文章编号：1009－038X(2002)06－0554－05

代谢通量分析优化米根霉 R1021 发酵生产 L(＋)-乳酸过程

白冬梅[1,2]， 付卫明[1]， 赵学明[1]， 代海霞[1]， 李鑫钢[2]， 徐世民[2]
(1. 天津大学 化工学院，天津 300072；2. 天津大学精馏技术国家工程研究中心，天津 300072)

摘　要：建立了米根霉 R1021 的代谢网络，分析了米根霉 R1021 在分批发酵过程中不同阶段、不同氮源浓度、不同供氧量条件下的代谢通量分布，确定 PYR 是米根霉代谢网络上的关键节点，此节点的通量分配比影响着乳酸的最终产率. 在米根霉发酵中，当 NH_4NO_3 质量浓度为 2.0 g/L，空气体积流量为 2 L/min 时，流向乳酸的代谢流最大. 通过对模型进行优化计算得到 L(＋)-乳酸的最大理论得率 $Y_{P/S}$ 为 98.2%.

关键词：米根霉；L(＋)-乳酸；发酵；代谢通量分析
中图分类号：Q 933　　**文献标识码**：A

Optimization of L(＋)-Lactic Acid Fermentation by *Rhizopus oryzae* R1021 by Metabolic Flux Analysis

BAI Dong-mei[1,2]， FU Wei-ming[1]， ZHAO Xue-ming[1]， DAI Hai-xia[1]， Li Xin-gang[2]， XU Shi-min[2]
(1. School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. National Engineering Research Center for Distillation Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A detailed flux analysis of glucose metabolism for L(＋)-lactic acid production by filamentous fungus *Rhizopus oryzae* R1021 was carried out. On the basis of metabolic mechanism of *Rhizopus oryzae*, a complete metabolic network of *Rhizopus oryzae* was constructed, including glycolytic pathway, tricarboxylic acid cycle and the pathways to synthesize various kinds of precursors such as animo acids and nucleic acids. The uptake and production rates of glucose, biomass, L(＋)-lactate, malate, fumarate, ethanol, O_2 and CO_2 were measured, and fluxes through the metabolic network of *Rhizopus oryzae* were estimated by using these known experiment data. Based on the flux analysis of this system, the metabolic flux distributions were shown for different conditions. The results showed that the optimal NH_4NO_3 concentration and aeration rate were 2 g/L and 2 L/min, respectively. The theoretic yield of L(＋)-lactic acid was 98.2% by model optimization calculation.

Key words: *Rhizopus oryzae*; L(＋)-lactic acid; fermentation; metabolic flux analysis

收稿日期：2002－06－21； **修订日期**：2002－10－11.
基金项目：国家自然科学基金项目(No. 20036010)资助课题；博士点基金项目(No. 2000005622)资助课题.
作者简介：白冬梅(1972－)，女，黑龙江哈尔滨人，工学博士，博士后.

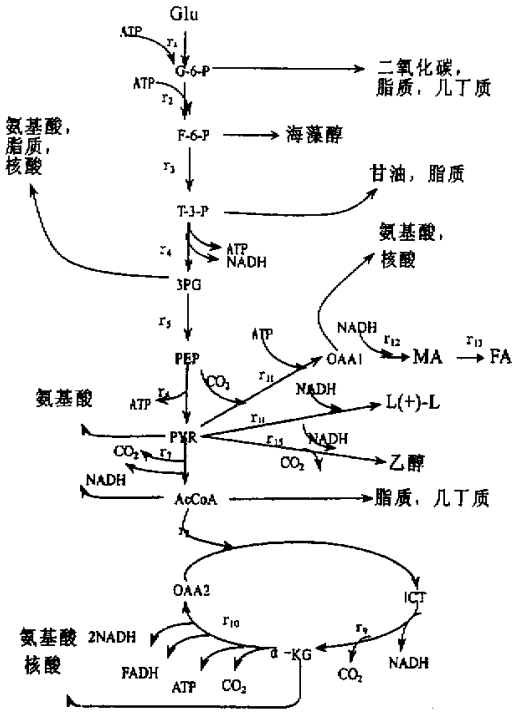
发酵过程控制的目的是得到更多的目标产物,传统的方法是通过控制环境条件使其适于细胞的生长和产物合成.而代谢工程则为人们提供了新的方法:通过基因工程技术改变代谢流,修饰、扩展和构建代谢途径,改变细胞内部代谢通量的分配,使细胞在一定条件下生成更多的产物[1].在代谢工程的基础研究中,目前应用最为广泛的方法是代谢通量分析(Metabolic flux analysis, MFA).在对细胞内生化途径完全了解的情况下,通过对不同代谢途径的通量大小和代谢通量随培养条件变化规律的研究,可以对菌株如何进行底物同化、异化以及自身优化生长等提供量化的信息,这是代谢工程改造菌体的重要理论基础[1].

L(+)-乳酸及其衍生物广泛应用于食品、医药、农业和化学工业中,尤其是近年来,人们利用乳酸聚合生产可生物降解塑料、绿色包装材料及农用薄膜,来解决日益严重的环境污染问题,引起了世界范围的广泛关注,展示了其广阔的应用前景.米根霉是生产 L(+)-乳酸的理想菌种.目前关于米根霉代谢通量模型的研究只有两篇文献报导,Wright[2,3]等研究了 Na_2CO_3 对米根霉胞内通量分布和乳酸生产的影响,确定了最适 Na_2CO_3 浓度.本研究在前人研究的基础上,结合作者关于代谢副产物的研究,构建出 *Rhizopus oryzae* R1021 利用葡萄糖进行代谢的网络图谱和代谢通量模型,分析了米根霉 R1021 在发酵的不同阶段胞内的通量分布,研究了氮源 NH_4NO_3 浓度和通气速率对胞内代谢通量分布的影响,并求算出米根霉发酵过程中乳酸的最大理论得率 $Y_{P/S}$,为发酵过程操作参数的选择提供了定量的指导.

1　米根霉的代谢通量模型

根据已有的文献报道[2~4]和相关的微生物学和生物化学[5,6]的知识,构建出米根霉菌内主要代谢网络图,如图 1 所示,包括糖酵解(EMP)反应、三羧酸循环(TCA)反应和合成菌体组分所需前体物质的途径反应.

据 Wright[2,3]报道,米根霉体内存在两个丙酮酸代谢库:一个存在于原生质内,丙酮酸分别转化为乙醇、乳酸、草酰乙酸、苹果酸和富马酸;另一个存在于线粒体内,丙酮酸转化为辅酶 A 进入三羧酸循环(TCA),产生富马酸和苹果酸.因此,胞内同时存在两个富马酸和苹果酸代谢库.Wright 经过实验证明胞外累积的苹果酸和富马酸由第一个丙酮酸代谢库产生,故模型中只包括一条丙酮酸羧化酶催化生成苹果酸和富马酸的途径.



Glu. 葡萄糖;G-6-P. 6-磷酸葡萄糖;F-6-P. 6-磷酸果糖;T-3-P. 3-磷酸甘油醛;3PG. 3-磷酸甘油酸;PEP. 磷酸烯醇式丙酮酸;PYR. 丙酮酸;L-LA. L-乳酸;MA. 苹果酸;FA. 富马酸;EtOH. 乙醇;α-KG. α-酮戊二酸;OAA. 草酰乙酸;AcCoA. 乙酰辅酶 A;ICT. 异柠檬酸;Chitin. 几丁质;Lipid. 脂;Mannitol. 海藻醇;Glycerol. 甘油.

图 1　米根霉胞内主要代谢途径

Fig. 1　The central metabolic scheme for *Rhizopus oryzae*

对于米根霉代谢网络中的各个组分,都符合质量守衡定律,对每一种组分列出质量平衡方程(略).为计算方便,代谢反应方程写成矩阵形式:

$$\mathrm{d}x/\mathrm{d}t = \boldsymbol{T}^{\mathrm{T}} \times \boldsymbol{r}$$

式中,$\boldsymbol{T}^{\mathrm{T}}$ 为代谢网络的计量系数矩阵,$\boldsymbol{r}$ 为反应速率向量,$\mathrm{d}x/\mathrm{d}t$ 包括 3 部分:一部分是底物消耗和产物合成速率,由实验测得;一部分是生物合成的前体物质,由文献中菌体组分含量数据得到;一部分是胞内中间物质,处于拟稳态,累积速率为 0.

对于米根霉发酵的代谢通量模型,共 51 个方程(方程略),57 个变量,整个方程的自由度为 6.而实验可以测得葡萄糖的比消耗速率 r_1、和菌体、L(+)-乳酸、苹果酸、富马酸、乙醇、二氧化碳的比产生速率(μ, r_{14}, r_{MA}, r_{13}, r_{15}, CER)等共 7 组数据,故此体系为超定体系,需采用最小二乘法求解.

万方数据

2 材料与方法

2.1 培养基

2.1.1 斜面培养基 PDA培养基.

2.1.2 种子培养基 组分(g/L):葡萄糖 60.0,NH_4NO_3 2.0,NaH_2PO_4 0.3,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05,$CaCO_3$ 10(单独灭菌,用于调节pH).

2.1.3 发酵培养基 组分(g/L):葡萄糖 60.0~100.0,NH_4NO_3 2.0,NaH_2PO_4 0.3,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05;pH 5.8.

2.2 培养方法

2.2.1 种子摇瓶培养 2 L的三角瓶装入150 mL种子培养基,一次性添加$CaCO_3$ 1.5 g,接种孢子浓度为3×10^6个/mL,于34 ℃,200 r/min培养22 h.

2.2.2 发酵罐发酵培养 5 L的全自动发酵罐内加入3 L发酵培养基,接种量为体积分数10%,通气体积流量1~5 L/min,罐压为0.02 MPa,搅拌速度为300 r/min,发酵过程中采用50%的NaOH自动控制pH在5.8±0.1,于34 ℃下培养28~44 h.消泡油采用多批次流加操作,以罐内出现较多泡沫为流加前提,通常一次滴加2~3滴即可. 发酵过程中对pH和温度进行控制,pH,T,溶氧DO,搅拌转速r,气速Q,入口压力P均在线测量,每4 h记录一次;尾气中氧和二氧化碳的含量每4 h测量一次;每4 h取样一次(20 mL左右),分别测量发酵液中菌体细胞、葡萄糖、L(+)-乳酸、苹果酸、富马酸和乙醇的浓度.

2.3 分析方法

2.3.1 取样 用量筒准确量取20 mL发酵液,冰浴下迅速冷却,于4 ℃,10 000 r/min离心20 min.上清液用于分析发酵液中各成分如葡萄糖浓度和有机酸浓度,沉淀经过处理后测量菌体干重.

2.3.2 细胞浓度测定 取离心所得沉淀,用蒸馏水洗净后在90~100 ℃的烘箱中烘干5 h,称重至恒重(g),细胞质量浓度(g/L)为$(W\times1000)/V$.

2.3.3 发酵液中的葡萄糖、L(+)-乳酸及微量酸的同时测定 HPLC法[7~10].

2.3.4 发酵液中微量乙醇的测定 GC法[11].

2.3.5 发酵尾气中氧和二氧化碳的定量测定 GC法.

2.4 各物质速率的计算

实验测得物质质量浓度随时间的变化数据,通过多项式拟合,获得质量浓度随时间变化的多项式,然后求导得到某种到底物消耗或产物合成的速率.

万方数据

2.5 矩阵方程求解

Excel程序[12].

3 结果与讨论

3.1 发酵过程不同阶段的代谢通量分析

米根霉R1021的L(+)-乳酸间歇发酵进程见图2.可知,乳酸的生成与细胞的生长密切相关.发酵产酸过程和菌体生长均可分为3个阶段:第一阶段为细胞生长延迟期,约8 h,此阶段内细胞处于活跃的代谢中,只是细胞分裂迟缓,产酸量很低;第二阶段为细胞的对数生长期,细胞呈几何级数增长,产酸量逐渐增大,发酵液中糖质量浓度迅速下降;第三阶段为细胞生长稳定期.当发酵28 h后,细胞生长达到最大,趋于稳定,产酸量的增长速度下降,至32 h达到稳定值,此时残糖质量浓度降至2 g/L以下.

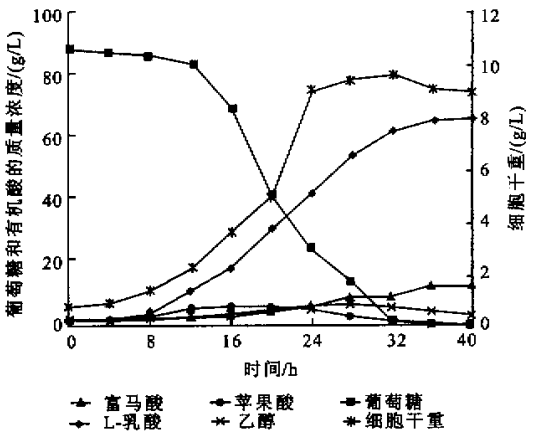


图2 米根霉R1021的L(+)-乳酸间歇发酵进程

Fig.2 The L(+)-Lactic acid batch fermentation by *Rhizopus oryzae* R1021

选取细胞生长和发酵产酸的3个时期,即第6,20,32 h的实验数据(见表1),代入通量模型中求解,通量分布结果如图3所示.

3.2 氮源质量浓度对米根霉胞内通量分布的影响

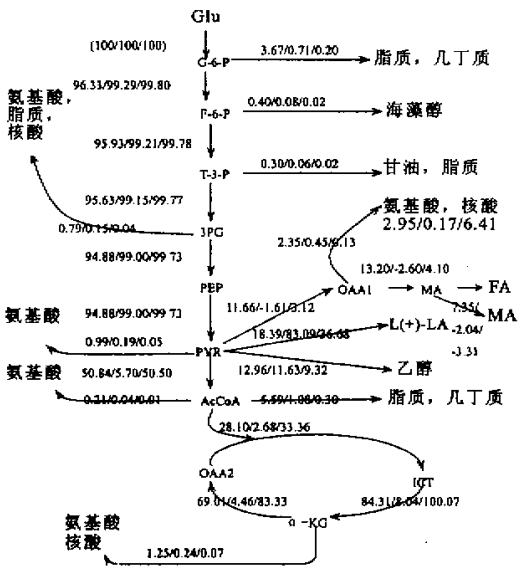
发酵培养基中氮源的种类及其质量浓度对发酵过程有重要的影响,早期研究仅注重其对发酵最终结果的影响而对发酵过程及菌内代谢变化的影响缺乏深入分析.作者从培养基中的主要成分氮源出发,以米根霉R1021为菌种,应用代谢通量分析法,研究了氮源质量浓度对胞内代谢方式的影响.

以发酵培养基为基础,加入不同浓度的NH_4NO_3进行间歇发酵培养,分别取发酵20 h的数据(略)代入米根霉的通量模型进行计算,其通量分布结果如图4所示.

表 1　米根霉 R1021L(+)间歇发酵过程的比速率值(mmol/(gDCW·h))

Tab.1　The specific rates for L(+)-Lactic acid ferment process by *Rhizopus oryzae* R1021 (mmol/(gDCW·h))

t/h	r_1	r_{14}	r_{MA}	r_{13}	r_{15}	CER	μ
6	1.4573	0.5008	0.2011	0.0808	0.3548	3.6998	0.1667
20	7.8401	12.632	−0.3149	0.0253	1.7892	4.1921	0.1826
32	0.7658	0.6226	−0.0543	0.1062	0.1541	2.6987	0.0054



图中数据从左至右分别为发酵 6,20,32 h 的代谢通量值(mmolC/(gDCW·h))

Glu.葡萄糖;G-6-P. 6-磷酸葡萄糖;F-6-P. 6-磷酸果糖;T-3-P. 3-磷酸甘油醛;3PG. 3-磷酸甘油酸;PEP. 磷酸烯醇式丙酮酸;PYR. 丙酮酸;L-LA. L-乳酸;MA. 苹果酸;FA. 富马酸;EtOH. 乙醇;α-KG. α-酮戊二酸;OAA. 草酰乙酸;AcCoA. 乙酰辅酶 A;ICT. 异柠檬酸;Chitin. 几丁质;Lipid. 脂;Mannitol. 海藻醇;Glycerol. 甘油.

图 3　米根霉 R1021 间歇发酵不同时刻的代谢通量分布

Fig. 3　Metabolic flux distribution of *Rhizopus oryzae* R1021 in batch fermentation

由图 4 不同氮源浓度下间歇发酵过程的通量值比较可知,当培养基中氮源 NH_4NO_3 的质量浓度由1.0 g/L 提高到 4.0 g/L 时,生成 L(+)-乳酸的代谢流减少了 16.08%,分别是 85.75%,83.09%,77.94%,71.96%,而生成菌体的代谢流增加了 22.47%.这说明氮源浓度增高时,菌体生长速度加快,培养基中的葡萄糖用于菌体生长及维持增多,而用于产酸的葡萄糖相应减少.因此菌体生长存在一最佳的速率使得乳酸的产生速率达最大.考虑菌体生长与产酸的相关性,并结合不同氮源浓度下的产酸结果,确定 2.0 g/L 的 NH_4NO_3 质量浓度为最佳氮源浓度.

3.3　通气量对米根霉胞内通量分布的影响

根据前面的分析,米根霉代谢网络模型上的关键节点是 PYR,氧的存在与否以及氧的多少极大地影响着 PYR 节点上各分支途径上酶的活性,影响着 PYR 处通量分配比的变化,进而极大地影响着 L(+)-乳酸的最终产率.缺氧条件下,PYR 经脱羧、还原生成乙醇而非 L(+)-乳酸;有氧条件下,分子氧与 PYR 竞争 H,抑制 PYR 作为 H 的受体,导致 PYR 还原产物——L(+)-乳酸产率降低.所以米根霉发酵过程中供氧量是一个重要的参数,影响着米根霉胞内通量的分布.发酵过程中控制不同的通气量,取发酵 20 h 的速率数据计算不同通气量条件下米根霉胞内通量分布,结果表明:当通气体积流量变化后,无论是细胞组分还是产物的合成通量都产生了极大的变化,其中 EMP 途径的通量改变不大,而 PYR 之后的代谢流重新分配,变化较大.通气量过大或过小,乳酸的速率都会变小.当通气体积流量为 1 L/min 时,米根霉的厌氧代谢增加,乙醇与乳酸的代谢流之比达到 0.67,而在 2 L/min 时仅为 0.14;当通气量为 4 L/min 时,米根霉的好氧代谢增加,乙醇的速率变化不大,而苹果酸和富马酸的速率分别提高了 0.9 和 3.8 倍.分析表明,一方面分子氧与 PYR 竞争 H,抑制 PYR 作为 H 的受体,导致 PYR 还原物 L(+)-乳酸产率降低,另一方面由于细胞质内丙酮酸羧化酶需 CO_2 作为底物,而此时供氧量充足,菌体呼吸旺盛,三羧酸循环通量提高,产生了大量 CO_2,使 PYR 在丙酮酸羧化酶的作用下产生了大量 OAA,进一步生成苹果酸和富马酸,这与 Longacre 的研究[3]一致.

3.4　L(+)-乳酸的最大理论得率

假定在没有菌体生长和多余副产物时,碳源以最大可能转化为目标产物,此时的得率称为理论得率($Y_{P/S}$).根据前面所建的模型方程,在最大的 $Y_{P/S}$ 下,考虑菌体的维持[9],满足方程:$r_1 = 7.46$,$\mu = 0$,$r_{MA} = 0$,$r_{13} = 0$,$r_{15} = 0$,求解得到最大理论得率 $Y_{P/S} = 98.2\%$,接近乳酸细菌的同型发酵水平.文献上的理论得率 75%[14]由反应式:

$$2C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3C_3H_6O_3 + C_2H_5OH + CO_2$$

万方数据

得到,2 分子葡萄糖生成了 3 分子乳酸和 1 分子乙醇.而此处的最大理论得率考虑所有的副产物的产量均为 0 得到.近几年随着许多学者对米根霉发酵乳酸的菌种、工艺的研究,乳酸的产率已经达到 88%[15],远远超过了 75%,所以这里由代谢通量分析得出的最大理论得率 $Y_{P/S}=98.2\%$ 具有一定的意义.

4 结 语

1)根据米根霉的生物化学信息以及前人对米根霉生理学的研究建立了米根霉胞内代谢网络模型,然后结合菌体的组成信息建立了详细的米根霉胞内代谢反应的计量学模型.分析了出发菌株 R1021 在分批发酵过程中的不同阶段通量分布情况,确定 PYR 是米根霉代谢网络上的关键节点,此节点的分配比影响着乳酸的最终产率;米根霉在发酵过程中,存在一最佳的生长速率,此时乳酸的产生速率最大.

2)分析了米根霉 R1021 在不同氮源质量浓度下和不同通气量情况下的通量分布情况,表明氮源和供氧量影响着米根霉菌体的生长和产酸,而在米根霉的乳酸发酵过程中,存在一最佳的生长速率,当 NH_4NO_3 质量浓度为 2 g/L,通气体积流量为 2 L/min时,乳酸的产率最高.

3)通过对模型进行优化计算得到 L(+)-乳酸的最大理论得率 $Y_{P/S}$为 98.2%.

参考文献:

[1] BAILEY J E. Toward a science of metabolic engineering[J]. **Science**, 1991, 252:1668-1681.

[2] WRIGHT B E, LONGACRE A, REIMERS J. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*[J]. **J theor Biol**, 1996, 182:453-457.

[3] LONGACRE A, REIMERS J M, GANNON J E, *et al*. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhzopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields[J]. **J theor Biol**, 1997, 21:30-39.

[4] PEDERSEN H, MORTEN C, NIELSEN J. Identification of enzymes and quantification of metabolic fluxes in the wild type and in a recombinant Aspergillus oryzae strain[J]. **Applied Environmental Microbiology**, 1999, 65:11-19.

[5] 武汉大学、复旦大学生物系微生物学教研室. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 1987.

[6] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 1991.

[7] 白冬梅, 班睿, 赵学明. 反相高效液相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中的乳酸[J]. 色谱, 2000, 18(6):527-528.

[8] 白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 高效液相色谱手性流动相添加剂分离乳酸对映体[J]. 分析化学, 2001, 29(4):413-415.

[9] 白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 高效液相色谱法测定米根霉乳酸发酵液中乳酸的光学纯度[J]. 色谱, 2001,19(1):1-3.

[10] 白冬梅, 赵学明, 胡宗定. 反相 HPLC 双检测器法同时测定米根霉乳酸发酵液中的有机酸与葡萄糖[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(1):13-17.

[11] 袁卫锋, 班睿, 赵学明. 气相色谱法测定乳酸发酵液中的微量乙醇[A]. 第九届全国生物化工学术会议,天津, 2000.

[12] 马红武,赵学明,迟万忠.应用 Excel 处理生化过程数据[J].计算机与应用化学,1998,15(6):352-356.

[13] VALLINO J J, STEPHANOPOULOS G. Metabolic flux distributions in Corynebaxterium glutamicum during growth and lysine overprodution[J]. **Biotechnol Bioeng**, 1993, 41:633-646.

[14] 曹本昌, 徐建林, 匡群. L-乳酸研究综述[J]. 食品与发酵工业, 1993,(3):56-61.

[15] ZHOU Y, DOMINGGUEZ J M, CAO N J. Optimization of L(+)-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311[J]. **Applied Biochem Biotech**, 1999, 77~79:401-407.

(责任编辑 李春丽)

万方数据