

## 腺嘌呤对大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 和其耐乙酸突变株 DA19 代谢流分布的影响

张艳军<sup>1</sup>, 张晓云<sup>2</sup>, 李志敏<sup>3</sup>, 叶勤<sup>3</sup>

<sup>1</sup>浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

<sup>2</sup>江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013

<sup>3</sup>华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

**摘要:** 【目的】本文通过分析在基本培养基中添加腺嘌呤对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和其耐乙酸突变株 DA19 代谢流分布的影响, 从而进一步了解二者在代谢调控方面的差异。【方法】对 2 个菌株分别在氮源限制基本培养基及添加腺嘌呤的氮源限制基本培养基中进行连续培养, 分析两者代谢流变化差异, 并与酶活测定结果进行比较。【结果】添加腺嘌呤降低了 DH5 $\alpha$  的葡萄糖比消耗速率和乙酸的比生成速率, 提高了菌体关于葡萄糖的得率, 而丙酮酸比生成速率变化不明显。与 MN 培养基相比, 添加腺嘌呤后 DH5 $\alpha$  降低了乙酸分流比, 提高了分泌丙酮酸和三羧酸循环分流比, 同时明显改变了磷酸果糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和乙酸激酶酶活。与 DH5 $\alpha$  不同, 添加腺嘌呤使得 DA19 的丙酮酸比生成速率增加了近 57%, 而其它参数无明显改变。与 MN 培养基相比, DA19 在添加腺嘌呤后降低了三羧酸循环分流比, 大大提高了分泌丙酮酸分流比, 而关键酶活未发生明显改变。酶活变化与代谢流结果基本一致。【结论】由于大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 DA19 嘌呤核苷酸从头合成途径能力存在差异, 因此添加腺嘌呤对两个菌株的代谢流分布产生了完全不同的影响。

**关键词:** 大肠杆菌, 乙酸, 代谢流, 腺嘌呤

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 10-1358-06

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  在复合培养基中生长良好, 但在基本培养基中生长很差, 而且产乙酸多<sup>[1]</sup>, 而其乙酸耐受突变株 DA19 在基本培养基中生长和乙酸积累都得到明显改善<sup>[2]</sup>。为了了解二者在代谢调控上的差异, 对 2 个菌株在氮源限制基本培养基及添加 3 g/L 乙酸钠的氮源限制基本培养基中进行了连续培养, 比较了二者代谢流分布、关键酶活及蛋白表达的差异<sup>[1, 3]</sup>。其中 DA19 在基本培养基中的 *purH* 编码的磷酸核糖氨基咪唑羧基酰胺转甲基酶

的表达水平为 DH5 $\alpha$  的 1.89 倍<sup>[1]</sup>, 而该酶是嘌呤核苷酸从头合成途径的一个酶, 而在 DH5 $\alpha$  中过量表达 *purHD* 基因可以改善其在基本培养基中的生长情况<sup>[4]</sup>, 表明 DH5 $\alpha$  和 DA19 的嘌呤核苷酸从头合成能力存在差异。

由于在基本培养基中菌体需要由碳源和氮源物质来从头合成各种氨基酸和核苷酸, 如果某种物质缺乏或者合成不能满足细胞生长的需要, 则会影响到细胞的生长代谢。除从头合成途径外, 大肠杆菌

基金项目: 浙江师范大学博士科研启动资金 (ZC304010094); 2010 年度浙江师范大学校级科研项目 (KYJ06Y10193)

作者简介: 张艳军 (1979 -), 男, 河北唐山人, 讲师, 博士, 研究方向为发酵过程工程。Tel: +86-579-82282187; Fax: +86-579-82282269;

E-mail: yjzhang@zjnu.cn

收稿日期: 2011-04-14; 修回日期: 2011-06-06

也可利用现有的嘌呤碱与 5-磷酸核糖焦磷酸,在磷酸核糖转移酶(核苷酸焦磷酸化酶)的作用下形成嘌呤核苷酸<sup>[5]</sup>。在摇瓶中培养时,基本培养基中单独添加 18 种氨基酸对 DH5 $\alpha$  的生长并没有明显的改善作用,而添加腺嘌呤则使其菌体浓度比对照提高了 44%<sup>[1]</sup>。此外在发酵罐中进行分批培养时,基本培养基中添加腺嘌呤明显缩短了 DH5 $\alpha$  分批培养的延迟期,并使得最大比生长速率增大为原来的 2.2 倍,同时提高了菌体关于葡萄糖的得率系数,降低了乙酸比生成速率<sup>[6]</sup>。而添加腺嘌呤对其乙酸耐受突变株 DA19 影响很小。这些结果也表明 DH5 $\alpha$  和 DA19 的嘌呤核苷酸从头合成能力存在差异。因此本研究对大肠杆菌 DH5 $\alpha$  及 DA19 在添加腺嘌呤的氮源限制基本培养基中进行了连续培养,考察腺嘌呤对二者代谢流分布的影响,并与关键酶活测定结果进行比较,从而进一步了解二者在代谢调控方面的差异,为下一步应用代谢工程方法改造菌种提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**大肠杆菌 DH5 $\alpha$  [*supE44lacU169 (80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]。DA19 是 DH5 $\alpha$  的耐乙酸突变株,由本实验室筛选<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 培养基:**LB 培养基(1 L)含蛋白胨 10 g,酵母抽提物 5 g,NaCl 10 g,pH 7.2。M 培养基(1 L)含 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 15.12 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g,NaCl 0.5 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,CaCl<sub>2</sub> 0.011 g,葡萄糖 2 g,氯化铵 1 g,1% (w/v) 维生素 B<sub>1</sub> 0.2 mL,微量元素混合液<sup>[8]</sup> 0.2 mL,pH 7.0。MN 培养基为氮源限制的 M 培养基,1 L 中含葡萄糖 8 g,氯化铵 0.3 g,其它成分与 M 培养基相同。MNAd 培养基为添加 10 mg/L 腺嘌呤的 MN 培养基。所有培养基都采用去离子水配制。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**蛋白胨和酵母抽提物为英国 Oxoid 公司产品。葡萄糖测定试剂盒购于上海科欣生物技术研究所。5 L 发酵罐为华东理工大学化工研究所生产的 RIBE-5 型玻璃发酵罐。气相色谱为上海分析仪器厂 GC112A,采用 Chromosorb101 作为固定相。离子色谱仪为美国

Dionex 公司 ICS1500,采用 Ionpac AS11-HC 4 mm × 250 mm 阴离子分析柱、Ionpac AG11-HC 4 mm × 50 mm 保护柱和电导检测器。

### 1.2 培养方法及条件

将 1 mL 冷冻保存的菌种接入 250 mL 锥形瓶里的 30 mL LB 培养基中,旋转摇床 30℃,250 r/min 培养 12 h 为一级种子。转接 3 mL 一级种子于装有 100 mL M 培养基的 500 mL 锥形瓶中,相同条件 DA19 培养 10 h, DH5 $\alpha$  培养 17 h,为二级种子。

连续培养在 5 L 发酵罐中进行,利用国家生化工程技术研究中心(上海)的 TopHawk 软件由计算机控制和采集在线数据。发酵罐装 2.5 L MN 或 MNAd 培养基,接入二级种子 200 mL,在搅拌转速 500 r/min,通气量 4 L/min,温度 30℃ 下分批培养至静止期,用 2 台蠕动泵分别以相同速率加入新鲜培养基和抽出培养液,使培养液的总体积保持恒定。培养过程溶氧不低于 30%。每隔 4 h 取样测定菌体密度、葡萄糖浓度和 pH,连续 3 次不变即认为到达稳态。

### 1.3 分析方法

菌体浓度采用浊度法,将培养液适当稀释后测 OD<sub>600</sub>,按标准曲线计算菌体干重。葡萄糖浓度采用葡萄糖测定试剂盒测定。铵离子浓度采用 Berthelot 法<sup>[9]</sup> 比色测定。乙酸和丙酮酸浓度采用离子色谱测定。乙醇浓度采用气相色谱方法测定。对细胞破碎后的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶<sup>[10]</sup>、磷酸果糖激酶<sup>[11]</sup>、异柠檬酸脱氢酶<sup>[10]</sup>、乙酸激酶<sup>[11]</sup> 和异柠檬酸裂解酶<sup>[12]</sup> 进行测定。每一种酶的酶活为 3 次测定的平均值。

### 1.4 大肠杆菌代谢流的计算

大肠杆菌代谢网络主要包括糖酵解(EMP)、三羧酸循环(TCA)、磷酸戊糖(PP)途径、补给途径和乙酸途径<sup>[13]</sup>。大肠杆菌通过磷酸转移酶系统(PTS)摄取葡萄糖,每摄取 1 mol 葡萄糖消耗 1 mol PEP 并生成 1 mol 丙酮酸。PP 途径不仅为生物大分子合成提供前体,而且还为生物合成提供还原力——NADPH,当菌体产生的 NADPH 过量时,通过反应 22 把 NADPH 转换为 NADH<sup>[14]</sup>,经呼吸链氧化。因异柠檬酸裂解酶受到葡萄糖的阻遏<sup>[15]</sup>,过量葡萄糖存在下不考虑该途径。用于形成菌体的前体需求根据大肠杆菌的菌体组成计算<sup>[16]</sup>。

本研究采用物料平衡法计算代谢流分布<sup>[17]</sup>。

根据各节点代谢物的流量平衡,有:

$$Ax(t) = r(t)$$

式中: $A$ 为 $m \times n$ 的化学计量系数矩阵, $x(t)$ 为 $n$ 维流量向量, $r(t)$ 为 $m$ 维代谢物浓度变化率/摄取率/生产率向量。本研究分析连续培养稳态下的流量分布,中间代谢物浓度恒定,与胞外交换的代谢物流量可测得,因此流量分布的计算为由上式得到的线性方程组的解<sup>[18]</sup>。根据构建的大肠杆菌代谢网络图<sup>[3]</sup>,对22个代谢物建立了包括22个未知流量的22个方程。

表1 在MNAd连续培养DH5 $\alpha$ 和DA19的稳态过程参数

Table 1 Process parameter of DH5 $\alpha$  and DA19 during Steady state in the MNAd medium

Strain	Medium	Dilute rate/ (1/h)	DCW/ (g/L)	$Y_{X/G}$ / (g/g)	$Q_{Glc}$	$Q_{Ac}$	$Q_{Pyr}$	$Q_{Eth}$
DH5 $\alpha$	MN	0.128 ± 0.002	0.638 ± 0.011	0.181 ± 0.007	3.93 ± 0.15	1.66 ± 0.05	2.15 ± 0	0.161 ± 0.025
DA19	MN	0.134 ± 0.002	0.632 ± 0.002	0.223 ± 0.002	3.33 ± 0.04	1.17 ± 0.03	1.25 ± 0.22	ND
DH5 $\alpha$	MNAd	0.131 ± 0.002	0.625 ± 0.012	0.197 ± 0.006	3.70 ± 0.12	1.26 ± 0.05	2.24 ± 0.01	0.186 ± 0.042
DA19	MNAd	0.134 ± 0.001	0.618 ± 0	0.219 ± 0.005	3.40 ± 0.07	1.20 ± 0.07	1.96 ± 0	ND

ND:Not detected

与MN培养基相比,添加腺嘌呤后DH5 $\alpha$ 的 $Q_{Glc}$ 降低了6%, $Y_{X/G}$ 提高了8.8%, $Q_{Ac}$ 降低了24%,而 $Q_{Pyr}$ 仅增加了4%,变化不明显,但丙酮酸关于葡萄糖的得率系数( $Y_{Pyr/G}$ )增加了11%。添加腺嘌呤明显提高了DH5 $\alpha$ 的葡萄糖代谢效率,但其 $Y_{X/G}$ 仍低于DA19,而且乙酸和丙酮酸比生产速率高于同样条件下的DA19。此外,添加腺嘌呤并未能避免DH5 $\alpha$ 产生乙醇,因此DH5 $\alpha$ 三羧酸循环/电子传递链的限制并未因添加腺嘌呤而完全解决。由此推测DH5 $\alpha$ 还可能存在合成其它物质能力的限制,例如嘧啶核苷酸的合成,还有待于做进一步研究。

与DH5 $\alpha$ 不同,在MN培养基中添加腺嘌呤后DA19的 $Q_{Glc}$ 、 $Q_{Ac}$ 和 $Y_{X/G}$ 等无明显变化,但其 $Q_{Pyr}$ 增加近57%。因此在基本培养基中添加腺嘌呤对2个菌株代谢的影响完全不同。

## 2.2 DA19和DH5 $\alpha$ 代谢流分布的比较

根据表1所示DA19和DH5 $\alpha$ 在氮源限制的连续培养数据,计算出稳态代谢流分布,见表2。与MN培养基相比,添加腺嘌呤后DH5 $\alpha$ 的酵解途径(EMP,r2)的流量降低了6.5%,仍高于相同情况下DA19的EMP流量,同时其TCA循环(r8)流量降低了10%。而DA19在添加腺嘌呤后的EMP途径变化不明显,但TCA循环流量降低达到了25%。由5-磷酸木酮糖和4-磷酸赤醉糖生成6-磷酸果糖和

## 2 结果和讨论

### 2.1 DA19和DH5 $\alpha$ 的连续培养

DH5 $\alpha$ 和DA19连续培养的稳态结果见表1。在各实验中,连续培养的稳态铵离子浓度均为0,反映了铵的限制。在MN中,DA19关于葡萄糖的得率系数( $Y_{X/S}$ )比DH5 $\alpha$ 提高了24%,而葡萄糖比消耗速率( $Q_S$ )、乙酸和丙酮酸比生成速率( $Q_{Ac}$ 、 $Q_{Pyr}$ )都有所降低<sup>[3]</sup>。

表2 不同培养条件下DH5 $\alpha$ 和DA19的代谢流分布(mmol/(g·h))

Table 2 Metabolic fluxes in DH5 $\alpha$  and DA19 at difference culture conditions (mmol/(g·h))

Strain (medium)	DH5 $\alpha$ (MN)	DA19 (MN)	DH5 $\alpha$ (MNAd)	DA19 (MNAd)
Dilute rate	0.128	0.134	0.131	0.134
r1	3.93	3.33	3.70	3.40
r2	3.66	3.05	3.42	3.12
r3	3.75	3.14	3.52	3.21
r4	7.50	6.28	7.03	6.42
r5	7.36	6.13	6.88	6.27
r6	2.87	2.22	2.61	2.28
r7	4.25	3.88	3.66	3.30
r8	2.19	2.45	1.97	1.85
r9	2.19	2.45	1.97	1.85
r10	2.07	2.32	1.84	1.71
r11	0.25	0.26	0.26	0.26
r12	0.05	0.05	0.05	0.05
r13	0.20	0.21	0.21	0.21
r14	0.05	0.05	0.05	0.05
r15	0.05	0.05	0.05	0.05
r16	0.00	0.00	0.00	0.00
r17	0.46	0.48	0.47	0.48
r18	1.66	1.17	1.26	1.20
r19	0.16	0.00	0.19	0.00
r20	16.47	15.91	14.66	13.65
r21	2.07	2.32	1.84	1.71
r22	0.63	0.82	0.38	0.22

3-磷酸甘油醛的反应流量 ( $r_{16}$ ) 均为 0, 说明 PP 途径的功能主要是提供合成菌体前体物质, 并没有多余的碳流返回糖酵解途径, 而二者比生长速率基本相同, 使得 2 个菌株进入磷酸戊糖途径 (PP 途径,  $r_{11}$ ) 的流量十分接近, 且很小。

2 个菌株在丙酮酸和乙酰辅酶 A 节点流量有较明显差异, 见图 1。DA19 在 MN 培养基中分泌丙酮酸的分流比 ( $Q_{PYR} / (r_1 + r_6)$ ) 比 DH5 $\alpha$  低 29% 左右, 乙酸的分流比 ( $Q_{AC} / r_7$ ) 比 DH5 $\alpha$  低 22%, 而 TCA 分流比 ( $r_8 / r_7$ ) 比 DH5 $\alpha$  则要高 22% 左右<sup>[3]</sup>。与 MN 培养基相比, 添加腺嘌呤使得 DH5 $\alpha$  的分泌丙酮酸的分流比由 0.312 增加为 0.354, TCA 分流比由 0.516 增加为 0.538, 而乙酸的分流比则由 0.390 降低为 0.344。而添加腺嘌呤对 DA19 的 3 个分流比的影响则完全不同: 分泌丙酮酸的分流比由 0.225 增加为 0.345, 乙酸的分流比由 0.302 增加为 0.364, 而 TCA 分流比则由 0.633 降低为 0.559。这就使得两个菌株在添加腺嘌呤后的 3 个分流比十分接近。

根据代谢流分布结果, 可以计算 ATP (取 P/O 比为 2) 和二氧化碳的比生成速率  $Q_{ATP}$ 、 $Q_{CO_2}$ , 以及比耗氧速率  $Q_{O_2}$ , 在此基础上可以计算呼吸熵 RQ、菌体的 ATP 得率  $Y_{ATP}$  和碳回收率, 其结果见表 3。

表 3 由代谢流结果计算 DA19 和 DH5 $\alpha$  的  $Q_{ATP}$ 、 $Q_{CO_2}$ 、 $Q_{O_2}$ 、RQ、以及  $Y_{ATP}$  和碳回收率

Table 3  $Q_{ATP}$ ,  $Q_{CO_2}$ ,  $Q_{O_2}$ , RQ,  $Y_{ATP}$  and Carbon recovery in DA19 and DH5 $\alpha$  derived from the metabolic fluxes

Dilute rate (1/h)	Strain	Medium	$Q_{ATP}$	$Q_{O_2}$	$Q_{CO_2}$	RQ	$Y_{ATP}$ (g/mol)	Carbon recovery
			mmol/(g·h)					
0.128	DH5 $\alpha$	MN	46.0	9.27	8.62	0.93	2.78	99
0.134	DA19	MN	43.7	9.11	8.77	0.96	3.06	100
0.131	DH5 $\alpha$	MNAd	41.0	8.25	7.59	0.92	3.19	99
0.134	DA19	MNAd	37.9	7.68	6.98	0.91	3.53	100

2 个菌株的碳回收率都非常接近 100%。 $Y_{ATP}$  仅 2-4 g/mol, 远低于能量偶合时的 10 g/mol 左右, 这与本研究使用的氮源限制培养基有关。与碳源限制相比, 过量的碳源使得分解代谢和合成代谢的解偶联, 降低菌体的能量代谢效率, 从而表现为较高的碳源消耗速率和较低的菌体关于碳源的得率。与 MN 培养基相比, 添加腺嘌呤后 DH5 $\alpha$  的  $Q_{ATP}$  和  $Q_{O_2}$  降低了 11%,  $Q_{CO_2}$  降低了 12%, 而  $Y_{ATP}$  提高了 15%。与 DH5 $\alpha$  类似, 添加腺嘌呤后 DA19 的  $Q_{ATP}$ 、 $Q_{O_2}$  和  $Q_{CO_2}$  分别降低了 13%、16% 和 20%, 而  $Y_{ATP}$  提高了 15%。这是因为当存在外源嘌呤碱时, 细胞利用补

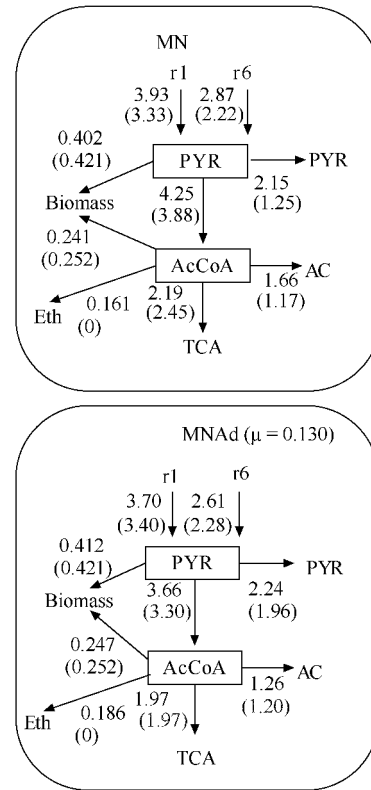


图 1 丙酮酸和乙酰 CoA 节点流量分布 (括号内数值代表 DA19 的流量)

Fig. 1 Metabolic fluxes at the pyruvate and acetyl-CoA nodes (the values in the parentheses represent the fluxes in DA19).

救合成途径——主要是在磷酸核糖转移酶的作用下合成嘌呤核苷酸<sup>[5]</sup>, 减少了从头合成途径合成嘌呤时所需的 ATP, 从而使得  $Y_{ATP}$  提高, 与添加腺嘌呤后  $Q_C$  和  $Q_{AC}$  均降低的结果一致。

### 2.3 关键酶活比较

在基本培养基中添加腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  和 DA19 的代谢流分布产生了不同的影响, 因此对连续培养过程中两个菌株的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH)、磷酸果糖激酶 (PFK)、异柠檬酸脱氢酶 (ICDH)、乙酸激酶 (ACK) 及异柠檬酸裂解酶 (ICL) 等关键酶活进行了测定, 结果见图 2。

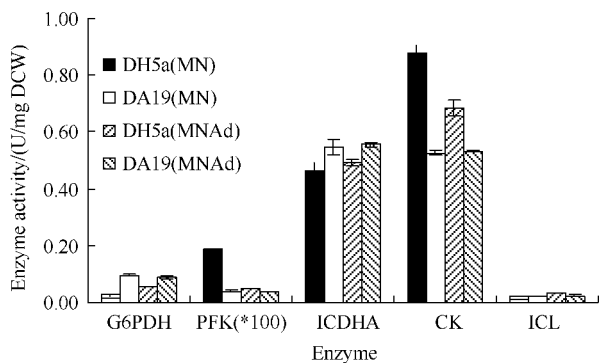


图2 DH5α和DA19连续培养稳态时的酶活

Fig. 2 Key enzyme activities in DH5α and DA19 in nitrogen limited continuous culture.

与MN培养基时相比,添加腺嘌呤后DH5α的6-磷酸葡萄糖脱氢酶酶活增加了116%,但代谢流( $r_{11}$ )没有明显差异,这是因为相同比生长速率下合成细胞所需前体相同,而磷酸戊糖途径主要起为合成细胞结构物质提供前体的作用,NADPH可由TCA循环中异柠檬酸脱氢酶催化的反应提供。

与MN培养基时相比,添加腺嘌呤后DH5α的磷酸果糖激酶和乙酸激酶酶活分别降低了约75%和22.2%,与代谢流的变化趋势一致。磷酸果糖激酶是酵解过程中的最关键的限速酶。ATP是磷酸果糖激酶的底物,也是其变构调节物,当细胞内含有丰富的ATP时,处于高能荷状态,此酶几乎没有活性,糖酵解作用减弱。在基本培养基中添加腺嘌呤后,DH5α的磷酸果糖激酶酶活仅为MN培养基中酶活的25%,但双向电泳并未检测到其表达量发生变化,表明添加腺嘌呤提高了DH5α胞内ATP水平,从而造成磷酸果糖激酶酶活的改变。而DH5α在MN培养基中磷酸果糖激酶酶活为相同条件下DA19的4.5倍,但在双向电泳上也未发现二者表达量的差异<sup>[1]</sup>,由此推测,DH5α胞内的ATP浓度低于相同条件下的DA19,从而造成了二者磷酸果糖激酶酶活的差异。

异柠檬酸脱氢酶酶活变化不明显,但代谢流结果显示TCA流量降低。三羧酸循环的速度是被精细的调节控制,其速度主要取决于细胞对ATP的需求。添加腺嘌呤提高了DH5α胞内ATP水平,会抑制TCA循环中的酶,同时添加腺嘌呤还减少了从头合成途径合成嘌呤所需的ATP,从而降低TCA循环流量。

因葡萄糖对ICL表达存在阻遏作用,测得的ICL活性很低,这与构建网络时的假设一致。

DA19的嘌呤核苷酸从头合成途径能力可以满足菌体合成的需求,因此在基本培养基中添加腺嘌呤并未引起DA19关键酶活明显改变,与代谢流分析结果一致:除降低TCA循环流量外,添加腺嘌呤

并未改变DA19其它途径的流量。DA19异柠檬酸脱氢酶酶活变化不明显,但TCA流量降低,与DH5α中的结果类似。

### 3 结论

与MN培养基相比,添加腺嘌呤降低了DH5α的葡萄糖消耗速率和乙酸的比生成速率,提高了 $Y_{X/G}$ ,而 $Q_{Pyr}$ 变化不明显。代谢流和酶活分析结果均表明,添加腺嘌呤对DH5α的影响显著:与MN培养基相比,添加腺嘌呤后DH5α降低了乙酸分流比,提高了分泌丙酮酸的分流比和TCA分流比,同时明显改变了磷酸果糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和乙酸激酶酶活。

与DH5α不同,添加腺嘌呤并未改变DA19的 $Q_C$ 、 $Q_{AC}$ 和 $Y_{X/G}$ ,但 $Q_{Pyr}$ 增加近57%。代谢流结果表明,与MN培养基相比,添加腺嘌呤后DA19降低了TCA分流比,提高了分泌丙酮酸的分流比。而添加腺嘌呤对DA19酶活并未产生明显的影响。

总之,添加腺嘌呤对两个菌株产生了完全不同的影响。

### 参考文献

- [1] 张晓云. 大肠杆菌DH5α及其耐乙酸突变株DA19的代谢特性研究. 华东理工大学学位论文. 2006.
- [2] 朱才庆,叶勤. 大肠杆菌DH5α及其耐乙酸突变株生长和产乙酸规律. 华东理工大学学报(*Journal of East China University of Science and Technology*), 2004, 30(1): 51-56.
- [3] 张艳军,张晓云,李志敏,叶勤. 大肠杆菌及其耐乙酸突变菌的连续培养和代谢流比较. 化工学报(*Journal of Chemical Industry and Engineering*), 2008, 59(1): 160-166.
- [4] 张艳军,张晓云,李志敏,叶勤. 基因 $atpA$ 、 $purHD$ 和 $ndh$ 的过量表达对大肠杆菌DH5α生长的影响. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(8): 1042-1047.
- [5] 沈同,王镜岩. 生物化学(下). 第二版. 北京:高等教育出版社,1990.
- [6] 张晓云,张艳军,李志敏,夏月兰,叶勤. 腺嘌呤对大肠杆菌DH5α及其耐乙酸突变株DA19生长和代谢的影响. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(3): 430-434.
- [7] 朱才庆,叶勤. 大肠杆菌DH5α耐乙酸突变株的选育及其代谢特性研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43(4): 460-465.
- [8] Pan JG, Rhee JS, Lebeault JM. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters*, 1987, 9: 89-94.
- [9] Shahinian AH, Reinhold JG. Application of the phenol-hypochlorite reaction to measurement of ammonia concentrations in kjeldahl digests of serum and various

- tissues. *Clinical Chemistry*, 1971, 17: 1077-1080.
- [10] Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. Berlin: Verlag Chemie, 1983.
- [11] Willis A. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1982.
- [12] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Archives of Microbiology*, 1997, 167: 332-342.
- [13] Goel A, Ferrance J, Jeong J, Atai MM. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42(66): 686-696.
- [14] Boonstra B, French CE, Wainwright I, Bruce NC. The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(3): 1031-1034.
- [15] Walsh K, Koshland DE Jr. Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(14): 8430-8437.
- [16] Varma A, Boesch BW, Palsson BO. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42: 59-73.
- [17] Nielsen J. Metabolic engineering: Techniques of analysis of targets for genetic manipulations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58: 125-132.
- [18] 李志敏, 叶勤. 大肠杆菌乙酸耐受株的代谢流分布. 华东理工大学学报 (*Journal of East China University of Science and Technology*), 2002, 28(3): 248-251.

## Effect of adenine on metabolic fluxes in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ and its acetate-tolerant mutant DA19

Yanjun Zhang<sup>1\*</sup>, Xiaoyun Zhang<sup>2</sup>, Zhimin Li<sup>3</sup>, Qin Ye<sup>3</sup>

<sup>1</sup> College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

<sup>2</sup> School of food & biological engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

<sup>3</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** [Objective] In order to further understand the difference in metabolic regulation between *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and its acetate-tolerant mutant DA19, we analyzed the effect of supplementing adenine in defined media on metabolic fluxes in the two strains. [Methods] *E. coli* DH5 $\alpha$  and DA19 were continuously cultured in nitrogen-limited defined media without or with supplemented adenine. Based on mass balance and metabolic reaction stoichiometry, the metabolic fluxes in DH5 $\alpha$  and DA19 at different culture condition were calculated, and the results were compared with the activities of key enzymes. [Results] The supplementation of adenine decreased specific glucose consumption rate and specific acetate production rate, and improved growth yield coefficient on glucose of DH5 $\alpha$ . Nevertheless, specific pyruvate production rate did not significantly change. Furthermore acetate split ratio decreased whereas pyruvate and TCA split ratios increased. Obvious changes were observed in the activities of phosphofructokinase, 6-phosphoglucose dehydrogenase and acetokinase. Compared with DH5 $\alpha$ , the supplementation of adenine increased rate specific pyruvate production rate of DA19 nearly 57%, and other parameters did not change. In addition, it showed decreased TCA split ratio and greatly increased pyruvate split ratio, whereas no changes in the key enzyme activities were observed. The differences of enzyme activities in the two strains were reasonably consistent with those in metabolic fluxes. [Conclusion] Because there were differences in the de novo biosynthesis capacity of purine nucleotides between DH5 $\alpha$  and DA19, supplementation of adenine had completely different effect on metabolic fluxes in two strains.

**Keywords:** *Escherichia coli*, acetic acid, metabolic flux, adenine

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Start-up Scientific Research Fund for the Doctoral Scholars of Zhejiang Normal University (ZC304010094) and by the 2010 annual university-level research projects of Zhejiang Normal University (KYJ06Y10193)

\* Corresponding author. Tel: +86-579-82282187; Fax: +86-579-82282269; E-mail: yjzhang@zjnu.cn

Received: 14 April 2011 / Revised: 6 June 2011