

研究简报

酵母合成的 ^{15}N L-色氨酸中 N 元素代谢通量的分析

刘占峰 袁其朋*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 以葡萄糖为碳源, 硫酸铵为氮源, ^{15}N 邻氨基苯甲酸为前体物, 利用酵母发酵合成 ^{15}N L-色氨酸, 是合成 ^{15}N L-色氨酸的一种新方法。为了有效的利用含氮的化合物, 实验过程中, 采用 ^{15}N 标记的邻氨基苯甲酸为示踪剂, 分析了 N 元素在 ^{15}N L-色氨酸合成过程中的代谢通量。结果表明, 93 % 外加的邻氨基苯甲酸被转化为 ^{15}N L-色氨酸。硫酸铵在促进菌体生长的同时, 0.05 % 硫酸铵被用于合成邻氨基苯甲酸, 并进一步被转化为 L-色氨酸, 5.95 % 硫酸铵被直接用于合成 ^{15}N L-色氨酸。

关键词: N 元素; ^{15}N L-色氨酸; 代谢

中图分类号: O611.7

^{15}N 同位素标记的 L-色氨酸作为示踪剂, 已经被用于紫色杆菌素结构的研究^[1]和色氨酸的代谢机理的探索^[2]。目前采用化学合成法以及微生物酶法已经合成了 ^{15}N L-色氨酸^[3-4], 但同位素利用率较低。酵母菌的生长能利用硫酸铵作为唯一氮源, 而且能够将邻氨基苯甲酸转化为 L-色氨酸, 邻氨基苯甲酸的转化率较高, 方法简单。因此, 可利用 ^{15}N 邻氨基苯甲酸发酵合成高同位素利用率的 ^{15}N L-色氨酸。目前, 谷氨酸棒杆菌合成色氨酸的代谢流分析已有报道^[5-6]。但氮元素在酵母合成 L-色氨酸中的作用却鲜有报道。本文以 ^{15}N 标记的邻氨基苯甲酸作示踪剂, 考察了 N 元素在酵母合成色氨酸中的代谢通量, 分析了硫酸铵与邻氨基苯甲酸在 ^{15}N L-色氨酸合成过程中的作用, 为酵母合理利用邻氨基苯甲酸和硫酸铵合成 ^{15}N L-色氨酸打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

出发菌株: 经过诱变以及 5-甲基 D, L-色氨酸处理的假丝酵母突变株。

^{15}N 邻氨基苯甲酸(自制), 葡萄糖、硫酸铵、硫酸镁、磷酸氢二钾以及碳酸钙均为市售分析纯。

收稿日期: 2005-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(20176001)

第一作者: 男, 1967 年生, 博士生

*通讯联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

1.2 分析方法

L-色氨酸纯度分析采用 Hitachi L-7100 液相色谱, Diamonsil C18 柱。检测条件为波长 360 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。采用梯度洗脱, 流动相 A 为乙腈和水的混合物, 二者的体积比为 75:25, 流动相 B 为 pH 9.0 的 NaAc 和 HAc 的缓冲溶液。初始 A:B 为 25:75, 10 min A:B 为 60:40, 13 min A:B 增至为 95:5, 17 min A:B 还原为 25:75, 20 min 洗脱结束。流速 1 mL/min, 进样量 5 μL 。

^{15}N L-色氨酸的结构以及丰度分析采用 Micro-mass Quattro 型质谱仪和 MAT-271 型气体同位素质谱仪。

1.3 培养基以及合成方法

种子培养基(g/L): 葡萄糖 50, 硫酸铵 5, 硫酸镁 0.5, 磷酸氢二钾 1.5, 玉米浆 10。pH 6.8。

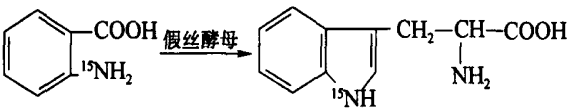
发酵培养基(g/L): 葡萄糖 60, 硫酸铵 10, 硫酸镁 0.5, 磷酸氢二钾 1.5, ^{15}N -邻氨基苯甲酸 0.5, 碳酸钙 20。pH 6.8。

首先, 将斜面菌种接种到装有 30 mL 种子液的 250 mL 锥形瓶中, 在摇床中 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 振荡培养 18 h。然后将 10 % 的种子液接种到装有 30 mL 发酵液的 250 mL 锥形瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min, 振荡培养 144 h。发酵期间流加 ^{15}N 邻氨基苯甲酸、葡萄糖以及硫酸铵。其中, ^{15}N 邻氨基苯甲酸被溶解在 50 % 乙醇水溶液中, 加入量为 1.575 g/L, 葡萄糖加入量 50 g/L, 硫酸铵加入量 2.1 g/L。从 36 ~ 108 h, 每隔 12 h 流加一次。

发酵液经 3500 r/min,离心 15 min。上清液用质量分数 1 %草酸调 pH 值至 4.5,然后过滤。将滤液经 732 阳离子树脂柱吸附,2 %的氨水洗脱。洗脱液经旋转蒸发仪浓缩至干,氯仿以及大孔树脂脱色。脱色液经浓缩,用 70 ~ 60 %乙醇溶液溶解,冷却,结晶,烘干,得¹⁵N L-色氨酸产品。

2 结果与讨论

¹⁵N L-色氨酸合成方案如下



在¹⁵N L-色氨酸的合成过程中,含氮化合物为硫酸铵和邻氨基苯甲酸。酵母在发酵过程中利用硫酸铵中的铵离子,并将其转化为代谢的产物

硫酸铵 铵离子 谷氨酰胺 -酮酸 色氨酸或其它氨基酸

邻氨基苯甲酸是 L-色氨酸合成过程中的代谢中间产物,代谢机理如图 1 所示。

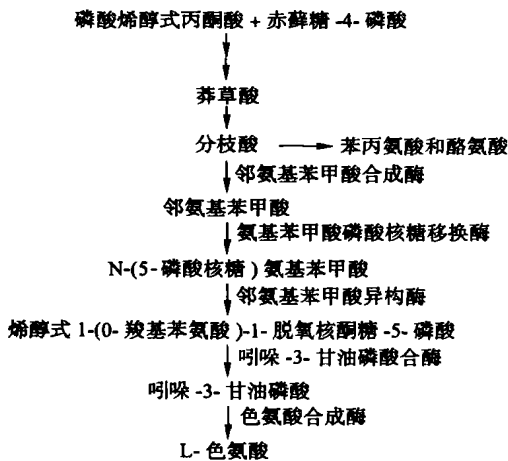


图 1 色氨酸的合成机理

Fig. 1 Synthetic pathway to L-tryptophan

酵母能够将自身合成的邻氨基苯甲酸转化为色氨酸。在酵母发酵过程中,加入适量的邻氨基苯甲酸,可减少发酵过程中色氨酸产生的抑制,增加色氨酸的产量。

2.1 非标记 L-色氨酸发酵过程中硫酸铵对发酵的影响

在非标记 L-色氨酸发酵过程中,硫酸铵与邻氨基苯甲酸的加入采用表 1 的三种方式进行。从实验结果可以看出,无邻氨基苯甲酸的发酵,由于硫酸铵

易被酵母快速利用,培养基中的硫酸铵全部用于菌体的生长,24 h 发酵液检测,L-色氨酸的浓度只有 0.001 g/L;在发酵中后期无硫酸铵可利用时,整个发酵过程基本没有色氨酸生成,144 h 发酵液检测,L-色氨酸的浓度只有 0.003 g/L。色氨酸的生产属于部分相关型,酵母生长的中后期,生产色氨酸。当发酵中后期适量流加硫酸铵,144 h 发酵液中 L-色氨酸浓度由 0.003 g/L 增加到 0.009 g/L。实验结果表明,酵母的生长可利用硫酸铵作为唯一氮源,并合成色氨酸。但加入的 12.1 g/L 硫酸铵中,只有 0.005 g/L 硫酸铵合成了色氨酸,其它的硫酸铵主要用于菌体的生长。

表 1 不同硫酸铵与邻氨基苯甲酸的加入方式对 L-色氨酸产量的影响

Table 1 The effect of addition of different amounts of ammonium sulphate and anthranilic acid on the yield of L-tryptophan

(培养基)/g L ⁻¹		(流加)/g L ⁻¹		产量/g L ⁻¹	
硫酸铵	邻氨基苯甲酸	硫酸铵	邻氨基苯甲酸	24 h	144 h
10	0	0	0	0.001	0.003
10	0	2.1	0		0.009
10	0.5	2.1	1.5	0.320	2.857

培养基以及发酵期间加入邻氨基苯甲酸,24 h 与 144 h 发酵液检测,L-色氨酸的浓度分别为 0.320 g/L 和 2.857 g/L,和无邻氨基苯甲酸的发酵相比,产量有大幅提高。证明菌体在对数生长期以及发酵过程中均可将邻氨基苯甲酸转化为 L-色氨酸。转化率分别为 43 %和 93 %。

2.2 标记 L-色氨酸发酵过程中 N 的代谢通量分析

在利用非标记硫酸铵与丰度为 98.63 %的邻氨基苯甲酸合成色氨酸过程中,L-色氨酸丰度为 48.67 %,如表 2 所示。质谱图如图 2(a) 所示。母峰出现在 m/z = 205,吲哚信号峰在 m/z = 118 出现,失去 H₂NCHCOOH 的信号峰出现在 m/z = 131。这些数据所确定的产品结构与 (1-¹⁵N)L-色氨酸的结构一致,它属于单标记的,¹⁵N 标记在吲哚环上,同位素来自于标记邻氨基苯甲酸上的氮。

在利用丰度为 10.20 %的硫酸铵与丰度为 10.01 %的邻氨基苯甲酸合成色氨酸过程中,L-色氨酸丰度为 9.72 %,如表 2 所示。质谱图如图 2(b) 所示。母峰出现在 m/z = 204、m/z = 205 和 m/z = 206,为非标记、单标记以及双标记的色氨酸的信号

峰。其中, $m/z = 206$ 的信号峰, 它的吲哚信号峰在 $m/z = 118$ 出现, 失去 $H_2^{15}NCHCOOH$ 部分的信号峰出现在 $m/z = 131$ 。数据显示双标记的 L-色氨酸中, ^{15}N 标记在吲哚环上和 α -氨基上。证明 α -氨基上标记的 N 来自于标记的硫酸铵。

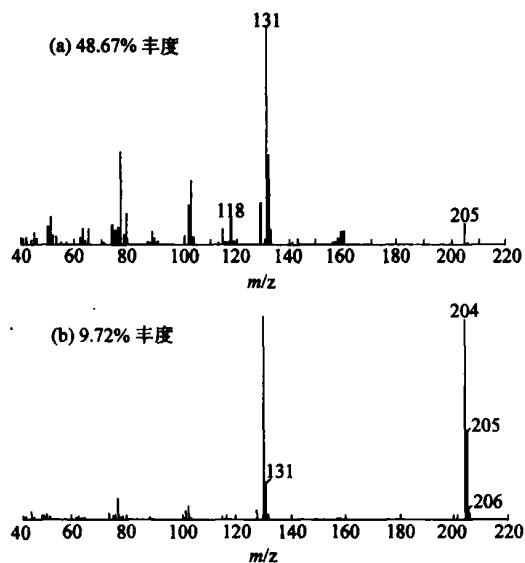


图 2 ^{15}N L-色氨酸的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of 48.67 % enriched ^{15}N L-tryptophan (a) and 9.72 % enriched ^{15}N L-tryptophan (b)

表 2 同位素标记邻氨基苯甲酸与硫酸铵的加入对 ^{15}N L-色氨酸丰度的影响

Table 2 The effect of addition of different amounts of ^{15}N isotopically enriched anthranilic acid and ammonium sulphate on the enrichment of ^{15}N L-tryptophan

丰度/ %		
^{15}N 邻氨基苯甲酸	硫酸铵	^{15}N L-色氨酸
10.02	10.20	9.72
98.63	0	48.67

在利用非标记硫酸铵与丰度为 98.63 % 的邻氨基苯甲酸合成色氨酸过程中, ^{15}N L-色氨酸中非标记的氮为 1.33 %, 与 ^{15}N 邻氨基苯甲酸中非标记的氮相比, 还有 0.65 % 的氮是非标记。这些非标记的 N 来自于非标记硫酸铵。经计算得出, 0.006 g/L 的硫酸铵在发酵过程中合成邻氨基苯甲酸, 进而转化为 0.009 g/L L-色氨酸, 结果与表 1 的数据基本相符, 被转化的硫酸铵占总加入量的 0.05 %。此外, 色氨酸非吲哚环上的氮源全部来自于非标记硫酸铵中的氮, 需要 0.72 g/L 的硫酸铵, 占总加入量的 5.95 %。液相色谱显示, 发酵液中还含 0.05 g/L 的

苯丙氨酸和酪氨酸等微量的副产物, 它们所需的氮源也来自于硫酸铵。

3 结论

酵母利用葡萄糖发酵过程中, 以硫酸铵作为唯一氮源, 邻氨基苯甲酸作为前体物, 可获得高产的 L-色氨酸。

发酵过程中, 培养基以及发酵中后期分别加入 10 g/L 和 2.1 g/L 的硫酸铵, 仅有 0.05 % 的硫酸铵用于直接合成邻氨基苯甲酸, 进而转化为 L-色氨酸, 5.95 % 硫酸铵用于直接合成 L-色氨酸非吲哚环部分的氮, 而 93 % 外加邻氨基苯甲酸转化为 L-色氨酸。非标记的硫酸铵对 (1- ^{15}N) L-色氨酸的丰度仅有 1.33 % 的稀释。因此, 发酵过程中可利用非标记硫酸铵作为氮源, 利用 ^{15}N 邻氨基苯甲酸作为前体物合成 (1- ^{15}N) L-色氨酸; 由于 L-色氨酸中 α -氨基氮来源于硫酸铵, 发酵过程中利用 ^{15}N 硫酸铵作为氮源, ^{15}N 邻氨基苯甲酸作为前体物, 可获得双标记的 ^{15}N L-色氨酸。

参 考 文 献

- [1] Ruhul Momen A Z M, Tsutomu H. Biosynthesis of violacein: intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(3): 539 - 549.
- [2] Rapparini F, Cohen J D, Slovin J P. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Lemna gibba* studied using stable isotope labeled anthranilate and tryptophan [J]. Plant Growth Regulation, 1999, 27: 139 - 144.
- [3] Unkefer C J, Lodwig S N, Silks L A, *et al.* Stereoselective synthesis of stable isotope-labeled L- α -Amino acids: chemomicrobiological synthesis of L-[1- ^{13}C]-, L-[2- ^{13}C]-, and L-[1- ^{15}N] Tryptophan [J]. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 1991, 29: 1247 - 1256.
- [4] 范如霖. 稳定同位素标记有机合成法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1986, 88 - 89.
- [5] 王健, 陈宁. 基于途经分析及代谢流分析的 L-色氨酸发酵条件优化 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2004, 26(6A): 68 - 73.
- [6] 王健, 陈宁, 张蓓, 等. L-色氨酸生物合成的代谢流量的分析 [J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 473 - 479.

(下转第 94 页)

- a metal compound[J]. *Chemosphere*, 2002, 51 (9): 855 - 860.
- [14] Parga J R, Shukla S S, Carrillo-Pedroza F R. Destruction of cyanide waste solutions using chlorine dioxide, ozone and titania sol[J]. *Waste Manage*, 2003, 23 (2): 183 - 191.
- [15] Pisarello M L, Milt V, Peralta M A, *et al* E. Simultaneous removal of soot and nitrogen oxides from diesel engine exhausts[J]. *Catal Today*, 2002, 75 (1): 465 - 470.
- [16] Despres J, Koebel M, Krocher O. Adsorption and desorption of NO and NO₂ on Cu-ZSM-5 [J]. *Micropor Mesopor Mat*, 2003, 58(2): 175 - 183.
- [17] Hadjiivanov K, Klissurski D, Ramis G, *et al*. Fourier transform IR study of NO_x adsorption on a CuZSM-5 DeNO_x catalyst[J]. *Applied Catal B- Environ*, 1996, 7 (3): 251 - 267.
- [18] Arai H M. Removal of NO_x through sorption-desorption cycles over metal oxides and zeolites[J]. *Catal Today*, 1994, 22(1): 97 - 109.

Experimental study of regeneration and optimization of reaction conditions for a catalyst for simultaneous removal of NO and SO₂ from waste gas

ZHU Jing-li^{1,2} WANG Yan-hui¹ MA Run-yu¹

(1. State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Petrochina Company Limited Liaoyang Petrochemical Company, Liaoning Liaoyang 111003, China)

Abstract: Experimental results showed that use of relatively high temperatures improved the performance of activated carbon impregnated with KOH and Na₂CO₃ (ACNaK_{2.5}) as a catalyst for removal of NO and SO₂ from waste gas under appropriate conditions. Further study indicated that the optimum temperature for simultaneous removal of NO and SO₂ was 120 °C. Pressure did not have a significant effect on the removal of NO and SO₂ under the experimental conditions employed. Repeated cycles of adsorption and regeneration showed that the catalyst had good stability when used at 120 °C, 2000 h⁻¹ space velocity, and ambient pressure. Analysis of the fresh and used catalysts confirmed that the structure of the catalyst was unchanged after adsorption.

Key words: catalyst; adsorption; regeneration; optimization

(上接第 90 页)

Metabolic flux analysis of elemental nitrogen for L-tryptophan biosynthesis in yeast

LIU Zhan-feng YUAN Qi-peng

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: A new synthesis method for ¹⁵N L-tryptophan by yeast fermentation using glucose as carbon source, ammonium sulphate as nitrogen source, and ¹⁵N anthranilic acid as a precursor is described. In order to ensure efficient use of the nitrogen source compounds, the metabolic flux of elemental nitrogen was analyzed for L-tryptophan biosynthesis using the ¹⁵N anthranilic acid as a tracer in the experimental process. The results indicated that 93 % of the L-tryptophan was derived from exogenous anthranilic acid. Ammonium sulphate contributed to the growth of the yeast and anthranilic acid was also synthesized from ammonium sulphate and subsequently converted into L-tryptophan (0.05 % of the total yield). A further 5.95 % of L-tryptophan was directly synthesized from ammonium sulphate.

Key words: elemental nitrogen; ¹⁵N L-tryptophan; metabolism