

— 亚麻酸代谢途径模型中关键节点的分析

刘秀杰, 李柏林, 欧杰*, 徐焰
(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘要: 本文建立了 ω -亚麻酸的代谢途径模型, 初步应用该模型求解 ω -亚麻酸生物合成过程中不同时期的代谢流量分配, 详细分析了各时期代谢流量分配发生改变的原因, 并探讨 ω -亚麻酸累积的机理。分析得到 G6P、丙酮酸和乙酰 CoA 节点是控制代谢流分布的关键节点。并且通过添加缓冲剂醋酸钠调节乙酰 CoA 节点提高 ω -亚麻酸代谢流量。

关键词: 代谢通量; ω -亚麻酸; 生物合成

Analysis of Key Nodes in Metabolic Pathway Model of ω -Linolenic Acid

LIU Xiu-jie, LI Bai-lin, OU Jie*, XU Yan
(College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: A metabolic pathway model of ω -linolenic acid was constructed in this paper. On the basis of the model, metabolic flux distributions of ω -linolenic acid biosynthesis at different fermentation stages and the reasons of the changes were analyzed. The analysis showed that the key nodes of the metabolic control were G6P, PYR and AcCoA. The metabolic flux of ω -linolenic acid could be increased by adding NaAc which could adjust the AcCoA node.

Key words: metabolic flux; ω -linolenic acid; biosynthesis

中图分类号: 0815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)12-0188-03

ω -亚麻酸(ω -linolenic acid, GLA), 是人体必需脂肪酸之一。GLA 可衍生成二高 ω -亚麻酸(DHGLA), 它是前列腺素 PG-I 的前体, 也是花生四烯酸(AA)和前列腺素 PG-II 的来源。GLA 直接参与人体内的一系列代谢和生物合成的过程, 参与细胞膜的组成、调节细胞的生理生化活性等一系列作用^[1,2]。

流量平衡模型^[3~5]是建立在拟稳态假设和质量守恒定律基础上的。建立流量平衡模型首先应当用化学计量平衡式来表达代谢网络中的各步生化反应; 其次还要知道在代谢体系中的实际需求问题, 包括菌体合成、维持需求或是某特定产物的累积。这些信息比以往的动力学表达式容易得到。流量平衡模型把代谢流量作为有待求解的未知量, 在细胞代谢途径酶动力学信息不清楚的情况下, 通过 MFA 的质量平衡原理就可以得到关于潜在代谢网络的重要信息^[6]。

1 ω -亚麻酸代谢通量模型的建立

综合各种文献资料^[7,8], 本文基于以下原则或假设建立代谢网络: (1) 细胞处于非生长时期或细胞浓度变化不

大可以忽略; (2) 细胞代谢过程中不存在乙醛酸循环; (3) NADPH 供需平衡, 即反应途径中消耗的 NADPH 与 HMP 途径、TCA 循环产生的 NADPH 总数相等; (4) 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。

考虑经由 K 个途径代谢物进行的 J 个胞内反应, 其质量平衡式给出, 或以向量符号表示为^[9]:

$$dX_{\text{met}}/dt = r_{\text{met}} - \mu X_{\text{met}}$$

X_{met} 是胞内代谢物(或途径中间物)的浓度向量, r_{met} 是一个包含在 J 个反应中的胞内代谢物形成净速率的向量。

因为大部分途径代谢物的胞内水平是非常低的, 所以最后一项一般可被忽略, 于是得到简单的平衡式:

$$0 = r_{\text{met}} - G^T V$$

该代谢网络主要包括糖酵解途径、磷酸己糖途径、三羧酸循环和代谢产物积累四个部分:

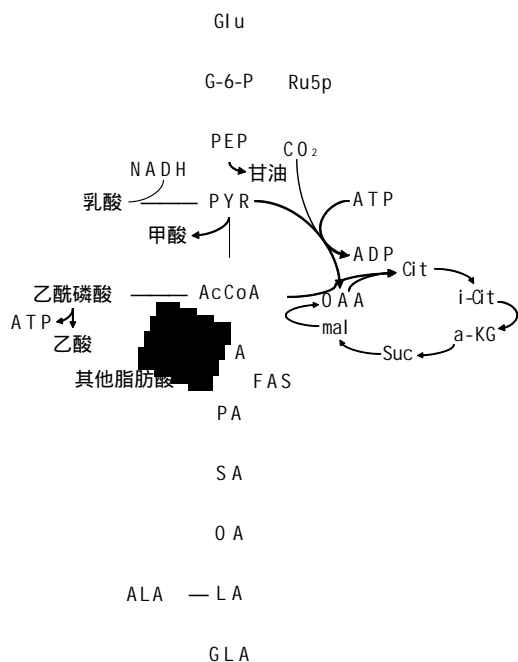
(1) 糖酵解途径(EMP): 主要是将葡萄糖分解为丙酮酸; (2) 磷酸己糖途径(HMP): 主要是在糖代谢中为细胞生长和产物合成提供前体和还原力; (3) 三羧酸循环途径

收稿日期: 2006-07-10

*通讯作者

基金项目: 上海市重点学科建设项目(T1102)

作者简介: 刘秀杰(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。



Glu—葡萄糖; G-6-P—6-磷酸葡萄糖; Ru5p—5-磷酸核酮糖; PEP—磷酸烯醇式丙酮酸; PYR—丙酮酸; AcCoA—乙酰辅酶A; OAA—草酰乙酸; Cit—柠檬酸; i-Cit—异柠檬酸; a-KG—α-酮戊二酸; Suc—琥珀酸; MA—十四酸; PA—棕榈酸; OA—油酸; LA—亚油酸; GLA—γ-亚麻酸; ALA—α-亚麻酸。

图2 γ-亚麻酸生物合成途径网络简图^[10]

Fig.2 The metabolic network of γ-linolenic acid^[10]

(TCA): 除为合成提供前体外, 三羧酸循环主要作用是提供能量; (4) 代谢物积累途径: 主要是有机酸和脂肪酸等的积累。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌种

深黄被孢霉 (*Mortierella isabellina*) AS 3.3410。

2.1.2 培养基

斜面培养: PDA。

种子培养基: 葡萄糖 8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, NaCl 0.1%, 蛋白胨 0.1%, 酵母膏 0.4%。

发酵培养基: 葡萄糖 8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, NaCl 0.05%, 酵母膏 0.2%。

2.1.3 培养条件

种子: 装液量 20% (50ml/250ml), 于 28℃, 180r/min 振荡培养 2d。

发酵: 5L 发酵罐, 接种量 5%, 装液量 4.0L, 于 28℃, 气液比 1.0, 搅拌转速 400r/min, 发酵 120h 左右。

2.2 方法

2.2.1 菌量测定 抽滤的菌丝体漂洗后, 于 60℃ 烘至恒重后测量重量。

2.2.2 葡萄糖测定 DNS 法。

2.2.3 NH_4^+ 测定 改进的靛酚蓝比色法。

2.2.4 总油脂 索氏抽提法。

2.2.5 油脂样品处理方法 取一定量的油脂, 加入 3~4ml 的 KOH-甲醇液 (0.5N KOH) 3~4ml, 充 N_2 , 于 65℃ 水浴 20~25min 进行皂化, 冷却后加入 2ml BF_3 -甲醇液 (14%), 65℃ 水浴 5~10min, 冷却后加入足量的饱和食盐水和 1ml 正己烷振荡, 静置分层后取上层正己烷相进样。

2.2.6 脂肪酸测定 GC 测定, Agilent 6890A plus, 色谱柱 HP-5 (5%) - 二苯基聚硅氧烷共聚物色谱柱 (30m × 250μm × 0.25μm), 流速 1ml/min, FID 检测器。

2.2.7 有机酸样品处理方法 取一定量发酵液过滤, 将滤液冷冻保存备用。分析时取发酵液以 5000r/min 离心 15min, 上清液用 0.45μm 的膜过滤后进样。

2.2.8 有机酸测定 HPLC 测定, Agilent 1100 液相色谱仪, 色谱柱 Zorbax-SB-C₁₈ (5μm, 4.6 × 150mm), 流动相: 磷酸二氢铵 (用 H_3PO_4 调节 pH 至 3.0), 流速 1ml/min, 柱温 35℃, 检测波长 210nm, DAD 检测器。

2.2.9 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, 然后求导得到某时刻底物消耗或产物合成的速率。

3 结果与分析

3.1 γ-亚麻酸发酵不同阶段代谢通量分析

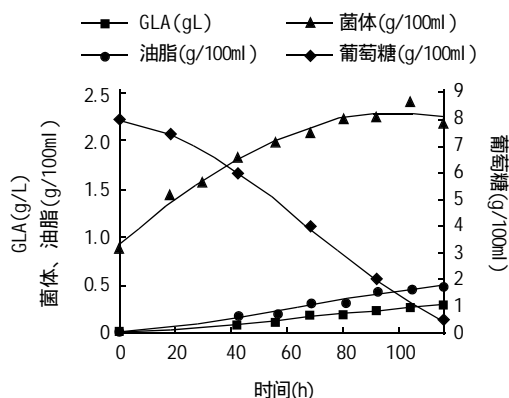


图3 γ-亚麻酸生物合成过程

Fig.3 The biosynthetic process of γ-linolenic acid

发酵过程中 γ-亚麻酸发酵进程见图 3 可知, 根据菌株的培养条件进行实验得到发酵过程中菌体浓度、葡

葡萄糖浓度、油脂浓度、 γ -亚麻酸生成浓度随时间的变化的速率曲线。 γ -亚麻酸的生成与细胞的生长相关。根据底物消耗、菌体生长以及代谢情况,可以看到5L罐发酵到72h后进入菌体生长后期,针对48和86h代谢浓度计算速率代入通量模型中求解,通量分布结果如图4所示。

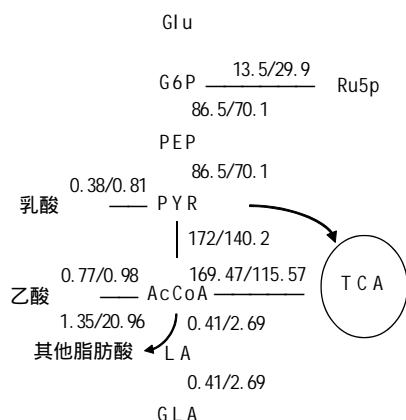


图4 发酵48和86h代谢通量简图
Fig.4 The metabolic flux diagram of fermentation for 48 and 86h

在86h流入Ru5p的流量增加推测是由于在48h EMP途径和TCA途径的通量都较大,此时细胞量和GLA形成还比较少,有机酸也有一些积累,由TCA循环所提供的NADH已足够提供细胞生长所需的前体和能量而不需由HMP途径提供细胞合成前体物质,相应的HMP流量非常低。48h左右HMP途径的流量得到加强,流向GLA和其他脂肪酸的流量也有较大幅度的上升,这也可从5L罐菌体-油量-GLA关系图得出油脂的积累得到证实。这可能是由于HMP途径的增强,使提供NADPH的量相应增加,增强了脂肪酸合成的前体,所以有助于不饱和脂肪酸产量的提高。

随着发酵时间的增加,86h左右流入乙酰CoA的流量的代谢流量是48h左右的0.51倍,90h左右流入TCA的流量是45h左右流量的0.37倍。在86h左右,TCA的流量比48h左右低,推测是由于菌体不断生长,TCA提供的能量已不能满足菌体生长的需求,相应地菌体活力逐渐降低,从而流入TCA途径的碳源流量相应降低。同时菌体由于维持代谢也可能利用所生成的有机酸,也会导致发酵液的pH回升。在48h左右流入GLA和其他脂肪酸的碳代谢流增加,使脂肪酸得到积累。

通过代谢流分布分析可以得出:G6P、丙酮酸和乙

酰CoA节点的代谢流分布变化较大,是控制代谢流分布的关键节点,它们分别表征了HMP途径、EMP途径、脂肪酸合成途径和TCA途径的代谢流的分配。

3.2 缓冲剂对深黄被孢霉胞内代谢通量的影响

乙酰CoA是合成GLA的关键节点,因此他的积累有利于GLA的合成。加入一定的缓冲剂可以延长菌体处于较适pH的时间,增加乙酰CoA的积累,促使更多的乙酰CoA转化成GLA。在培养基中含有0.3%醋酸钠时,其总脂肪值以及GLA的代谢支路的流量有显著的提高,推测醋酸钠还可在胞内经磷酸激酶转化为乙酰CoA,而乙酰CoA是脂肪酸合成和能量代谢的重要前体。可能对深黄被孢霉合成GLA中的 γ -和 ω -脂肪酸脱氢酶活性有较明显的增强作用。

4 结 论

根据GLA生物合成的生物化学信息以及前人对深黄被孢霉生理学的研究建立了GLA生物合成网络模型。分析了出发菌株AS 3.3410在分批发酵过程中的不同阶段通量分布情况,确定G6P、丙酮酸和乙酰CoA节点是米根霉代谢网络上的关键节点。乙酰CoA是合成GLA的关键节点,0.3%醋酸钠时,其总脂肪值以及GLA的代谢支路的流量有显著的提高。

参考文献:

- [1] 林峰,等. γ -亚麻酸及其研究和应用[J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(5): 263-267.
- [2] 董杰明,等. γ -亚麻酸的保健作用[J]. 卫生研究, 2003, 32(3): 299-301.
- [3] Wolfgang Wiechert. ^{13}C metabolic flux analysis[J]. Metabolic Engineering, 2001, (3): 195-206.
- [4] K Lee, F Berthiaume, GN Stephanopoulos, et al. Metabolic flux analysis: a powerful tool for monitoring tissue function[J]. Tissue Eng, 1999, 5 (4): 347-368.
- [5] Gregory Stephanopoulos, Joseph J Vallino. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction[J]. Science, 1991, 252: 1675-1680.
- [6] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering[J]. Science, 1991, 252: 1668-1674.
- [7] 沈同. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1994. 78-278.
- [8] Walsh K, Koshland D E. Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase[J]. J Biol Chem, 1985, 260: 8430-8437.
- [9] 斯蒂芬 那保罗. 代谢工程[M]. 赵学明, 白冬梅, 等译. 北京: 化学工业出版社, 2003. 182-190.
- [10] Alonso D L, et al. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids[J]. Biotechnol Adv, 2000, 18(6): 481-497.