

# 黄色短杆菌 TK0303 的 L-亮氨酸生物合成途径分析

刘 辉<sup>1</sup> 陈 宁<sup>1</sup> 温廷益<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>天津科技大学生物工程学院 天津 300457) (<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** :应用途径分析方法分析了在拟稳态时黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) TK0303 由葡萄糖发酵生产 L-亮氨酸的代谢途径,确定了 L-亮氨酸合成的最佳途径和最大理论产率。通过比较途径分析所获得的反应模型,确定了丙酮酸和乙酰辅酶 A 是 L-亮氨酸合成途径的关键节点。在此基础上改变外界环境因子,强化 L-亮氨酸生物合成途径中丙酮酸和乙酰辅酶 A 两个关键节点的代谢流,以期进一步提高 L-亮氨酸产率。结果表明,经过谷氨酸以及醋酸铵的调节,代谢途径流量发生显著变化,L-亮氨酸产量有明显提高。

**关键词** :L-亮氨酸 途径分析 黄色短杆菌

中图分类号 :TQ922 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2007)02-0249-05

途径分析(pathway analysis)是代谢工程中用以指导遗传操作的理论基础,是代谢网络分析的重要方法之一<sup>[1~3]</sup>。途径分析可以确定产物生成的所有可能代谢途径和基本反应模型。这些反应模型可由凸分析确定,由计算机算得<sup>[4~6]</sup>。若以向量  $e$  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: $Y = \sum a_i e_i (a_i \geq 0)$ 。实际上细胞内代谢网络就是由基本反应模型的非负线性组合产生的<sup>[4~7]</sup>。在这些基本反应模型中有一个代表最高的产率和代谢流分布的理想载流途径<sup>[8]</sup>。理想载流途径的构建开始于酶的确定、理论产率的计算和确定最优的代谢流分布,因此途径分析对于目的产物理想载流途径的构建具有重要意义。近年来途径分析在生物技术领域得到了广泛的应用,目前已被成功应用于酿酒酵母中聚  $\beta$ -羟丁酸以及大肠杆菌中芳香族氨基酸等物质合成的理论产率和最优代谢途径的确定<sup>[9]</sup>。但尚未见 L-亮氨酸生物合成途径分析的相关报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株** :黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) TK0303( $Met^- + Ile^L + 2-TA^r + \alpha-AB^r + \beta-HL^r + Rif^r + SG^r$ ),天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌种。

**1.1.2 培养基** :①活化斜面培养基:每升含葡萄糖 1g,蛋白胨 10g,牛肉膏 10g,酵母膏 5g,NaCl 2.5g,琼

脂粉 20g。②种子培养基:每升含葡萄糖 30g,玉米浆 25mL,尿素 2.0g(分消),磷酸二氢钾 1.0g,硫酸镁 0.4g,硫酸锰 0.01g,蛋氨酸 0.3g,VB<sub>1</sub> 300 $\mu$ g,生物素 200 $\mu$ g。③发酵培养基:每升含葡萄糖 130g,玉米浆 41mL,硫酸铵 24g,醋酸铵 22g,磷酸二氢钾 1g,硫酸镁 0.4g,硫酸锰 0.01g,谷氨酸 0.42g,蛋氨酸 0.5g,异亮氨酸 0.06g,VB<sub>1</sub> 300 $\mu$ g,生物素 50 $\mu$ g。以上培养基用 NaOH 调 pH 7.0 ~ 7.2,75kPa 蒸汽灭菌 20min<sup>[10]</sup>。

### 1.2 培养方法

**1.2.1 斜面活化培养** :28 $^{\circ}$ C 培养 20 ~ 24h。

**1.2.2 5L 自控发酵罐分批发酵** :5L 发酵罐中装液量 3L,接种量 300mL,28 $^{\circ}$ C 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 500r/min,发酵 64h。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 OD 值测定** :发酵液稀释一定倍数后,在波长 620nm 处用 752 分光光度计测定。

**1.3.2 发酵液中 L-亮氨酸含量测定** :采用 Elite-AAA 氨基酸分析仪测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 亮氨酸生物合成途径分析

根据相关参考文献<sup>[11~14]</sup>,本途径分析模型的建立基于如下假设:

(1)由于菌体生长代谢络复杂,同时考虑葡萄糖到 L-亮氨酸的完全转化,所以本文将不考虑黄色短

基金项目 天津市高等学校科技重点研究项目(2004ZD14)

\* 通讯作者。Tel/Fax :86-10-62566568 E-mail :wenty@im.ac.cn

作者简介 刘 辉(1980-)男,山东东营人,博士研究生,研究方向为代谢工程。E-mail :liuhui9802@yahoo.com.cn

收稿日期 2006-08-08;接受日期 2006-10-24;修回日期 2006-10-11



氨酸合成支路的代谢流量而敲除丙酮酸脱氢酶基因 ,那么就会使得 L-亮氨酸的另一重要前体物乙酰辅酶 A 合成量不足 ,从而影响 L-亮氨酸的转化率。由表 1 可知 ,无论 L-亮氨酸的转化率高低 ,从丙酮酸生成乙酰辅酶 A 的代谢流基本没有改变 ,这表明乙酰辅酶 A 的大量合成是 L-亮氨酸合成的前提。一方面乙酰辅酶 A 直接参与 L-亮氨酸的合成( r27 ) ,另一方面乙酰辅酶 A 通过 TCA 循环进一步代谢生成谷氨酸( r15 ) ,从而为生成 L-亮氨酸的转氨作用提供足量的氨基来源。然而要保证 L-亮氨酸的高转化

率 ,这两方面是必须同时处理好 ,否则会极大地影响 L-亮氨酸的生成。e7 e8 e9 e10 e11 e12 模型 r15 代谢流量过大 ,造成了碳架的浪费 ,也会降低了 L-亮氨酸的转化率。e1 e2 e3 的高转化率主要归因为 : 一方面 r13 为 0 ,保证了乙酰辅酶 A 完全转化为 L-亮氨酸 ,节约了碳架 ;另一方面 r15 分别为 6、6、7 ,保证了生成 L-亮氨酸的转氨作用所需的足量的谷氨酸。这是一个矛盾 ,但是该矛盾通过外源添加谷氨酸 ,是能够得到解决的。这也是后面乙酰辅酶 A 节点扰动的重要依据。

表 2 葡萄糖发酵生产 L-亮氨酸的基本反应模型

Table 2 Basic reaction modes for L-leucine production from glucose

Modes	r1	r2	r3	r4	r5	r6	r7	r8	r9	r10	r11	r12	r13	r14	r15	r16	r17	r18	r19	r20	r21	r22	r23	r24	r25	r26	r27
e1	10	7	9	19	19	7	3	2	1	1	1	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	7	0	7	
e2	10	7	9	19	19	6	3	2	1	1	1	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	6	
e3	10	7	9	19	19	6	3	2	1	1	1	1	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	6	
e4	10	6	9	19	18	6	4	3	1	1	1	1	1	1	7	1	1	1	1	0	0	0	6	6	0	6	
e5	10	6	9	19	18	6	5	3	2	2	2	1	1	1	7	1	1	1	1	0	1	1	0	6	5	0	5
e6	10	5	8	18	17	6	5	3	2	2	2	2	2	2	8	1	2	1	1	0	1	1	0	6	5	0	5
e7	10	4	8	18	16	6	5	4	2	2	2	2	2	2	8	2	2	2	2	0	1	1	1	6	4	0	4
e8	10	4	8	18	16	6	6	4	2	2	2	3	3	3	8	2	3	2	2	0	2	2	0	5	4	0	4
e9	10	4	8	18	15	6	7	4	2	2	2	3	3	3	9	3	3	3	3	0	2	2	0	5	3	0	3
e10	10	3	8	18	15	6	7	5	2	2	2	4	4	4	9	4	4	3	3	0	3	3	0	6	3	0	3
e11	10	3	8	18	14	6	7	5	2	2	2	4	4	4	9	4	4	3	3	0	3	3	0	6	3	1	2
e12	10	3	8	18	14	6	7	5	2	2	2	5	5	5	10	4	5	3	3	0	3	3	0	6	3	2	1

2.2 主要节点的扰动

经途径分析后 ,确定了 L-亮氨酸生物合成最优的代谢途径。该途径中 L-亮氨酸生成的最重要的酶有磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、乙酰乳酸合成酶、支链氨基酸转氨酶、α-异丙基苹果酸合成酶。通过选育磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活力减弱、天冬氨酸族氨基酸缺陷等突变株如蛋氨酸缺陷( Met<sup>-</sup> ) ,可增大 L-亮氨酸生物合成代谢流。选育以琥珀酸为唯一碳源生长微弱的菌株 ,可以使 L-亮氨酸的前体物丙酮酸以及乙酰辅酶 A 积累。2-噻唑丙氨酸( 2-TA )是 L-亮氨酸和 L-缬氨酸的结构类似物 ,通过选育 2-TA<sup>r</sup> ,有利于解除乙酰乳酸合成酶和 α-异丙基苹果酸合成酶所受到的反馈抑制和阻遏。α-氨基丁酸( α-AB )是缬氨酸的结构类似物 ,选育 α-AB<sup>r</sup> 有利于解除缬氨酸对乙酰乳酸合成酶的反馈抑制。该 L-亮氨酸产生菌 TK0303 遗传标记为( Met<sup>-</sup> + Ile<sup>L</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + α-AB<sup>r</sup> + β-HL<sup>r</sup> + Rif<sup>r</sup> + SG<sup>r</sup> ) ,从而为本实验奠定了遗传学方面的基础。由于对应不同的外界环境刺激 ,细胞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。

2.2.1 添加谷氨酸的扰动 :由上述途径分析可知 ,谷氨酸是转氨基作用合成 L-亮氨酸的氨基来源 ;由于菌株 TK0303 具有以琥珀酸为唯一碳源生长微弱的特性 ,菌体合成谷氨酸的能力较弱 ,这样可以使 L-亮氨酸的前体物丙酮酸以及乙酰辅酶 A 积累 ,从而 L-亮氨酸合成得到加强。但是要想保证为生成 L-亮氨酸提供足量的氨基 ,外源添加谷氨酸就显得尤为重要。

由图 2 可知谷氨酸添加量为 0.2g/L 时 ,菌体浓度以及 L-亮氨酸产量较不添加谷氨酸时有明显提高 ,谷氨酸添加量高于 0.2g/L 时 ,菌体浓度相近 ,L-亮氨酸产量进一步提高。当谷氨酸添加量为 0.4g/L 时 ,L-亮氨酸产量比不添加谷氨酸的增加 56%。其原因可以从以下两方面来理解 ( 1 )菌株 TK0303 具有以琥珀酸为唯一碳源生长微弱的特性 ,因而菌体合成谷氨酸的能力被减弱 ,谷氨酸添加量为 0.2g/L 有利于菌体的生长 ,进而导致产酸增加。( 2 )在谷氨酸添加量为 0.4g/L 时 ,菌浓增加已经不明显的情况下 ,L-亮氨酸的产量仍能进一步增加 ,这就说明生成 L-亮氨酸的转氨作用得到加强 ,谷氨酸添加量充足。

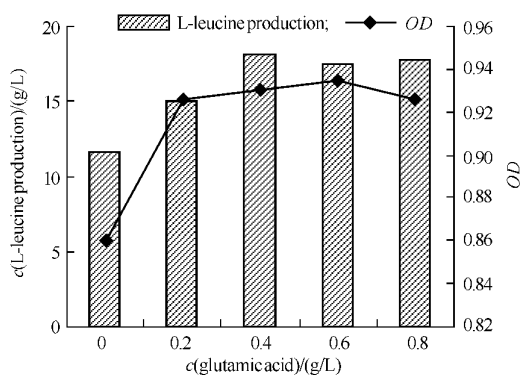


图2 谷氨酸对 L-亮氨酸产量的影响

Fig.2 Effect of glutamic acid on the production of L-leucine.

**2.2.2 添加醋酸铵的扰动** 醋酸铵在发酵中不仅起着氮源的作用,同时醋酸根参与了 L-亮氨酸的合成。由上述途径可知,在 L-亮氨酸生物合成途径中从丙酮酸到  $\alpha$ -乙酰乳酸这一过程中,需要活性乙醛的参与,而活性乙醛又来源于丙酮酸。醋酸根被菌体吸收后,能被转化成活性乙醛,减少了丙酮酸的消耗,强化了反应 r26,从而有利于 L-亮氨酸合成。

实验中醋酸铵浓度不同,通过添加硫酸铵保持发酵培养集中总铵根离子浓度一致,图3 是其发酵过程曲线。

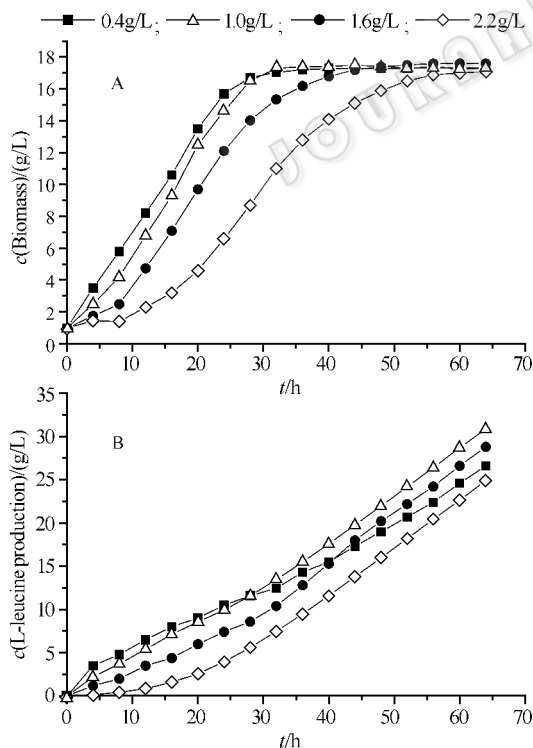


图3 醋酸铵对黄色短杆菌 TK0303 生长(A)和 TK0303 L-亮氨酸产量(B)的影响

Fig.3 Effect of  $\text{NH}_4\text{Ac}$  on the growth (A) and L-leucine production (B) of *Brevibacterium flavum* TK0303.

由图 3-A 可知,醋酸铵的添加量对菌体的生长有明显的影。醋酸铵浓度为 2.2g/L 时,醋酸铵添加量过高,菌体生长受抑制,生长最慢;1.6g/L 次之,1.0g/L 和 0.4g/L 生长情况接近。由图 3-B 可知,醋酸铵的添加量对菌体的产酸亦有明显的影响。醋酸铵浓度为 2.2g/L 时,由于菌体生长受到抑制,菌体产酸最慢;醋酸铵浓度为 1.6g/L 时,其发酵产酸水平在 40h 之前低于醋酸铵浓度为 0.4g/L 的条件下的产酸水平,而在 40h 之后产酸明显提高;醋酸铵浓度为 1.0g/L 时,菌体产酸最快。因此,菌体前期产酸主要决定于菌体生长速度,而到达稳定期后,产酸速率则与醋酸铵的添加量有关。在未造成抑制的前提下,醋酸铵浓度增大,则后期产酸较快。此结论与途径分析结果相一致。

### 3 结论

应用途径分析方法分析了在稳态时黄色短杆菌 TK0303 由葡萄糖生成 L-亮氨酸的途径。确定 L-亮氨酸合成的最佳途径及此时的代谢流分布和产率。L-亮氨酸的最大理论产率为 70%(摩尔比)。经调节因子谷氨酸、醋酸铵调节后,代谢途径流量可发生显著变化,L-亮氨酸产量有明显提高。

### 参考文献

- [1] Klamt S, Stelling J. Two approaches for metabolic pathway analysis? *Trends Biotechnol*, 2003, **21**: 64–69.
- [2] Gagneur J, Jackson DB, Casari G. Hierarchical analysis of dependency in metabolic networks. *Bioinformatics*, 2003, **19**(8): 1027–1034.
- [3] Dandekar T, Moldenhauer F, Bulik S, et al. A method for classifying metabolites in topological pathway analyses based on minimization of pathway number. *BioSystems*, 2003, **70**(3): 255–270.
- [4] Schilling CH, Letscher D, Palsson BO. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *J Theor Biol*, 2000, **203**(2): 229–248.
- [5] Schilling CH, Palsson BO. Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genomic scale pathway analysis. *J Theor Biol*, 2000, **203**(3): 249–283.
- [6] Schuster S, Dandekar T, Fell DA. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trend Biotechnol*, 1999, **17**(2): 53–60.
- [7] Schuster S, Fell DA, Dandekar T. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(3): 326–332.

- [ 8 ] Vijayasankaran N , Carlson R , Srien F. Metabolic pathway structures for recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2005 , **68** ( 6 ) : 737 – 746 .
- [ 9 ] Schuster S , Klamt S , Weckwerth W , *et al* . Use of network analysis of metabolic systems in bioengineering. *Bioprocess Biosyst Eng* , 2002 , **24** : 363 – 372 .
- [ 10 ] 姚志湘 , 伍时华 , 陈 宁 , 等 . L – 亮氨酸分批发酵动力学研究 . 广西工学院学报 , 2003 , **14** ( 3 ) : 5 – 7 .
- [ 11 ] 全志明 , 曹竹安 . 杂交瘤细胞代谢流分析模型及其在批式培养中的应用 . 无锡轻工大学学报 , 2001 , **20** ( 1 ) : 11 – 15 .
- [ 12 ] 应汉杰 , 欧阳平凯 . 应用代谢途径流量模型探讨 FDP 合成机理 . 化工学报 , 2000 , **51** ( 3 ) : 313 – 319 .
- [ 13 ] 王 健 , 陈 宁 , 张 蓓 , 等 . L-色氨酸生物合成的代谢流量分析 . 微生物学报 , 2003 , **43** ( 4 ) : 473 – 480 .
- [ 14 ] Liao JC , Hou SY , Chao YP. Pathway analysis , Engineering , and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnol Bioeng* , 1996 , **52** : 129 – 140 .
- [ 15 ] Pharkya P , Burgard AP , Maranas CD. Exploring the overproduction of amino acids using the bilevel optimization framework optKnock. *Biotechnol Bioeng* , 2003 , **84** ( 7 ) : 887 – 899 .

## Pathway analysis for production of L-leucine by *Brevibacterium flavum* TK0303

LIU Hui<sup>1</sup> , CHEN Ning<sup>1</sup> , WEN Ting-yi<sup>1 2 \*</sup>

(<sup>1</sup> College of Bioengineering , Tianjin University of Science and Technology , Tianjin 300457 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology , Chinese academy of sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract** *Brevibacterium flavum* is used for the production of a number of amino acids in the biotechnology industry . The yield of producing a metabolite is ultimately limited by the ability of the central metabolism and the desired biosynthesis pathway . Pathway analysis is a very useful tool for metabolic engineering , which can be applied to increase the yield of a metabolite or channeling a metabolite into desired pathways . It does not require any kinetic parameters and only uses the Stoichiometric equations . Pathway analysis for production of L-leucine by *Brevibacterium flavum* TK0303 at steady state was conducted in this paper . Theoretical yield and flux distribution for optimal pathway were determined . It is also concluded that pyruvate and acetyl-coenzyme A are the key nodes of the L-leucine biosynthesis pathway by analyzing the flux distributions of different modes . According to the pathway analysis , the production of L-leucine is expected to be raised by strengthening the flux of the key nodes ( pyruvate and acetyl-coenzyme A ) through changing the environmental factors . Because the flux of TCA cycle in *Brevibacterium flavum* TK0303 is weak , the production of L-leucine must be provided enough amido by adding glutamic acid to the fermentation medium .  $\text{NH}_4\text{Ac}$  is both a carbon source and a nitrogen source , which could be helpful to the production of L-leucine . The effects of glutamic acid and  $\text{NH}_4\text{Ac}$  on the production of L-leucine were further studied . The production of L-leucine increased 56% by adding glutamic acid . By improving the concentration of  $\text{NH}_4\text{Ac}$  , the biosynthesis of L-leucine was greatly strengthened too . The results indicate that the flux of L-leucine can be largely increased by changing the chemical regulatory factors such as  $\text{NH}_4\text{Ac}$  and glutamic acid and the modes established by pathway analysis prove to be efficient to describe the metabolic network of L-leucine production by *Brevibacterium flavum* TK0303 .

**Keywords** : L-leucine ; pathway analysis ; *Brevibacterium flavum*