

# 谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 合成 L-丝氨酸的代谢通量分析

张晓梅<sup>1</sup>, 窦文芳<sup>1</sup>, 许泓瑜<sup>1</sup>, 许正宏<sup>1,2</sup>

1 江南大学医药学院 制药工程研究室, 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

**摘要:** 以一株由自然界筛选获得的能够利用糖质原料直接产 L-丝氨酸的谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 为研究对象, 考察了一碳单元循环中的辅因子—叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对菌株生长、蔗糖消耗及 L-丝氨酸生成的影响, 同时对处于对数生长期的菌株进行了代谢流量分析。结果发现, 添加扰动因子叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 对磷酸戊糖途径 (HMP) 碳流影响较大, 碳源主要用于细胞生长及合成能量, 而流向目的产物 L-丝氨酸的碳流减少。同时在添加维生素 B<sub>12</sub> 时, 增大了 G3P 节点的 L-丝氨酸合成途径的分流比, 但造成三羧酸循环 (TCA) 的流量不足, 需要大量回补, 从而限制了产物合成速率的进一步提高。

**关键词:** 谷氨酸棒杆菌, L-丝氨酸, 一碳单元, 代谢通量分析

## Metabolic flux analysis of L-serine synthesis by *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062

Xiaomei Zhang<sup>1</sup>, Wenfang Dou<sup>1</sup>, Hongyu Xu<sup>1</sup>, and Zhenghong Xu<sup>1,2</sup>

1 Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062 was an L-serine producing strain stored at our lab and could produce L-serine directly from sugar. We studied the effects of cofactors in one carbon unit metabolism-folate and VB<sub>12</sub> on the cell growth, sucrose consumption and L-serine production by SYPS-062. In the same time, the metabolic flux distribution was determined in different conditions. The supplementation of folate or VB<sub>12</sub> enhanced the cell growth, energy synthesis, and finally increased the flux of pentose phosphate pathway (HMP), whereas the carbon flux to L-serine was decreased. The addition of VB<sub>12</sub> not only increased the ratio of L-serine synthesis pathway on G3P joint, but also caused the insufficiency of tricarboxylic acid cycle (TCA) flux, which needed more anaplerotic reaction flux to replenish TCA cycle, that was an important limiting factor for the further increasing of the L-serine productivity.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum*, L-serine, one carbon units, metabolic flux analysis

**Received:** May 26, 2010; **Accepted:** August 26, 2010

**Supported by:** State Key Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707804), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020104), Program for New Century Excellent Talents in University of China (No. NCET-07-0380).

**Corresponding author:** Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@163.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707804), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA020104), 教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-07-0380) 资助。

L-丝氨酸是生物体内一种重要的中间代谢产物,广泛应用于医药、食品、化妆品领域<sup>[1]</sup>。L-丝氨酸的生产方法主要有蛋白水解法、化学合成法、酶法和发酵法<sup>[2]</sup>。微生物和酶法均以甘氨酸及甘油酸盐为前体,而直接利用糖质原料发酵生产 L-丝氨酸的报道较为少见。Petra 等最近分析研究了谷氨酸棒杆菌中 L-丝氨酸代谢途径中的一些关键酶,首次构建了产 L-丝氨酸的基因工程菌,产量为 86 mmol/L<sup>[3-5]</sup>;随后为解决遗传信息易丢失的问题,又构建了叶酸缺陷型的基因工程菌 *C. glutamicum*  $\Delta pabABC\Delta sdaA$  (*pserACB*), L-丝氨酸产量可达 346 mmol/L<sup>[6]</sup>。魏东等<sup>[7]</sup>对一株重组黄色短杆菌进行诱变改良,筛选获得色氨酸营养缺陷型的高产突变株,该菌株能以糖质原料作为唯一碳源合成 L-丝氨酸,但尚未见进一步的研究报道。作者所在课题组从自然界中筛选得到一株能直接利用糖质原料发酵生产 L-丝氨酸的谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* SYPS-062,并考察分析了 6 种维生素对 L-丝氨酸积累的影响<sup>[8]</sup>,而野生型谷氨酸棒杆菌直接利用糖质原料合成 L-丝氨酸尚未见文献报道。

近年来利用代谢通量分析的手段使目的氨基酸大量积累的例子在国内外已有许多报道,张克旭等<sup>[9]</sup>建立了谷氨酸棒杆菌合成 L-色氨酸(L-Try)的代谢流量平衡模型,线性规划得到 L-色氨酸理想代谢流分布。Tomokazu 等<sup>[10]</sup>对 2 株能够合成谷氨酸的谷氨酸棒杆菌的代谢流作了比较,发现通过降低  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶活性来提高谷氨酸产量效果明显。Hua 等<sup>[11]</sup>分析了不同溶氧水平对谷氨酸棒杆菌积累 L-赖氨酸的影响。但到目前尚未见 L-丝氨酸代谢通量方面的研究,作者课题组前期的研究发现一碳循环中的辅因子叶酸和维生素 B<sub>12</sub>对 L-丝氨酸生成的影响非常显著,同时对生物量的积累有较大的促进作用,因此本研究选择叶酸和维生素 B<sub>12</sub>作为扰动因子,在不同条件下对 *C. glutamicum* SYPS-062 的 L-丝氨酸代谢网络进行通量分析,定量研究该菌株细胞内各代谢途径之间的关系,具体分析了限制 L-丝氨酸进一步积累的因素,为下一步的菌种改良和发酵工艺优化控制等奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*C. glutamicum* SYPS-062 为本研究室分离保藏,能利用糖质原料直接合成 L-丝氨酸。

### 1.2 培养基

保藏培养基 (g/L): 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 3, 琼脂 20。

种子培养基 (g/L): 玉米浆 20, 豆饼水解液 20, 葡萄糖 30, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, 尿素 1.5, MgSO<sub>4</sub> 0.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20, pH 7.0。

发酵培养基 (g/L): 蔗糖 60, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub> 0.5, MnSO<sub>4</sub> 0.02, FeSO<sub>4</sub> 0.02, CaCO<sub>3</sub> 20, pH7.0。VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、VB<sub>6</sub>、VB<sub>12</sub>、生物素和叶酸根据实验需要添加。

### 1.3 培养方法

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基 (30 mL/250 mL 锥形瓶), 在 30℃ 转速 110 r/min (往复式摇床) 下培养 24 h 后, 以 5% (V/V) 接种量接入发酵培养基。摇瓶发酵装液量为 20 mL/250 mL 锥形瓶, 在 30℃ 转速 110 r/min (往复式摇床) 下发酵 96 h。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 生物量的测定

发酵液用 0.25 mol/L 的盐酸稀释至适当倍数, 测定 562 nm 处的光密度, 按照 1 OD=0.27 g/L DCW, 换算为菌体干重。

#### 1.4.2 L-丝氨酸和蔗糖浓度的测定

L-丝氨酸浓度采用安捷伦 1100 液相色谱仪测定。色谱柱: Hypersil ODS-C18 4 mm×125 mm; 柱温: 40℃; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测器: 荧光检测器; 激发波长: 340 nm; 发射波长: 450 nm; 流动相: 20 mmol/L 醋酸钠: 乙醇: 乙腈=1:2:2 (V/V)。蔗糖浓度采用间苯二酚法测定<sup>[12]</sup>。

#### 1.4.3 有机酸含量测定

HPLC 分析法 (HP1100), 色谱条件: ZORBAX SB C18, 流动相 0.1 mol/L 磷酸-磷酸二氢钾缓冲液, 进样量 5  $\mu$ L, 紫外检测波长为 210 nm。

接种后和发酵结束后分别测定每个摇瓶的重

量。分别将测得的浓度换算为恢复成原重后的浓度(文中出现的均为换算后的浓度)。

### 1.5 *C. glutamicum* 的 L-丝氨酸代谢网络的构建

综合文献分析<sup>[13]</sup>, 本研究基于以下原则或假设建立代谢网络:

1) 早期的许多研究都报道 *C. glutamicum* 及其相关菌株胞内含有完整的 EMP 和 TCA 循环及磷酸戊糖途径 (PP 途径)<sup>[14]</sup>。Vallino 等的研究表明, TCA 循环是谷氨酸菌属发酵过程中的主要氧化途径<sup>[15]</sup>; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶催化的反应是 TCA 循环的主要回补反应。基于此, 作者在构建 *C. glutamicum* SYPS-062 的代谢网络时未考虑乙醛酸途径; 以葡萄糖为底物的谷氨酸细菌胞内未发现 ED 途径<sup>[16]</sup>, 因此本代谢网络未考虑 ED 途径。

2) 由于利用菌株 SYPS-062 生产 L-丝氨酸属于偶联型发酵过程, 因此选择在 L-丝氨酸快速合成的阶段作分析, 在该阶段细胞同样增殖迅速, 因此生物量的积累是不可忽略的; 细胞组成采用 Vallino and Stephanopoulos 测得的数据: C 47.6%; H 6.46%; O 31.0%; N 11.8%; 灰分 3.02%。

3) NADPH、NADH、ATP 供需平衡, 即反应途径中消耗的与 EMP 途径、HMP 途径、TCA 循环产生的总数相等。

4) 按照固定比例进行的反应以及无分支点的中间反应, 可简化为一个反应方程。

5) 于不同发酵阶段对可能的有机酸代谢副产物如乙酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙酮酸、乳酸、柠檬酸、丙酸、丁酸及甲酸进行了检测 (数据未列出), 发现在整个发酵过程中, 始终未检测到乙酸、乳酸、丙酸、丁酸、甲酸, 因此, 在代谢网络的构建中不考虑这几种物质的合成途径, 丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和柠檬酸在细胞外有微量积累, 但在 L-丝氨酸大量合成时期基本不变化, 因此将这 3 种物质视为中间代谢产物, 不向胞外积累。

### 1.6 *C. glutamicum* 的 L-丝氨酸代谢流平衡模型的建立

根据文献报道以及以上分析, L-丝氨酸生物合成的代谢网络见图 1, 各步反应的化学计量方程见附录。

### 1.7 代谢流研究的数学基础和代谢方程组的求解

代谢网络分析理论的基本原理如下: 1) 根据细胞生化特征确定约束条件。2) 准稳态假设 (Pseudo-steady-state): 假设细胞内的中间代谢物均处于准稳态, 即其浓度变化速率为 0。3) 通过测定胞外代谢产物的积累速率计算发酵过程代谢流量, 构建代谢网络。

对于代谢网络中的每个组分, 都符合质量守恒定律, 即组分的积累速率等于该组分的生成减去消耗速率, 其数学表达式为:

$$ri(t) = \sum \alpha_j x_j(t) - \sum \alpha_k x_k(t) \quad (1)$$

式中,  $x_j(t)$ : 第  $j$  步反应的反应速率 [mmol/(L·h)];  $x_k(t)$ : 第  $k$  步反应的反应速率 [mmol/(L·h)];  $\alpha_j$ : 第  $j$  步反应的反应计量系数;  $\alpha_k$ : 第  $k$  步反应的反应计量系数;  $ri(t)$ : 中间代谢物  $i$  的积累速率 [mmol/(L·h)]。

将代谢网络中涉及的  $m$  个组分的物料平衡式联立, 就得到如下代谢网络平衡矩阵:

$$Ar = 0 \quad (2)$$

式 (2) 中的  $A$  是  $n \times k$  阶的代谢反应行列矩阵,  $r$  是  $k \times 1$  阶的反应速度的向量。其中  $n$  表示简化后代代谢网络的节点个数; 而  $k$  则表示反应速度的总个数, 它是简化代谢网络模型的反应式个数与着眼物质速度式的个数之和。如果  $k$  个总反应速度中有  $m$  个是在线可测的, 对应的可测速度向量为  $r_m$ , 而其余不可测速度向量为  $r_c$ , 则式 (2) 可以分解成下列形式:

$$Ar = A_m r_m + A_c r_c = 0 \quad (3)$$

这样, 不可测速度向量为  $r_c$  就可以利用式 (4), 由可测速度向量  $r_m$  和代谢反应行列矩阵  $A$  来进行推定:

$$r_c = -A_c^{-1} A_m r_m \quad (4)$$

$r$  的元素列于附录, 由  $r$  元素可得节点数为 34 个, 方程数 26 个, 方程自由度为 8, 需要测得 8 个速率方可确定代谢网络中的流量分布, 在 L-丝氨酸的发酵过程中, 离线检测的胞外代谢物为蔗糖、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-缬氨酸、L-甘氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸、生物量的浓度, 对时间微分得到各物质的积累速率, 即  $r_m$ , 将这些速率带入式 (4), 使用 PC-Matlab 软件对进行矩阵运算, 可求得代谢流分布。

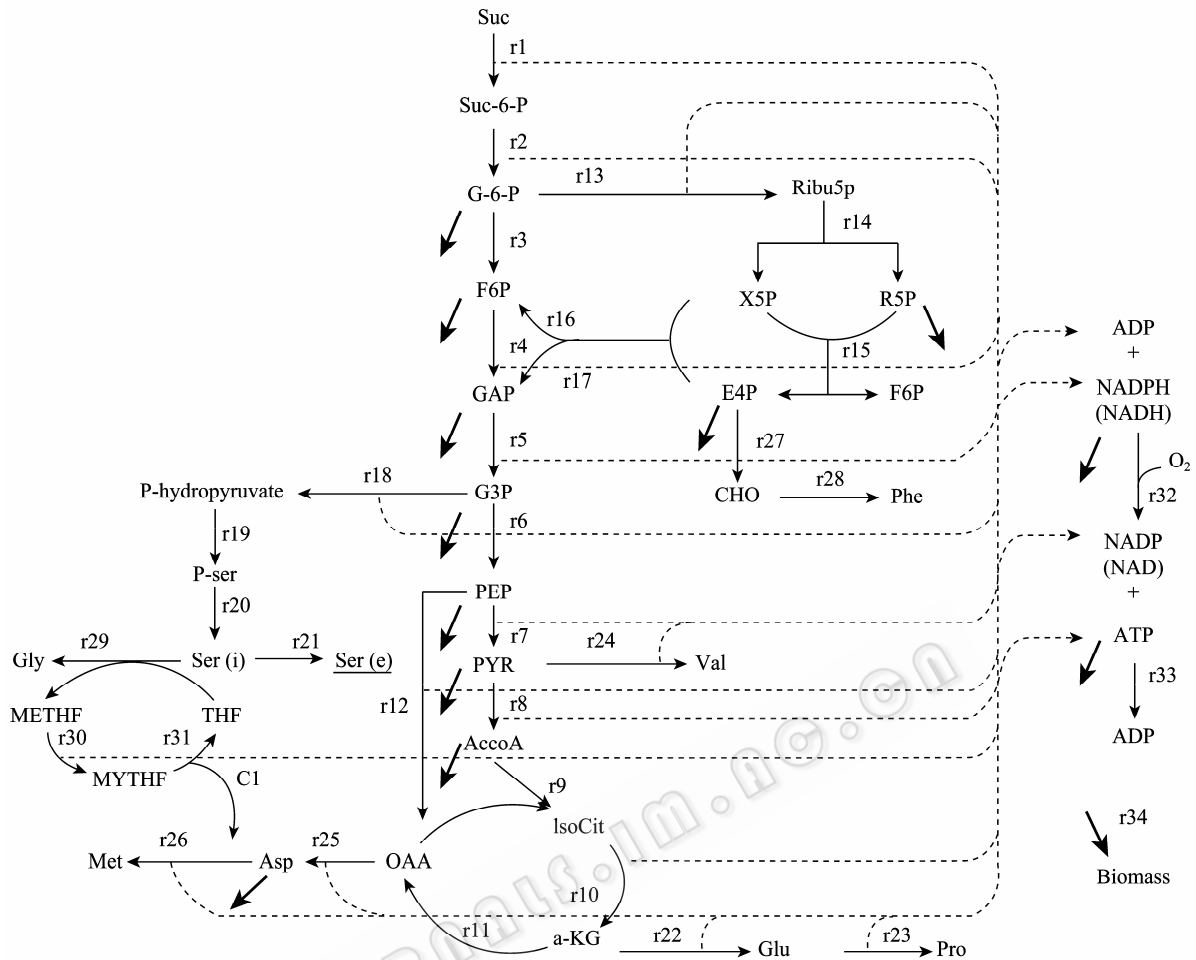


图1 *C. glutamicum* SYPS-062 L-丝氨酸代谢网络模型

Fig. 1 The Metabolic network model of L-serine in *C. glutamicum* SYPS-062. Suc: sucrose; Suc-6-P: sucrose-6-phosphate; G-6-P: glucose-6-phosphate; F-6-P: fructose-6-phosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; G3P: 3-phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; Pyr: pyruvate; AcCoA: acetyl coenzyme A; IsoCit: isocitrate;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarate; OAA: oxaloacetate; Asp: L-aspartate; Met: L-methionine; Pro: L-proline; Val: valine; CHO: chorismic acid; Phe: L-phenylalanine; ser(i): L-serine(intracellular); ser(e): L-serine(extracellular); Gly: glycine; THF: tetrahydrofolic acid; METHF: methylenetetrahydrofolic acid; MYTHF: methyltetrahydrofolic acid; ser(i): L-serine(intracellular); ser(e): L-serine(extracellular); Glu: glutamate; Pro: praline; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADH: nicotinamide adenine dinucleotide-reduced; NAD: nicotinamide-adenine dinucleotide; ATP: adenosine triphosphate; ADP: adenosine diphosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; R5P: ribose-5-phosphate; X5P: xylulose-5-phosphate; Ribu5P: ribulose-5-phosphate.

## 2 结果与分析

### 2.1 *C. glutamicum* SYPS-062 在不同条件下发酵过程比较

作者课题组前期研究表明, 叶酸和  $VB_{12}$  对 *C. glutamicum* SYPS-062 发酵影响最为显著, 对 L-丝氨酸积累有很大的促进作用<sup>[8]</sup>, 因此选择单独添加 40  $\mu\text{g/L}$  叶酸和 0.4  $\mu\text{g/L}$   $VB_{12}$  作为扰动因子, 考察其对 L-丝氨酸代谢网络的影响, 深入剖析这两种维生素的影响机制。

图 2 为不同条件下菌株 *C. glutamicum* SYPS-062

的发酵过程参数, 从图 2 可以看出添加叶酸和  $VB_{12}$  对菌体生长及 L-丝氨酸积累的显著促进作用。其中 0~48 h 为延滞期, 在这几种条件下菌体生长都非常缓慢, 糖耗也非常少, 仅为 3 g/L 左右; 48~96 h 为细胞的对数生长期, 此时菌体增殖的速率达到最大值, L-丝氨酸的积累也较迅速, 叶酸和  $VB_{12}$  也表现出对菌体生长及 L-丝氨酸积累的显著促进作用, 其中  $VB_{12}$  的促进作用非常显著, 叶酸次之。之后进入稳定期, 菌体增长速度明显下降, 而对于 L-丝氨酸的积累, 则在初始条件下, 仍有缓慢的增加, 但在分别添加两种扰动的情况下, L-丝氨酸的积累量基

本不变, 或有一定的下降。这个结果表明, 添加这两种扰动, 不但能够提高产量, 而且会在一定程度上提前结束发酵, 缩短发酵周期。

在不同的培养条件下, 蔗糖的消耗情况总趋势大体一致, 但消耗速度受扰动因子的影响很大。图 2D 表示了产物 L-丝氨酸对蔗糖转化率也同样受到扰动的影响, 结果显示随着发酵时间的延长, 转化率不断升高, 但初始条件下, 增长幅度较添加扰动的情况较小。结合以上分析, 选择在 L-丝氨酸积累速度最快的细胞对数生长期后期 (72~88 h) 进行代谢通量分析。

## 2.2 *C. glutamicum* SYPS-062 胞内的代谢流量分析

细胞代谢是由一个受到精密调控而又彼此协调的代谢网络来完成的, 通常情况下, 细胞对不同的环境条件会有不同的反应, 通过自身协调来使细胞代谢尽可能维持最优的资源配置。表 1 比较了在不同条件下 *C. glutamicum* SYPS-062 发酵 72~88 h 的

碳代谢流量分配。从表 1 可以看出, 这两种扰动改变了细胞内的代谢网络流量分布, 即产生了有效的刺激。以下对代谢网络分布作具体分析。

### 2.2.1 *C. glutamicum* SYPS-062 在不同条件下 HMP 途径的流量分配

磷酸戊糖途径 (HMP 途径) 是合成细胞物质的重要途径, 对 SYPS-062 的代谢网络模型而言, HMP 途径具有 3 方面的作用: 1) 合成细胞物质, 在该模型中, 5-磷酸核糖、4-磷酸赤藓糖都是对生物量积累贡献较大的物质; 2) 合成还原力, 以供细胞合成产物, 积累细胞物质; 3) 合成该菌株发酵过程中的重要的代谢副产物脯氨酸。结果显示 HMP(r13) 在初始条件下分流较添加扰动的情况分流少, 即体现出在该条件下, 细胞繁殖不活跃, 生长不旺盛, 对碳流需求不大。而在添加扰动的情况下, 尤其是添加 VB<sub>12</sub>, 细胞增殖迅速, HMP 途径的流量增大 (r13=64), 这个结果再次证明了叶酸和 VB<sub>12</sub> 对促进细胞生长方面的有效影响。

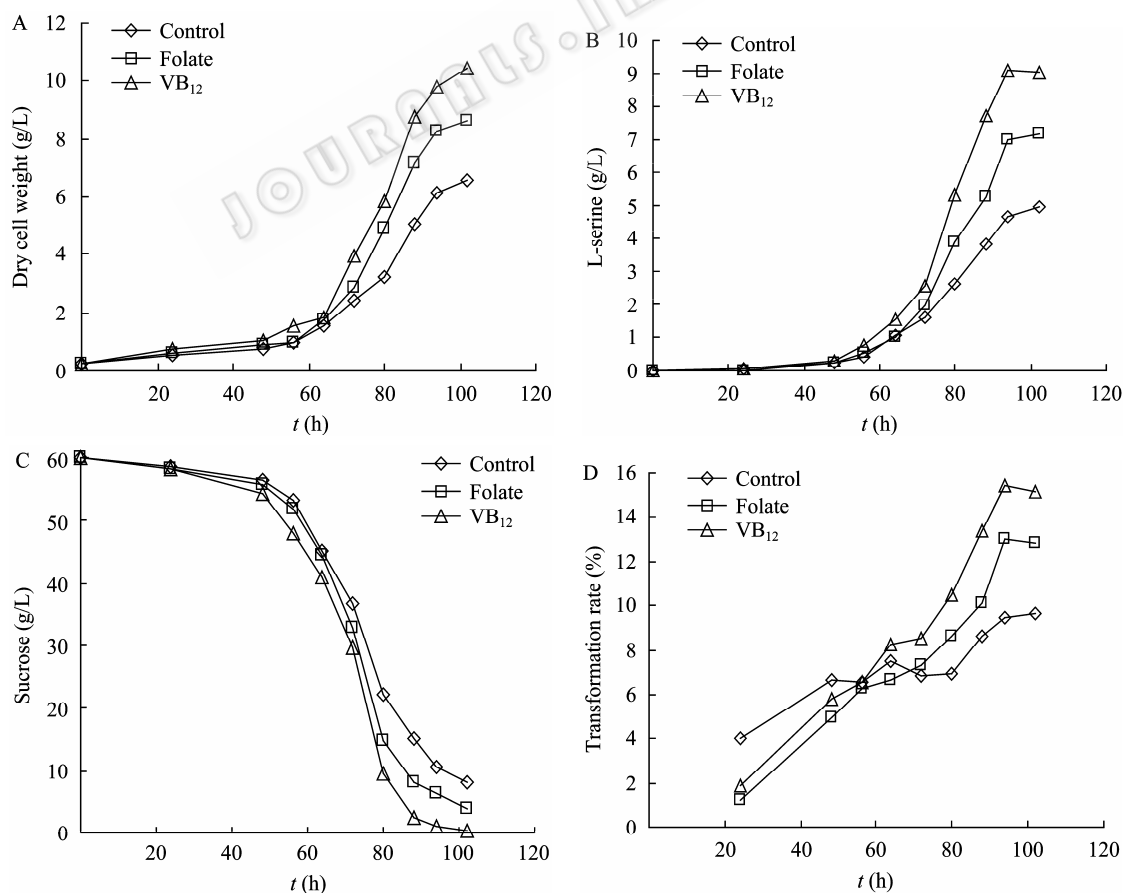


图 2 不同发酵条件下的参数曲线

Fig. 2 The parametric curves in different fermentation condition.

表1 不同条件对 *C. glutamicum* SYPS-062 中碳代谢流量的影响

Table 1 Effect of different condition on the distribution of carbon flux in *C. glutamicum* SYPS-062

	Original condition	Folate	VB <sub>12</sub>
r1	100.0	100.0	100.0
r2	100.0	100.0	100.0
r3	143.1	138.3	132.7
r4	170.8	166.4	163.4
r5	354.5	345.7	332.1
r6	304.4	276.7	237.7
r7	241.4	193.3	140.7
r8	237.5	184.9	132.6
r9	208.1	150.3	96.4
r10	208.1	150.3	96.4
r11	151.7	80.9	14.4
r12	58.5	77	90.5
r13	55.0	59.1	64.7
r14	55.0	59.1	64.7
r15	47.0	48.1	53.2
r16	28.2	29.0	31.6
r17	14.1	14.5	15.8
r18	39.0	49.7	75.6
r19	39.0	49.7	75.6
r20	39.0	49.7	75.6
r21	34.5	42.9	69.1
r22	55.4	69.4	82.0
r23	10.4	7.2	9.0
r24	1.2	4.7	4.4
r25	3.1	7.9	8.5
r26	2.4	6.9	7.5
r27	1.4	0.2	1.5
r28	1.4	0.2	1.5
R29	4.4	6.8	6.5
r30	4.4	6.8	6.5
r31	4.4	6.8	6.5
r32	1155.1	885.4	633.4
r33	2361.3	1580.1	921.2
r34	65.4	90.3	92.2

### 2.2.2 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 节点流量分析

PEP 在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PPC) 的催化下转化为草酰乙酸 (OAA) (r12), 这个反应在 *C. glutamicum* 的代谢过程中也占有极其重要的地位, 因为它是该类细菌在较低碳源浓度的培养基上生长时的唯一一条磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应 (Anaplerotic reaction, r12), 即碳流较少时的唯一一条进入 TCA 循环的回补途径, 在 3 种不同条件下,

PEP 节点流量分布如图 3 所示。

在初始条件下, PEP 回补途径的流量最少, 而添加 VB<sub>12</sub> 时最大, 这个结果体现了添加扰动 (尤其是 VB<sub>12</sub>) 促进 L-丝氨酸积累, 提高生物量的合成, 从而导致了碳流在进入 TCA 循环之前被大量分流, TCA 循环碳流不足, 需要通过大量回补途径补充碳流。这个结果也可从 TCA 循环中 r11 的数据体现出来, 在添加 VB<sub>12</sub> 的情况下, 该步反应的流量仅为 14.4, 而初始条件流量为 151.7。如果进一步增大生物量积累速度, 产物积累速度, 则会导致 TCA 循环严重不足, 限制正常的生理活动, 因此, TCA 循环碳流不足成为进一步提高产量的瓶颈因素。

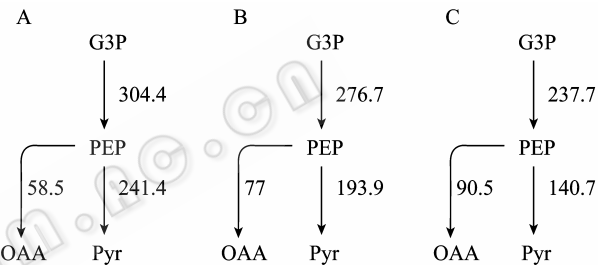


图3 不同发酵条件下 PEP 节点代谢流量分布情况

Fig 3 Metabolic flux distribution of PEP node in different fermentation condition.

### 2.2.3 3-磷酸甘油酸 (G3P) 节点流量分析

G3P 节点是 L-丝氨酸合成途径中第一个反应物, 该节点的分流比在很大程度上体现了单位底物 L-丝氨酸的合成效率。由图 4 知, 在初始条件下, ser/G3P 的分流比 (r18/r5) 为 11%, 添加叶酸和 VB<sub>12</sub> 的情况下, 分别为 14% 和 22%, 这个结果体现出 VB<sub>12</sub> 对 G3P 节点流量的重新分配非常有效, 而叶酸相比较对该节点影响较小。因此, 叶酸和 VB<sub>12</sub> 虽然都促进 L-丝氨酸发酵, 但作用机理是不同的。

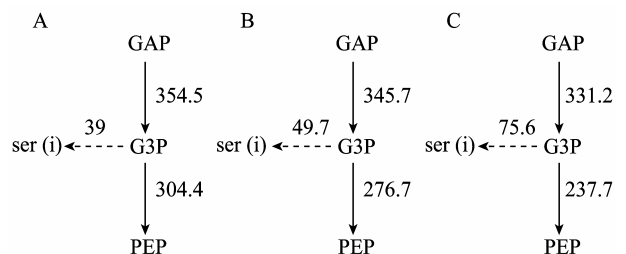


图4 不同发酵条件下 G3P 节点代谢流量的分布情况

Fig 4 Metabolic flux distribution of G3P node in different fermentation condition.

### 2.2.4 *C. glutamicum* SYPS-062 在不同条件下合成能量分析

*C. glutamicum* SYPS-062 代谢网络中反应 33 中的 ATP 为网络中正常进行时需要另外合成的以补充细胞生理代谢的 ATP, 由表 2 可见, ATP 通量与 L-丝氨酸的积累呈负相关, ATP 通量高时, L-丝氨酸合成通量低; 反之, ATP 通量低时, L-丝氨酸合成通量则高。这个结果体现了在添加扰动的前提下, 尤其是添加 VB<sub>12</sub> 对能量合成有促进作用, 即细胞不但加速生长, 快速合成产物 L-丝氨酸, 并且通过正常的自身代谢产生了较多的能量, 以维持细胞正常的生理代谢活动, 导致所需要另外合成的能量减少。

表 2 不同条件下 L-丝氨酸合成通量与 ATP 通量的关系  
Table 2 Relationship between L-serine production and biomass flux and ATP generation under different conditions

	Original condition	Folate	VB <sub>12</sub>
NADH (NADPH) (r32)	1155	885	633
ATP (r33)	2361	1580	921
L-Serine	34.5	42.9	69.1
Biomass	65.4	90.3	92.24

### 2.2.5 *C. glutamicum* SYPS-062 不同条件下合成的副产物的比较

由表 3 可见, L-脯氨酸是合成速率最大的副产物, L-蛋氨酸次之, 如能从遗传角度或发酵控制方面使副产物生成减少, 可以达到代谢流迁移的目的, 从而增大目标产物 L-丝氨酸的积累。这几种副产物中, 甘氨酸与 L-丝氨酸代谢关系密切, 甘氨酸是 L-丝氨酸的下一级代谢产物, 其流量随着 L-丝氨酸合成流量的增大而增大是显而易见的, 但添加叶酸虽然 L-丝氨酸的合成流量没有达到最大值, 但甘氨酸的合成速率达到最大值, 这是因为叶酸是该反应的辅因子, 对这一步转化有一定的促进作用。

表 3 不同发酵条件对副产物合成的影响  
Table 3 Synthesis rate of byproducts under different conditions

Byproducts	Gly	L-Met	L-Pro	L-Phe	L-Val
Original condition	4.4	2.4	10.4	1.4	1.2
Folate	6.8	6.9	7.2	0.2	4.7
VB <sub>12</sub>	6.5	7.5	9.0	1.5	4.4

### 2.2.6 *C. glutamicum* SYPS-062 在不同条件下一碳循环的探讨

一碳循环在微生物体内非常重要, 参与许多氨基酸、核酸、脂类的合成, 对细胞生理行为影响非常大。在本模型中, 由于目标产物 L-丝氨酸是一碳单元的前体, 是微生物体内重要的一碳单元的来源, 所以构建了一碳单元的部分循环路径, 即通过 r29, L-丝氨酸降解为甘氨酸和一碳单元, 再由四氢叶酸 (THF) 作为载体携带一碳单元 (r30), 生成甲叉四氢叶酸 (METHF) (r31), 后者被氧化为甲基四氢叶酸 (MYTHF) 后释放出一碳单元。本模型中, 包括一个重要的需要一碳的反应, 即 r24: 由天门冬氨酸 (Asp) 生成甲硫氨酸 (Met)。虽然由于模型具有一定的简化, 不能囊括所有一碳单元参与的反应, 但单就目前这两个生成及消耗一碳的反应来看, 仍然具有一定的规律性: 即在初始条件下, 生成的一碳单元流量 (r30) 明显较少, 添加扰动后, 生成一碳的流量显著提高, 虽然不能对生成甲硫氨酸的流量 (r27) 和 MYTHF 释放一碳的途径作定量的关系描述, 但添加扰动同样使甲硫氨酸的合成速率显著提高。尤其添加 VB<sub>12</sub> 时, 达到最大值, 这是由于 VB<sub>12</sub> 是生成甲硫氨酸的过程中甲基转移酶的辅因子, 会促进一碳单元的转移与利用。

## 3 讨论

采用代谢网络分析方法对 *C. glutamicum* SYPS-062 进行研究表明, 扰动因子叶酸和 VB<sub>12</sub> 影响了 HMP 途径的分流, 更多的碳流入 HMP 途径产生更多的能量及细胞物质, 导致了细胞生长旺盛, 增殖迅速, 同时使流向目的产物 L-丝氨酸的分流减少。何宁等<sup>[17]</sup>对利用谷氨酸棒杆菌生产生物絮凝剂 REA-11 的代谢网络模型进行通量分析, 结果与本研究一致。

对 G3P 节点分析得到 VB<sub>12</sub> 可以显著提高 L-丝氨酸合成途径的分流比, 而叶酸对该节点分流比的提高较小, 说明虽然这两种辅因子都可以提高 L-丝氨酸合成途径的流量。但通过对 PEP 节点的分析发现, 添加 VB<sub>12</sub> 时, 由于大量碳流进入 L-丝氨酸合成途径, 同时生物量也大量积累, 致使 TCA 循环

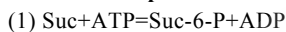
中碳流不足, r11 流量仅为 14.4, 需要大量回补, 已经限制了进一步的提高合成 L-丝氨酸的速度, 成为进一步提高产量的一个瓶颈因素。

由于在对数生长中后期产物合成速率达到最大值, 此时培养基的蔗糖已有很大程度上的消耗 (图 2C), 因此可以考虑在后期采用补糖策略, 提供充足的碳源, 一定程度上缓解这种矛盾。同时还应看到, 虽然 L-丝氨酸属于 I 型发酵, 产物合成与菌体生长有密切的关系, 但细胞的快速生长繁殖对碳流的消耗同样很大, 寻求高产量和高细胞浓度之间的平衡点, 提高单位菌体的产酸率是进一步提高产量所需要慎重考虑的。

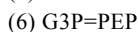
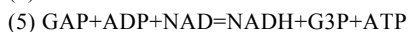
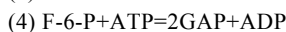
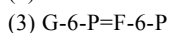
一碳循环是微生物的一个重要的循环, 并且与 L-丝氨酸的积累关系密切, 本模型对一碳循环作了较大的简化, 得知在添加叶酸和 VB<sub>12</sub> 的情况下, 一碳单元利用更充分、有效, 尤其在添加 VB<sub>12</sub> 时, 对 HMP 途径和合成甲硫氨酸这两个需要一碳的反应有较显著的促进。关于一碳循环更多的信息, 没有办法从本模型中分析得到, 有待于进一步的研究。

## 附录: 化学计量学方程式

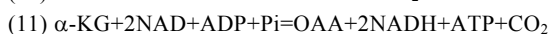
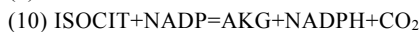
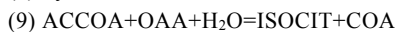
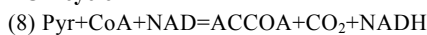
### Glucose transport



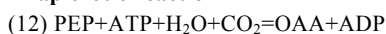
### EMP pathway



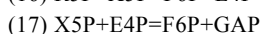
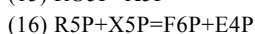
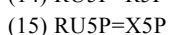
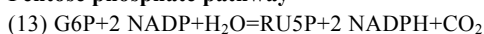
### TCA cycle



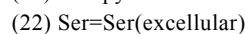
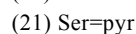
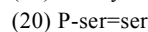
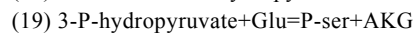
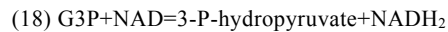
### Anaplerotic reaction



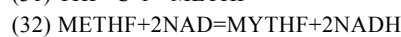
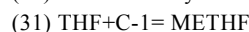
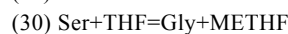
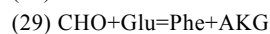
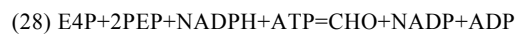
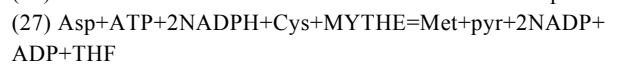
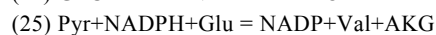
### Pentose phosphate pathway



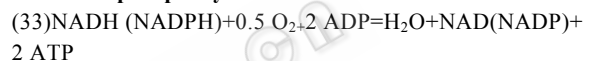
### Serine synthesis or utilization



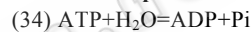
### Byproducts formation or utilization



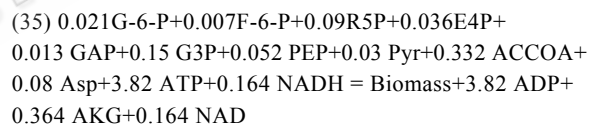
### Oxidative phosphorylation



### ATP consumption for maintenance and futile cycles



### Biomass formation



## REFERENCES

- [1] Chai DL, Qi QJ, Ji MG, *et al.* Study on the advance of serine. *Chem Technol Market*, 2006, **29**(5): 17-19.  
柴多里, 祁秋景, 基本格, 等. 丝氨酸的研究进展. 化工科技市场, 2006, **29**(5): 17-19.
- [2] Zhang KX. *Amino Fermentation Technology*. Beijing: China Light Industry Press, 1993: 13-25.  
张克旭. 氨基酸发酵工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1993: 13-25.
- [3] Peters-Wendisch P, Stolz M, Etterich H, *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 7139-7144.
- [4] Peters-Wendisch P, Netzer R, Eggeling L, *et al.* 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **60**(4): 437-441.
- [5] Netzer R, Peters-Wendisch P, Eggeling L, *et al.*



- Cometabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(12): 7148–7155.
- [6] Peters-Wendisch P, Wendisch VF, Eggeling L. L-Serine and glycine. *Amino Acid Biosynthesis*, 2007, **5**: 260–272.
- [7] Wei D, Tan HL, Yang HY, *et al.* Breeding of L-serine producing strain and optimization of fermentation conditions. *Amino Acids Biotic Resources*, 2006, **28**(1): 46–48.  
魏东, 谭慧琳, 杨海燕, 等. L-丝氨酸高产菌株的选育和摇瓶法条件优化. *氨基酸和生物资源*, 2006, **28**(1): 46–48.
- [8] Zhang XJ, Dou WF, Xu HY, *et al.* Effects of vitamins on the direct fermentative production of L-serine in *Corynebacterium glutamicum* SYPS-062. *China Biotechnol*, 2007, **27**(5): 50–55.  
张晓娟, 窦文芳, 许泓瑜, 等. 维生素对谷氨酸棒杆菌 SYPS-062 直接发酵合成 L-丝氨酸的影响. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(5): 50–55.
- [9] Wang J, Chen N, Zhang P, *et al.* Metabolic flux analysis of L-tryptophan biosynthesis. *Acta Microbiol Sin*, 2003, **43**(4): 473–480.  
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.
- [10] Shirai T, Nakato A, Izutani N, *et al.* Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab Eng*, 2005, **7**(2): 59–69.
- [11] Hua Q, Fu PC, Yang C, *et al.* Microaerobic lysine fermentations and metabolic flux analysis. *Biochem Eng J*, 1998, **2**: 89–100.
- [12] Han YS. The Food Chemistry Laboratory. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1992: 19–23.  
韩雅珊. 食品化学实验指导. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 19–23.
- [13] Zhang KX. Metabolic Control Fermentation. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 132–179.  
张克旭. 代谢控制发酵. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 132–179.
- [14] Oishi K, Aida H. Studies on amino acid fermentation. Part XI. Effect of biotin on the Embden-Meyerhof-Parnas pathway and the hexose-monophosphate shunt in a glutamic acid-producing bacterium *Brevibacterium ammoniagenes* 317-1. *Agric Biol Chem*, 1965, **29**: 83–89.
- [15] Vallino JJ, Stephanopoulos G. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and Lysine overproduction. *Biotech Bioeng*, 1993, **41**: 633–646.
- [16] Shiio I, Otsuka S, Tsunoda T. Glutamic acid formation from glucose by bacteria. IV Carbon dioxide fixation and glutamate formation in *Brevibacterium flavum* No. 2247. *J Biochem*, 1960, **48**: 110–120.
- [17] He N, Li Y, Chen J. Metabolic network modeling and metabolic flux analysis of production of novel bioflocculant REA-11. *J Chem Ind Eng (China)*, 2005, **56**(4): 681–688.  
何宁, 李寅, 陈坚. 新型生物絮凝剂 REA-11 的代谢模型建立与代谢网络分析. *化工学报*, 2005, **56**(4): 681–688.