

L-缬氨酸合成的代谢流量分析

李秀敏¹ 李乃强² 杨 毅¹ 姜绪林¹ 邱勇隽² 张星元^{1*}

¹(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

²(上海凯赛研发中心有限公司,上海 201203)

摘 要 分别测定谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) AS1.495 及其 3 个逐个叠加不同遗传标记的突变株 AA361、AAT231 和 AATV341 在特定培养时段(26~28h) L-缬氨酸等代谢物的胞外浓度,由此计算这一时段这些代谢物在发酵液中积累(或消耗)的速率,分别做出这 4 株菌在拟稳态下的代谢流量分布图,进而研究育种过程中不同遗传标记的叠加对代谢网络中 L-缬氨酸合成流量分布的影响。结果表明遗传标记的引入使流量分配发生了重大变化,节点处的流量分配朝着有利于 L-缬氨酸合成的方向改变。6-磷酸葡萄糖节点处流入 EMP 途径和 HMP 途径的流量分配由 17.0:83.0 变为 24.3:75.7,丙酮酸节点处流入 L-缬氨酸合成途径和其他途径的流量分配由 15.8:84.2 变为 76.7:23.3。L-缬氨酸合成的分支途径上的流量由最初的 5.37 增大为 37.3,乳酸合成途径的流量从 11.1 最后降为 1.16。L-缬氨酸产量由 4 g/L 提高到 24.5 g/L。代谢流量分布的变化趋势与 L-缬氨酸产量的变化趋势是互相吻合的。以 2-噻唑丙氨酸抗性突变(2-TA^r)和 L-天冬氨酸氧肟酸盐超敏性突变(L-AAH^{ss})有效地进行代谢流遗传导向的事实,在代谢流量分析的层面上,证明结构类似物抗性突变和结构类似物超敏性突变是代谢流导向和设计育种的十分有效的手段,代谢流量分析会成为设计育种的校正方法。

关键词 L-缬氨酸,谷氨酸棒杆菌,代谢流量分析

中图分类号 Q933, Q935 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0403-05

我国到目前为止,多采用随机诱变和定向筛选的方法进行 L-缬氨酸育种^[1,2],国外在 80 年代开始采用基因工程手段进行 L-缬氨酸育种^[11]。1991 年 Bailey^[3]等正式提出代谢工程的概念,随着代谢工程和分子生物学的发展,开始把它们结合起来进行 L-缬氨酸育种。德国的 Eva Radmacher 等人^[4]采用分子生物学手段,过量表达 *ilvBNCD* 基因,使 *ilvA* 和 *panBC* 基因缺失,得到的工程菌可积累缬氨酸 11g/L。

代谢流量分析(metabolic flux analysis)是一种研究胞内代谢的方法,根据胞内主要反应的化学计量模型和胞内代谢产物的质量平衡来计算胞内的代谢流量。这种分析方法的基础是拟稳态假设:假设在产物形成速率最快的阶段各种中间代谢物的胞内浓度变化速率为 0。根据质量平衡,由 n 个中间代谢物即可得到 n 个关于速率的方程,通过测定胞外代谢产物的浓度,计算未知途径的流量^[5,6,7]。

本文通过对菌种选育过程中所得到的不同突变株发酵过程的研究,测定遗传标记不同的 4 株菌

AS1.495 及其突变株 AA361、AAT231 和 AATV341 在 L-缬氨酸形成阶段的相关代谢物的胞外浓度,得到它们在 L-缬氨酸形成阶段的代谢流量分布图,并对它们的代谢流量分布进行比较和分析,研究了育种过程中遗传标记的叠加对 L-缬氨酸合成网络中流量分布的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

谷氨酸棒杆菌 AS1.495(Leu⁻),由中国微生物菌种保藏中心提供。突变株 AA361(Leu⁻, L-AAH^{ss})、AAT231(Leu⁻, L-AAH^{ss}, 2-TA^r)和 AATV341(Leu⁻, L-AAH^{ss}, 2-TA^r, Vd⁻),它们分别是谷氨酸棒杆菌 AS1.495(Leu⁻)依次叠加 L-天冬氨酸氧肟酸盐超敏(L-AAH^{ss})、2-噻唑丙氨酸抗性(2-TA^r)和缬氨酸降解途径缺损(Vd⁻)等遗传标记所得的突变株,由本实验室提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(g/L):牛肉膏 30、蛋白胨 10、氯

化钠 5、琼脂条 20 ,pH 7.0 0.1 MPa 下灭菌 20 min。

1.2.2 种子培养基(g/L):葡萄糖 40、尿素 3、
KH₂PO₄ 1.5、K₂HPO₄ 0.5、MgSO₄ · 7H₂O 0.5、蛋白胨
20、酵母浸出膏 5 ,pH 7.0 0.1 MPa 下灭菌 20 min。

1.2.3 摇瓶发酵培养基 (g/L):葡萄糖 90、
(NH₄)₂SO₄ 40、KH₂PO₄ 1、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 、FeSO₄ ·
7H₂O 0.002、MnSO₄ · H₂O 0.002、生物素 5 × 10⁻⁵、VB1
5 × 10⁻⁴、豆饼水解液 20 ;CaCO₃ 50 ,pH 7.2 0.1 MPa
下灭菌 20 min。

1.3 分析方法

- 1.3.1 pH 值的测定 :**pHS-2C 型精密数显酸度计测
定。
- 1.3.2 还原糖测定 :**DNS 法^[8]。
- 1.3.3 缬氨酸测定 :**比色定量法^[9,10]。
- 1.3.4 有机酸测定**

色谱仪 :HP1100 ;色谱柱 :ZORBAX SB C₁₈ 4.6mm
× 250 mm ;流动相 :0.1%(V/V)磷酸 ;流速 :1 mL/
min 柱温 :25℃ ;检测器 :紫外检测器 ;检测波长 :210
nm。

1.3.5 氨基酸测定 :氨基酸自动分析仪。

1.3.6 菌浓的测定^[11] :移取菌悬液 0.2 mL 于 4.8
mL 0.25 mol/L 的盐酸溶液中 ,于 721 型分光光度计
上测 620 nm 处吸光度。

2 结果和讨论

2.1 L-缬氨酸形成阶段各菌株的胞外代谢产物浓
度的测定

谷氨酸棒杆菌 AS1.495 及其突变株在 30℃ 下 ,
旋转式摇床转速为 100 r/min 时 ,经摇瓶发酵培养基
发酵的发酵曲线如图 1 所示。发酵进行到 24 ~ 32h

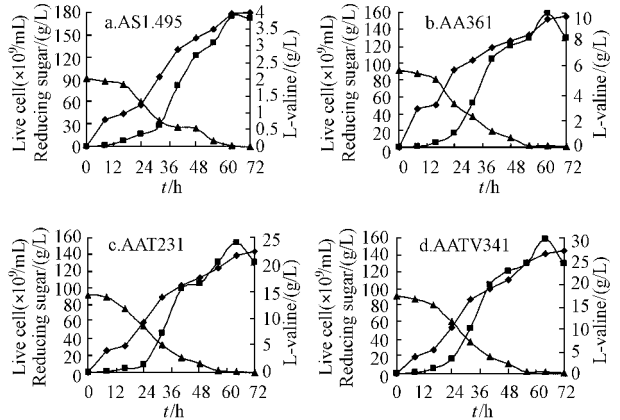


图 1 AS1.495 及其突变株的发酵过程曲线

Fig.1 Fermentation time courses of AS1.495 and its mutants

—▲— reducing sugar ; —■— live cell ; —◆— L-valine

这一阶段的 L-缬氨酸积累速率最快 ,可以假设此阶
段处于拟稳态 ,各种代谢物的胞内积累速率为 0^[11]。
因此 ,分别测定出发菌株及其各突变株在摇瓶培养
基中发酵 26 h 和 28 h ,发酵液中的还原糖、缬氨酸、
赖氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、丙氨酸等氨基酸及乳酸、
乙酸、丙酮酸等有机酸的胞外浓度 ,计算它们的积累
或消耗速率 ,研究它们在此阶段的代谢流量分布情
况。为了便于比较 ,以葡萄糖的消耗速率为 100 计
得到的各代谢产物的速率(见表 1)。

表 1 各菌株发酵至 28h(L-缬氨酸形成阶段)
时各代谢产物速率(以葡萄糖为 100 计)

Table 1 Accumulation/consumption rates of the exocellular metabolites				
Mutants Metabolites	AS1.495	AA361	AAT231	AATV341
Glucose	100	100	100	100
Valine	5.37	7.47	30.7	37.3
Alanine	4.81	8.17	4.77	3.59
Glutamate	8.91	13.9	6.00	4.74
Isoleucine	1.35	2.11	1.54	1.31
Lysine	2.19	0.83	0.0447	0.0239
Histidine	0	0	0.337	0.337
Pyruvate	0.214	0.342	0.557	0.528
Lactate	11.1	18.3	2.72	1.16
Acetate	0	0	0	0

2.2 L-缬氨酸形成阶段各菌株的代谢流量分配的
计算

设 V₁ , V₂ , V₃ , 分别为图 3 所示途径的代谢
流量 ,因为可以假定 L-缬氨酸形成阶段代谢处于拟
稳态 ,此时各种中间代谢产物的累积速率为 0。由
质量平衡得 :

$$\alpha (V_1 - V_2) = V_3 + V_4 + V_5 + V_6 + V_7 + V_8 + V_{PYR}$$

根据表 1 中的数据可以计算出 AS1.495 及各突
变株的代谢流量分布(见图 2)。AATV341 ,AA361 ,
AAT231 与 AS1.495 相比 ,各个途径的流量都发生变
化 ,L-缬氨酸合成途径上的流量由 AS1.495 的 5.37
变为 37.3。特别是从 AAT231 引入了 2-TA⁺ 标记 ,流
量分配发生了重大变化。说明 2-TA 对 L-缬氨酸合
成网络的影响最大。下面结合两个节点进行详细的
分析。

2.3 主要节点处的流量分配

人们通常认为目的产物的产率偏低是由于相关
酶系或酶级联反应限制了产物的合成能力。最新研

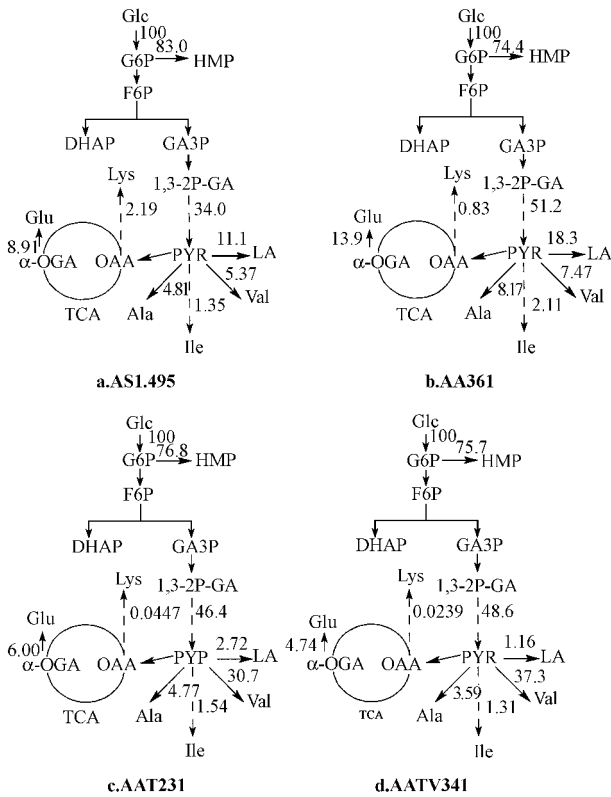


图2 AS1.495 及其各突变株缬氨酸合成网络的代谢流量分布图

Fig.2 Metabolic flux distribution maps for the valine fermentation of AS1.495 and its mutants

究结果表明,尽管与特定产物合成途径相匹配的全部酶活确实控制着产物的合成速率,但产物的最终产量却是各种中间代谢物分支点处流量分配的综合结果^[8]。在代谢网络中,将两个或多个不同途径的分支汇合点称为节点。其中,对目的产物的形成具有重要影响的那种节点称为主要节点。考虑 L-缬氨酸合成的相关代谢途径(图3),本文对影响 L-缬氨酸合成的两个主要节点 G6P、PYR 进行分析,研究各个突变株不同遗传标记的引入对这两个节点处的流量分配产生的变化以及对 L-缬氨酸合成的影响。

2.3.1 6-磷酸-葡萄糖节点处的流量分配 葡萄糖有两条主要的降解代谢途径,即 EMP、HMP。HMP 途径的主要作用是为 L-缬氨酸合成途径的乙酰羟酸还原异构酶催化的反应提供还原力 NADPH。催化 PEP 合成 OAA 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶受 L-天冬氨酸的反馈抑制和阻遏,L-AAH(L-天冬氨酸氧肟酸盐)是 L-天冬氨酸的结构类似物,L-AAH^{ss} 突变株(L-天冬氨酸氧肟酸盐超敏性突变株)的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶调节特性发生了变化。由图 4a 和

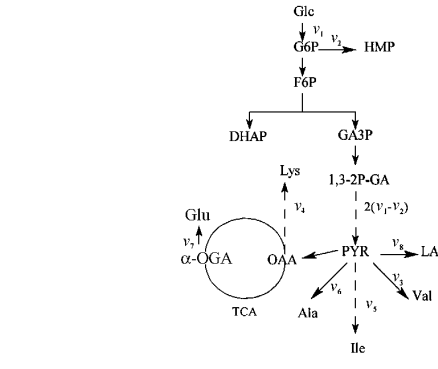


图3 代谢流量的计算
Fig.3 Calculation of metabolic flux

4b 可以看出,引入了 L-AAH^{ss} 标记的突变株 AA361 与出发菌株 AS1.495 相比,在此节点处的流量分配发生了较大的变化,6-磷酸-葡萄糖流入 EMP 的流量由出发菌株 AS1.495 的 17.0 增加到 25.6,使更多的代谢物流入了 EMP 途径(从 17 上升到 25.6),更有利于 L-缬氨酸的合成。但是引入了 2-TA^r 标记的 AAT231 和 AATV341,6-磷酸-葡萄糖流入 HMP 途径的流量与 AA361 相比有所降低,可能是因为 2-TA 同时也是 L-组氨酸的结构类似物,AAT231 的 L-组氨酸合成途径上的反馈调节被部分解除,而 L-组氨酸是由 HMP 途径出发合成的,所以 HMP 途径的流量有所增加。

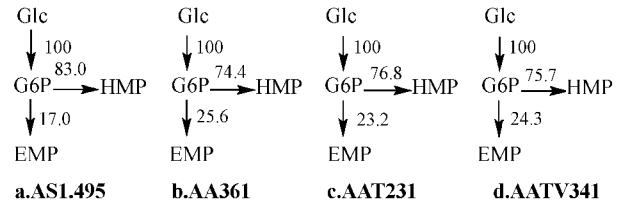


图4 不同突变株中 G6P 节点处的流量分配

Fig.4 Flux distribution around the G6P node in different mutants

2.3.2 丙酮酸节点处的流量分配 在细菌中,丙酮酸除了可以流入 TCA 循环和流向 L-缬氨酸的合成,还可以参与丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸和异亮氨酸的合成,或生成乳酸、乙酸等有机酸。实验菌株均为亮氨酸缺陷型突变株(Leu⁻),发酵液中未检测到乙酸(见表1),因此这里可以不考虑合成亮氨酸的流量,可以忽略流向乙酸的流量。丙酮酸节点的流量分配较为复杂,为了便于比较,把 EMP 途径中由 1,3-2P-GA 到 PYR 的途径上的流量以 100 计,比较这个节点处的流量分配情况(见图5)。

突变株 AA361 与出发菌株 AS1.495 相比,添加了 L-AAH^{ss} 标记,使 6-磷酸葡萄糖节点处的流量分配

发生较大的变化,进而要分析丙酮酸节点的流量分配的变化。由图 5a 和 5b 可知,从 TCA 循环中 OAA 出发的赖氨酸合成途径上的流量尽管已由 6.44 下降到 1.62,但是 L-缬氨酸的流量由 15.8 变为 14.6,反而略有下降,实际上并非如此。从图 4 中可见,L-AAH^{ss} 标记的添加使流向 EMP 途径的流量从 17 上升到 25.6,但不同的流量在图 5 中均已化为 100,因此图 5a 与图 5b、5c、5d 的输入不在同一个水平上,因此,L-缬氨酸的流量实际是有上升的(见图 2a 和 2b)。再比较图 5a 和 5b,虽然 L-AAH^{ss} 标记的添加使菌株 AS1.495 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的基因发生了突变,由 PEP 通过羧化途径固定 CO₂ 回补 TCA 循环的量减少。但是原用于回补而进入 TCA 循环的那部分 PEP 并没有完全经丙酮酸流向 L-缬氨酸的合成,而是有相当一部分形成了其它杂酸(主要是乳酸),推测这主要是由于 L-缬氨酸合成途径上的第一个酶乙酰羟氨基酸合成酶受 L-缬氨酸的反馈抑制和阻遏,L-缬氨酸合成途径不够通畅,多余的丙酮酸流向乳酸。

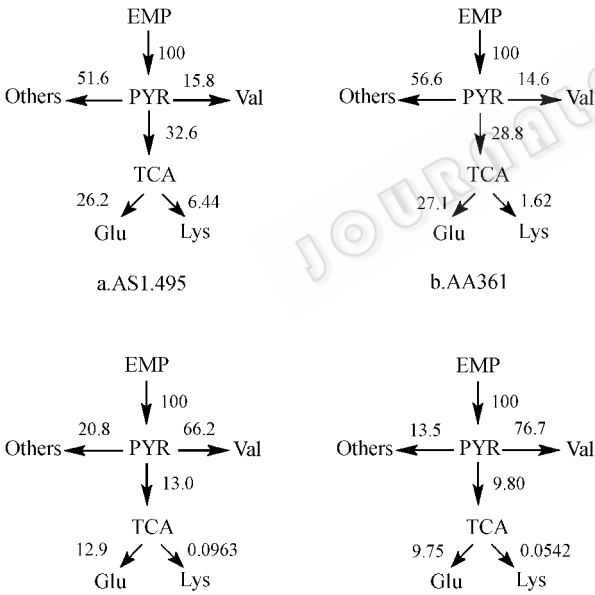


图 5 不同突变株中 PYR 节点处的流量分配
Fig.5 Flux distribution around the PYR node in different mutants

2-TA(2-噻唑丙氨酸)是 L-缬氨酸的结构类似物,突变株 AAT231 是 2-TA^r 突变株(2-噻唑丙氨酸抗性突变株),推测它的 L-缬氨酸合成途径上的乙酰羟氨基酸合成酶已(部分)解除了反馈抑制和阻遏,L-缬氨酸合成途径已被疏通。由图 5 b 与图 5 c 可以看出 2-TA^r 标记的引入使丙酮酸节点处的流量分配发生了重大变化。L-缬氨酸的流量由突变株

AA361 的 14.6 猛增到 AAT231 的 66.2,大部分的丙酮酸流向了 L-缬氨酸合成途径,丙酮酸流向 TCA 循环的流量由突变株 AA361 的 28.8 下降为 AAT231 的 13.0。而且,由于 L-缬氨酸合成途径反馈调节的解除,丙酮酸流向乳酸途径的流量也大大降低了,由突变株 AA361 的 56.6 降为 AAT231 的 20.8(见图 5b 和 5c 并对比图 3b 和 3c)。

对于增加了标记 Vd-的突变株(缬氨酸降解途径缺损突变株)AATV341,它的 L-缬氨酸降解途径受损,生成的 L-缬氨酸被循环再利用的机会减少,L-缬氨酸合成途径的流量由突变株 AAT231 的 66.2 增加为 AATV341 的 76.7。突变株 AATV341 虽然不能够把 L-缬氨酸作为能源使用,但是 L-缬氨酸小分子整体仍可参与蛋白质等大分子物质的合成,所以,它的 L-缬氨酸合成途径的流量与 AAT231 相比,变化不是很大。

综合以上结果可以看出,遗传标记 L-AAH^{ss}、2-TA^r、Vd^r 的引入使流量分配发生了重大变化。6-磷酸-葡萄糖节点处流入 EMP 途径和 HMP 途径的流量分配由 17.0:83.0 变为 24.3:75.7;丙酮酸节点处流入 L-缬氨酸合成途径和其他途径的流量分配由 15.8:84.2 变为 76.7:23.3。引入 3 个遗传标记后,谷氨酸棒杆菌 AS1.495 L-缬氨酸合成途径上的流量由最初的 5.37 增大为 37.3;L-缬氨酸产量也由 4.00 g/L 逐级提高到 24.5 g/L(4.00→9.80→19.4→24.5)。图 4 和图 5 所标示的代谢流量分布的变化趋势与 L-缬氨酸产量的变化趋势是吻合的,特别是遗传标记 2-TA^r 的引入对于 L-缬氨酸合成的代谢流来说是个十分有力的导向。乳酸合成途径的流量由出发菌株 AS1.495 的 11.1 最后降为 1.16(见图 2a 和 2d),这也从另一个侧面证明遗传导向是成功的。

相对其它途径上的流量变化,L-谷氨酸、L-丙氨酸和 L-异亮氨酸合成途径上的流量相对于 L-缬氨酸合成途径上的流量变化较小。丙酮酸的积累量随着遗传标记的叠加有逐渐增加的趋势,但增加的绝对数值较小。但是即使是 AATV341,仍有发酵 L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-异亮氨酸和乳酸的副产物,因此进一步的研究仍在进行之中。

REFERENCES(参考文献)

[1] Zhang WG(张伟国),Qian H(钱和). Studies on the fermentation condition of L-valine. *Amino Acids & Biotic Resources* (氨基酸和生物资源),2001,23(3):28-31
[2] Wang P(王平),He Y(何英). Selective breeding and fermentation
© 中国科学院微生物研究所期刊编辑部 2004

- (大连轻工业学院学报), 2002, 21(6): 116–119
- [3] Bailey JE. Towards a science of metabolic engineering. *Science*. 1991, 252: 1668–74
- [4] Radmacher E, Vaitsova A, Burger U *et al.* Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 5: 2246–2250
- [5] Wolfgang W. ¹³C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering*, 2001, 3: 195–206
- [6] Lee K, Berthiaume F, Stephanopoulos GN *et al.* Metabolic flux analysis: a powerful tool for monitoring tissue function. *Tissue Eng*, 1999, 5(4): 347–68
- [7] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J. *Metabolic Engineering*, Academic Press, New York, 1998
- [8] Cai WQ(蔡武城), Yuan HJ(袁厚积). Chemical Analysis Method of Biological Substance(生物物质常用化学分析法), Beijing: Science Press, 1982
- [9] Zeng XQ(曾祥群), Zhou HB(周海滨), Zhang ZM(张志民). Studies on technological conditions of extracting valine. *Fermentation Science & Technology*(发酵科技通讯), 2001, 30(1): 22–24
- [10] Pan JX(潘家秀), Ren MX(任梅轩), Xu JJ(徐俊杰) *et al.* Technique of Protein Chemistry(蛋白质化学研究技术), Beijing: Science Press, 1962
- [11] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen J. *Metabolic Engineering*, Academic Press, New York, 1998

Metabolic Flux Analysis of L-valine Fermentation in *Corynebacterium glutamicum*

LI Xiu-Min¹ LI Nai-Qiang² YANG Yi¹ JIANG Xu-Lin¹ QIU Yong-Juan² ZHANG Xing-Yuan^{1*}

¹(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

²(Shanghai Cathaybiotech R&D Company, Shanghai 201203, China)

Abstract In industrial fermentation of amino acids the cells are often forced to synthesize the biochemicals excessive of their physiological needs. The knowledge of metabolic networks and their regulation relevant usually come from biochemical research, especially from enzymology, not from engineering study. To enrich the knowledge of metabolic sub-network of L-valine syntheses for higher production of L-valine, *Corynebacterium glutamicum* AS1.495 and its genetic derivatives AA361, AAT231, AATV341 were used for metabolic flux analysis. AS1.495 is a leucine auxotrophic (Leu^-), and the three derivatives carry additional mutations. AA361 contains D-aspartic acid- β -hydroxamate supersensitive marker (Leu^- , L-AAH^{ss}), AAT231 (Leu^- , L-AAH^{ss}, 2-TA^r) is D-aspartic acid- β -hydroxamate supersensitive and 2-thiazole alanine resistant, and AAT341 (Leu^- , L-AAH^{ss}, 2-TA^r, Vd⁻) is a D-aspartic acid- β -hydroxamate supersensitive, 2-thiazole alanine resistant and valine-decompose-ability imperfect (Vd^-). The concentrations of extra-cellular metabolites were determined under sub-steady-state of the batch culture. The metabolic flux distribution maps of the four strains were obtained, compared and analyzed.

Our analysis showed that the flux ratio of EMP and HMP from the glucose-6-phosphate had increased from 0.205 in the parental strain AS1.495 to 0.321 in the multiple-mutation strain AATV341; the flux ratio of L-valine synthesis branch and the rest branches from the pyruvate node increased from 0.188 in AS1.495 to 3.29 in AATV341; the flux of lactic acid synthesis branch decreased from 11.1 in AS1.495 to 1.16 in AATV341; the flux of L-valine synthesis branch increased from 5.37 in AS1.495 to 37.3 in AATV341; and the productivity of L-valine correspondently increased from 4 g/L in AS1.495 to 24.5 g/L in AATV341. These results indicate that the introduction of analog supersensitive marker L-AAH^{ss} and/or analog resistant marker 2-TA^r skew the metabolic flux towards the formation of L-valine. This study revealed the usefulness of the metabolic flux analysis as a tool for verification of existing production strains. The analysis may play an important role in helping us to rationally re-design metabolism for further improvement of fermentation process.

Key words L-valine, corynebacterium, glutamicum, metabolic flux analysis