

技术与方法

一种中间代谢途径代谢通量的定量分析方法*

张慧敏^{1,2)} 朱江峰²⁾ 清水和幸²⁾ 姚善泾^{1)**}(¹⁾浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州 310027; ²⁾九州工业大学生物系统工程学系, 福岡, 820-8520, 日本)

摘要 以¹³C 标记的碳源, 用二维核磁共振技术 (¹H-¹³C, HMQC) 测定代谢中产生的氨基酸标记模式, 研究对中间代谢途径胞内代谢通量进行定量分析的方法. 通过开发软件包, 改进同位素分布的数学模型, 提出了反应映射矩阵 (RMM) 等概念. 由简化算法, 提高程序的执行效率, 建立了定量分析胞内代谢通量的平台. 代谢模型涉及了糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环、几种回补反应、发酵途径和氨基酸合成途径.

关键词 代谢通量, 二维核磁共振技术, 中间代谢途径, 同位素分布模型

学科分类号 TQ 921.7

随着基因组学和酶学的发展, 对生物代谢途径的研究已经进入了定性和定量的分子水平. 代谢通量的概念表示胞内不同酶催化反应进行的速率, 在定量分析中可为研究胞内代谢过程提供有力的工具. 胞内与环境之间的物质交换通量, 如底物消耗、产物生成、生物量生长和气体放出速率等, 可以通过仪器来检测. Sonia 等^[1]曾经基于这些数据, 通过系数矩阵模型, 利用中间代谢产物作物量平衡来计算胞内代谢通量. 但是, 结果的准确性往往取决于所建立的不同辅酶因子平衡假设的有效性, 或待优化的最大化生物量等目标方程的合理性. 1995 年, Szyperski 等^[2]将二维核磁共振技术应用于获取胞内代谢信息. Schmidt 等^[3]提出了从氨基酸的标记模式来计算其在中间代谢途径前体的标记模式更为可行.

我们利用¹³C 标记的碳源, 通过二维核磁共振技术 (¹H-¹³C, HMQC) 来测定氨基酸的标记模式, 通过改进同位素分布的数学模型, 为定量分析胞内代谢通量建立平台.

1 算法与模型

1.1 代谢模型

本文考察了 *E. coli* 的中间代谢途径, 包括主要的碳骨架代谢途径和氨基酸生物合成途径. 乙醛酸支路在葡萄糖作碳源时处于被抑制的状态而未被考虑. 模型中主要包括了糖酵解途径 (Embden-Meyerhof Parnas)、磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway)、三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle)、一些回补反应和发酵途径 (图 1).

1.2 算法模型

1.2.1 系数矩阵: 上面建立的代谢系统可以被看

成一个黑盒子, 已知输入和部分输出的通量以及内部的结构, 要考察内部代谢通量的分布情况. 中间代谢产物相对于输入输出处于一个很小的浓度, 在拟稳态假设下, 认为其生成与消耗处于平衡状态, 需要首先对中间代谢产物作物量平衡的计算来描述系统内部结构的信息^[1,4]. 以 6-磷酸葡萄糖 (G6p) 为例:

$$v_{\text{Glc} \rightarrow \text{G6p}} - v_{\text{G6p} \rightarrow \text{F6p}} - v_{\text{G6p} \rightarrow \text{R5p}} - v_{\text{G6p} \rightarrow \text{biomass}} = 0 \quad (1)$$

其中, Glc、G6p、F6p、R5p、biomass 分别代表葡萄糖 (glucose, Glc)、6-磷酸葡萄糖 (glucose-6-phosphate, G6p)、6-磷酸果糖 (fructose-6-phosphate, F6p)、5-磷酸核糖池 (ribose-5-phosphate pool, R5p) 和合成的生物物质.

同样对代谢模型中其他的中间代谢产物作物量平衡, 用矩阵的形式表示则为:

$$\mathbf{A} \cdot \mathbf{f} = \mathbf{b} \quad (2)$$

式中 $\mathbf{A}$ 为物量平衡的系数矩阵, $\mathbf{f}$ 为中间代谢途径所有净通量组成的向量, $\mathbf{b}$ 为常数向量, 包括底物消耗速率, 一些可测量的胞外代谢产物, 如乳酸、乙酸、二氧化碳的生成速率. 不考虑不确定性大的辅酶因子 NADH、NADPH 和 ADP、ATP 等的平衡关系, 允许矩阵 $\mathbf{A}$ 奇异, 系统为未定. 选取一组自由的未定通量, 作为被优化的对象, 使测得的氨基酸标记模式和拟和值之间的偏差最小.

1.2.2 同位素平衡: 对于上述未定的系统, 我们

* 国家自然科学基金资助项目 (20276065).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-87951982, E-mail: yaosj@che.zju.edu.cn

收稿日期: 2002-10-21, 接受日期: 2002-12-28

通过二维核磁共振实验测得的氨基酸碳骨架上 ^{13}C 标记模式来提供更多的限制条件。首先引入原子映

射矩阵的概念来描述代谢模型中的每一个反应^[5]。对于一个反应如图2所示。

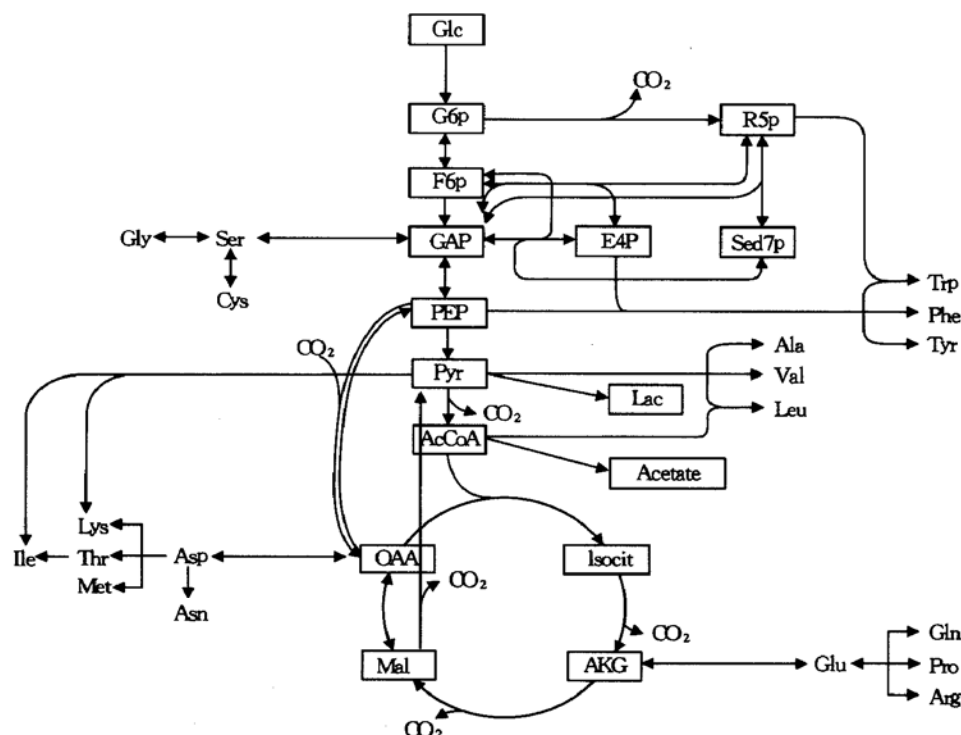


Fig. 1 Central metabolism model constructed for *Escherichia coli*

AcCoA: acetyl coenzyme A; PEP: phosphoenolpyruvate; GAP: glyceraldehyde 3-phosphate; Pyr: pyruvate; OAA: oxaloacetate; Mal: malate; Lac: lactic acid; IsoCit: isocitrate; AKG: α -ketoglutarate; E4p: erythrose-4-phosphate.

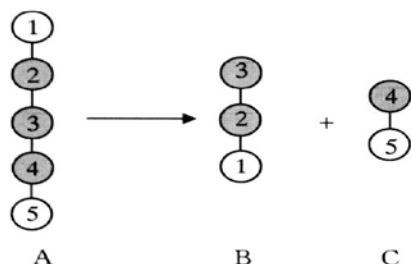


Fig. 2 The route of carbons in a simple example

其中数字表示碳原子的转化路线，深色表示标记的碳原子。构造原子映射矩阵 $M_{A \rightarrow B}$ ，该矩阵的行数为产物 B 中碳原子的个数，列数为反应物 A 中碳原子的个数，如 A 中的第 n 个碳原子到了 B 的第 m 个碳原子的位置上，则在第 m 行，第 n 列的位置上标记“1”，其余位置为“0”。则 $M_{A \rightarrow B}$ 和 $M_{A \rightarrow C}$ 分别为：

$$M_{A \rightarrow B} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$M_{A \rightarrow C} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

该矩阵中描述了此反应中碳原子的去向。为了描述分子的标记模式，我们构造两种向量。第一种为同模式标记分子向量，简称为同模子，该向量中标记的碳原子记为 1，未标记的碳原子记为 0。对于图 2 中的反应物与生成物，其同模子为：

$$I_A = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_B = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad I_C = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}$$

由此，产物的同模子可以由反应物的同模子与相应的原子映射矩阵决定：

$$I_B = M_{A \rightarrow B} \cdot I_A \quad I_C = M_{A \rightarrow C} \cdot I_A$$

第二种信息更为详细的向量，同模子丰度分布向量，简称为分布向量。该向量中每个元素分别为该种分子中每种同模子的丰度，记为 IDV (isotopomer distribution vector)。对于一个具有 n 个碳原子的分子，该向量含有 2^n 个元素，以同模子所编码的二进制数值大小排列。以含 3 个碳原子的丝氨酸为例：

$$IDV_{ser} = \begin{bmatrix} PI_{ser}(0) \\ PI_{ser}(1) \\ PI_{ser}(2) \\ PI_{ser}(3) \\ PI_{ser}(4) \\ PI_{ser}(5) \\ PI_{ser}(6) \\ PI_{ser}(7) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} PI_{ser}(000_{bin}) \\ PI_{ser}(001_{bin}) \\ PI_{ser}(010_{bin}) \\ PI_{ser}(011_{bin}) \\ PI_{ser}(100_{bin}) \\ PI_{ser}(101_{bin}) \\ PI_{ser}(110_{bin}) \\ PI_{ser}(111_{bin}) \end{bmatrix}$$

其中 $PI_{ser}(i)$ 为丝氨酸第 i 个同模子的丰度值, $\sum_{i=0}^7 PI_{ser}(i) = 1$. 该向量包含了每种分子标记模式的最丰富信息. 产物分子的分布向量由反应物分子的分布向量和反应机理所决定. 在此基础上, 利用同模子映射矩阵的概念来描述反应物分子分布向量对产物分子分布向量的贡献^[3], 并为了适应不同类型的反应, 拟对其进行改进. 对每一对反应物和产物构造一个同模子映射矩阵, 记为 **IMM** (isotopomer mapping matrices), 该矩阵行数为产物 **IDV** 中元素的个数, 对应为产物中不同的标记模式, 列数为反应物 **IDV** 中元素的个数, 对应于反应物中不同的标记模式. 当反应物中某个同模子对产物中某个或某几个同模子有贡献时, 在 **IMM** 中相应的位置标记“1”, 其余位置为“0”. 在程序中, 我们用原子映射矩阵和反应物, 产物的同模子来生成 **IMM**, 以丙酮酸 (pyruvate, Pyr) 到乙酰辅酶 A (acetyl coenzyme A, AcCoA) 的反应为例, 其算法如下:

$$M_{pyr \rightarrow AcCoA} \cdot I_{pyr} = I_{AcCoA} \quad (3)$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (4)$$

结果亦为未标记的乙酰辅酶 A 分子, 则对 **IMM**_{pyr → AcCoA} 中的第一行第一列的元素赋值为“1”, 当丙酮酸的标记模式为 (001)_{bin} 时, 结果仍为 (00)_{bin}, 则对 **IMM**_{pyr → AcCoA} 中第一行第二列的元素赋值为“1”, 同理遍历丙酮酸所有的标记模式, 对 **IMM**_{pyr → AcCoA} 中适当的位置赋值“1”, 其余位置为“0”, 结果为式 (5) 所示:

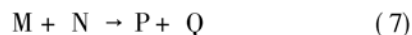
$$IMM_{pyr \rightarrow AcCoA} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (5)$$

则由丙酮酸决定的对乙酰辅酶 A 标记模式的

贡献为:

$$IDV_{AcCoA} = IMM_{pyr \rightarrow AcCoA} \cdot IDV_{pyr} \quad (6)$$

对于双分子的反应如:



在构造 **IMM**_{M > P} 时, 同样先由原子映射矩阵和反应物, 产物的同模子出发:

$$M_{M > P} \cdot I_M + M_{N > P} \cdot I_N = I_P \quad (8)$$

先在每一个 M 的同模子 I_M 下, 遍历 N 的所有同模子 I_N , 这样就遍历了所有反应物标记模式的组合, 得到了 **IMM**_{M > P} 中应赋值为“1”的位置. 则反应物 M, N 对产物 P, Q 的标记模式的贡献为:

$$IDV_P = (IMM_{M > P} \cdot IDV_M) \odot (IMM_{N > P} \cdot IDV_N) \quad (9)$$

$$IDV_Q = (IMM_{M > Q} \cdot IDV_M) \odot (IMM_{N > Q} \cdot IDV_N) \quad (10)$$

式中 $\odot$ 为两个同样大小向量中相应位置元素相乘. 此时, 我们注意到 **IMM**_{N > P} 和 **IMM**_{M > P} 都由 $M_{M > P} \cdot I_M$ 、 $M_{N > P} \cdot I_N$ 生成, 其中包含了大量的冗余信息, 而 **IMM** 的生成又比较繁琐, 尤其对于碳原子数多的分子参加的反应, 其大小成几何级数增长, 占用了大量的内存空间, 不利于程序执行的效率. 所以, 我们提出反应映射矩阵的概念, 在该矩阵相应的位置不是赋值“1”, 而是输入相应的同模子丰度值, 记为 **RMM** (reaction mapping matrices), 其行数仍为产物 **IDV** 中元素的个数, 列数为反应物 **IDV** 中元素的个数. 仍以反应 2 为例, 在生成 **IMM**_{M > P} 的时候, 在一种 M 的同模子下, 遍历 N 的所有同模子, 得到产物 P 的同模子, 此时, 在 **RMM** 中产物 P 的同模子所对应的行与反应物 M 的同模子对应的列所确定的位置上, 赋值为生成 P 的该种同模子相应的 N 的同模子的丰度值. 例如:

$$IMM_{M > P} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \cdot & 1 & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (11)$$

$$RMM_{M>P} = \begin{bmatrix} PI_N(i) & 0 & 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & PI_N(j) & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \cdot & PI_N(k) & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & PI_N(l) & 0 & 0 & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & PI_N(m) & 0 & \cdot & \cdot & \cdot & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (12)$$

于是, 该反应对产物 P, Q 标记模式的贡献就被简化为:

$$IDV_P = (RMM_{M>P} \cdot IDV_M) \quad (13)$$

$$IDV_Q = (RMM_{M>Q} \cdot IDV_M) \quad (14)$$

对于多原子参加的反应, 同样在相应的位置上, 赋值为该反应中当前考察的一对“反应物与产物”之外的其他所有反应物相应的同模子的丰度积. 这样在双原子或多原子参加的反应中, 需要由多个 **IMM** 所描述的信息就被包含在了一个反应映射矩阵 **RMM** 中, 大大减少了内存占用量, 提高了程序的计算效率.

对于三羧酸循环中有对称分子琥珀酸和延胡索酸参加的反应, 应特别考虑. 由非对称分子生成对称分子的反应, 和对称分子之间的反应可直接按式 (13), (14) 计算, 而由对称分子生成非对称分子的反应, 则需按两条反应路线计算, 如图 3 所示.

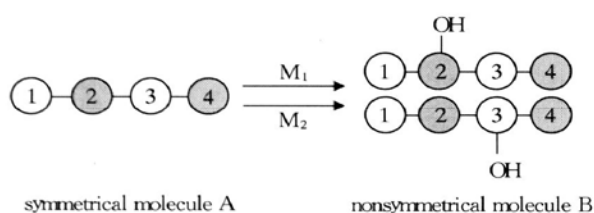


Fig. 3 Reaction from symmetrical molecule

由两条反应路线所编码的两个原子映射矩阵 M_1 和 M_2 出发, 产生出两个反应映射矩阵 RMM_1 和 RMM_2 , 则由该反应决定的对称反应物分子 A 对非对称产物分子 B 的标记模式的贡献为:

$$IDV_B = RMM_{A>B} \cdot IDV_A \quad (15)$$

式中 $RMM_{A>B} = \frac{1}{2} (RMM_1 + RMM_2)$. 在以上数学描述下, 对代谢模型中所有的中间代谢产物作同位素的平衡:

$$\sum_i v_{out,i} \cdot IDV_n = \sum_j v_{in,j} \cdot RMM_{j>n} IDV_j \quad (16)$$

式中, $v_{out,i}$ 表示从中间代谢产物 n 出发的反应 i 的代谢通量, $v_{in,j}$ 表示由反应 j 流入中间代谢产物 n 的通量, $RMM_{j>n}$ 为 j 反应中任意一个反应物到 n 的反应映射矩阵, IDV_j 则为在 $RMM_{j>n}$ 所选取的反应物的分布向量.

1.2.3 由中间代谢产物到氨基酸的信号转换: 根据氨基酸和在中间代谢途径中作为其前体的代谢中间产物反应路线, 构造出一系列的 $RMM_{metabolite>amino\ acid}$, 由此, 代谢中间产物的 $IDV_{metabolite}$ 很容易被转化成相应氨基酸的 $IDV_{amino\ acid}$, 而二维核磁共振实验测得的并不直接是氨基酸的分布向量, 而是每个氨基酸每个碳原子的某种峰形面积占该碳原子总峰面积的比重. 氨基酸碳骨架上由于相邻 ^{13}C 的耦合形式不同而给出不同的峰形, 包括单峰 (S), 双峰 (D1 和 D2), 四重峰 (DD), 和三峰 (当四重峰中 $J_{cc} = J_{cc'}$ 时, 四重峰形重叠为三重峰), 如图 4 所示.

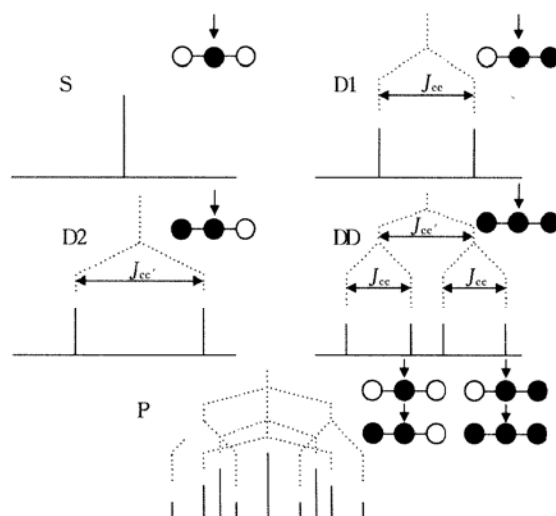


Fig. 4 Multiplet patterns arising from coupling of adjacent ^{13}C isotopes in three carbon atom fragments of amino acids

The center carbon is the observed nucleus. $\bullet$: ^{13}C -labeled nuclei.

所以, 氨基酸的 $IDV_{\text{amino acid}}$ 需要转化为不同的峰形模式信息才可以与实验数据比较, 我们同样用矩阵操作来实现这个过程, 以三碳分子丝氨酸为例, 该分子一位和三位碳原子可以给出单峰 (S), 双峰 (D1 或 D2), 中间的碳原子可以给出单峰 (S), 双峰 (D1 和 D2), 和四重峰 (DD, $J_{cc} \neq J_{cc'}$), 则信号的转化过程如式 (17) ~ (20) 所示.

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot IDV_{\text{ser}} = \begin{bmatrix} S_{c1}^{\text{ser}} \\ S_{c2}^{\text{ser}} \\ S_{c3}^{\text{ser}} \end{bmatrix} \quad (17)$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \cdot IDV_{\text{ser}} = \begin{bmatrix} D1_{c1}^{\text{ser}} \\ D1_{c2}^{\text{ser}} \\ D1_{c3}^{\text{ser}} \end{bmatrix} \quad (18)$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot IDV_{\text{ser}} = \begin{bmatrix} D2_{c1}^{\text{ser}} \\ D2_{c2}^{\text{ser}} \\ D2_{c3}^{\text{ser}} \end{bmatrix} \quad (19)$$

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \cdot IDV_{\text{ser}} = \begin{bmatrix} DD_{c1}^{\text{ser}} \\ DD_{c2}^{\text{ser}} \\ DD_{c3}^{\text{ser}} \end{bmatrix} \quad (20)$$

则丝氨酸上 α 碳原子上单峰 (S) 对该碳原子总峰面积的贡献为:

$$S_{c2}^{\text{ser}} = \frac{S_{c2}^{\text{ser}}}{S_{c2}^{\text{ser}} + D1_{c2}^{\text{ser}} + D2_{c2}^{\text{ser}} + DD_{c2}^{\text{ser}}} \quad (21)$$

结果与实验测得的数据比较, 进行拟合, 最小化其偏差.

1.2.4 优化

核磁共振实验提供了大量的数据, 使整个系统变得超定. 由于整个系统的复杂性和非线性, 不可能找出解析解. 但当系数矩阵中一组自由未定通量被赋值后, 通过同位素平衡, 可以得到中间代谢产物的 IDV , 继而得到氨基酸的 IDV , 从而得到在该组通量下的每个氨基酸每个碳原子的某种峰形面积对该碳原子总峰面积的贡献, 其值可与实验数据进行比较、优化来拟合这组自由通量. 被优化的目标方程为:

$$F(v) = \sum_{i=1}^M \left(\frac{W_i - E_i(v)}{\delta_i} \right)^2 + \sum_{j=1}^N \left(\frac{Y_j - v_k}{\delta_j} \right)^2 \quad (22)$$

式中 v 为待优化的自由通量组成的向量, W_i 为核磁共振的测量值, $E_i(v)$ 为在该组 v 值下对应于 W_i 信号的计算值, Y 为胞外代谢产物的测量值, v_k 为对应于该 Y_j 的拟和值. δ 为该实验值的绝对

误差限. 这里, 我们采用了杂合遗传算法^[6~10], 通过先全局搜索, 再局部搜索来最小化该目标方程. 在此为 Sequential Simplex 技术, 程序流程如图 5 所示.

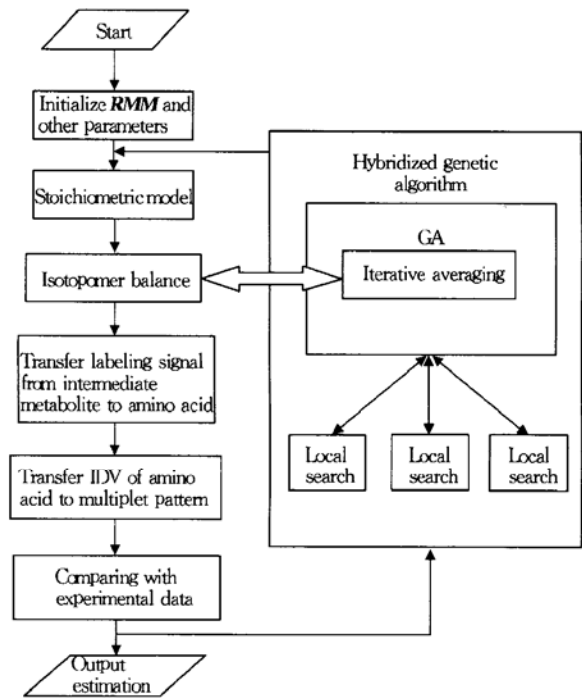


Fig. 5 The structure of the program

2 材料与方法

本实验使用的菌株为 *E. coli* K12. 在 1L 的发酵罐中, 培养温度 37 °C, 转速 300 r/min, 通气量 1 L/min. 为了不干扰核磁共振的测定, 使用合成培养基, 其中碳源为 90% 天然的葡萄糖和 10% 的 ^{13}C 均匀标记的葡萄糖, 总浓度为 10 g/L. 乙酸、乳酸通过高效液相色谱检测. 在对数生长期取样 200 ml 离心. 菌体经去离子水洗涤后用 6 mol/L HCl 在 105 °C 下水解 48 h. 水解过程中, 半胱氨酸和色氨酸由于氧化而损失, 谷氨酸和天冬酰胺酸被脱氨. 水解液经 0.2 μm 微孔过滤器过滤和冷冻干燥后, 溶解在 600 μL 的 0.1 mol/L 氘代盐酸的 D_2O 溶液中, 在室温下放置 2 h 以上, 作为二维核磁共振实验的样品. 样品在 Bruker AVANCE 400S 核磁共振仪, 27 °C、 ^{13}C 共振频率 100.6 MHz 下分析, 记录了两维 ^1H - ^{13}C heteronuclear multiple-quantum correlation (HMQC) 图谱. 核磁共振分析时间 21.29 h, 数据获取过程中采用 WALTZ-16 复合式脉冲去耦合策略. 根据 ^1H 的位移和 ^1H 与 ^{13}C 的

式中 δ 为可逆反应的逆反应速率. 该比率将逆反应速率 $\delta \in [0, \infty]$ 转化到 $[0, 1]$ 区间上, 二者可根据式 (23) 相互换算, 方便表示和避免参数趋向于无穷. 结果表明, 在该种培养条件下, 糖酵解途径的代谢通量要大于磷酸戊糖途径的代谢通量, 同时由于供氧充足, 呼吸作用旺盛, 三羧酸循环也很活跃, 提供了大量呼吸作用所需要的 NADH. 此时代谢以有氧呼吸为主, 乙酸为主要的发酵途径, 但只占很小的比重, 前期生成的乳酸在乳酸脱氢酶的作用下, 略有消耗, 重新被转化成丙酮酸. 各种回补途径中以磷酸烯醇式丙酮酸到草酰乙酸的反应为主. 各代谢中间产物池的输入与输出的差值为该代谢中间产物合成其他生物物质所需, 包括多糖、蛋白质、DNA、RNA 和脂类等.

我们可以看到, 这种对代谢通量进行定量分析的方法可以被方便地应用到其他菌种, 包括变异菌株和基因工程菌中, 不同的培养条件和不同的研究目的中. 使我们对微生物代谢过程的认识从定性走向了定量, 为研究微生物的代谢机理提供了强有力的工具, 为代谢工程的研究提供了更完善的手段和广阔的前景.

参 考 文 献

- 1 Sonia C, Juan C A, Miguel A A. Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **47** (2): 193~208
- 2 Szyperski T. Biosynthetically directed fractional ^{13}C -labeling of proteinogenic amino acids An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur J Biochem*, 1995, **232** (2): 433~448
- 3 Schmidt K, Carlsen M, Neilsen J, *et al.* Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **55** (6): 831~840
- 4 Marx A, Graaf A A, Wiechert W, *et al.* Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **49** (2): 111~129
- 5 Zupke C, Stephanopoulos. Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnol Prog*, 1994, **10**: 489~498
- 6 Goldberg D E. Genetic Algorithm in Search, Optimization and Machine Learning. USA: Addison Wesley Professional press, 1989. 1~256
- 7 Holland J H. Adaptation in Natural and Artificial Systems. USA: The University of Michigan Press, 1975. 10~64
- 8 Michalewicz Z. Genetic Algorithm + Data Structures = Evolution Programs AI Series. New York: Springer-Verlag Press, 1994. 1~45
- 9 Houck C, Joines J, Kay M. A comparison of genetic algorithm, random restart, and two-opt switching for solving large location-allocation problems. *Computers and Operations Research*, 1996, **23** (6): 587~596
- 10 Oriyama H, Shimizu K. Online optimization of culture temperature for ethanol fermentation using a genetic algorithm. *J Chem Tech Biotechnol*, 1996, **66** (3): 217~222
- 11 Neil S F, Douglas S C, Harvey W B. Using isotopomer path tracing to quantify metabolic fluxes in pathway models containing reversible reactions. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **74** (3): 196~211
- 12 Yang C, Hua Q, Shimizu K. Quantitative analysis of intracellular metabolic fluxes using GC-MS and two-dimensional NMR spectroscopy. *J Biosci Bioeng*, 2002, **93** (1): 111~999

A Quantitative Analysis of Intracellular Metabolic Fluxes for Central Metabolism*

ZHANG Hui-Min^{1,2)}, ZHU Jiang-Feng²⁾, KAZUYUKI SHIMIZU²⁾, YAO Shan-Jing^{1)**}

⁽¹⁾ Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

⁽²⁾ Department of Biochemical Engineering and Science, Kyushu Institute of Technology, Iizuka, Fukuoka, 820-8502, Japan)

Abstract A scheme of investigating the intracellular metabolic fluxes by isotope ^{13}C labeling experiments and analyzing the labeling patterns of cellular amino acids by two-dimensional [^1H - ^{13}C] nuclear magnetic resonance spectroscopy was developed. The software package was constructed with a comprehensive and improved isotopomer model, which introduce the concept of Reaction Mapping Matrices (*RM*). Thus with a simplified algorithm, the platform is established for quantitating the intracellular flux distribution and investigating the cellular metabolism more efficiently. The metabolic model includes the Embden-Meyerhof-Parnas, the pentose phosphate pathway, the tricarboxylic acid cycle, anaplerotic reaction sequences, some fermentative pathway and pathways involved in amino acid synthesis.

Key words metabolism flux, two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, central metabolism route, isomer distribution model

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (20276065).

** Corresponding author. Tel: 86-571-87951982, E-mail: yaosj@che.zju.edu.cn

Received: October 21, 2002 Accepted: December 28, 2002