

L-缬氨酸生物合成中的代谢流量分析

张克旭 赵丽丽 张蓓 陈宁

(天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

摘要: 应用流量平衡模型,通过物料衡算和 MATLAB 线性规划方法得到了发酵中后期 L-缬氨酸合成过程的代谢流量分布。代谢流分析结果表明,在分批培养生成 L-缬氨酸的过程中,有 62.8% 的葡萄糖进入糖酵解途径生成 L-缬氨酸,38.2% 进入 HMP 途径,仅 9.2% 的碳架进入 TCA 循环。实验条件下的代谢流(58)与理想代谢流(92.31)相比,仍应从遗传改造和发酵控制方面降低 TCA 循环的代谢流,减少副产氨基酸的生成来进一步提高缬氨酸的产率。

关键词: 缬氨酸, 代谢流分布, 线性规划

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 05-0049-05

ANALYSIS OF L-VALINE BIOSYNTHESIS MECHANISM BY METABOLIC FLUX BALANCE MODEL

ZHANG Ke-Xu ZHAO Li-Li ZHANG Bei CHEN Ning

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222)

Abstract: Using metabolic flux balance model, the metabolic flux balance of L-valine synthesis was established in this paper by material balances and linear programming method. The analysis results indicate that 62.8% metabolic flux entered EMP pathway and 38.2% metabolic flux entered the HMP pathway. And only 9.2% carbon entered the TCA cycle. But comparing to the optimal flux distributions of 92.31, the production of L-valine should be improved from the genetic manipulation and fermentation control through reducing byproduct of amino acid and decreasing the metabolic flux.

Key words: L-valine, The metabolic flux distribution, Metabolic flux analysis, Linear program

L-缬氨酸作为人体必需氨基酸之一,主要用以配制复合氨基酸输液和其他治疗药物,在人类生命代谢中占有十分重要的地位^[1]。为了提高 L-缬氨酸的转化率,必须进行生物合成的研究和代谢流量控制分析,了解特定培养条件下细胞合成的代谢与分解,利用代谢工程的手段对代谢网络进行有目的地修饰^[2],使得基本代谢途径适合于特定代谢物的生产。本研究根据物料平衡和已知代谢途径,利用 MATLAB 软件线性规划得到 L-缬氨酸分批发酵中后期的理想代谢流分布,以期对 L-缬氨酸生产菌种的选育及发酵控制提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 菌株

黄色短杆菌 *Brevibacterium flavum* TV10 (Ile⁻ + Leu⁻ + SG⁺ + α -AB⁺) 天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌株。

1.2 测定方法

菌体浓度: 吸取样品菌液 0.5mL 加入 9.5mL 水, 摇匀后测定 A_{620} 值。

还原糖: 采用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定。

氨基酸: 采用比色定量法及高效液相色谱法测定。

2 代谢流平衡模型的建立

2.1 物料平衡关系的建立

根据物料平衡计算代谢物的积累速率^[3]，有如下方程：

$$\frac{dx_i}{dt} = \sum_j S_{ij} V_j \tag{1}$$

S_{ij} ：第 i 个化合物在第 j 个反应中的计量系数， S_{ij} 为正、负或零，分别表示第 j 个反应产生、消耗或不涉及第 i 个化合物。 V_j ：第 j 个反应代谢流量矢量。 $\frac{dx_i}{dt}$ ：中间代谢物的积累速率 (mmol/L·h)。

假设细胞内的中间代谢物均处于拟稳态，即其浓度变化速率为 0，可得方程：

$$SV = 0 \tag{2}$$

S ($m \times n$) 是代谢网络的化学计量系数矩阵， V 是代谢流量矢量。

2.2 代谢流平衡模型的建立

黄色短杆菌细胞内主要有糖酵解 (EMP) 和磷酸戊糖 (HMP) 途径，然后进入三羧酸循环 (TCA)。在 TCA 的回补反应中也存在包括乙醛酸循环的各种酶，但研究资料表明^[4]，在以葡萄糖或葡萄糖为底物的培养基中培养时，乙醛酸支路并未出现。本试验中所采用的 L-缬氨酸生产菌是亮氨酸与异亮氨酸双重缺陷突变株，故代谢途径中无亮氨酸与异亮氨酸合成支路。为了降低代谢网络的复杂性和减少代谢流量平衡方程，

本文基于以下原则建立代谢网络：(1) 由于菌体生长代谢网络复杂，而菌体处于非生长时期，因此本文不考虑菌体细胞的生长代谢；(2) NADPH 供需平衡，即消耗的 NADPH 与产生的 NADPH 数目相等；(3) 细胞代谢中不存在乙醛酸循环；(4) 只考虑主要代谢物质的流量平衡方程；(5) 在细胞生长不旺盛阶段，由于大量无效循环的存在，ATP 的消耗量和细胞维持能总量并不相等，因此本文不考虑 ATP 总量的平衡。

根据文献资料，综合上述分析，L-缬氨酸生物合成的代谢网络见图 1，反应速率具有如下计量关系：

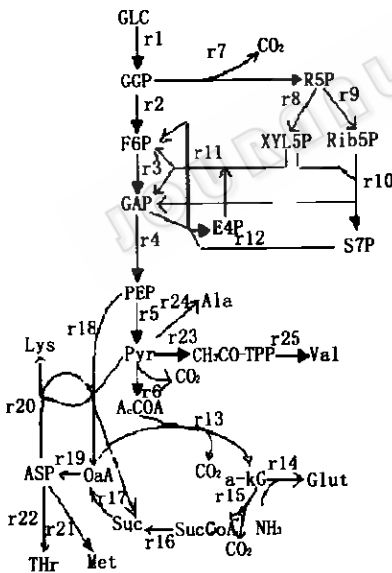


图 1 L-缬氨酸生物合成的代谢网络

$$\begin{aligned}
 &G6P: r1-r2-r7=0, \text{ Rib5P: } r7-r8-r9=0, \text{ Xyl5P: } r8- \\
 &r10-r11=0, \text{ Rib5P: } r9-r10=0, \text{ E4P: } r11-r12=0, \text{ Sed7P: } \\
 &r10-r12=0, \text{ Fru6P: } r2-r3+r11+r12=0, \text{ GAP: } 2r3-r4+ \\
 &r10-r12=0, \text{ PEP: } r4-r5-r18=0, \text{ Pyr: } r5-r6-r20-r24-r25-r26
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &=0, \text{ AcCoA: } r6-r13-r28=0, \text{ } \alpha\text{-kC: } r13-r14=0, \text{ Glut: } r15-r19-r20-r24-r25=0, \text{ SucCoA: } r14-r16-r20=0, \text{ Suc: } r16-r17+ \\
 &r20=0, \text{ OAA: } r13-r17-r18+r19=0, \text{ ASA: } r19-r20-r21-r22=0, \text{ Ac-TPP: } r23-r25=0, \text{ NADP: } 2r7+r13-r15-r19-r20-r21-r22- \\
 &r25=0.
 \end{aligned}$$

方程数为 19，未知数为 25，方程自由度为 6，即需测定 6 个速率方可确定代谢网络中的流量分配，在 L-缬氨酸发酵中后期离线测得葡萄糖、缬氨酸与其它几种副产氨基

酸的浓度, 对其进行数值微分即可求得糖消耗速率 r_1 和各种氨基酸的积累速率 r_{20} 、 r_{21} 、 r_{22} 、 r_{24} , 将此作为已知参量, 代入上述代谢速率平衡方程, 利用 MATLAB 软件求得代谢流分布。

3 结果与讨论

3.1 代谢流计算

以葡萄糖的摩尔消耗速率为 100 (mmol/L·h), 计算 L-缬氨酸发酵中后期代谢流分布, 同时利用 MATLAB 软件^[5]线性规划得到理想代谢流分布, 结果见表 1。

表 1 L-缬氨酸合成的代谢流分布

反应速率	计算代谢流	理想代谢流	反应速率	计算代谢流	理想代谢流
r_1	100.00	100.00	r_{14}	5.60	0.00
r_2	62.80	53.845	r_{15}	22.00	0.00
r_3	87.60	84.61	r_{16}	2.60	0.00
r_4	187.60	184.61	r_{17}	5.60	0.00
r_5	154.60	184.61	r_{18}	33.00	0.00
r_6	27.60	0.00	r_{19}	11.00	0.00
r_7	37.20	46.15	r_{20}	3.00	0.00
r_8	24.80	30.77	r_{21}	6.00	0.00
r_9	12.40	15.38	r_{22}	2.00	0.00
r_{10}	12.40	15.38	r_{23}	58.00	92.30
r_{11}	12.40	15.38	r_{24}	8.00	0.00
r_{12}	12.40	15.38	r_{25}	58.00	92.31
r_{13}	27.60	0.00			

注: 表中单位均为 mmol/L·h

3.2 代谢流量分析

尽管细胞能够对不同环境的刺激作出反应, 使细胞的代谢流量发生变化, 但这种改变仅仅是代谢反馈调节的结果, 目的是为了细胞的生存而合成细胞所需的物质, 代谢网络中的基本代谢物和能量还是按一定的比例合成的^[6]。因此, 它本身不可能适合于任一特定代谢物的超量生产。要使某种代谢物超量生产, 就要求代谢中的流量分配作出较大的改变, 代谢工程的目的是通过改变代谢流的方向以提高产率。为此, 必须仔细分析代谢网络中的一些节点。本文即对缬氨酸生物合成的载流途径的主要节点 GLC6P、PEP、PYR 进行了代谢流分析。分析结果见图 2, 图 3, 图 4。

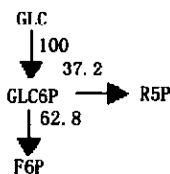


图 2 L-缬氨酸发酵中后期
GLC6P 节点代谢流量分配

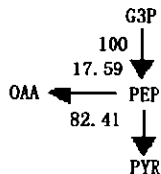


图 3 L-缬氨酸发酵中后期
PEP 节点代谢流量分配

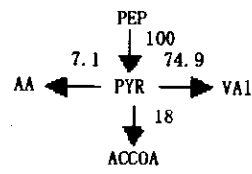


图 4 L-缬氨酸发酵中后期
PYR 节点代谢流量分析

3.2.1 GLC6P 节点代谢流分析: 葡萄糖有 3 条主要代谢途径: EMP、HMP 和 TCA 途径。由图 2 看出葡萄糖进入 EMP 途径的代谢流为 62.8, HMP 途径的代谢流为 37.2, 但是由于没有细胞生长, HMP 产生的磷酸戊糖全部转化成 EMP 途径的中间产物, 因而 HMP 途径的主要作用是氨基酸合成提供还原力 NADPH。

3.2.2 PEP 节点代谢流分析: PEP 通过 CO_2 固定反应生成草酰乙酸, 而草酰乙酸是合

成其它几种副产氨基酸的前体。在图3中有17.59%的PEP通过CO₂固定反应形成OAA而参与了其它几种氨基酸的合成(以形成PEP的流量为100%计算)。因此,有必要减少这一TCA循环的回补反应,以使更多的PEP参与缬氨酸的合成。

3.2.3 PYR节点代谢流分析: 丙酮酸是一关键节点,几种氨基酸的合成以及TCA循环均需丙酮酸直接或间接参与,在图4中有79%的PYR参与了缬氨酸的生物合成(以形成PYR的流量为100%计算)。因此了解丙酮酸节点,需要进一步对它们的刚性程度进行评估,即通过比较在稳定状态下的流量分配和为提高转化率而进行的干扰下同一网络中的流量分配进行评估,进而有目的的对网络节点处进行基因修饰。

3.2.4 估算代谢流与理想代谢流比较: 本试验所采用的菌株是亮氨酸与异亮氨酸双重缺陷型菌株,使得由丙酮酸到异亮氨酸以及 α -酮基异戊酸到亮氨酸的合成途径被切断,使缬氨酸得以积累。在发酵中后期,L-缬氨酸的代谢流量为58,质量转化率为35.99%,但是与理想的代谢流57.28%($92.31 \times 111/100 \times 180$)相比,在几乎没有菌体生长的情况下,仍然没有达到极大值。造成这一现象的原因是副产物的形成和TCA循环的损失。

代谢网络是一个十分复杂的多酶同步催化反应体系,仅仅改变其中的一步限速反应,对产物合成的影响往往不会很大,因此要优化某一代谢网络,必须同时调节对产物有影响的主要节点处,使代谢途径流量重新获得分配,以利于目的产物的积累^[7]。必须进一步判断几个主要节点GLC6P、PEP、PYR的节点类型,尤其是刚性节点的判断,然后利用基因工程技术和化学调节因素减轻或消除节点的刚性,使代谢流量的分配更有利于缬氨酸的合成。

3.3 极端代谢流分配

根据所建立的代谢流平衡模型,运用MATLAB软件进行线性规划,采用Linprog函数取优可得到各种极端情况下的代谢流分布^[8],表2即为假定各种氨基酸产量最大时的代谢流分布情况。

表2 各种氨基酸产量最大时代谢流的分配

极端情况 代谢流分配	Val (max)	Ala (max)	Met (max)	Lys (max)	Thr (max)
r7 (HMP)	46.15	85.71	100	85.71	100
r13 (TCA)	0	0	75	57.1	75
r20 (Lys)	0	0	0	57.14	0
r22 (Met)	0	0	91.67	0	0
r23 (Thr)	0	0	0	0	91.67
r24 (Ala)	0	171.43	0	0	0
r25 (Val)	92.31	0	0	0	0

从表2可知,几种氨基酸合成的理想途径均需经过HMP途径,说明这几种氨基酸的合成均需提供还原力NADPH, Met和Thr在HMP流量达最大值100时产量最高, Lys和Ala相对较低,缬氨酸产量最低,这说明

缬氨酸对HMP的依赖性小,这与这几种氨基酸的合成过程中所需还原力的多少是一致的。由TCA循环的代谢流分配情况可以看出,Val和Ala产量最大时不经过TCA循环,这为发酵控制提供了有益的启示,因为TCA的流量与发酵过程中的溶氧控制密切相关,适当控制溶氧可以增加Val、Ala的产量,同时也可抑制Met、Lys与Thr等副产物的形成。因此,在缬氨酸的发酵控制中,摸索出最适的溶氧控制至关重要。

4 结论

(1) 应用代谢流量平衡模型和缬氨酸合成代谢途径, 建立了缬氨酸合成代谢途径流量模型, 计算出了发酵中后期的代谢流分布并通过 MATLAB 线性规划得到了缬氨酸理想代谢流分布以及各种极端情况的代谢流分布。

(2) 葡萄糖经 EMP、HMP 与 TCA 循环的代谢流分配不同, 降低 TCA 循环的代谢流量, 增大 EMP 途径的流量可以使缬氨酸产量增加。

(3) 副产氨基酸占有一定的比例, 因此如能从遗传角度和发酵控制方面使副产氨基酸的生成减少, 就能达到代谢流迁移的目的, 从而增大合成缬氨酸的代谢流。

(4) 发酵中后期降低溶氧有利于 Val 的生成, 同时可抑制副产氨基酸的产生, 在缬氨酸的发酵控制中, 溶氧是关键的控制因素。

参考文献

- [1] 张伟国, 钱和. 氨基酸和生物资源, 2001, 23 (3): 28~31.
- [2] 史晋辉. 生命的化学, 2001, 21 (1): 71~73.
- [3] Christophe H. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 71 (4): 286~306.
- [4] Joseph J. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 41 (6): 633~646.
- [5] 龚剑, 朱亮. MATLAB 5.x 入门与提高. 北京: 清华大学出版社, 2000.
- [6] 张星元, 潘中明. 生物工程进展, 1999, 19 (6): 38~41.
- [7] 凌利, 陈光旨, 周河治. 广西科学, 1999, 6 (22): 115~119.
- [8] 苏金明, 阮沈男. MATLAB 实用指南. 北京: 电子工业出版社, 2002.