

氧化还原电位调控对钝齿棒杆菌代谢通量分布的影响

陈小举^{1,2}, 操新民², 姜绍通², 李兴江^{2,*}

(1.巢湖学院化学与材料工程学院, 安徽 巢湖 238000; 2.合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 研究不同氧化还原电位对钝齿棒杆菌厌氧发酵特性的影响, 并对菌株的代谢通量分布特征进行了分析。结果表明, 氧化还原电位由-56 mV降为-400 mV时, 发酵液中琥珀酸质量浓度由14 g/L上升为20.2 g/L, 乳酸质量浓度由44.9 g/L下降为35.2 g/L。代谢通量分析结果表明, 降低氧化还原电位对6-磷酸葡萄糖与磷酸烯醇式丙酮酸节点处的代谢流分布影响显著。氧化还原电位为-400 mV时, 胞内戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway, HMP)代谢通量与-56 mV相比增加了1.74倍, 由磷酸烯醇式丙酮酸流向C4途径的代谢通量与-56 mV相比增加了78%, 琥珀酸通量由31.73 mmol/(L·g·h)增加到56.53 mmol/(L·g·h), 乳酸代谢通量由159.73 mmol/(L·g·h)下降为133.50 mmol/(L·g·h)。研究结果表明6-磷酸葡萄糖与磷酸烯醇式丙酮酸节点是影响钝齿棒杆菌厌氧发酵产琥珀酸的关键节点, 为后期通过菌种改造以调节乳酸和琥珀酸的生成比、实现乳酸与琥珀酸联产奠定了基础。

关键词: 钝齿棒杆菌; 氧化还原电位; 代谢通量分析; 厌氧发酵

Effect of Redox Potential Regulation on Metabolic Flux Distribution of *Corynebacterium crenatum*

CHEN Xiaojun^{1,2}, CAO Xinmin², JIANG Shaotong², LI Xingjiang^{2,*}

(1. College of Chemistry and Material Engineering, Chaohu University, Chaohu 238000, China;

2. College of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: For the co-production of lactic acid and succinic acid, the effect of redox potential regulation on the fermentation process of *Corynebacterium crenatum* was studied and the metabolic flux distribution was also analyzed. When the redox potential level was changed from -56 to -400 mV, the concentration of succinic acid in the fermented broth increased from 14 to 20.2 g/L; meanwhile, the concentration of lactic acid decreased from 44.9 to 35.2 g/L. The results of metabolic flux analysis indicated the metabolic flux distribution at the glucose 6-phosphate and phosphoenolpyruvate nodes were affected significantly. Compared with the value obtained at -56 mV, the flux of pentose phosphate pathway (HMP) pathway increased by 2.74 fold and the flux from phosphoenolpyruvate to oxaloacetate increased by 78%. As a result, the flux of succinic acid increased from 31.73 to 56.53 mmol/(L·g·h) and the flux of lactic acid decreased from 159.73 to 133.50 mmol/(L·g·h). The results of this study demonstrated that glucose 6-phosphate and phosphoenolpyruvate were the key nodes that could affect the production of succinic acid by *C. crenatum* fermentation under anaerobic conditions, which has contributed to the co-production of lactic acid and succinic acid by manipulating wild-type *C. crenatum* to change the ratio of succinic acid/lactic acid through metabolic engineering.

Key words: *Corynebacterium crenatum*; redox potential; metabolic flux analysis; anaerobic fermentation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609031

中图分类号: Q812

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 09-0165-05

引文格式:

陈小举, 操新民, 姜绍通, 等. 氧化还原电位调控对钝齿棒杆菌代谢通量分布的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 165-169.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609031. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Xiaojun, CAO Xinmin, JIANG Shaotong, et al. Effect of redox potential regulation on metabolic flux distribution of *Corynebacterium crenatum*[J]. Food Science, 2016, 37(9): 165-169. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201609031. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31470002); 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2015A216);

巢湖学院科研启动项目(KYQD-201402)

作者简介: 陈小举(1984—), 男, 博士研究生, 研究方向为生物资源综合利用。E-mail: chenxiaojun2012@hotmail.com

*通信作者: 李兴江(1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品发酵工程。E-mail: lixingjiang1978@hfut.edu.cn

琥珀酸与乳酸是广泛用于食品行业的有机酸^[1-3]。鉴于食品安全,食品产业中所用的琥珀酸与乳酸多是通过发酵法生产的,这使得发酵法制备琥珀酸与乳酸具有十分广阔的市场前景。

钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)发酵产精氨酸时,属于有氧发酵过程^[4]。许虹等^[5]研究发现,供氧水平对钝齿棒杆菌胞内的代谢流分布影响较大。将钝齿棒杆菌于无氧条件下培养时,琥珀酸与乳酸是其主要产物,但70%左右的葡萄糖会转化为乳酸,而琥珀酸的产量相对较低,不利于乳酸和琥珀酸的联产^[6-7]。

由3-磷酸甘油醛生成磷酸烯醇式丙酮酸的过程伴随1分子H还原力的释放,理论上仅满足由草酰乙酸至苹果酸或者由富马酸至琥珀酸所需的还原力,即:糖酵解途径所产生的还原力仅满足制备琥珀酸所需还原力的50%。因此,如果要继续提高琥珀酸产量,增加微生物胞内的H还原力水平是比较有效的方法之一。如Zheng Pu等^[8]利用基因组改组技术得到菌株*Actinobacillus succinogenes* F3-II-3-F,该菌株产琥珀酸的能力提高了73%,代谢通量分析结果显示该菌株胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)通量增加是导致琥珀酸产量升高的主要原因。向发酵培养基中添加电子供体或电子受体来改变胞内的氧化还原电势可以用于调控胞内的H还原力水平,从而影响到微生物的代谢特征。如Li Jian^[9]、姜岷^[10]等利用铁氰化钾和二硫苏糖醇控制*A. succinogenes*厌氧发酵产琥珀酸时的氧化还原电位水平,实现了对胞内NADH/NAD⁺比的调控,使琥珀酸生产速率由0.75 g/(L·h)提高到1.18 g/(L·h)。

秦义等^[11]认为,在采用基因工程改造代谢网络时,要准确分析微生物代谢网络的结构和特征,以便对其进行定向改造。代谢通量分析是代谢工程研究领域中的一种重要研究方法^[12],通过通量分析可以找到对目的产物影响较大的关键节点或者确定整个代谢过程中具有特殊地位的途径或反应。本实验拟通过调控发酵培养基的氧化还原电位水平,对菌株在不同氧化还原电位水平下的代谢通量进行分析,考察不同氧化还原电位对钝齿棒杆菌代谢流分布的影响,找出可以提高琥珀酸产量的关键节点,这对于后期通过改造菌种、优化发酵过程以调节乳酸和琥珀酸的生成比,实现乳酸与琥珀酸联产具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

钝齿棒杆菌 CICC20219,购于中国工业微生物保藏中心,合肥工业大学农产品加工重点实验室保藏。

1.1.2 培养基

菌株增殖培养基:葡萄糖40 g/L、尿素2 g/L、酵母浸粉2 g/L、酪蛋白氨基酸7 g/L、硫酸铵7 g/L、磷酸二氢钾0.5 g/L、磷酸氢二钾0.5 g/L、硫酸镁0.5 g/L、硫酸亚铁6 mg/L、硫酸锰4.2 mg/L、生物素0.2 mg/L、硫胺素0.2 mg/L, pH 7.0,于0.1 MPa灭菌15 min。

发酵培养基:葡萄糖80 g/L、磷酸二氢钾0.5 g/L、磷酸氢二钾0.5 g/L、硫酸镁0.5 g/L、硫酸亚铁6 mg/L、硫酸锰4.2 mg/L、生物素0.2 mg/L、硫胺素0.2 mg/L, pH 7.0,于0.1 MPa灭菌15 min。

1.2 方法

1.2.1 培养方法

1.2.1.1 有氧培养富集菌体

将单菌落钝齿棒杆菌接种于含30 mL增殖培养基的250 mL摇瓶中,30℃、200 r/min培养12 h以制备种子。吸取5 mL种子液接种于含150 mL增殖培养基的摇瓶中,在30℃、200 r/min的条件下培养10 h,使生物量大量增加,然后将培养液于5 000 r/min、4℃离心10 min收集菌体。

1.2.1.2 厌氧发酵产有机酸

将收集的菌体接种于含1.5 L发酵培养基的3 L发酵罐中,每罐生物量干质量浓度平均为5 g/L左右。通入CO₂,持续5 min后停止通入任何气体,密封发酵罐,于30℃、150 r/min进行厌氧发酵,pH值为7.0,中和剂为MgCO₃。每组实验均重复3次。

1.2.2 氧化还原电位控制

K₃Fe(CN)₆与Na₂S·7H₂O分别作为氧化剂与还原剂。发酵开始后,通过添加1 g/L的K₃Fe(CN)₆与10 mg/L的Na₂S·7H₂O分别将发酵液的氧化还原电位控制在原始水平(-56 mV)、-200 mV与-400 mV这3种水平。发酵过程中,当发酵液的氧化还原电位水平与最初设定的水平相差超过5 mV时,通过人工流加K₃Fe(CN)₆与Na₂S·7H₂O将其维持在设定水平。

1.2.3 代谢通量分析

代谢网络构建方法如文献[13]所述,主要包括糖酵解(embden meyerhof parna, EMP)途径、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, HMP) C4(由草酰乙酸到琥珀酸)途径及乙醛酸循环。整个代谢网络包含27个代谢反应(表1),其中第27号方程为维持细胞代谢的ATP消耗。钝齿棒杆菌在厌氧培养时不再增殖,其生物量变化很小,因此在通量计算过程中可以忽略生物量对代谢分布的影响^[6-7]。如表2所示,中间代谢物为23个,据此列出的代谢通量方程为27个(表1),即变量数与代谢方程数分别为23与27,由此可知方程自由度为4,需测定4个变量才能对方程求解。本研究可离线精确检测4个变量,分别是葡萄糖消耗速率及乳酸、琥珀酸和乙酸的生成速率,可检测变量与自由度相等,表明代谢方程可求解。

表1 厌氧条件下钝齿棒杆菌的代谢反应
Table 1 Metabolic reactions of *C. crenatum* under anaerobic conditions

通量	代谢反应
J_1	葡萄糖+ATP→6-磷酸葡萄糖+ADP
J_2	6-磷酸葡萄糖→6-磷酸果糖
J_3	6-磷酸果糖+ATP→1,6-二磷酸果糖+ADP
J_4	1,6-二磷酸果糖→3-磷酸甘油醛
J_5	3-磷酸甘油醛+NAD ⁺ →1,3-二磷酸甘油酸+NADH
J_6	1,3-二磷酸甘油酸+ADP+Pi→磷酸烯醇式丙酮酸+ATP
J_7	磷酸烯醇式丙酮酸+ADP→丙酮酸+ATP
J_8	丙酮酸+NAD ⁺ +辅酶A→乙酰辅酶A+CO ₂ +NADH+H ⁺
J_9	6-磷酸葡萄糖+NADP ⁺ +H ₂ O→6-磷酸葡萄糖酸+NADPH+H ⁺
J_{10}	6-磷酸葡萄糖酸+NADP ⁺ +H ₂ O→5-磷酸核酮糖+CO ₂ +NADPH+H ⁺
J_{11}	5-磷酸核酮糖→5-磷酸核糖
J_{12}	5-磷酸核糖→5-磷酸木酮糖
J_{13}	5-磷酸核糖+5-磷酸木酮糖→3-磷酸甘油醛+7-磷酸景天酮糖
J_{14}	3-磷酸甘油醛+7-磷酸景天酮糖→6-磷酸果糖+4-磷酸赤藓糖
J_{15}	5-磷酸木酮糖+4-磷酸赤藓糖→6-磷酸果糖+3-磷酸甘油醛
J_{16}	丙酮酸+NADH+H ⁺ →乳酸+NAD ⁺
J_{17}	乙酰辅酶A+ADP+Pi→乙酸+辅酶A+ATP
J_{18}	草酰乙酸+乙酰辅酶A+H ₂ O→柠檬酸+辅酶A
J_{19}	乙醛酸+乙酰辅酶A+H ₂ O→苹果酸+辅酶A
J_{20}	柠檬酸→异柠檬酸
J_{21}	异柠檬酸→乙醛酸+琥珀酸
J_{22}	磷酸烯醇式丙酮酸+CO ₂ +H ₂ O→草酰乙酸+Pi
J_{23}	草酰乙酸+NADH+H ⁺ →苹果酸+NAD ⁺
J_{24}	苹果酸→富马酸+H ₂ O
J_{25}	富马酸+NADH+H ⁺ →琥珀酸+NAD ⁺
J_{26}	琥珀酸(胞内)→琥珀酸(胞外)
J_{27}	ATP→ADP+Pi

表2 代谢通量方程
Table 2 Equations from metabolic flux balance

编号	代谢中间体	代谢平衡方程
1	6-磷酸葡萄糖	$J_1 - J_2 - J_9 = 0$
2	6-磷酸果糖	$J_2 - J_3 + J_{14} + J_{15} = 0$
3	1,6-二磷酸果糖	$J_3 - J_4 = 0$
4	3-磷酸甘油醛	$2J_4 - J_5 + J_{13} - J_{14} + J_{15} = 0$
5	1,3-二磷酸甘油酸	$J_5 - J_6 = 0$
6	磷酸烯醇式丙酮酸	$J_6 - J_7 - J_{22} = 0$
7	丙酮酸	$J_7 - J_8 - J_{16} = 0$
8	乙酰辅酶A	$J_8 - J_{17} - J_{18} - J_{19} = 0$
9	6-磷酸葡萄糖酸	$J_{10} - J_9 = 0$
10	5-磷酸核酮糖	$J_{10} - J_{11} - J_{12} = 0$
11	5-磷酸核糖	$J_{13} - J_{11} = 0$
12	5-磷酸木酮糖	$J_{12} - J_{13} - J_{15} = 0$
13	7-磷酸景天酮糖	$J_{13} - J_{14} = 0$
14	4-磷酸赤藓糖	$J_{14} - J_{15} = 0$
15	柠檬酸	$J_{20} - J_{18} = 0$
16	异柠檬酸	$J_{21} - J_{20} = 0$
17	乙醛酸	$J_{19} - J_{21} = 0$
18	草酰乙酸	$J_{22} - J_{18} - J_{23} = 0$
19	苹果酸	$J_{23} + J_{19} - J_{24} = 0$
20	富马酸	$J_{24} - J_{25} = 0$
21	琥珀酸	$J_{26} - J_{25} - J_{21} = 0$
22	H平衡	$J_5 + J_8 + J_9 + J_{10} - J_{16} - J_{23} - J_{25} = 0$
23	ATP	$J_6 + J_7 + J_{17} - J_1 - J_3 - J_{27} = 0$

1.2.4 检测分析方法

发酵液样品处理与代谢物精确检测方法如文献[13]所述。生物量采用干质量法测定^[14]。

2 结果与分析

2.1 氧化还原电位调控对发酵结果的影响

微生物胞内的多种代谢反应都涉及电子的得失，因此，可以通过合适手段调控培养基的氧化还原电位以改变代谢网络中关键节点的代谢流分布，使代谢反应朝着有利于目标产物积累的方向进行^[15]。在本研究中，通过人为流加K₃Fe(CN)₆与Na₂S溶液分别将发酵培养基的氧化还原电位控制在-56、-200 mV与-400 mV（-56 mV为发酵培养基最初氧化还原电位水平），以研究胞外不同氧化还原电位水平对钝齿棒杆菌厌氧发酵结果的影响，结果如图1所示。由于钝齿棒杆菌在厌氧条件下其生物量变化很小，因此，本研究中忽略了生物量变化对厌氧发酵结果的影响。

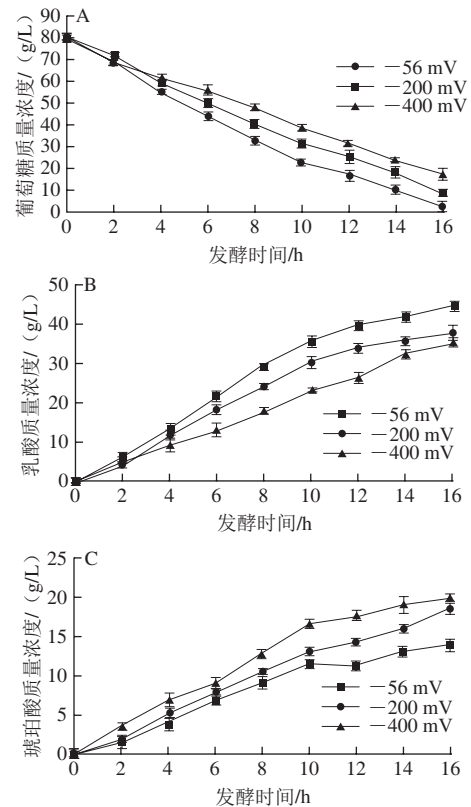


图1 氧化还原电位对发酵过程的影响

Fig. 1 Effect of redox potential on the fermentation process of *C. crenatum*

由图1可知，改变发酵培养基的氧化还原电位水平对钝齿棒杆菌在厌氧发酵条件下的葡萄糖代谢速率、乳酸与琥珀酸的产量影响较大。由1.2.1节可知，本研究是采用两阶段发酵法。在厌氧阶段时，生物量平均为5 g/L

左右,因此,在发酵开始后的4 h内,3种氧化还原电位下的葡萄糖利用速率都处于较高的水平(图1A)。随着发酵时间的延长,氧化还原电位对底物利用速率的影响开始显现,降低氧化还原电位水平对葡萄糖利用速率产生不利影响。当氧化还原电位由 -56 mV 变为 -400 mV 时,发酵结束后发酵液中残糖含量由 2.3 g/L 增加到 17.0 g/L ,葡萄糖平均利用速率同比下降19%。在降低氧化还原电位后,胞内的 NADH/NAD^+ 比会升高^[7],而高水平的 NADH/NAD^+ 比会对糖酵解途径中的3-磷酸甘油醛脱氢酶产生一定的抑制^[16],进而对葡萄糖利用速率产生不利影响。

降低氧化还原电位水平后,钝齿棒杆菌利用的葡萄糖虽然减少,但发酵液中的琥珀酸终质量浓度明显增加。由图1C可知,当氧化还原电位处于 -400 mV 时,发酵液中琥珀酸终质量浓度由 14 g/L 上升到 20.2 g/L ,与 -56 mV 相比,琥珀酸质量浓度增加了44%,琥珀酸对葡萄糖的得率也由19.5%增加到32%。同时,乳酸质量浓度由 44.9 g/L 降为 35.2 g/L ,与 -56 mV 相比,乳酸质量浓度下降22%,其对葡萄糖的得率也由63%变为59%(图1B)。

氧化还原电位调控已成功用于对多种厌氧微生物的发酵过程进行代谢调节^[17]。已有研究表明,微生物胞外的氧化还原电位变化会对胞内的氧化还原电势产生影响,主要体现为物质代谢和能量代谢的变化^[15,18]。在厌氧发酵过程中,发酵环境的氧化还原电位被人为降低以后会使胞内还原电势升高,微生物只有通过调节胞内代谢反应以产生还原力更强的代谢产物(如琥珀酸),才能降低胞内的还原电势以使胞内氧化还原电势重归平衡。Sridhar^[19]、Liu Rongming^[20]等分别对*Clostridium thermosuccinogenes*、*Escherichia coli*进行研究时也发现低氧化还原电位水平更有利于琥珀酸的生产。

2.2 氧化还原电位对代谢通量的影响

钝齿棒杆菌在厌氧发酵时主要利用C4途径和乙醛酸循环生产琥珀酸,其中C4途径对还原力的需求较大。已有研究结果表明,降低钝齿棒杆菌发酵液中的氧化还原电位会增加其胞内的可用还原力水平^[7],而还原力主要由HMP途径与EMP途径产生。通过代谢流分析,研究不同氧化还原电位水平下6-磷酸葡萄糖节点处的代谢通量分布变化,可以更深入地了解HMP途径与EMP途径对琥珀酸得率的影响,为进一步通过代谢调控提高琥珀酸得率以调节乳酸和琥珀酸生成比,为实现乳酸与琥珀酸联产提供依据。

本研究对比分析了钝齿棒杆菌在 -56 、 -200 、 -400 mV 条件下的代谢通量分布变化。在通量计算过程中对结果进行了归一化处理,所有代谢通量数据单位均为 $\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{h})$,即以 $100\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{h})$ 的葡萄糖为计算基准。由于代谢通量计算的前提是:假设细

胞内的中间代谢物均处于拟稳态,因此取发酵稳定且菌体代谢旺盛时的发酵液以精确计算葡萄糖消耗速率及乳酸、琥珀酸、乙酸生成速率,并将其作为代谢通量常数项代入方程进行求解,更能准确地比较分析钝齿棒杆菌在氧化还原电位调控前后的代谢通量分布变化。本实验取发酵时间6~8 h时间段的样品进行代谢通量分析,代谢通量计算结果如表3所示。调控氧化还原电位对6-磷酸葡萄糖节点处的代谢流分布产生显著影响,氧化还原电位越低,HMP途径的代谢通量越大。氧化还原电位为 -56 mV 时,HMP途径(J_9)与EMP途径(J_2)的代谢通量比为9.89:90.11,将氧化还原电位调为 -400 mV 时,HMP途径与EMP途径的代谢通量比增加为27.09:72.91,HMP途径代谢通量同比增加了1.74倍。HMP通量增加后,磷酸烯醇式丙酮酸节点处的代谢通量分布也有较大变化。氧化还原电位调为 -56 mV 时,流向C4途径的通量(J_{22})与流向丙酮酸的通量比为(J_7)31.73:164.97,表明多数葡萄糖用于乳酸的生成。氧化还原电位为 -400 mV 时,与 -56 mV 相比,流向C4途径的代谢通量增加了78%,结果使琥珀酸通量由 $31.73\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{h})$ 增加到 $56.53\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{h})$,同时,乳酸通量(J_{16})由 $159.73\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{h})$ 下降为 $133.50\text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{h})$,主要副产物乙酸的通量也下降了98%。

表3 代谢通量分布
Table 3 Metabolic flux distribution

通量	mmol/ (L · g · h)		
	-56 mV	-200 mV	-400 mV
J_1	100.00	100.00	100.00
J_2	90.11	84.35	72.91
J_3	96.70	94.78	90.97
J_4	96.70	94.78	90.97
J_5	196.70	194.79	190.97
J_6	196.70	194.79	190.97
J_7	164.97	151.16	134.45
J_8	5.25	5.44	0.95
J_9	9.89	15.65	27.09
J_{10}	9.89	15.65	27.09
J_{11}	3.30	5.22	9.03
J_{12}	6.60	10.43	18.06
J_{13}	3.30	5.22	9.03
J_{14}	3.30	5.22	9.03
J_{15}	3.30	5.22	9.03
J_{16}	159.73	145.72	133.50
J_{17}	2.36	2.54	0.05
J_{18}	1.45	1.45	0.45
J_{19}	1.45	1.45	0.45
J_{20}	1.45	1.45	0.45
J_{21}	1.45	1.45	0.45
J_{22}	31.73	43.62	56.53
J_{23}	30.28	42.18	56.08
J_{24}	31.73	43.62	56.53
J_{25}	31.73	43.62	56.53
J_{26}	33.18	45.07	56.98
J_{27}	167.33	153.70	134.50

菌株产琥珀酸的代谢途径主要是EMP途径、HMP途径、C4途径及乙醛酸循环,已有研究结果表明C4途径是该菌株产琥珀酸的主要代谢途径,经由C4途径生产的琥珀酸占整个琥珀酸产量的93%以上^[13]。利用C4途径产琥珀酸,理论上每消耗1 mol葡萄糖可产生2 mol琥珀酸,需要4 mol NADH,而每摩尔葡萄糖经由EMP途径只产生2 mol的NADH^[21-22],即使考虑HMP途径所产生的还原力(由于糖酵解途径是菌株代谢葡萄糖的主要途径),微生物胞内的总NADH也处于不足的水平,所以NADH不足是钝齿棒杆菌厌氧发酵制备琥珀酸的核心矛盾之一。微生物胞内的氧化还原态势会受到外界环境变化的影响,氧化还原电位的改变会对胞内的氧化还原态势产生影响,主要表现为NADH/NAD⁺比的变化^[23]。NADH及NAD⁺是3-磷酸甘油醛脱氢酶、乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶及琥珀酸脱氢酶等关键酶的辅酶,因此,胞外氧化还原电位的调控会对微生物代谢产物的分布产生复杂影响,进而影响到菌株的整个代谢通量分布^[6,17,24]。如本研究结果所示,降低氧化还原电位后,HMP代谢通量增加,细胞可以合成更多的NADPH,NADPH可以在转氢酶的作用下转化为NADH,继而用于产生更多的琥珀酸。结果表明,6-磷酸葡萄糖与磷酸烯醇式丙酮酸节点是影响钝齿棒杆菌厌氧发酵产琥珀酸的关键节点,即对6-磷酸葡萄糖进行代谢调控可以调节乳酸和琥珀酸的生成比。

3 结 论

微生物胞外的氧化还原电位变化会对胞内的物质代谢和能量代谢产生影响。本实验研究了不同氧化还原电位水平对钝齿棒杆菌厌氧发酵特性的影响并对其代谢通量分布进行了分析。发酵结果显示,不同氧化还原电位水平对钝齿棒杆菌在厌氧发酵条件下的葡萄糖代谢速率、乳酸及琥珀酸的产量影响较大,降低发酵液氧化还原电位水平对6-磷酸葡萄糖与磷酸烯醇式丙酮酸节点处的代谢流分布影响显著,使更多的碳源流向HMP途径与C4途径,以增加胞内还原力的可用水平与琥珀酸产量,说明低氧化还原电位更有利于琥珀酸的产生。本实验确定了6-磷酸葡萄糖与磷酸烯醇式丙酮酸节点是影响钝齿棒杆菌产琥珀酸的关键节点,即对6-磷酸葡萄糖与磷酸烯醇式丙酮酸节点进行代谢调控可以调节乳酸和琥珀酸的生成比,为后期通过菌种改造以调节乳酸和琥珀酸的生成比、实现乳酸与琥珀酸联产奠定了基础。

参考文献:

[1] 王立梅,齐斌. *L*-乳酸应用及生产技术研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 608-612.

[2] 叶小金,王红蕾,王晓俊,等. 玉米秸秆糖醇发酵产丁二酸及表征[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 161-165. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201423032.

[3] BEAUPREZ J J, MEY M D, SOETAERT W K. Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(7): 1103-1114. DOI:10.1016/j.procbio.2010.03.035.

[4] 陶帅,窦文芳,张晓梅,等. 高产精氨酸的钝齿棒杆菌在高低供氧条件下的差异蛋白质组学初步研究[J]. 化工学报, 2011, 62(6): 1649-1655.

[5] 许虹,窦文芳,许泓瑜,等. 不同供氧水平对 *L*-精氨酸分批发酵过程的影响[J]. 化工学报, 2008, 59(9): 2295-2301.

[6] CHEN X J, JIANG S T, LI X J, et al. Production of succinic acid and lactic acid by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(1): 39-44. DOI:10.1007/s13213-012-0441-8.

[7] CHEN X J, JIANG S T, ZHENG Z, et al. Effects of culture redox potential on succinic acid production by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(8): 1250-1255. DOI:10.1007/s13213-012-0441-8.

[8] ZHENG P, ZHANG K K, YAN Q, et al. Enhanced succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* after genome shuffling[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(8): 831-840. DOI:10.1007/s10295-013-1283-5.

[9] LI J, JIANG M, CHEN K Q, et al. Effect of redox potential regulation on succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, 33(8): 911-920. DOI:10.1007/s00449-010-0414-x.

[10] 姜岷,黄秀梅,李建,等. 氧化还原电位调控对产琥珀酸放线杆菌代谢通量分布的影响[J]. 化工学报, 2009, 60(10): 2555-2561.

[11] 秦义,董志姚,刘立明,等. 工业微生物中 NADH 的代谢调控[J]. 生物工程学报, 2009, 25(2): 161-169.

[12] VARMA A, PALSSON B O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use[J]. Bio/technology, 1994, 12: 994-998.

[13] 陈小举,姜绍通,李兴江,等. 钝齿棒杆菌产乳酸与琥珀酸的代谢调控[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 157-162. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201311035.

[14] OKINO S, NOBURYU R, SUDA M, et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(3): 459-464. DOI:10.1007/s00253-008-1668-y.

[15] LIU C G, LIN Y H, BAI F G. Development of redox potential-controlled schemes for very-high-gravity ethanol fermentation[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 153(1): 42-47. DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.03.007.

[16] DANSHINA P, SCHMALHAUSEN E, AVETISYAN A, et al. Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis[J]. IUBMB Life, 2001, 51(5): 309-314. DOI:10.1080/152165401317190824.

[17] LIU C G, XUE C, LIN Y H, et al. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31: 257-265. DOI:10.1016/j.biotechadv.2012.11.005.

[18] de GRAEF M R, ALEXEEVA S, SNOEP J L, et al. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(8): 2351-2357.

[19] SRIDHAR J, EITEMAN M A. Metabolic flux analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 94(1): 51-69. DOI:10.1385/ABAB:94:1:51.

[20] LIU R M, LIANG L Y, JIANG M, et al. Effects of redox potential control on succinic acid production by engineered *Escherichia coli* under anaerobic conditions[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(5): 740-744. DOI:10.1016/j.procbio.2014.02.010.

[21] LEE P C, LEE W G, KWON S, et al. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H₂/CO₂ supply and glucose concentration[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(8/9): 549-554. DOI:10.1016/S0141-0229(98)00156-2.

[22] LEE S J, SONG H, LEE S Y. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1939-1948. DOI:10.1016/0142-0615(94)00006-9.

[23] 姜岷,李建,陈可泉,等. 氧化还原电位调控对产琥珀酸放线杆菌厌氧发酵产丁二酸的影响[J]. 化工进展, 2008, 27(8): 1250-1253.

[24] INUI M, MURAKAMI S, OKINO S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2004, 7(4): 182-196. DOI:10.1159/000079827.