

枯草芽孢杆菌生产胞苷的途径分析

魏志强, 徐庆阳, 刘淑云

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 运用 METATOOL 软件对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TZM1012 由葡萄糖生物合成胞苷的代谢途径进行分析, 以确定胞苷合成的最佳途径和最大理论产率。结果表明其最大理论产率为 0.28, 5-磷酸核糖焦磷酸与草酰乙酸是胞苷合成途径的关键节点, 发酵中后期低溶氧控制是胞苷合成的重要前提, 溶氧控制在 5%~10% 时胞苷产量可提高 15.8%。结论是以途径分析为指导, 改变外界环境因子, 胞苷的产量可得到显著的提高。

关键词: 胞苷; 途径分析; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q524; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0544-04

Metabolic Pathway of Cytidine Synthesis in *Bacillus Subtilis*

WEI Zhi-qiang, XU Qing-yang, LIU Shu-yun

(College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: METATOOL soft ware was applied to analyze the cytidine biosynthesis pathway in *Bacillus subtilis* TZM1012. The results was as follows: PRPP and oxaloacetic acid were found to be the key nodes in cytidine biosynthesis pathway and low dissolved oxygen concentration in the medium-term and last periods of fermentation was an important precondition of cytidine biosynthesis. The highest theoretical yield of cytidine was 0.28 and cytidine yield could increased by 15.8% if the dissolved oxygen concentration in fermentation broth was of 5%~10%. According to the analysis of metabolic pathway of cytidine biosynthesis, the yield of cytidine can be greatly improved by changing the environmental factors.

Key words: cytidine; pathway analysis; *Bacillus subtilis*

胞苷作为嘧啶核苷主要用于生产抗肿瘤、抗病毒药物的中间体, 是制造阿糖胞苷 (Ara-CR)、环胞苷 (Cyclo C)、三磷酸胞苷 (CTP)、胞二磷胆碱 (CDP-Choline) 等药物的主要原料, 是比较昂贵的核苷原料药之一。随着胞苷在医药方面的应用不断拓展, 市场需求量不断增加, 实际产量远远不能满足市场需求。提高胞苷发酵产率、降低生产成本已成为目前一个重要课题。

近年来, 人们利用代谢工程方法改变细胞内部的代谢流分布, 使其在一定环境下生成更多的产物。代谢流分析 (Metabolic Flux Analysis, MFA)、途径分析 (Pathway Analysis) 等方法是在代谢工程中用以指导遗传操作的理论基础, 是代谢网络分析的基本方法^[1-3]。代谢网络分析已从简单的分析代谢反应挂图发展到深入研究代谢网络结构^[4]。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^[5-7]。细胞内代谢网络是由基本反应模型的非负线性组合产生的, 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^[8]。理想载流途径的构建开始于酶的确、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的意义。近年来途径分析在生物技术领域得到了广泛的应用, 目前, 已有蔡显鹏、王健等人分析了鸟苷发酵过程中代谢流的迁移^[9-10], 张蓓等人研究了枯草芽孢杆菌生产肌苷的代谢流^[11], 但尚未见胞苷的生物合成途径分析的相关报道。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) TZM1012, 天津科技大学微生物研究室保存菌株。

1.2 培养基

活化斜面培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 4, 酵母膏 10, 牛肉膏 14, pH 7.2, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 40, 蛋白胨 20, 酵母膏 5, MgSO₄·7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 0.5, KH₂PO₄ 1.5, pH 7.0~7.2, 0.1 MPa 灭菌 15 min。

收稿日期: 2008-01-23

作者简介: 魏志强, 硕士研究生, 研究方向: 代谢控制发酵

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 164, K₂HPO₄ 2.17, 玉米蛋白粉 8, 玉米浆 40, 尿素 20, 起始 pH 6.7, 发酵温度 36.3 °C, CaCO₃ 5(分消), 0.1 MPa 灭菌 15 min.

1.3 分析方法

菌体浓度测定: 稀释 20 倍, 用 752 分光光度计在波长 620 nm 处测定。

胞苷含量的测定: Agilent 高效液相分析仪测定。

葡萄糖测定: 采用 SBA-40C 型葡萄糖—谷氨酸分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 胞苷生物合成途径分析

本文中途径分析模型基于下列几个主要假设:

(1) 由于菌体生长中代谢网络复杂, 所以本文不考虑枯草芽孢杆菌细胞的生长代谢。

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

(3) 途径分析不能区别同工酶, 所以它们都被认为是同一个反应步骤。

(4) 包含可逆反应会产生反应模型的无效循环, 所以在途径组合过程中不允许选取可逆反应的两个方向进行组合。

(5) 反应途径中消耗的 NADPH 与 HMP 途径、TCA 循环产生的 NADPH 总数相等。

经 metatool 软件^[12]分析所得胞苷生物合成网络如图 1 所示, 化学计量矩阵和产生的向量如表 1 所示。任何一个基础反应模型都包含一系列无用的反应(用“0”表示)。任何一个模型的胞苷得率都可以由胞苷的通量与葡萄糖至葡萄糖 6 磷酸反应的通量相除来得到。

通过途径分析可知, 由葡萄糖进入代谢网络有两种方式, 一种是葡萄糖由 EMP 途径进入代谢网络; 另一种是由 HMP 途径进入代谢网络。葡萄糖生成草酰乙酸的途径有两种方式, 一种是 PEP 经 TCA 循环生成 OAA, 生成 2 分子 CO₂; 另一种是 CO₂ 的回补反应, 即 PEP 直接生成 OAA。OAA 经谷草转氨酶催化生成天冬氨酸, 天冬氨酸与 PRPP 共同构成胞苷结构的碳架来源。

由于尿苷合成的前体物天冬氨酸和 PRPP 分别来自 TCA 循环和 HMP 途径, 一部分 CO₂ 来自 TCA 循环的脱羧反应, 一部分 NH₃ 来自于谷胺酰胺的脱氨基反应, 所以涉及到的代谢途径较多, 也比较复杂。因此由 metatool 分析所得 28 个基本反应模型中, 胞苷得率都较低。按由高到低可分为 4 组, 由高到低依次为:

1. (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10) : 0.28; 2. (12, 14, 16, 19, 21, 23, 25, 27, 28) : 0.231; 3. (13, 15, 20, 22, 24, 26) : 0.171; 4. (4, 11, 17, 18) : 0.143。

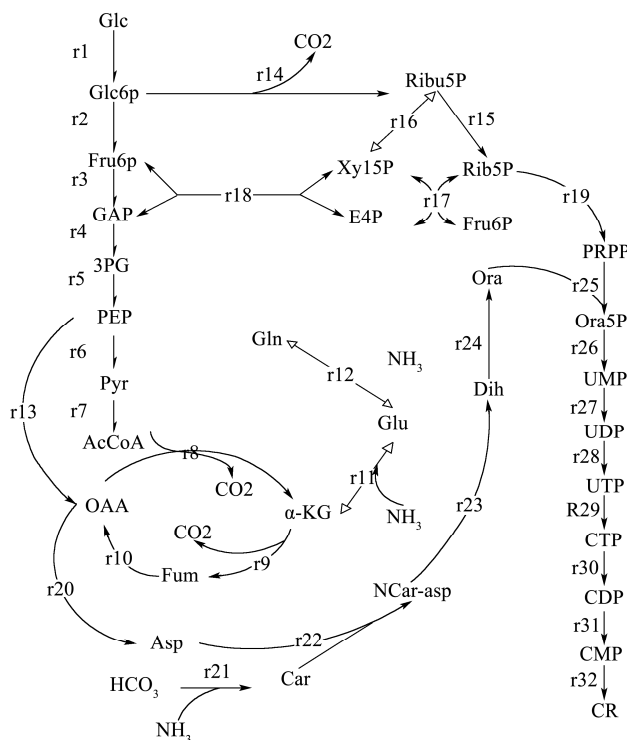


图 1 胞苷生物合成代谢网络

Fig.1 Metabolic pathway of cytidine biosynthesis

- 注: (1) Glc: 葡萄糖; (2) Glc6P: 葡萄糖 6 磷酸; (3) Fru6P: 果糖 6 磷酸; (4) GAP: 3-磷酸甘油醛; (5) 3PG: 3-磷酸甘油酸; (6) Pyr: 丙酮酸; (7) AcCoA: 乙酰辅酶 A; (8) OAA: 草酰乙酸; (9) α-KG: α-酮戊二酸; (10) Glu: 谷氨酸; (11) Gln: 谷氨酰胺; (12) Fum: 延胡索酸; (13) Ribu5P: 5-磷酸核酮糖; (14) Xyl15P: 5-磷酸木酮糖; (15) Rib5P: 5-磷酸核糖; (16) E4P: 4-磷酸赤藓糖; (17) PRPP: 5-磷酸核糖焦磷酸; (18) Asp: L-天冬氨酸; (19) Car: 羧甲酰磷酸; (20) NCar-asp: 羧甲酰磷酸天冬氨酸; (21) Dih: 二氢乳清酸; (22) Ora: 乳清酸; (23) Ora5P: 乳清酰胺; (24) UMP: 尿苷酸; (25) UDP: 尿苷二磷酸; (26) UTP: 尿苷三磷酸; (27) CTP: 胞苷三磷酸; (28) CDP: 胞苷二磷酸; (29) CMP: 胞苷酸; (30) CR: 胞苷。

在模型 1 中, 葡萄糖由 EMP 途径进入代谢网络, PEP 未经 TCA 循环直接生成 OAA 进入嘧啶合成途径, 避免因生成 CO₂ 而造成浪费, 胞苷摩尔产率达到 0.28。模型 2 中, 葡萄糖完全由 HMP 途径进入代谢网络, PEP 未经 TCA 循环直接生成 OAA 进入嘧啶合成途径, 胞苷摩尔产率达到 0.23。在模型 3 中, 葡萄糖由 EMP 途径进入代谢网络, PEP 经 TCA 循环生成

OAA, 因生成较多 CO₂ 造成碳架浪费, 胞苷得率为 0.17。在模型 4 中, 葡萄糖完全由 HMP 途径进入代谢网络, PEP 经 TCA 循环生成 OAA, 胞苷得率最低,

只有 0.14。由此可知, 第一类模型为由葡萄糖生成胞苷的最优化模型。

表 1 葡萄糖生物合成胞苷的基本反应模型

Table 1 Fundamental reaction models of cytidine biosynthesis from glucose

模型	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9	e10	e11	e12	e13	e14	e15	e16	e17	e18	e19	e20	e21	e22
r1	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.4	1	0.4	1
r2	1.6	10	0	3.5	0.8	2	0	0	0.3	0.6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
r3	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	C	0.3	0.6	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5
r4	0.3	0.3	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	4.1	4.7	4.7	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.6	0.3	0.6
r5	1.5	0	1.5	2.2	4.8	0	0	0.8	1.6	10	0	3.5	0.8	2	0	0	0.3	0.6	0.2	0.4	0	0
r6	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	C	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r7	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r8	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r9	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r10	1	1	3	1.5	3.2	1.5	3.2	1.5	3.2	9.3	10.5	10.5	0.7	1.8	0.7	1.8	0.7	1.8	0.4	1	0.4	1
r11	1	1	3	1.4	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	13	15	15	1	2.6	1	2.6	1	2.6	1	2.3	1	2.3
r12	1	1	3	1.4	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	13	15	15	1	2.6	1	2.6	1	2.6	1	2.3	1	2.3
r13	1	1	3	0	2.1	0	2.1	0	2.1	13	15	15	0	1.6	0	1.6	0	1.6	0	1.3	0	1.3
r14	-0.3	-0.3	-0.9	1	0	1	0	1	0	-5.2	-5.9	-5.9	0.6	0	0.6	0	0.6	0	0.6	0	0.6	0
r15	0.3	0.3	0.9	0.5	1	0.5	1	0.5	1	5.2	5.9	5.9	0.4	1	0.4	1	0.4	1	0.4	1	0.4	1
r16	3.2	1.5	3.2	1.5	3.2	9.3	10.5	3.2	1.5	3.2	1.5	3.2	1.5	3.2	1.5	3.2	3.2	1.5	3.2	1.5	3.2	9.3
r17	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	13	15	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	13
r18	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	13	15	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	3.2	1.4	3.2	1.4	3.2	13
r19	2.1	0	2.1	0	2.1	13	15	2.1	0	2.1	0	2.1	0	2.1	0	2.1	2.1	0	2.1	0	2.1	13
r20	0.3	0.3	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	4.1	4.7	4.7	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.6	0.3	0.6
r21	0.5	0.5	1	0.7	1.5	0.7	1.5	0.7	1.5	4.1	4.7	4.7	0.3	0.8	0.3	0.8	0.3	0.8	0.2	0.4	0.2	0.4
r22	-0.1	-0.1	-0.4	-0.2	-0.5	-0.2	-0.5	-0.2	-0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.3	0.1	0.3
r23	-0.5	-0.5	-1.5	-0.8	-1.6	-0.8	-1.6	-0.8	-1.6	-3.1	-3.5	-3.5	-0.3	-0.6	-0.3	-0.6	-0.3	-0.6	0	0	0	0
r24	-0.5	-0.5	-1.5	-0.8	-1.6	-0.8	-1.6	-0.8	-1.6	-3.1	-3.5	-3.5	-0.3	-0.6	-0.3	-0.6	-0.3	-0.6	0	0	0	0
r25	-1	0.5	0	-1.4	-3.2	0.8	1.6	0	0	-7.2	3.5	0	-0.5	-1.4	0.3	0.6	0	0	-0.2	-0.4	0	0
r26	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r27	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r28	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r29	0.3	0.3	1	0	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.8	4.1	5.2	4.7	5.2	4.7	0.3	0.6	0.3	0.3	0.8	0.6
r30	0.5	0.5	1	0	0.7	1.5	0.7	1.5	0.7	1.5	0.3	4.1	3	4.7	3	4.7	0.1	0.3	0.3	0.2	0.8	0.4
r31	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3
r32	0.4	0.4	1	0.5	1.2	0.5	1.2	0.5	1.2	3.1	3.5	3.5	0.3	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.1	0.3	0.1	0.3

2.2 胞苷生物合成途径扰动分析

基础模型都是理想化模型, 需求量通常是混合的, 所以通量分布是许多模型的叠加。对于一个特定的反应系统, 在确定了基础模型后, 通过引导最优途径中 氨甲酰磷酸合成酶、氨甲酰天冬氨酸转移酶、二氢乳

清酸酶、二氢乳清酸脱氢酶、乳清酸磷酸核糖转移合成酶、乳清酸脱羧酶成比例的过量表达, 在不破坏整个代谢途径的情况下, 提高胞苷的产率, 以防止通量的浪费。为了避免因生成CO₂而造成浪费, 应该对6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶进行节堵, 过量表达转酮醇酶, 这

是一个比较合理的途径。按照途径分析, TCA循环应该减弱。因为大多数的ATP都是由TCA循环提供的。所以该循环中的酶不能被完全敲除, 而可以敲除腺苷琥珀酸合成酶。通过对上述3种模型的分析, 确定了合成胞苷的最优代谢途径。增加胞苷产量的关键, 在于解除UMP对氨甲酰磷酸合成酶、氨甲酰天冬氨酸转移酶、二氢乳清酸酶、二氢乳清酸脱氢酶、乳清酸磷酸核糖转移合成酶、乳清酸脱羧酶的反馈阻遏, UMP对氨甲酰磷酸合成酶的反馈抑制, CTP对尿苷酸激酶的反馈抑制, CMP对尿苷酸激酶的反馈阻遏。

由于NH₄⁺的积累一方面导致丙氨酸的积累, 从而抑制谷氨酰胺合成酶(GS), 导致谷氨酰胺合成减少, 另一方面使HMP途径减弱, TCA循环增强, 从而确定在发酵初期减少原培养基中(NH₄)₂SO₄的量来增加胞苷的代谢流。将(NH₄)₂SO₄的浓度降至1.2 g/L, 扰动前后OAA节点处代谢流变化如图3所示。

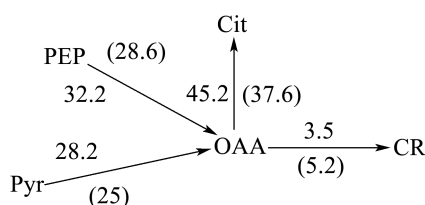


图2 扰动前后OAA节点处代谢流变化

Fig.2 Changes of metabolic flux in OAA node before and after disturbance treatment

由图2可知, 扰动前 OAA 的代谢流为 60.4, Cit 的代谢流为 45.2, 有 72.3%的 OAA 流向 TCA 循环, 造成了碳源的浪费。扰动后 OAA 的代谢流为 53.2, Cit 的代谢流为 37.6, 有 61.6%的 OAA 流向 TCA 循环, 结果使发酵中后期胞苷的代谢流从 3.5 增加到 5.2。

现阶段国内外各种研究表明^[13,14], 溶氧对代谢过程有显著影响, 故本文采用控制溶氧的方法来改变胞苷代谢流, 结果在 5 L 罐发酵中后期溶氧控制在 5%~10%之间时, 胞苷产率提高 15.8%, 如图 3 所示。

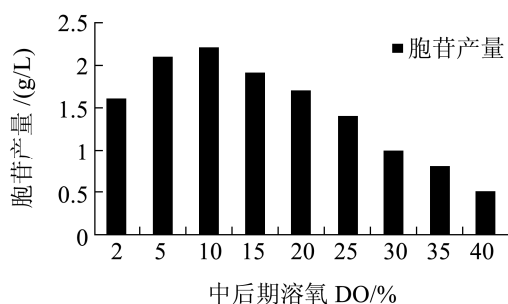


图3 中后期溶氧控制与胞苷产量的关系

Fig.3 Effect of DO concentration on cytidine production

3 结论

应用途径分析方法分析了枯草芽胞杆菌TSM1012由葡萄糖生物合成胞苷的途径, 根据途径分析结果, 确定了胞苷合成的最佳途径及理论产率, 实验结果与途径分析相一致。根据该途径分析结果, 通过发酵中后期不同溶氧控制, 使胞苷的产量有了明显提高。

参考文献

- [1] Klamt S,Stelling J.Two approaches for metabolic pathway analysis? [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21: 64-69
- [2] Gagneur J, et al. Hierarchical analysis of dependency in metabolic networks[J].Bioinformatics,2003,19(8): 1027-1034
- [3] Dandekar T, et al. A method for classifying metabolites in topological pathway analyses based on minimization of pathway number [J]. BioSystems, 2003, 70(3): 255-270
- [4] 张蓓.代谢工程[M].天津:天津大学出版社,2003
- [5] Schilling CH,Ietscher D,Palsson BO.Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective[J].J TheorBiol, 2000, 203(2): 249-283
- [6] Schilling CH, Palsson BO. Assessment of metabolic capabilities of Haemophilus influenzae Rd through a genomic scale pathway analysis[J]. J Theor Biol, 2000, 203(3): 249-283
- [7] Schuster S, Dandekar T, Fell DA. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering [J]. Trend Biotechnol, 1999, 17(2): 53-60
- [8] Vijayasankaran N, Carlson R,Srience F.Matabolic pathway structures for recombinant protein synthesis in Escherichia coli[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2005, 68(6): 737-746
- [9] 蔡显鹏,陈双喜.鸟苷发酵过程代谢流迁移的分析[J].生物工程学报,2002,18(5):622.625
- [10] 王健,周昌平,张蓓,等.鸟苷产生菌的代谢途径分析[J].生物加工过程,2004,2(2):74-79
- [11] ZHANG Bei, ZHANG Kexu, CHEN Ning, XU Yongquan. Analysis of metabolic fluxes in batch cultures of inosine-overproducing bacillus subtilis [J], Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2003, 36(3): 116-122
- [12] <http://mudshark.brookes.ac.uk/sware.html>
- [13] 刘勇,陈雅丽,张长铠,等.L-异亮氨酸发酵对氧需求的研究[J].生物技术,1998,8(1):26-28
- [14] 张伟国,陈坚,伦世仪.供氧对异亮氨酸分批发酵的影响[J].无锡轻工大学学报,2001,20(5):96-97,100