

# 鸟苷发酵过程的定量和优化 :抑制 $\text{NH}_4^+$ 离子 积累提高了苷产量 70%

黄明志\* 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 生化工程技术研究中心 生物工程学院,上海 200237)

**摘 要** 基于质量守恒定律和代谢反应中间代谢物的拟稳态假设,定量研究了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)代谢流分布随时间变化的特征。研究表明,在鸟苷发酵过程 40h 左右,存在着从己糖单磷酸途径到酵解途径的代谢流迁移,所迁移的碳源主要生成了氨基酸和有机酸。定量研究的结果,为发酵过程的工艺优化提供了重要依据。

**关键词** 代谢流迁移,定量研究,鸟苷,枯草芽孢杆菌

中图分类号 Q525 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0200-06

微生物细胞体内有众多的代谢反应,这些代谢反应组成了复杂的代谢网络并受到严格调控。细胞体内部、细胞体与外界环境之间通过代谢网络进行着复杂的物质、能量和信息交换。要深入地理解发酵过程中所呈现出的代谢行为和特征,为发酵过程优化提供线索,并为今后的菌株基因改造指明方向,就必须对细胞内的代谢网络进行定量研究<sup>[1]</sup>。

微生物细胞体内的代谢反应数目上千个,在现有的条件下,很难对每个代谢反应逐一地研究,一定的简化是非常必要的。在微生物中普遍存在的中心代谢途径(包括 EMP、HMP 和 TCA 等途径),为菌体生长和产物合成提供了前体、还原力和能量,是代谢网络定量研究的重要位点。研究物质在各个途径和各个代谢反应上的分布情况,对于深入理解细胞的代谢调控机制,有着重要意义<sup>[2]</sup>。

代谢流的研究方法有很多种,在缺乏相关代谢反应的动力学和调节信息时,可利用物料的质量守恒定律和对中间代谢物的拟稳态假设,通过测定细胞生长量、产物生成量、底物消耗量和其他代谢物积累量,再经过一定数学处理,可计算出细胞内代谢流的分布情况<sup>[3,4]</sup>。

在鸟苷发酵过程中,存在着所谓的“40h 现象”,即发酵 12h 后开始进入高速产苷期,但在 40h 左右,糖耗速率增加时,产苷速率却在下降,糖苷转化率明

显下降<sup>[5]</sup>。本文应用代谢流分析技术,利用大量的在线参数和手工分析实验参数,研究鸟苷发酵过程在这段时间中代谢流分布随时间变化的情况,为工艺优化提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种、培养基、仪器设备和测定方法

菌种 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)754<sup>#</sup> 培养基成份、所用仪器设备和测定方法等参见文献[5]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 代谢流研究的数学基础

代谢流分析的理论基础是物料的质量守恒定律,本文在此引入了中间代谢物的拟稳态假设。

设在某一代谢网络中,有  $N$  种代谢物, $M$  个代谢反应,并有  $Q$  个物料流入或流出该代谢网络,则对第  $i$  种代谢物,有如下所示的质量守恒式:

$$\frac{d(C_i V)}{dt} = \sum_{k=1}^Q F_k C_{ik} + \sum_{j=1}^M \alpha_{ij} R_j \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (1)$$

式(1)中,

$V$  反应体系体积( $\text{m}^3$ )

$C_i$  反应体系中代谢物  $i$  的摩尔浓度( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )

$t$  反应时间( $\text{s}$ )

$F_k$  第  $k$  种物料流的流量,入为正,出为负( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )

$C_{ik}$  第  $k$  种物料流中代谢物  $i$  的摩尔浓度( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )

$R_j$  第  $j$  个代谢反应的反应速率 ( $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ )

$\alpha_{ij}$  第  $j$  个代谢反应中代谢物  $i$  的计量系数(无因次),反应物为负,产物为正

将式(1)右边的第一项移项至左边,得

$$\sum_{j=1}^M \alpha_{ij} R_j = \frac{d(C_i V)}{dt} - \sum_{k=1}^Q F_k C_{ik} \quad (2)$$

式(2)为代谢流分析中的代谢方程组。拟稳态假设是设中间代谢物的积累项,即上式右边的第一项为零,此时式(2)可记作

$$AX = b \quad (3)$$

对于有  $N$  种代谢物,  $M$  个代谢反应的代谢网络,  $A$  是  $N \times M$  化学计量关系矩阵,  $X$  是  $M$  维反应速率向量,  $b$  是  $M$  维代谢物的质量变化速率和与环境交换速率的差。当  $M = N$  且  $A$  非奇异时,代谢方程组有唯一解;当  $M > N$  时,代谢方程组存在最优解。当  $M < N$  时,代谢方程组有多解。

## 2.2 代谢网络的构建

图1是经参考相关文献<sup>[2,6]</sup>,并根据研究需要所构建的 *Bacillus subtilis* 简化代谢网络。该代谢网络主要由糖酵解途径、己糖单磷酸途径、三羧酸循环、氧化磷酸化和代谢物积累等5个部分组成。

**2.2.1 酵解途径(EMP)部分:**糖酵解途径主要是将1分子葡萄糖分解为2分子丙酮酸,包括  $r_4$ 、 $r_6$ 、 $r_7$ 、 $r_8$ 、 $r_9$  和  $r_{10}$  共6个代谢反应。

**2.2.2 己糖单磷酸途径(HMP)部分:**己糖单磷酸途径主要是为细胞生长和产物合成提供前体和还原力,包括  $r_2$  和  $r_5$  共2个代谢反应。

**2.2.3 三羧酸循环(TCA)部分:**三羧酸循环主要作用是提供前体和可氧化磷酸化为ATP的NADH,包括  $r_{12}$ 、 $r_{14}$ 、 $r_{15}$ 、 $r_{16}$ 、 $r_{17}$ 、 $r_{18}$  和  $r_{19}$  共7个代谢反应。

**2.2.4 氧化磷酸化部分:**氧化磷酸化可将NADH和FADH氧化磷酸化为ATP,包括  $r_{21}$ 、 $r_{22}$  和  $r_{23}$  共3个代谢反应。

**2.2.5 底物或代谢物净积累部分:**包括  $r_1$ 、 $r_3$ 、 $r_{11}$ 、 $r_{13}$  和  $r_{20}$  共5个代谢反应。

附录1是该代谢网络包含的代谢反应式,附录2是从该代谢网络推导出的代谢方程组。

附录2中的23种代谢物可分为3个部分:菌体合成前体、胞外代谢物和胞内中间代谢物。菌体合成前体包括  $x_2$ 、 $x_3$ 、 $x_5$ 、 $x_6$ 、 $x_7$ 、 $x_8$ 、 $x_9$ 、 $x_{10}$ 、 $x_{12}$ 、 $x_{14}$ 、 $x_{16}$ 、 $x_{18}$ 、 $x_{20}$  和  $x_{21}$  共14种代谢物,每合成1g菌体时它们所需的量按表1计算。表1的数据取自文献[6]。胞外代谢物包括  $x_1$ 、 $x_5$ 、 $x_{10}$ 、 $x_{11}$ 、 $x_{13}$ 、 $x_{15}$ 、 $x_{18}$ 、 $x_{19}$  和  $x_{20}$ ,胞内中间代谢物包括  $x_{17}$  和  $x_{22}$ 。

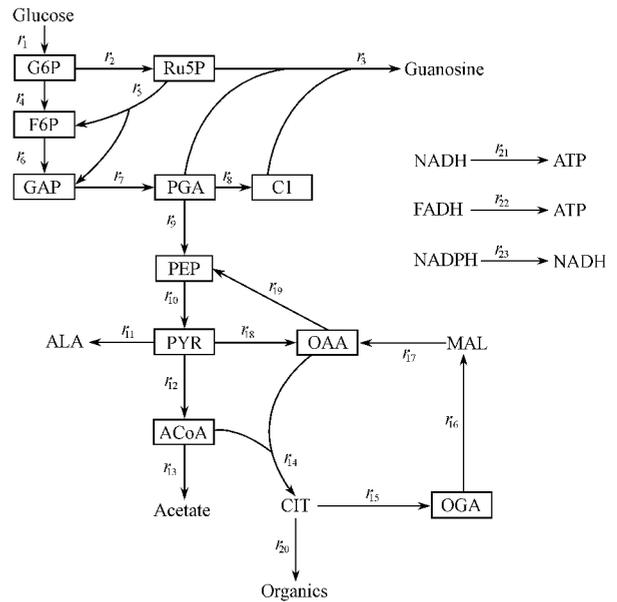


图1 *Bacillus subtilis* 简化代谢网络

Fig. 1 Simplified metabolic reaction networks of *Bacillus subtilis*

G6P. Glucose-6-phosphate; Ru5P. Ribulose-5-phosphate; F6P. Fructose-6-phosphate; GAP. Glyceraldehydes-3-phosphate; PGA. 3-phosphoglyceric acid; PEP. Phosphoenolpyruvate; PYR. Pyruvate; ACoA. Acetyl coenzyme A; OAA. Oxaloacetate; CIT. Citric acid; OGA. Oxoglutarate; MAL. Malate; ALA. Alanine

表1 菌体合成对前体和能量的需求量 ( $10^{-6}$  mol/g 干重)

Table 1 Amount of precursor required for biomass formation ( $10^{-6}$  mol/g dry weight)

Precursor	G6P	F6P	R5P	E4P	GAP	PGA	PEP	PYR
Amount	154	190	816	308	194	1395	711	2492
Precursor	ACoA	OAA	OGA	CI	CO2	ATP	NADH	NADPH
Amount	2132	1923	1071	156	-2025	38608	-3595	16333

## 2.3 代谢方程组的解

附录2中,有23个未知数,23个方程。但因  $r_{10}$ 、 $r_{18}$  和  $r_{19}$  形成循环,某一时刻  $r_{18}$  和  $r_{19}$  只能存在一个,故实际上只有22个未知数,方程组有最优解。但为了检验代谢方程组解的有效性,在解方程组时只用了22个方程,保留第19个方程以检验解的有效性。

在发酵过程中,通过在线检测通气流量、发酵液体积、排气氧和二氧化碳浓度,离线分析菌体、葡萄糖和产物浓度,用HPLC测定乙酸、柠檬酸和丙酮酸等有机酸浓度,并对丙氨酸等17种氨基酸浓度进行测定,得到了计算所需要的数据。利用MATLAB语言<sup>[7]</sup>编程解出了代谢方程组的解,表2是工艺优化前发酵24h后各个时间段内的代谢流分布的归一化

表示(以  $r_1$  为基准)。表中,倒数第二行是由尾气分析仪数据直接计算出的氧消耗速率,倒数第一行是倒数第二行数据与代谢方程组解出的氧化磷酸化所消耗的氧速率的比值。该比值在 1 左右,表明代谢方程组的解是可信的。

表 2 工艺优化前归一化表示的代谢流分布  
(单位 mol/100 mol glucose)

Table 2 Normalized metabolic fluxes before optimization  
(mol/100 mol glucose)

$t/h$	24.00	32.00	40.00	44.00	48.00	52.00
$r_1$	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
$r_2$	11.72	16.27	5.60	4.75	2.67	0.52
$r_3$	10.41	14.42	4.75	4.75	1.56	0.52
$r_4$	88.10	83.47	94.28	95.25	97.17	99.48
$r_5$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$r_6$	87.88	83.16	94.14	95.25	96.99	99.48
$r_7$	175.54	166.00	188.13	190.51	193.78	198.96
$r_8$	5.30	7.34	2.43	2.37	0.86	0.26
$r_9$	158.21	141.94	179.90	183.39	189.98	198.17
$r_{10}$	157.38	140.77	179.36	183.39	189.28	198.17
$r_{11}$	-0.21	0.57	-0.70	0.58	7.54	7.80
$r_{12}$	130.34	132.12	128.20	126.29	136.30	132.27
$r_{13}$	-2.36	2.53	-1.62	-7.79	9.70	10.02
$r_{14}$	130.29	126.19	128.24	134.07	124.55	122.25
$r_{15}$	109.54	127.76	80.63	81.97	90.10	69.66
$r_{16}$	108.47	126.24	79.94	81.97	89.19	69.66
$r_{17}$	108.61	126.44	80.03	81.97	89.31	69.66
$r_{18}$	23.77	2.72	49.59	52.10	37.02	52.59
$r_{19}$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$r_{20}$	21.31	0.00	49.27	52.71	35.22	54.13
$r_{21}$	643.22	692.75	557.74	576.95	585.93	541.77
$r_{22}$	108.47	126.24	79.94	81.97	89.19	69.66
$r_{23}$	87.89	97.25	67.51	79.60	75.34	69.40
$O_2$	383.63	456.73	263.32	260.39	307.80	233.95
Ratio-O	1.02	1.12	0.83	0.79	0.91	0.77

## 2.4 代谢流迁移

图 2 是 HMP ( $r_2$ ) 和 EMP ( $r_4$ ) 途径流量的变化。40h 之后, HMP 开始下降, 而 EMP 同步上升, 表明代谢从 HMP 途径向 EMP 途径迁移。

## 2.5 迁移碳源的去向

图 3 是  $r_{14}$  (ACoA 进入 TCA 循环的反应) 上流量的变化。在各个时间段内,  $r_{14}$  流量并没有显著的变化。那么, 从 HMP 途径向 EMP 途径迁移的碳源流到哪里了呢?

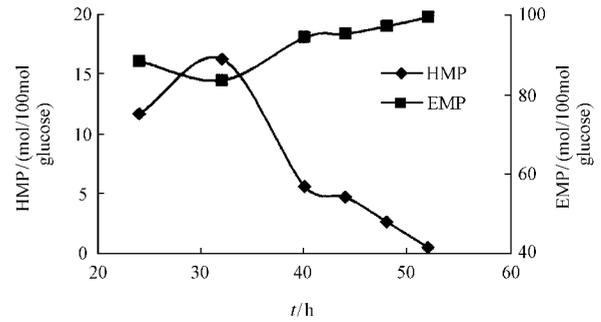


图 2 HMP 和 EMP 变化趋势

Fig. 2 Changes of HMP and EMP

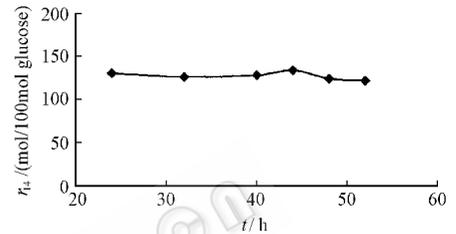


图 3  $r_{14}$  变化趋势

Fig. 3 Change of  $r_{14}$

图 4 是  $r_{11}$  (生成丙氨酸) 和  $r_{20}$  (生成有机酸) 上流量的变化。40h 后,  $r_{11}$  和  $r_{20}$  都有所增大, 特别是  $r_{11}$  更是大幅增加, 说明了从 HMP 途径向 EMP 途径迁移的碳源主要生成了氨基酸和有机酸。

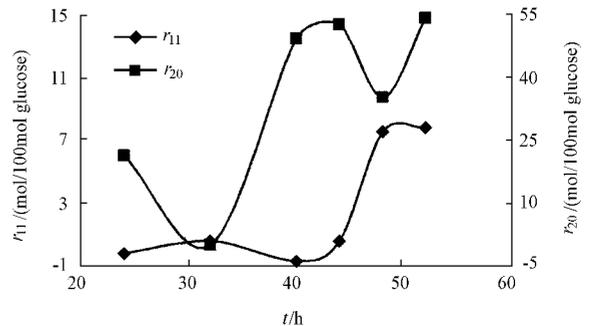


图 4  $r_{11}$  和  $r_{20}$  变化趋势

Fig. 4 Changes of  $r_{11}$  and  $r_{20}$

## 2.6 代谢流迁移的原因

如图 5 所示是优化前后  $NH_4^+$  浓度与产苷的关系。在 40h 左右, 工艺优化前的  $NH_4^+$  浓度有着明显的升高, 而工艺优化后的  $NH_4^+$  浓度却基本维持不变。氨水在鸟苷发酵过程中主要有两个作用, 一是维持发酵液的 pH 在某工艺控制点, 使 pH 可随工艺调控需要而变化, 二是用作氮源, 以  $NH_4^+$  ( $NH_3$ ) 形式参与细胞的代谢过程。微生物利用  $NH_4^+$  ( $NH_3$ ) 是在同一氧化水平进行的过程, 主要被同化生成谷

氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。这些同化作用的产物成为其它含氮前体的氨基或酰胺基供体,可转化成其它的氨基酸。微生物同化  $\text{NH}_4^+$  是消耗 ATP 的过程,因此势必增加对能量的需求,而能源的产生又依赖于碳源的利用,因此该过程中代谢流的迁移,与发酵液中  $\text{NH}_4^+$  的积累有关。至于  $\text{NH}_4^+$  的积累为何及如何引起代谢流迁移的详细机制,有待于分子水平和细胞水平等方面的深入研究。

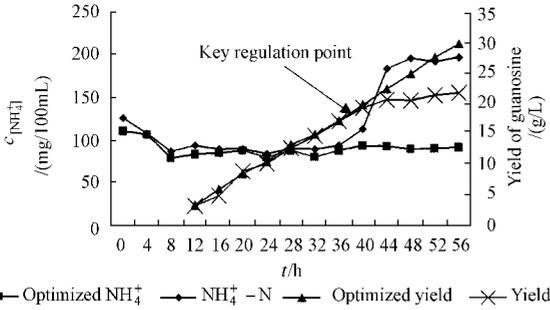


图5  $\text{NH}_4^+$  浓度与产苷关系

Fig.5 Relationships between  $\text{NH}_4^+$  concentration and yield of guanosine

## 2.7 代谢流迁移的抑制

通过代谢流分析,发现了发酵过程的关键调控点,即在发酵中后期的40h之前,在工艺上大幅调整控制参数,优化发酵过程,抑制发酵液中  $\text{NH}_4^+$  的积累,成功地抑制了代谢流的迁移。表3是工艺优化后归一化表示的代谢流分布的详细数据,表中倒数第一行的值在1左右,同样表明代谢方程组的解是可信的。

图6和图7分别是工艺优化前后 HMP 和 EMP 途径上代谢流分布的对比。在工艺优化前,40h之后,HMP 途径流量开始下降,而 EMP 途径流量同步上升,即代谢从 HMP 途径向 EMP 途径迁移;但工艺优化后,此时 HMP 途径流量不但不下降,而是有所升高,同时 EMP 途径流量同步下降,即代谢没有发生从 HMP 途径向 EMP 途径的迁移,HMP 途径得到了强化。HMP 途径为鸟苷合成提供前体,它的强化有利于产物的生成,因而,工艺优化后,最终产苷浓度达 30g/L,比文献报道<sup>[8]</sup>的国内最高产率 17.7g/L 提高了近 70%。

图8是工艺优化前后生成 ALA 途径上代谢流分布的对比。在工艺优化前,40h之后,ALA 途径流量大幅升高,但工艺优化后,ALA 途径流量维持在很低水平,从一个侧面说明了发酵液中  $\text{NH}_4^+$  的积累得到了抑制。

表3 工艺优化后归一化表示的代谢流分布  
(单位: mol/100 mol glucose)

Table 3 Normalized metabolic fluxes after optimization  
(mol/100 mol glucose)

t/h	24	34	40	48	52
$r_1$	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
$r_2$	13.06	12.26	11.32	16.51	11.28
$r_3$	12.14	12.02	11.15	15.42	10.77
$r_4$	86.82	87.71	88.66	83.34	88.65
$r_5$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$r_6$	86.66	87.66	88.63	83.16	88.57
$r_7$	173.17	175.29	177.24	166.13	177.05
$r_8$	6.14	6.03	5.59	7.78	5.42
$r_9$	153.75	156.94	160.30	141.57	160.23
$r_{10}$	153.17	156.79	160.19	140.88	159.91
$r_{11}$	0.22	0.35	-0.12	-0.40	0.09
$r_{12}$	140.97	135.65	139.90	103.62	143.11
$r_{13}$	-3.59	-6.46	1.50	-30.95	-7.67
$r_{14}$	142.87	141.67	138.10	132.56	149.85
$r_{15}$	135.73	122.07	118.73	99.63	134.67
$r_{16}$	134.98	121.87	118.60	98.74	134.26
$r_{17}$	135.08	121.89	118.61	98.85	134.31
$r_{18}$	9.27	20.16	19.75	35.46	16.35
$r_{19}$	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
$r_{20}$	9.10	14.68	22.47	34.92	15.74
$r_{21}$	741.95	709.00	703.95	596.03	747.78
$r_{22}$	134.98	121.87	118.60	98.74	134.26
$r_{23}$	118.13	113.00	111.09	78.16	122.93
$O_2$	458.24	400.63	399.84	308.62	447.11
Ratio-O	1.05	0.96	0.97	0.89	1.01

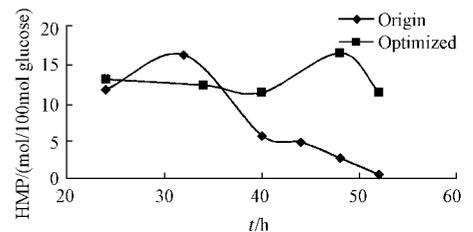


图6 HMP 途径的代谢流分布

Fig.6 Metabolic fluxes of HMP

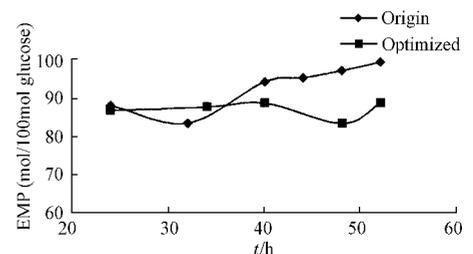


图7 EMP 途径的代谢流分布

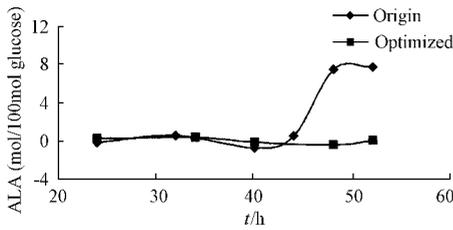


图 8 ALA 途径的代谢流分布

Fig.8 Metabolic fluxes of ALA pathway

### 3 结 论

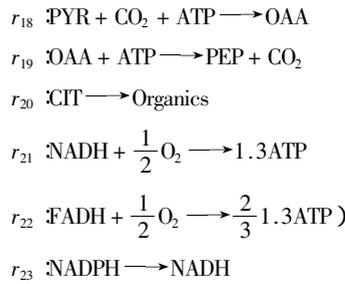
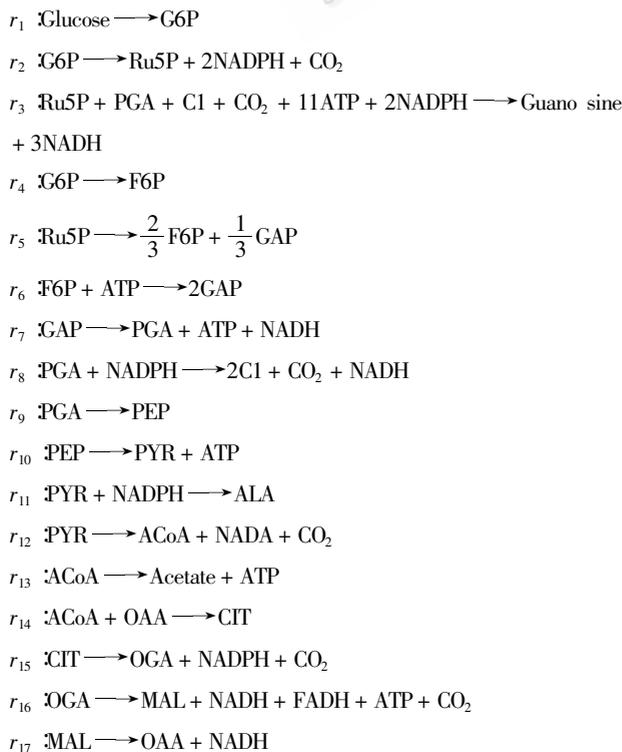
应用代谢流分析技术,研究了鸟苷发酵过程生产期中代谢流分布随时间变化的特征。结果表明:

- 在 40h 前后发生了从 HMP 到 EMP 途径的代谢流迁移。
- 在 40h 前后迁移的碳源主要生成了氨基酸和有机酸。

因此,要克服鸟苷发酵过程中的“40h 现象”就必须在 40h 之前采取措施,阻止代谢流从 HMP 到 EMP 的迁移,让更多的碳源流向产苷途径。基于这些依据,我们成功地抑制了代谢流在 40h 左右的迁移,维持了稳定的产苷速率,获得了高浓度的产物。

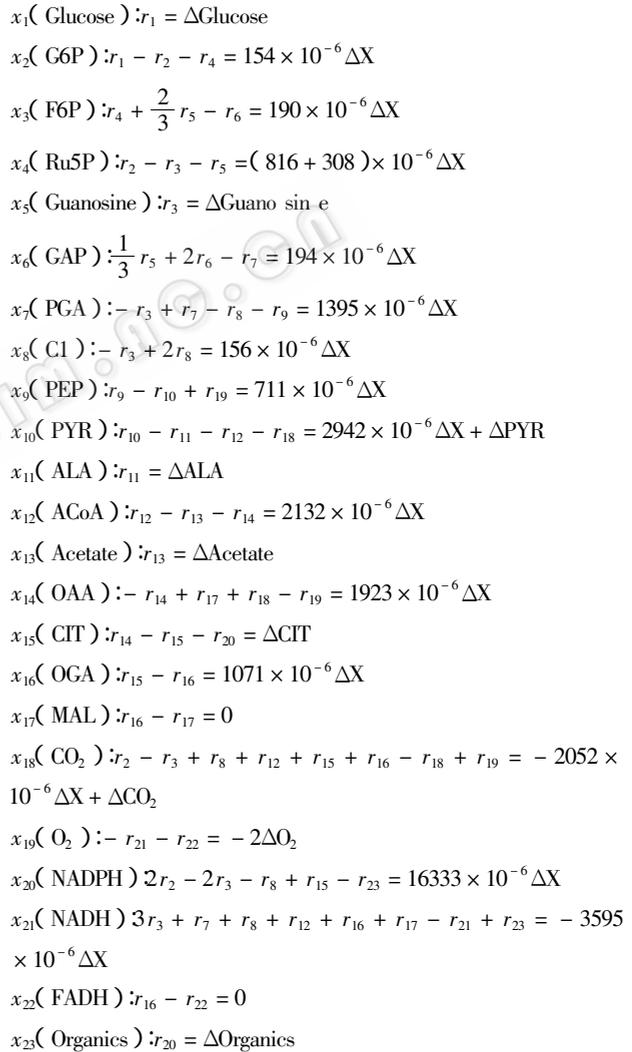
#### 附录 1 *Bacillus subtilis* 代谢反应

##### Appendix 1 Metabolic reactions in *Bacillus subtilis*



#### 附录 2 *Bacillus subtilis* 代谢方程组

##### Appendix 2 Metabolic equations in *Bacillus subtilis*



#### REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Edwards J S , Palsson B O . How will bioinformatics influence metabolic engineering . *Biotechnol Bioeng* , 1998 , **58** ( 2 - 3 ) : 162 - 169
- [ 2 ] Akshay G , Jerome F , Jinwook J , Mohammed M A . Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis* . *Biotechnol Bioeng* , 1993 , **42** ( 4 ) : 686 - 696
- [ 3 ] Nielsen J . Metabolic engineering : Technique for analysis of targets

- 125 - 132
- [ 4 ] Park S M , Sinskey A J , Stephanopoulos G . . Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnol Bioeng* , 1997 , **55** ( 6 ) : 864 - 879
- [ 5 ] CAI X P ( 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 , **42** ( 2 ) : 232 - 235
- [ 6 ] Uwe S , Douglas C C , James E B. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides , riboflavin , and folic acid. *Biotechnol Bioeng* , 1998 , **59** ( 2 ) : 227 - 238
- [ 7 ] WANG B W ( 王炳武 ) . Applied Textbook of MATLAB 5.3 ( MATLAB 5.3 实用教材 ) . Beijing : Chinese Water Conservancy and Water Power Press 2000
- [ 8 ] TANG S R ( 汤生荣 ) , HUANG W H ( 黄卫红 ) , HOU Z R ( 侯左荣 ) . Process of Guanosine Production by Fermentation. *Chinese Industrial Microbiology* ( 工业微生物 ) , 1998 , **28** ( 4 ) : 11 - 16

## Quantitation & Optimization of Guanosine Fermentation Process : Prevention of $\text{NH}_4^+$ Accumulation Increases Guanosine Production by 70%

HUANG Ming-Zhi\* CAI Xian-Peng CHEN Shuang-Xi CHU Ju ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang  
( State Key Laboratory of Bioreactor Engineering , National Engineering Research Center for Biotechnology , and Bioengineering College , East China University of Science and Technology , Shanghai 200237 , China )

**Abstract** Metabolic engineering has become a powerful tool for optimization of industrial fermentation processes. Metabolic engineering usually undergoes three steps : construction of a recombinant strain with improved properties , genetic and biochemical analysis of the strain , and identification of target for further improvement. Metabolic fluxes analysis is an important part of the biochemical analysis. Based on the law of mass conservation and assuming pseudo-steady-state for the intermediates in the metabolic pathways , we have quantitatively analyzed the time course of the flux distribution in *Bacillus subtilis* and used the data to reveal the nature of the so-called “ 40 hour ” phenomenon in fermentation of guanosine , a key raw material for the synthesis of additives for human consumption and animal feeds. The phenomenon refers to the observation that guanosine production , which proceeds at high rate from 12 hour on , declines around 40 hour while consumption of glucose keeps increasing , leading to the lower yield of the nucleoside. Equations based upon the metabolic network of *Bacillus subtilis* consisted of EMP pathway , HMP pathway , TCA cycle , oxidative phosphorylation pathway and others reactions of the intermediates , was constructed. The equations were solved by using the quantitative data obtained in this study. The air flow and volume , concentration of oxygen and carbon dioxide in the exit-gas were monitored online ; the concentration of biomass , glucose and guanosine was analyzed manually ; and the concentration of acetate , citric acid , pyruvate , and 17 amino acids were HPLC quantified. The solutions of the equation were proved to be valid , as the experimental data on oxygen consumption agrees with that of predicted form the equation. The results indicated that at 40h of the fermentation process the flux of HMP pathway , which provides the precursor of the nucleoside , decreased while that of EMP pathway and the pathways that generate amino acids and organic acids increased. The shift correlated with the accumulation of  $\text{NH}_4^+$  in the broth. The assimilation of  $\text{NH}_4^+$  is an energy consuming process and could shift the metabolism to the energy generating EMP pathway. Accordingly , measures were taken to prevent the accumulation of  $\text{NH}_4^+$  . The interference indeed stopped the metabolism shift and boosted the guanosine production at 30 g/L , 70% higher than the level reported in literature.

**Key words** metabolic flux shift , quantitative analysis , Guanosine , *Bacillus subtilis*

Received : 09-16-2002

This work was supported by grants from the Dawn Plan ( No. 01SG28 ) and the Key Subjects of Shanghai Municipal Government.

\* Corresponding author. Tel : 86-21-64253522 ; E-mail : huangmingzhi@263.net.cn

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