⁺]效应,表现为(图 5)一个恶性循环,即[NH₄⁺]抑制 GS,导致形成产物的 HMP 途径受阻,这样相对增加了 EMP 通量,使形成的丙酮酸增加,进而促进[NH₄⁺]的增加;或者是[NH₄⁺]激活磷酸果糖激酶(PFK),直接导致 EMP 通量的增强,进而导致丙酮酸增加,[NH₄⁺]增加的循环;丙氨酸又是 GS 的反馈抑制剂,同样会造成产物合成的抑制,间接促进 EMP 通量;此外,高的胞外 NH₄⁺ 浓度也会使 NH₄⁺ 输送系统(amt)活性受到抑制^[9],从而促进发酵液中的[NH₄⁺]增加。

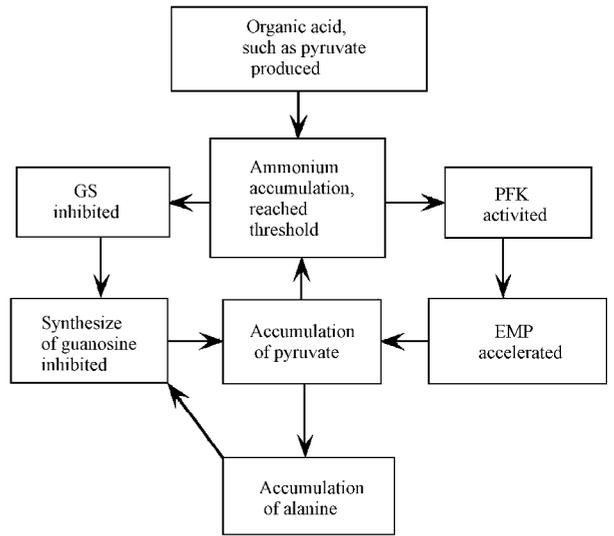


图 5 假设的铵离子效应示意图

Fig.5 Hypothetic sketch map of ammonium ion effect

2.2 代谢流的优化

经过以上分析,我们确认导致代谢流迁移的一系列现象的关键是由于过程中[NH₄⁺]的积累达到阈值所造成,在此基础上改进工艺,通过调整代谢流在 EMP 和 HMP 之间的分配平衡后成功地抑制了氨基酸和有机酸的积累(图 6),从而根本上抑制了代谢流的迁移,始终维持产苷速率在较高水平(图 7),最终产苷水平较优化前提高 35%,比文献报道最高水平^[1]提高了 70%。

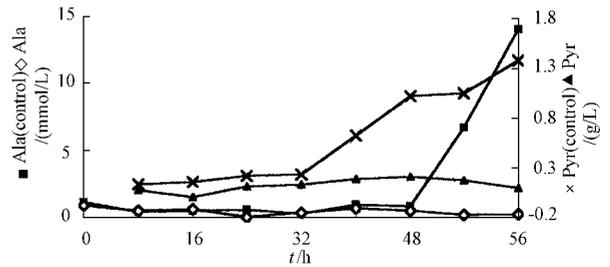


图 6 调整前后丙氨酸、丙酮酸浓度曲线

Fig.6 Profile of pyruvate and alanine between optimized and original technology

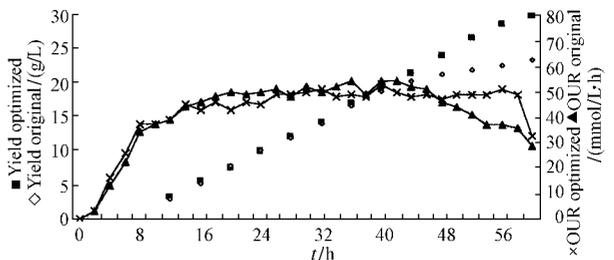


图 7 调整前后产苷和 OUR 的比较

Fig.7 Profile of guanosine yield and OUR between optimized

3 结 论

[NH_4^+] 是发酵过程中一种重要的效应因子,控制适当的浓度对发酵过程异常重要,在黄原胶发酵过程研究中 Serour^[10] 等人认为 NH_4^+ 的耗尽是产物黄原胶开始产生的信号,在鸟苷发酵中可能也存在相似的机制,即在前期 12h 左右 [NH_4^+] 达到某一较低水平开始启动产苷过程,到后期随着 [NH_4^+] 达到某一较高的阈值而引起代谢流迁移的现象未见文献报道。由于本实验采用的是复合培养基的批操作方式,发酵过程中随着碳源、氮源的利用,发酵液粘度、产物浓度和菌体形态都发生了变化,因而很难将产率下降的代谢流迁移与铵离子效应定量的关联,这一铵离子效应的具体酶学和分子生物学机理还有待进一步通过合成培养基的恒化培养实验来证实。

发酵过程优化的实质应该是代谢流的优化,分析发酵过程时我们应该兼顾外界的操作变量和细胞内因的相互作用,无论是细胞水平酶活性的改变还是分子水平基因的抑制或激活都会因为操作变量和环境水平的改变而发生变化,并且都会直接或间接地反映在过程参数上,表现为过程参数的时变性,因而只要我们掌握了细胞代谢过程中的参数变化特征,结合代谢途径的分析,在代谢流的水平进行过程的动态优化,才有可能从本质上提高发酵产率。

REFERENCES (参考文献)

[1] TANG SH R (汤生荣), HUANG W H (黄卫红), HOU Z R (侯左

荣) *et al.* Process of guanosine production by fermentation. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 1998, 4: 11 ~ 15

[2] Komatsu K, Haneda K, Hirano A *et al.* Accumulation of Nucleic Acid-related Substances by Microorganisms. III. Derivation of Guanosine-producing Mutants from an Adenine Auxotroph of a Bacillus Strain. *J Gen Appl Microbiol*, 1972, 18: 19 ~ 27

[3] Biochemistry group in department of biology, PeiKing University. Guide of biochemistry experiment. PeiKing. People's Education Press, 1987, pp. 87 ~ 92

[4] CHEN Y H (陈永波), CHENG Q (程群), RAO H (饶斌) *et al.* Modification on determination method for amino acid. *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 1994, 12: 4 ~ 6

[5] CAI X R (蔡显鹏), CHEN S X (陈双喜), CHU J (储炬) *et al.* The optimization of guanosine fermentation based on process parameter correlation analysis. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2002, 23: 232 ~ 235

[6] Fisher S H, Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Ann Rev Microbiol*, 1991, 45: 107 ~ 135

[7] TAO W X (陶文沂). Chief editor, Physiologic and Genetic Breeding of Industrial Microbiology, PeiKing, Chinese Light Industry Press, 1997, pp. 216

[8] SHEN T (沈同), WANG J Y (王镜岩). Biochemistry (second half), PeiKing, High Education Press, 1994, pp. 259 ~ 276

[9] Kleiner D. Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes (Bakker, E. P., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 378 ~ 396

[10] R J Serour, B Kristiansen. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aurebasidium pullulans* in batch culture. *Eur J Appl Micro Biotech*, 1983, 17: 178 ~ 181

Analysis on Metabolic Flux Shift During Guanosine Fermentation

CAI Xian-Peng CHEN Shuang-Xi CHU Ju ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST,

National Engineering Research Center for Biotechnology, Shanghai 200237, China)

Abstract Taking the typical metabolic control product-guanosine as an example, the method of metabolic flux shift investigation based on process multi-levels parameter correlation analysis was established. The metabolic pathway, multi-parameter correlation, accumulation of amino acid and organic acid during guanosine fermentation process were integratively analyzed. The metabolic flux shift from HMP to EMP was ascertained, which was assumed to be caused by the accumulation of ammonium ion. The subsequent optimization based on controlling flux distribution between EMP and HMP did improve the yield by 35% when the metabolic flux shift was prevented.

Key words guanosine, metabolic flux, shift, correlation analysis

Received: 04-15-2002

This work was supported by Grant from ShuGuang Project Shanghai, No. 01SG28.

* Corresponding author: Tel: 86-21-64253658, Fax: 86-21-64253702, E-mail: siliangz@163.net

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>