

外源添加代谢中间体对产琥珀酸放线杆菌厌氧发酵制备丁二酸的影响

黄秀梅, 姜岷, 李建, 郑晓宇, 杨卓娜, 方晓江, 叶贵子

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 考察了外源添加中间代谢产物对菌体生长及发酵产酸的影响, 结果表明添加 0.5 g/L 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 时丁二酸产量最高。围绕产琥珀酸放线杆菌 NJ113 厌氧发酵产丁二酸的代谢网络进行代谢通量分析, 发现添加 PEP 后己糖磷酸途径 (HMP) 与糖酵解途径 (EMP) 的通量比由 39.4:60.3 提高至 76.8:22.6, 解决了丁二酸合成过程中还原力不足的矛盾, 导致 PEP 生成草酰乙酸的通量提高了 23.8%, 丁二酸代谢通量从 99.8 mmol/(g DCW·h) 增至 124.4 mmol/(g DCW·h), 而副产物乙酸及甲酸的代谢通量分别降低了 22.9%、15.4%; 关键酶活分析结果表明, 添加 0.5 g/L PEP 后 PEP 羧化激酶比酶活达到 1910 U/mg, 与对照相比提高了 74.7%, 而丙酮酸激酶的比酶活降低了 67.5%。最终丁二酸浓度为 29.1 g/L, 收率达到 76.2%, 比未添加 PEP 时提高了 11.0%。

关键词: 产琥珀酸放线杆菌, 丁二酸, 代谢通量分析, 中间代谢产物, 酶活

Effect of adding intermediate metabolites on succinate production by *Actinobacillus succinogenes*

Xiumei Huang, Min Jiang, Jian Li, Xiaoyu Zheng, Zhuona Yang, Xiaojiang Fang, and Guizi Ye

State Key Laboratory of Materials-oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: We investigated the effect of adding intermediate metabolites on cell growth and succinate production. The yield of succinic acid achieved to the highest when 0.5 g/L phosphoenolpyruvic acid (PEP) was added. According to the metabolic network of *Actinobacillus succinogenes* NJ113, the metabolic flux was calculated by metabolic flux analysis. The ratio of hexose monophosphate pathway to glycolytic pathway increased from 39.4:60.3 to 76.8:22.6 after adding 0.5 g/L PEP, thus the reducing power was better balanced. The flux of PEP to oxaloacetate was 23.8% higher, which made the succinic acid flux improve from 99.8 mmol/(g DCW·h) to 124.4 mmol/(g DCW·h) and the flux of acetic acid and formic acid decreased by 22.9% and 15.4%, respectively. The key enzyme activity analysis showed that the specific activity of PEP carboxykinase reached to 1910 U/mg with 0.5 g/L PEP addition, which was 74.7% higher than the control; and the specific activity of pyruvate kinase decreased by 67.5%. Finally, the concentration of succinic acid was 29.1 g/L with the yield of 76.2%.

Received: November 13, 2009; **Accepted:** February 23, 2010

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), National Natural Science Foundation of China (No. 20606017), Foundation of State Key Laboratory of Materials-oriented Chemical Engineering, "Qinglan Project" of Jiangsu Province, "The Six Talent Summit" of Jiangsu Province (No. 06-A-047).

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-83172075; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701), 国家自然科学基金 (No. 20606017), 材料化学工程国家重点实验室基金, 江苏省“青蓝工程”, 江苏省“六大人才高峰” (No. 06-A-047) 资助。

Keywords: *Actinobacillus succinogenes*, succinic acid, metabolic flux analysis, intermediate metabolite, enzyme activity

丁二酸 (又名琥珀酸) 作为 TCA 循环的中间代谢产物以及厌氧代谢的终端还原产物, 广泛存在于动物、植物以及微生物中^[1-2]。传统的生产方法是石化法, 其污染大、成本高, 严重抑制了丁二酸作为大宗化学品的发展潜力。随着生物工程技术的迅速发展和成熟, 生物法生产丁二酸由于其高效率、环保性以及原料的可再生性而引起许多研究者的注意^[3-4]。

近年来, 基于途径分析及代谢流分析的调控手段非常普遍^[5]。潘军华等^[6]通过添加醋酸盐、生物素、泛酸盐等对 FP094 菌株中由磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)、丙酮酸 (PYR) 和草酰乙酸 (OAA) 构成的“三角区”进行扰动, 定性分析了此扰动对赖氨酸合成所需前体物代谢流量的调节机制, 从而提高赖氨酸的产量。王帅等^[7]在谷氨酸发酵研究中, 发现添加少量乳酸会促进丙酮酸含量的增加, 而丙酮酸是谷氨酸的前提物质, 最终谷氨酸产量提高 15%。刘立明等^[8]研究了添加 TCA 循环中间产物可以促进光滑球拟酵母 CCTCC M202019 生长及积累丙酮酸的影响, 得出 OAA 更能促进细胞的生长, 丙酮酸得率及生产强度分别提高 6% 和 24%。

生物法制备丁二酸的过程主要是将 EMP 途径中得到的 PEP 经由 TCA 循环的还原支路, 通过一步 CO₂ 固定和两步还原反应生成丁二酸。该过程涉及的关键酶主要有磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶、苹果酸脱氢酶、富马酸酶和富马酸还原酶。McKinlay 等^[9]利用 ¹³C 原子标记分析代谢中间产物中的同位素位置研究丁二酸的代谢途径, 结果表明 PEP 是代谢过程中的一个重要节点, 它将整个代谢流分配到两个支路: 一部分 PEP 生成 OAA, 继而生成丁二酸, 称作 C₄ 支路; 另一部分 PEP 生成 PYR, 进而生成乙酸、甲酸等副产物, 称作 C₃ 支路。同时, 草酰乙酸和苹果酸 (MAL) 可经脱羧反应生成丙酮酸, 使代谢流在 C₄ 和 C₃ 支路间进行重新分配。因此, 除 PEP 外, OAA、MAL 和 PYR 也是代谢流分配中的重要节点。

目前, 通过添加少量代谢中间体对丁二酸代谢

途径进行扰动的研究在国内外还未见报道。本研究主要从代谢通量分析角度, 考察添加少量代谢中间产物 (如 PEP、PYR 等) 对产琥珀酸放线杆菌 NJ113 代谢通量分布及关键节点的影响, 并结合关键酶酶活分析说明其影响机理, 为优化发酵过程控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 由本实验室自主筛选并保存。

1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10 (分消), 酵母膏 5, NaHCO₃ 10, NaH₂PO₄·2H₂O 9.6, K₂HPO₄·3H₂O 15.5, pH 7.0, 121℃ 灭菌 15 min。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 40 (分消), 酵母膏 10, 玉米浆 10, 乙酸钠 1.36, KH₂PO₄ 3, MgCl₂·6H₂O 0.2, CaCl₂ 0.2, NaCl 1, Na₂HPO₄·12H₂O 0.31, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6, pH 7.0, 121℃ 灭菌 15 min (摇瓶培养需加 20 g/L 碳酸镁)。

1.3 培养方法

种子采用 100 mL 血清瓶培养, 装液量 50 mL, 接种量 2% (种子是相同条件下活化后的培养物), 于 37℃、180 r/min 摇床中培养 11 h; 血清瓶发酵培养装液量 30 mL, 接种量 3%, 通无菌 100% CO₂ 直至 pH 6.8~7.0, 摇床转速 180 r/min, 在 37℃ 下培养 20 h; 3 L 发酵罐 (BioFlo 110 fermenter, NBS) 装液量 1.5 L, 接种量 7%, 300 g/L Na₂CO₃ 控制过程 pH 6.8, 于 37℃、搅拌转速 200 r/min、100% CO₂ (通气量 0.5 L/min) 条件下培养。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞干重测定

称出干燥 10 mL 离心管重量 (G1), 取 4 mL 发酵液置于离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 再用 4 mL 蒸馏水清洗 2 次, 离心, 于 60℃ 烘箱中干燥至恒重后称重 (G2), 则菌体干重 (g/L) = (G2-G1)/4。

1.4.2 葡萄糖、乙醇及有机酸的测定

采用高效液相色谱法 (戴安 Ultimate 3000 系列), 色谱柱为 Aminex® HPX-87H 型离子排斥色谱柱 (300 mm×7.8 mm id, 5 μm), 以 0.005 mol/L H₂SO₄ 水溶液作为流动相, 流速 0.6 mL/min, 进样体积 20 μL, 柱温 55℃, 葡萄糖和乙醇利用示差折光检测器检测, 丁二酸、乙酸、甲酸等利用紫外检测器检测, 波长为 215 nm。

1.4.3 酶活的测定

细胞抽提物的制备: 取 30 mL 稳定期的发酵液于 50 mL 离心管中, 10 000 r/min、4℃离心 10 min, 弃去上清液, 用 5 mL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0, 含有 100 mmol/L Tris, 20 mmol/L KCl, 5 mmol/L MnSO₄, 2 mmol/L DTT, 100 mmol/L EDTA) 溶液洗涤 2 次后将细胞悬浮, 置于冰槽中超声破碎 20 min; 结束后 10 000 r/min、4℃离心 20 min, 将上清液转入另一离心管中, 保存在-80℃冰箱待用。

蛋白质浓度的测定: Bradford 法^[10], 以牛血清白蛋白作为标准。

PEP 羧化激酶 (Pepck) 酶活测定^[11]体系: 300 mmol/L Tris-HCl (pH 6.6), 300 mmol/L MgCl₂, 150 mmol/L MnCl₂, 1.125 mol/L NaHCO₃, 12 U/mL 苹果酸脱氢酶, 100 mmol/L ADP·Na₂, 3 mmol/L NADH, 150 mmol/L PEP, 细胞提取液; 所有底物于 37℃水浴 20 min, 然后采用联机紫外可见分光光度计于 340 nm 处测定反应的初速度。

丙酮酸激酶 (Pyk) 酶活测定体系^[12]: 300 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 300 mmol/L MgCl₂, 750 mmol/L KCl, 12 U/mL 乳酸脱氢酶, 100 mmol/L ADP·Na₂, 3 mmol/L NADH, 150 mmol/L PEP, 细胞提取液; 所有底物于 37℃水浴 20 min, 然后采用联机紫外可见分光光度计于 340 nm 处测定反应的初速度。

苹果酸脱氢酶 (Mdh) 酶活测定体系^[11]: 400 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 1.2 mmol/L NADH, 15 mmol/L OAA, 细胞提取液; 所有底物于 37℃水浴 20 min, 然后采用联机紫外可见分光光度计于 340 nm 处测定反应的初速度。

酶活单位的定义: 一个酶活力单位 (U) 定义为

1 min 催化 1 nmol 底物转化为产物的量; 比活力为每 mg 蛋白质所含的酶活力单位数。

$$\text{酶活力单位 (U/mL)} = \Delta A \times \frac{V \times 10^9}{\varepsilon \times v \times L}$$

式中, ΔA 为吸光度随时间的变化 (min^{-1}), V 为反应体系体积 (mL), ε 为摩尔消光系数 (NADH 在 340 nm 时为 $6.22 \times 10^3 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$), v 为样品量 (mL), L 为比色皿光径 (cm), 10^9 为将 mol 换算成 nmol。

比活力 (U/mg)=酶活力单位/蛋白浓度。

1.4.4 代谢过程及通量分析

根据相关文献[11]和[13], 发酵产物以及酶活分析, 建立了 *A. succinogenes* 以葡萄糖作为碳源合成丁二酸的代谢网络, 主要包括糖酵解 (EMP)、磷酸己糖 (HMP)、C₃、C₄、维持消耗以及生物量的合成途径。在建立网络模型时做了以下假设和简化处理: 1) 细胞中的中间代谢物处于拟稳态, 在整个反应中不积累; 2) 只考虑主要中心碳代谢反应的物流平衡; 3) 忽略培养基中有机氮源对细胞合成通量的贡献; 4) 能量供需平衡, 即合成菌体与产物所需的能量和 EMP、HMP 产生的能量总数相等; 5) 在代谢过程中, 由于一部分碳源用于细胞的维持、产能、CO₂ 放出以及分泌其他一些未知的代谢产物等, 造成碳源的不平衡现象, 在代谢网络通量的计算时忽略该部分通量; 6) *A. succinogene* 细胞组成参考 McKinlay 等^[9]的研究, 单一化为 CH₂O_{0.5}N_{0.2} 统一处理。整个代谢网络包括 24 个代谢反应方程, 见表 1。

根据拟稳态假设求解通量, 即假设细胞内的中间代谢物浓度变化速率为 0, 有 $Ar=X$, 其中, A 为胞内代谢反应计量系数矩阵 ($n \times m$), r 为代谢反应速率向量 ($m \times 1$), X 为代谢物净积累速率向量 ($n \times 1$), m 与 n 分别为反应方程和代谢中间体的个数。整个代谢网络包含 24 个代谢反应, 其中中间代谢物为 18 个, 自由度为 6; 可测速率有 7 个, 即葡萄糖消耗速率以及丁二酸、乙酸、甲酸、乳酸、乙醇、细胞的生成速率。根据中间产物代谢平衡方程 (表 2) 列出矩阵 A 。由于可测定的速率大于自由度, 该系统为超定系统, 可用最小二乘法求得简单解, 利用 MATLAB

表 1 代谢反应方程

Table 1 Metabolic reactions

No.	Flux	Metabolic reactions
1	r ₁	Glucose+ATP=G6P+ADP
2	r ₂	G6P=F6P
3	r ₃	F6P+ATP=FBP+ADP
4	r ₄	FBP=2GAP
5	r ₅	GAP+ADP+NAD ⁺ =PEP+ATP+NADH+H ₂ O
6	r ₆	PEP+ADP=PYR+ATP
7	r ₇	PYR+CoA +NAD ⁺ =ACA+CO ₂ +NADH
8	r ₈	ACA+Pi=CoA+Ac-P
9	r ₉	Ac-P+ADP=Acetate+ATP
10	r ₁₀	PYR+NADH=Lactate+NAD ⁺
11	r ₁₁	PYR+CoA=Formate+ACA
12	r ₁₂	ACA+2NADH=Ethanol+CoA+2NAD ⁺
13	r ₁₃	PEP+CO ₂ +ADP=OAA+ATP
14	r ₁₄	OAA+NADH=MAL+NAD ⁺
15	r ₁₅	MAL=FUM+H ₂ O
16	r ₁₆	FUM+NADH=Succinate+NAD ⁺
17	r ₁₇	G6P+H ₂ O+2NADP=RL5P+CO ₂ +2NADPH
18	r ₁₈	RL5P=X5P
19	r ₁₉	RL5P=R5P
20	r ₂₀	R5P+X5P=S7P+GAP
21	r ₂₁	S7P+GAP=E4P+F6P
22	r ₂₂	X5P+E4P=F6P+GAP
23	r ₂₃	ATP=ADP+Pi
24	r _{BM}	0.0102 G6P+0.0032 F6P +0.0364 GAP+0.0131 PEP+0.0685 PYR+0.0746 ACA+0.0372 OAA+0.0154 R5P+0.0077 E4P+1.1640 ATP+0.3334 NADPH=Biomass+1.1640 ADP+0.3334 NADP

Note: G6P: glucose-6-phosphate; RL5P: ribulose-5-phosphate; X5P: xylulose-5-phosphate; R5P: ribose-5-phosphate; S7P: sedoheptulose-7-phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; F6P: fructose-6-phosphate; FBP: fructose-1,6-bisphosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP: dihydroxyacetonephosphate; PEP: phosphoenolpyruvate; PYR: pyruvate; ACA: acetyl-CoA; Ac-P: acetyl phosphate; FUM: fumarate; MAL: malate; OAA: oxaloacetate.

软件线性规划求得代谢分布。在代谢通量的计算中，均以 100 mmol/(g DCW·h) 的葡萄糖为计算基准，所有代谢通量 r 的单位均为 mmol/(g DCW·h)。

2 结果与讨论

2.1 外源添加中间代谢产物对发酵的影响

外源添加少量的代谢中间体可能对代谢网络中关键酶活产生影响，从而影响代谢产物的分布情况。本实验通过血清瓶发酵考察不同浓度的 PEP、PYR、

表 2 代谢通量方程

Table 2 Equations of metabolic flux

No.	Metabolic intermediate	Equations from metabolic flux balance
1	G6P	r ₁ -r ₂ -r ₁₇ -0.0102r _{BM} =0
2	F6P	r ₂ -r ₃ +r ₂₁ +r ₂₂ -0.0032r _{BM} =0
3	FBP	r ₃ -r ₄ =0
4	GAP	2r ₄ -r ₅ +r ₂₀ -r ₂₁ +r ₂₂ -0.0364r _{BM} =0
5	PEP	r ₅ -r ₆ -r ₁₃ -0.0131r _{BM} =0
6	PYR	r ₆ -r ₇ -r ₁₀ -r ₁₁ -0.0685r _{BM} =0
7	ACA	r ₇ +r ₁₁ -r ₈ -r ₁₂ -0.0746r _{BM} =0
8	Ac-P	r ₈ -r ₉ =0
9	OAA	r ₁₃ -r ₁₄ -0.0372r _{BM} =0
10	MAL	r ₁₄ -r ₁₅ =0
11	FUM	r ₁₅ -r ₁₆ =0
12	RL5P	r ₁₇ -r ₁₈ -r ₁₉ =0
13	X5P	r ₁₈ -r ₂₀ -r ₂₂ =0
14	R5P	r ₁₉ -r ₂₀ -0.0154r _{BM} =0
15	S7P	r ₂₀ -r ₂₁ =0
16	E4P	r ₂₁ -r ₂₂ -0.0077r _{BM} =0
17	[H]	r ₅ +r ₇ -r ₁₀ -2r ₁₂ -r ₁₄ -r ₁₆ +2r ₁₇ -0.3334r _{BM} =0
18	ATP	-r ₁ -r ₃ +r ₅ +r ₆ +r ₉ +r ₁₃ -r ₂₃ -1.1640r _{BM} =0

OAA 及 MAL 对菌体生长及发酵产丁二酸的影响，这 4 种物质在培养基中的浓度范围为 0~2 g/L，结果见表 3。

表 3 添加中间代谢产物对发酵的影响

Table 3 Effects of adding intermediate metabolite on succinate fermentation

Metabolic intermediates	Concentration (g/L)	DCW	Succinic acid (g/L)
PEP	0.5	4.83	33.2
	1.0	4.73	32.6
	1.5	4.78	32.9
	2.0	4.55	31.9
PYR	0.5	4.53	29.3
	1.0	4.45	28.7
	1.5	4.57	29.6
	2.0	4.39	28.1
OAA	0.5	4.50	30.4
	1.0	4.59	31.5
	1.5	4.41	31.9
	2.0	4.46	31.2
MAL	0.5	4.51	31.8
	1.0	4.43	31.1
	1.5	4.54	31.5
	2.0	4.41	30.8
Control	—	4.39	29.5

由表 3 可知, 外源添加各种中间代谢对菌体浓度及丁二酸产量都有一定的影响。添加少量 PEP、OAA 以及 MAL 对菌体生长及产酸均有一定的促进作用, 其中添加 PEP 的效果最好。当培养基中 PEP 浓度为 0.5 g/L 时菌体浓度及丁二酸产量都达到最大, 丁二酸收率达到 83.2%, 较对照提高 9.3%; 而继续增加 PEP 浓度对菌体生长及丁二酸产量影响不明显, 甚至出现下降趋势。因此, 培养基中 PEP 的最佳添加浓度为 0.5 g/L, 以下实验主要考察添加 0.5 g/L PEP 对发酵过程的影响。

2.2 外源添加 PEP 对发酵结果的影响

在 3 L 发酵罐中考察添加 0.5 g/L PEP 对 NJ113 厌氧发酵产丁二酸的影响, 结果见图 1 和图 2。

从图 1、图 2 可以看出, 添加 PEP 后整个发酵过程的变化趋势与对照 (不添加 PEP 的发酵过程)

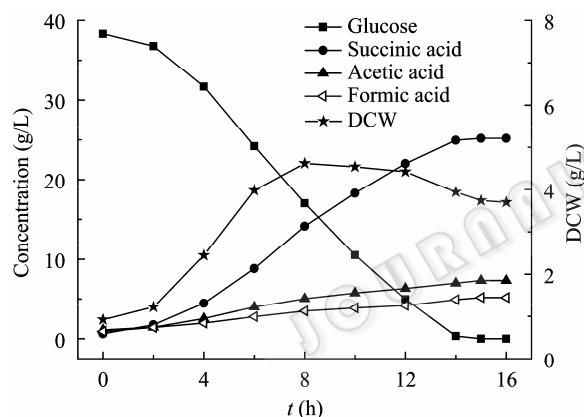


图 1 不添加 PEP 的发酵过程曲线

Fig. 1 Process of succinic acid fermentation without addition of PEP.

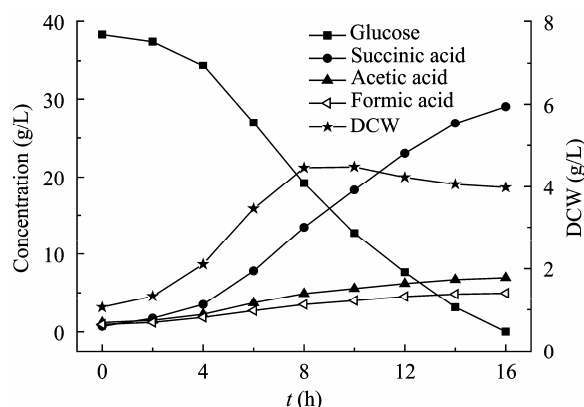


图 2 添加 0.5 g/L PEP 的发酵结果

Fig. 2 Process of succinate fermentation with 0.5 g/L PEP added.

一致。菌体在 2~8 h 内生长最快, 8 h 时细胞干重达到最大, 虽然较对照的略低, 但其稳定期较长, 衰亡速率较慢, 最终丁二酸产量并没有下降, 丁二酸浓度为 29.1 g/L, 收率达到 76.2%, 比未添加 PEP 时的 65.2% 提高了 11.0%。副产物乙酸、甲酸的浓度与对照相比均有所降低。PEP 作为 *A. succinogenes* NJ113 代谢途径的关键节点, 少量 PEP 的加入可能扰乱了菌体的正常代谢, 提高或降低了某些关键酶活, 从而改变代谢产物的分布, 最终导致丁二酸产量的提高。虽然添加 PEP 后发酵罐培养的丁二酸浓度较对照提高了, 但是远低于摇瓶培养的水平, 原因可能是发酵罐培养过程中流加的 Na_2CO_3 溶液对发酵液产生了稀释作用, 从而导致罐子的丁二酸浓度较摇瓶的低。

2.3 外源添加 PEP 对代谢通量分布的影响

代谢通量可以直观地反映不同途径的相互作用以及围绕代谢分支点的物质流分布, 进而表征细胞的代谢能力^[14]。为探讨外源添加 PEP 的影响机理, 对 *A. succinogenes* NJ113 进行代谢通量分析。利用菌体细胞稳定且碳代谢流旺盛时 (即稳定期) 的培养检测参数作为代谢通量常数项, 因此选择 10 h、10.5 h、11 h、11.5 h、12 h 取样分析发酵液中的菌体、葡萄糖、丁二酸、乙酸及甲酸的浓度, 得到在 11 h 时的单位时间浓度变化率, 并计算得到各反应 ($r_1 \sim r_{BM}$) 的代谢通量。PEP 添加与否的代谢通量分布情况如图 3 所示。

从图 3 中的通量分布情况可以看出, 在发酵后期 (11 h) 消耗很少的碳源用于菌体的合成, 添加 0.5 g/L PEP 的细胞合成通量与对照相比变化不大, 底物葡萄糖主要用来合成产物丁二酸等。通量变化主要在通往 HMP 途径、 C_3 及 C_4 途径的摩尔通量上, 其中 PEP 是影响丁二酸合成的关键节点, PYR 是影响乙酸、甲酸等副产物生成的关键节点。添加 PEP 后流向 C_4 途径的通量 r_{13} 比对照提高了 23.8%, 丁二酸代谢通量从 99.8 mmol/(g DCW·h) 增至 124.4 mmol/(g DCW·h); 同时, 流向 C_3 途径的通量 r_6 有所降低, 导致副产物乙酸及甲酸的代谢通量分别降低了 22.9%、15.4%, 使得更多的碳源用于合成产物丁二酸, 最终提高了丁二酸产量。

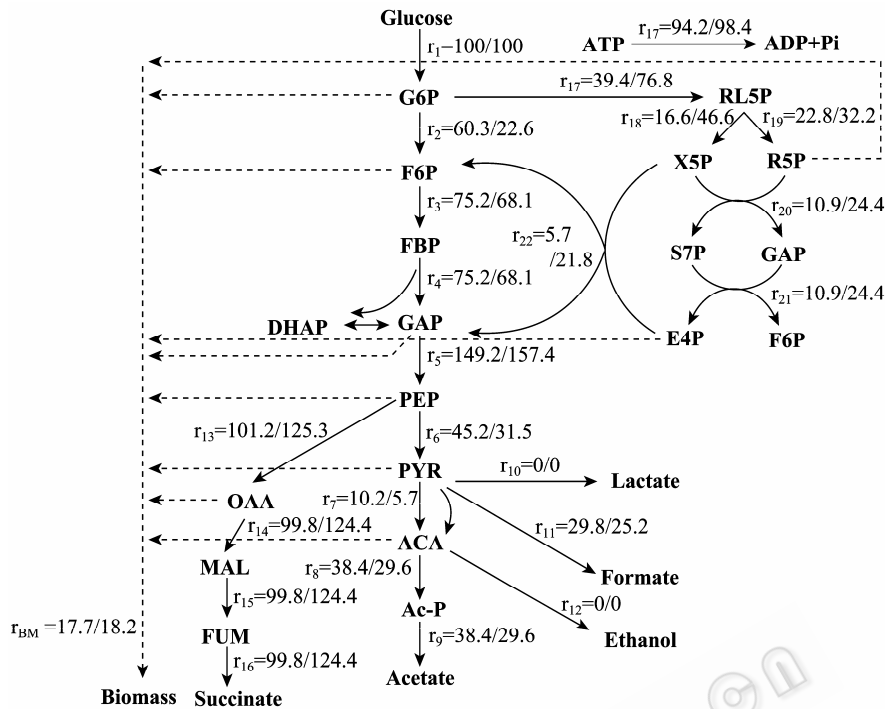


图3 添加 PEP 对代谢通量分布的影响 (左边: 不添加 PEP; 右边: 添加 PEP)

Fig. 3 Effects of adding PEP on metabolic flux distribution. Left flux from the control, right flux from the results of adding PEP.

2.4 外源添加 PEP 对关键酶活的影响

细胞代谢网络中的每一个反应都是由某种特定的酶催化的, 酶活力的大小可以直接反映各个反应的速率。外界环境 (如 pH、温度等) 的改变都会对酶活力产生不同程度的影响, 从而影响代谢产物的分布情况。*A. succinogenes* NJ113 代谢途径中的关键节点是 PEP 及 PYR^[9], PEP 在 Pepck 作用下生成 OAA 进入 C₄ 途径, 之后 OAA 在 Mdh 作用下生成苹果酸, 最终生成目标产物丁二酸; 而 PEP 也可以在 Pyk 作用下生成丙酮酸进入 C₃ 途径, 生成副产物乙酸、甲酸等。实验测定稳定期时 (11 h) 添加 PEP 后发酵过程的关键酶活, 并与对照比较, 结果见图 4。

由图 4 可知, 关键酶 Pepck 的比活力变化非常明显, 添加 0.5 g/L PEP 后 Pepck 比酶活达到 1 910 U/mg, 比对照提高了 74.7%; 同时 Mdh 也有所提高。而 Pyk 的比酶活有所降低, 添加 0.5 g/L PEP 后 Pyk 为 160 U/mg, 与不添加 PEP 相比降低了 67.5%。因此, Pepck 酶活的提高使得进入 C₄ 途径的碳流量增加, 从而减少进入 C₃ 途径的碳流量, 这与 Pyk 酶活降低是一致的, 最终合成更多的丁二酸, 同时降低乙酸及甲酸的产量。

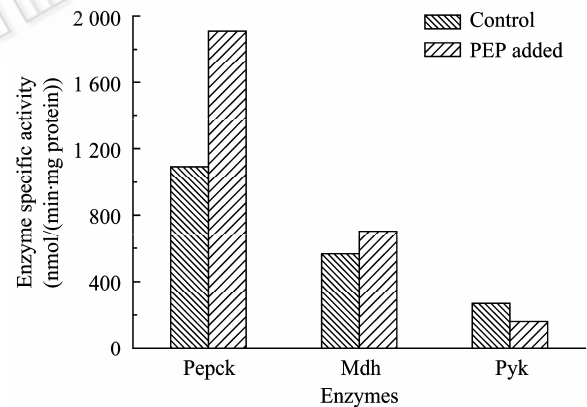


图4 添加 PEP 对关键酶活的影响

Fig. 4 Effects of PEP added on the key enzyme activity.

2.5 外源添加 PEP 对还原力通量分布的影响

在 *A. succinogenes* NJ113 厌氧代谢途径中, 1 mol 葡萄糖可以生成 2 mol PEP 以及 2 mol NADH, 而 2 mol PEP 生成 2 mol 丁二酸时需要消耗 4 mol NADH, 副产物乙酸、甲酸的生成过程不消耗也不产生 NADH, 可见, 产物丁二酸合成的矛盾是还原力不足, 积累更多的 NADH 将有利于丁二酸的合成。代谢通量分析结果表明添加 0.5 g/L PEP 后 HMP 途径与 EMP 途径的通量比由对照的 39.4 : 60.3 提高至 76.8 : 22.6, 也就是说, 通量更多地从 G6P 通过 HMP

途径进行代谢,并大量合成 NADPH, NADPH 除一部分用于细胞合成外,剩下的可在转氢酶的作用下转化为 NADH^[15]用于丁二酸合成,解决了 NADH 不足的矛盾。代谢网络中还原力[H]产生途径的通量分配情况见表 4。

表 4 添加 PEP 对[H]产生途径通量分布的影响

Table 4 Effects of PEP added on [H] flux distribution

	The flux of [H] (mmol/(g DCW·h))	NADH flux		NADPH flux
		r ₅	r ₇	r ₁₇
Control	238.2	149.2	10.2	39.4
Adding PEP	316.7	157.4	5.7	76.8

Note: the flux of [H]=r₅+r₇+2 r₁₇.

从表 4 可以看出, NADH 产生途径主要有两条,即 GAP 到 PEP (r₅) 和 PYR 到 ACA (r₇), 添加 PEP 对 NADH 的通量没有明显的影响,但是 NADPH 的通量变化 (r₁₇) 比较明显,与对照相比提高了 97.5%,导致还原力[H]总通量增加。由于两种情况下的菌体浓度没有明显的变化,因此,添加 PEP 条件下有较多的 NADPH 可在转氢酶的作用下生成 NADH,从而用于丁二酸的合成,最终提高丁二酸/(乙酸+甲酸)的比例。

3 结论

外源添加代谢中间体对菌体生长及发酵产丁二酸均有一定的影响,其中添加 0.5 g/L PEP 的效果最好。应用代谢通量分析方法得出添加 0.5 g/L PEP 后 HMP 与 EMP 途径的通量比由 39.4 : 60.3 提高至 76.8 : 22.6,因此可以合成更多的 NADPH,进而转化为 NADH,解决了还原力不足的矛盾,导致 PEP 生成 OAA 的通量提高了 23.8%,丁二酸代谢通量从 99.8 mmol/(g DCW·h) 增至 124.4 mmol/(g DCW·h)。最终丁二酸浓度为 29.1 g/L,收率达到 76.2%,比未添加 PEP 时提高了 11.0%,同时副产物乙酸、甲酸等与对照相比均有所降低。关键酶活分析结果表明,添加 0.5 g/L PEP 后可显著提高 Pepck 的比活力,PEP 比酶活达到 1 910 U/mg,与对照相比提高了 74.7%;同时 Mdh 也有所提高。而 Pyk 的比酶活有所降低,添加 PEP 后 Pyk 为 160 U/mg,较对照降低了 67.5%。这与丁二酸产量增加、副产物产量减少是

一致的。

REFERENCES

- [1] Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39**: 352–361.
- [2] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**(5): 545–552.
- [3] Willke T, Vorlop KD. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **66**(2): 131–142.
- [4] Lee PC, Lee WG, Lee SY, *et al.* Fermentative production of succinic acid from glucose and corn steep liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, **5**: 379–381.
- [5] Heijnen JJ, Gulik WM, Shimizu H, *et al.* Metabolic flux control analysis of branch points: an improved approach to obtain flux control coefficients from large perturbation data. *Metab Eng*, 2004, **6**: 391–400.
- [6] Pan JH, Pan ZM, Zeng MJ, *et al.* Effects of nutrition factors on the biosynthesis of lysine in a lysine producer *Brevibacterium lactofermentum* FP094. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2002, **21**(2): 130–134.
潘军华, 潘中明, 曾媚涓, 等. 营养因子对乳酸发酵短杆菌合成赖氨酸的影响. 无锡轻工大学学报, 2002, **21**(2): 130–134.
- [7] Wang S, Zhang WG. Effects and optimization of accession lactic acid and succinic acid in glutamate fermentation. *Sci Technol Food Ind*, 2008, **7**: 76–78.
王帅, 张伟国. 添加乳酸和琥珀酸对谷氨酸发酵的影响及优化研究. 食品工业科技, 2008, **7**: 76–78.
- [8] Liu LM, Li Y, Du GC, *et al.* Addition of TCA cycle intermediates enhances pyruvate production. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(1): 115–119.
刘立明, 李寅, 堵国成, 等. 添加 TCA 循环中间产物加速光滑球拟酵母积累丙酮酸. 生物工程学报, 2004, **20**(1): 115–119.
- [9] McKinlay JB, Shachar HY, Zeikus JG, *et al.* Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng*, 2007, **9**(2): 177–192.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976,

72: 248–254.

- [11] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, *et al.* Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 332–342.
- [12] Samuelov NS, Lamed R, Lowe S, *et al.* Influence of $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(10): 3013–3019.
- [13] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 6651–6656.
- [14] Hao WL, Liu JZ, Zhao BH. Principle and application of metabolic engineering for microbiology. *Biotechnol Bull*, 2007, **5**: 18–23.
郝伟丽, 刘景芝, 赵宝华. 微生物代谢工程原理与应用. 生物技术通报, 2007, **5**: 18–23.
- [15] McKinlay JB, Vieille C. ^{13}C -metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism at different NaHCO_3 and H_2 concentrations. *Metab Eng*, 2008, **10**: 55–68.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

2008 中国生物技术的发展报告

中华人民共和国科学技术部社会发展科技司

中国生物技术的发展中心

978-7-03-028106-7 ¥148.00 2010年7月

内容简介

《2008中国生物技术的发展报告》分为：政策篇、科学篇、技术篇、生物产业篇、国际合作篇。介绍了我国生物技术及其产业化发展的现状和主要成就，交流、总结了发展生物技术和产业的经验，宣传了政府发展生物技术的政策方针，收集反应了截至2008年底国内外生物技术研发和产业化的最新进展。

《2008中国生物技术的发展报告》能为生物科技领域的科学家、企业家、管理人员和关心支持生物技术与产业的各界人士提供参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：周文宇 (010-64031535)

网上订购：www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目