

基于代谢通量分析的琥珀酸放线杆菌高产选育研究

潘丽军, 李兴江, 姜绍通, 魏兆军, 陈晓晖, 蔡理钺, 王鹤峰, 蒋继军

合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009

摘要: 在对产琥珀酸放线杆菌代谢分析的基础上选育出高产突变株对琥珀酸的工业生物转化有重要意义。在矩阵分析代谢通量基础上, 围绕柔性节点下的副产物乙酸及乙醇的降低分别实施软 X 诱变及定点突变选育, 并对比分析了突变株与出发株相关酶活及基因序列变化。针对出发株的流量分析显示产物琥珀酸的代谢通量为 1.78(mmol/g/h), 主要副产物乙酸与乙醇的代谢通量分别为(0.60mmol/g/h)和(1.04 mmol/g/h), 并发现乙醇代谢加剧了琥珀酸合成中的 H 电子供体的不足; 筛选出的氟乙酸抗性突变株 S.JST1 的乙酸代谢通量降低了 96%, 为 0.024(mmol/g/h), 酶活检测表明磷酸乙酰转移酶(Pta)的酶比活力从 602 降低到 74, 进一步的序列对比分析发现 *pta* 突变基因中产生了一个突变位点; *adh* 定点复合突变株 S.JST2 的乙醇代谢通量降低了 98%, 为 0.020(mmol/g/h), 酶活检测表明 Adh 的酶比活力从 585 降低到 62, 最终突变株 S.JST2 琥珀酸累积产量达 65.7 g/L。围绕产琥珀酸放线杆菌 Pta 及 Adh 酶活的降低实施定向选育, 在降低副产物流量的同时, 有助于改善细胞 H 供体代谢平衡进而提高琥珀酸的流量。所获突变株具有工业应用潜力。

关键词: 产琥珀酸放线杆菌, 代谢通量, 选育, 磷酸乙酰转移酶, 乙醇脱氢酶

Breeding of *Actinobacillus Succinigenes* Mutants with Improved Succinate Production Based on Metabolic Flux Analysis

Lijun Pan, Xingjiang Li, Shaotong Jiang, Zhaojun Wei, Xiaohui Chen, Licheng Cai, Hefeng Wang, and Jijun Jiang

School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China

Abstract: It is very important to obtain high yield mutant strains on the base of metabolic flux analysis of *Actinobacillus succinigenes* S.JST for the industrial bioconversion of succinic acid. The metabolic pathway was analyzed at first and the flux of the metabolic networks was calculated by matrix. In order to decrease acetic acid flux, the strains mutated by soft X-ray of synchronous radiation were screened on the plates with high concentration of fluoroacetic acid. For decreasing the metabolic flux of ethanol the site-directed mutagenesis was carried out for the reduction of alcohol dehydrogenase(Adh) specific activity. Then the enzyme activity determination and the gene sequence analysis of the mutant strain was compared with those of the parent strain. Metabolic flux analysis of the parent strain indicated that the flux of succinic acid was 1.78(mmol/g/h) and that the flux of acetic acid and ethanol were 0.60 (mmol/g/h) and 1.04(mmol/g/h), respectively. Meanwhile the metabolic pathway analysis showed that the ethanol metabolism enhanced the lacking of H electron donor during the synthesis of succinic acid and that the succinic acid flux was

Received: January 20, 2008; **Accepted:** May 19, 2008

Supported by: the Key Project of Chinese National Program for Fundamental Research and Development (No. 2007BAD34B01), the Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 070411024), the Foundation of Hefei University of Technology (No. 073002F).

Corresponding author: Shaotong Jiang. Tel/Fax: +86-551-2901507; E-mail: jiangshaotong1954@163.com

国家科技支撑计划(No. 2007BAD34B01); 安徽省自然科学基金(No. 070411024); 合肥工业大学基金(No. 073002F)资助。

weakened by the metabolism of byproducts ethanol and acetic acid. Compared with the parent strain, the acetic acid flux of anti-fluoroacetic mutant strain S.JST1 was 0.024 (mmol/g/h), decreasing by 96%. Then the enzyme determination showed that the specific activity unit of phosphotransacetylase (Pta) decreased from 602 to 74 and a mutated site was founded in the *pta* gene of the mutant strain S.JST1. Compared with that of the parent strain S.JST1 the ethanol flux of *adh*-site-directed mutant strain S.JST2 was 0.020 (mmol/g/h), decreasing by 98%. Then the enzyme determination showed that the specific activity unit of Adh decreased from 585 to 62 and the yield of end product succinic acid was 65.7 (g/L). The interdiction of Adh and Pta decreased the metabolism of byproducts and the H electron donor was well balanced, thus the succinic acid flux was strengthened by the redundant carbon flux from these byproducts. The mutant strain S.JST2 obtained in this paper deserves being extended to application of industrial fermentation.

Keywords: *Actinobacillus succinogenes*, metabolic flux, breeding, phosphotransacetylase, alcohol dehydrogenase

琥珀酸广泛应用于化工、食品、医药、香料、染料、油漆、塑料和照相材料工业,琥珀酸可以直接或间接合成 250 种以上的化工产品。目前琥珀酸主要依赖石化原料制备,使其广泛应用受到限制^[1]。生物转化可再生原料生产琥珀酸的方法倍受重视,以可再生淀粉糖和二氧化碳作为主要原料,不仅摆脱了对石化原料的依赖,而且开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径,使琥珀酸成为未来最重要的生物基化工产品之一,其工业规模的微生物转化将成为一个最具发展潜力的绿色工艺模式^[2]。

琥珀酸作为三羧酸循环的中间体,也是许多严格厌氧菌和兼性厌氧菌累积产物^[3-5]。产生琥珀酸的微生物包括丙酸产生菌、典型的胃肠菌、瘤胃菌等^[6-8]。许多琥珀酸产生菌是从瘤胃中分离出来的,产琥珀酸放线杆菌就是其中最重要的一种^[9,10]。产琥珀酸放线杆菌的代谢过程中伴有大量副产物出现^[11,12],如何对菌株进行准确代谢分析并实施定向选育是产琥珀酸菌株的研究重点。笔者发现该类菌与大肠杆菌及厌氧螺菌相比较,它具有耐高糖及耐高琥珀酸盐的特点,尽管产生副产物,仍具有工业开发潜力。

代谢流量分析是代谢工程研究的最重要的一种手段和方法^[13,14]。在测定胞外物质变化的基础上,通过细胞内各种生化反应的化学计量可以计算出胞内各物质的流量分配^[15-17],在代谢分析基础上,通过比较由遗传或环境因素扰动而诱导的各代谢物流量分配变化,可以确定整个代谢过程中具有特殊地位的途径或反应^[18,19],并对某些特定的途径实施传统诱变或分子操作定向选育,是开发工业微生物的一个重要手段^[20,21]。而产琥珀酸放线杆菌的主要分支途径存在于丙酮酸及磷酸烯醇式的下游代谢,若能有效检测其下游代谢酶活及产物,则完全能够有效

理清其代谢通路并分析其代谢流量。

Zeikus 等^[11,12]的最新研究表明,该类菌株中的主要副产物为乙酸、甲酸、乙醇及乳酸,并在一定程度上降低了副产物乙酸的代谢量。笔者进一步分析发现该类菌在 TCA 阻断了的情况下,大量的乙酸产生必然伴随大量的丙酮酸脱羧产生 NADH,产生大量副产物乙酸是由于细胞 NADH 不足所造成,因此即使诱变选育的突变株中该类副产物有效降低了,仍要进行其他工艺调控,如有效增加 HMP 途径流量或增加发酵气体中的 H₂ 含量,以弥补 H 供体不足。同时由于 1 分子的乙酰辅酶 A 生成转化为 1 分子的乙醇需净消耗 2 分子的 NADH,因此副产物乙醇的生成更是加剧了细胞内还原力不足的矛盾,在不能获得有效的诱变选育时,基因敲除或定点突变选育是必需的。

本研究在代谢途径及流量分布分析的基础上,围绕磷酸乙酰转移酶与乙醇脱氢酶的降低实施了定向选育,突变株琥珀酸产量获得了显著提高。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

牛瘤胃中分离获得,16S rRNA 鉴定(GenBank Accession No. EU074771)分析为产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes* S.JST),为本实验室保藏。

1.1.2 发酵培养基(g/L)

玉米浆(CSL) 15, 酵母浸粉 10, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.16, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.7, NaCl 1.0, MgCl₂ · 6H₂O 0.2, CaCl₂ 0.2, 葡萄糖 80(分消), CaCO₃ 40, 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)5, pH 6.5。

1.1.3 培养条件

37°C 摇瓶厌氧发酵, 厌氧混合气中的二氧化碳及氢气的浓度通过厌氧气室控制。

1.1.4 试剂和仪器

DNA 提取、回收及 PCR 反应试剂均购自大连宝生物工程; 定点突变试剂及引物由普洛麦格(北京)生物技术有限公司提供; 高效毛细管电泳色谱(HPCE)采用美国 Beckman Coulter 公司 P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪; 气相采用安捷伦科技上海分析仪器有限公司色谱系统; 细胞破碎仪为 JY92-II 系统; 厌氧培养系统为 CBJS-5B/1; 软 X 射线装置为中国科技大学国家同步辐射实验室提供。

1.2 产物检测

1.2.1 生物量测定

恒重法。

1.2.2 残糖检测

DNS 法^[22]

1.2.3 有机酸检测

HPCE 检测, 石英毛细管内径 75 μm, 外径 375 μm, 有效长度 50 cm, 以 500 mmol/L H₃PO₄ 及 0.5 mmol/L 溴化十六烷三甲基铵(CTAB, pH6.5, 以 10 mol/L NaOH 调节)为运行电解质, 运行电压 9 kV, 运行时间 20 min, 柱温 20°C, 检测波长 200 nm, 压力进样 (3.5 kPa×5 s)。

1.2.4 乙醇检测

采用 1790 气相色谱仪, 配有氢火焰离子化检测器及 N 2000 色谱数据工作站, 色谱柱采用的是 DB-WAX 毛细管柱, 柱长 30 m, 内径 0.25 mm, 液膜厚度 0.5 μm, 色谱条件: N₂ 为载气, 流速为 15 mL/min, 进样器 240°C, 柱温 220°C, 检测温度 250°C, 进样量 1 μL, 分流比 1:100, 外标法定量。

1.3 代谢途径酶活检测

1.3.1 细胞粗酶液制备

37°C 条件下, CO₂ 厌氧气室摇瓶培养 24 h, 取 1 mL 发酵培养菌悬液 10 000 r/min 离心获得菌体, pH 7.5, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至 10 mL, 冰浴超声粉碎 10 min(超声 2s/间隔 5s), 4°C 下, 10 000 r/min 冷冻离心 15 min, 上清液即为原始粗酶液。

1.3.2 酶活测定

(1) 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶(Pepck)测定:

于对照比色皿中加入 3 mL pH 7.5, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 测定比色皿中加 2.3 mL 缓冲液, 之后依次加入 50 mmol/L MnCl₂、0.5 mmol/L 碳酸氢钠、0.5 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸钠、50 mmol/L 的 ADP(腺嘌呤核苷二磷酸)、5 mmol/L 还原辅酶 I (NADH)溶液各 0.1 mL, 置于 25°C 保温, 而后分别快速加入 0.1 mL 的 500 u/mL 苹果酸脱氢酶纯酶液与适量粗酶液, 启动反应; 在 340 nm 处, 3 min 内每 30 s 以对照比色皿调零, 记录测定比色皿吸光度值, 计算一定时间内吸光度的降低值 ΔA; 在苹果酸脱氢酶催化草酰乙酸(OAA)到苹果酸(Mal)的反应中, ΔG°' = -29.82 kJ/mol, 反应热力学决定了正向处于绝对优势, 因此在苹果酸脱氢酶酶活过剩的情况下, 苹果酸脱氢酶转化 OAA 生成 Mal 在速率上不存在限制, 其速率远远高于 Pepck 的催化速率, 所以 Pepck 固定二氧化碳催化底物磷酸烯醇式丙酮酸转化 OAA 的速率可以间接用苹果酸脱氢酶(Mdh)催化 NADH 的速率代替。(2)丙酮酸羧化酶(Pc)测定: 测定比色皿中分别加入 2.2 mL 缓冲液, 依次加入 1 mg/mL 生物素、50 mmol/L MgCl₂、0.5 mol/L 碳酸氢钠、0.5 mol/L 丙酮酸钠、50 mol/L 腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、5 mmol/L NADH 溶液各 0.1 mL, 25°C 保温, 之后操作同 Pepck 的检测。(3)Mdh 测定: 测定比色皿中分别加入 2.7 mL 缓冲液, 0.1 mL 50 mmol/L OAA, 0.1 mL 5 mmol/L NADH 溶液后, 25°C 保温, 其他操作同于 Pc 的检测。(4)乙醇脱氢酶(Adh)测定: 测定比色皿中分别加入 2.3 mL 缓冲液, 0.5 mL 1%(V/V)乙醇溶液(用缓冲液配制), 0.1 mL 5 mmol/L NADH 溶液后, 25°C 保温, 其他操作同于 Mdh 的检测。(5)Pta 测定参考文献[23]。

1.3.3 酶活力计算

酶活力单位计算在本方法相当于每分钟直接或间接消耗 1 μmol NADH 量, 计算式如下:

$$U = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times b \times \Delta t} \times n \times 10^3$$

酶的比活力为每毫克酶蛋白所具有的酶活力, 单位为 u/mg, 计算式如下:

$$\text{specific activity} = \frac{U}{V \times C \times n} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times b \times \Delta t \times C} \times 10^3$$

其中 ΔA—340 nm 处吸光度的变化值, 无量纲; V—酶促反应体积, 指比色皿中酶液体积, 为 3 mL;

ε —NADH 的表观摩尔消光系数, 为 6.22×10^3 (L/mol/cm); b —比色皿的光程, 为 1 cm; Δt —时间间隔, 为 3 min; n —稀释倍数, $n=30\ 000/x$; x —向反应比色皿内加入的粗酶液体积, 单位为 μL ; C —比色皿中酶蛋白质量浓度, 单位为 mg/mL。

1.4 代谢过程及通量分析

在菌株相关酶活分析及代谢产物精确检测条件下, 结合产琥珀酸放线杆菌的主代谢途径, 能够推测出其代谢过程, 并且利用拟稳态假设的方法, 可以求出各个途径的代谢通量的。

在代谢流计算过程中, 各种产物参数的获得通过本文 1.2 介绍的方法, 发酵时间统一取 20~24 h 的时间段进行代谢分析。细胞在 20 h 左右, 其代谢产物的生成速度及细胞的生成速度都比较稳定, 而且这一部分时间内的平均值与细胞总体发酵的平均值比较接近, 各个发酵批次之间重现性很好, 所以可统一考察该时间段变量。

由参考文献[11]可知, 这一类菌株同时具有 EMP 及 HMP 代谢途径的特点, 同时结合生化代谢基本原理可以列出附录表 1 中的序号 1 至序号 13 的生化反应。笔者通过对菌株的代谢产物检测发现主要有琥珀酸、乙酸、乙醇、乳酸、甲酸、柠檬酸等, 同时笔者分别检测到 Pepck、Pc、Mdh、Adh、Pta 等酶活, 从而可以推导其丙酮酸及磷酸烯醇式丙酮酸的代谢支路, 进而可以列出附录表 1 中的序号 14 至序号 27 的生化反应方程。附录表 1 中序号 28 的等式代表的是细胞的生物质量合成^[12], 由于同一个种的菌株在相似培养环境条件下, 其细胞的生物组成应一致, 因此细胞组成参考 Mariet J^[9]与 McKinlay JB^[12]的研究结论, 单一化为 $\text{CH}_2\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$ 统一处理。

详细的代谢通量方程及细胞组成分解等式见附录表 2, 其中前 19 项是由笔者根据附录表 1 的生化反应代谢平衡推导出的(27 个生化反应涉及到 8 个不同类型代谢流出口, 所以可用于构建代谢方程的节点个数为 $27-8=19$ 个)。第 20 项与第 21 项是笔者根据 H 供体及 ATP 代谢平衡分别列出的。第 22 项是笔者基于培养基中的葡萄糖消耗而列出的。第 23 项是笔者基于乙醛酸循环很弱而列出的。第 24 项至第 36 项是根据附录表 1 中的细胞质量组成而分解并转化成的物质的量等式^[12], 其中 NH_3 的代谢是将各种氨基酸的代谢折合成一种 NH_3 的参与。第 37 项至第

45 项是笔者基于可测的代谢终端产物及生物量而列出的。总共 45 个方程, 而需要求解的流量个数也是 45, 所以可以将附录表 2 中的 45 个方程联立, 利用 MATLAB 软件或 Excel 中的数学函数对原方程的逆矩阵进行求解得到各个代谢通量。

附录表 1 生化反应
Appendix Table 1 Biochemical reactions

No.	Involved flux	Metabolic reactions
1	J_1	$\text{PEP}+\text{Glc}=\text{G6P}+\text{Pyr}$
2	J_2	$\text{ATP}+\text{Glc}=\text{ADP}+\text{G6P}$
3	J_3	$\text{G6P}=\text{F6P}$
4	J_4	$\text{ATP}+\text{F6P}=\text{ADP}+2*\text{G3P}$
5	J_5	$\text{G3P}+\text{NAD}^++\text{Pi}+\text{ADP}=\text{PEP}+\text{NADH}+\text{ATP}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+$
6	J_{35}	$\text{G3P}=3\text{PG}$
7	J_6	$\text{ADP}+\text{PEP}=\text{ATP}+\text{Pyr}$
8	J_{24}	$\text{G6P}+2*\text{NADP}^+=2*\text{NADPH}+\text{Ru5P}+\text{CO}_2$
9	J_{25}	$\text{Ru5P}=\text{Ro5P}$
10	J_{28}	$\text{Ru5P}=\text{X5P}$
11	J_{26}	$\text{Ro5P}+\text{X5P}=\text{S7P}+\text{G3P}$
12	J_{27}	$\text{S7P}+\text{G3P}=\text{F6P}+\text{E4P}$
13	J_{29}	$\text{X5P}+\text{E4P}=\text{F6P}+\text{G3P}$
14	J_8	$\text{CO}_2+\text{PEP}+\text{ADP}=\text{OAA}+\text{ATP}$
15	J_7	$\text{ATP}+\text{Pyr}+\text{HCO}_3^-=\text{ADP}+\text{Pi}+\text{OAA}$
16	J_9	$\text{OAA}+\text{NADH}+\text{H}^+=\text{Mal}+\text{NAD}^+$
17	J_{10}	$\text{Mal}=\text{Fum}+\text{H}_2\text{O}$
18	J_{11}	$\text{Fum}+\text{FADH}_2=\text{FAD}+\text{Suc}$
19	J_{12}	$\text{Pyr}+\text{CoA}+\text{NAD}^+=\text{AcCoA}+\text{CO}_2+\text{NADH}$
20	J_{13}	$\text{AcCoA}+\text{H}_2\text{O}+\text{OAA}=\text{Cit}+\text{CoA}$
21	J_{14}	$\text{Cit}=\text{Isoc}$
22	J_{18}	$\text{AcCoA}+\text{Pi}=\text{CoA}+\text{Ac-P}$
23	J_{19}	$\text{Ac-P}+\text{ADP}=\text{Ace}+\text{ATP}$
24	J_{20}	$\text{AcCoA}+\text{NADH}+\text{H}^+=\text{AC.H.}+\text{CoA}+\text{NAD}^+$
25	J_{21}	$\text{AC.H.}+\text{NADH}+\text{H}^+=\text{EtOH}+\text{NAD}^+$
26	J_{22}	$\text{Pyr}+\text{CoA}=\text{For}+\text{AcCoA}$
27	J_{23}	$\text{Pyr}+\text{NADH}+\text{H}^+=\text{Lac}+\text{NAD}^+$
28	J_{Other}	$1.2522*\text{ATP}+0.5270*\text{NADPH}+0.05610*\text{G6P}+0.06989*\text{NH}_3+0.01724*\text{F6P}+0.083*\text{Ro5P}+0.02568*\text{E4P}+0.008852*\text{G3P}+0.1341*3\text{PG}+0.04667*\text{PEP}+0.1279*\text{Pyr}+0.1280*\text{AcCoA}+0.1043*\text{OAA}=1.0*\text{Biomass}+1.0547*\text{ADP}+0.5263*\text{NADP}^+$

(其中: 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)、丙酮酸(Pyr)、葡萄糖(Glc)、6-磷酸葡萄糖(G6P)、果糖-6-磷酸(F6P)、1, 6-二磷酸果糖(F-1, 6-2P)、3-磷酸甘油醛(G3P)、3-磷酸甘油酸(3PG)、5-磷酸核酮糖(Ru5P)、5-磷酸核糖(Ro5P)、5-磷酸木酮糖(X5P)、7-磷酸景天酮糖(S7P)、4-磷酸赤藓糖(E4P)、草酰乙酸(OAA)、苹果酸(Mal)、富马酸(Fum)、琥珀酸(Suc)、辅酶 A(CoA)、乙酰辅酶 A(AcCoA)、柠檬酸(Cit)、异柠檬酸(Isoc)、乙酰磷酸(Ac-P)、乙酸(Ace)、乙醛(AC.H.)、乙醇(EtOH)、甲酸(For)、乳酸(Lac)、 α -酮戊二酸(α -Ket)

附录表 2 代谢通量方程及其他条件方程
Appendix Table 2 Equations from metabolic flux balance and from other condition

No.	Metabolic intermediate	Equations from metabolic flux balance
1	Glc	$1 \cdot J_{11} + 1 \cdot J_{12} - 1 \cdot J_{45} = 0$
2	G6P	$1 \cdot J_{11} + 1 \cdot J_{12} - 1 \cdot J_{13} - 1 \cdot J_{24} - 1 \cdot J_{30} = 0$
3	F6P	$1 \cdot J_{13} - 0.5 \cdot J_{14} + 0.5 \cdot J_{27} + 0.5 \cdot J_{29} - 1 \cdot J_{31} = 0$
4	G3P	$1 \cdot J_{14} - 1 \cdot J_{15} + 0.5 \cdot J_{29} - 1 \cdot J_{34} - 1 \cdot J_{35} = 0$
5	3PG	$1 \cdot J_{35} - 1 \cdot J_{36} = 0$
6	PEP	$1 \cdot J_{15} - 1 \cdot J_{11} - 1 \cdot J_{16} - 1 \cdot J_{18} - 1 \cdot J_{37} = 0$
7	Ru5P	$1 \cdot J_{24} - 1 \cdot J_{25} - 1 \cdot J_{28} = 0$
8	Ro5P	$1 \cdot J_{25} - 0.5 \cdot J_{26} - 1 \cdot J_{32} = 0$
9	S7P	$1 \cdot J_{26} - 1 \cdot J_{27} = 0$
10	X5P	$1 \cdot J_{26} - 2 \cdot J_{28} + 1 \cdot J_{29} = 0$
11	E4P	$1 \cdot J_{27} - 1 \cdot J_{29} - 2 \cdot J_{33} = 0$
12	OAA	$1 \cdot J_{17} + 1 \cdot J_{18} - 1 \cdot J_{19} - 1 \cdot J_{13} - 1 \cdot J_{40} = 0$
13	Mal	$1 \cdot J_{19} - 1 \cdot J_{10} + 1 \cdot J_{17} = 0$
14	Fum	$1 \cdot J_{10} - 1 \cdot J_{11} = 0$
15	Glxt	$1 \cdot J_{16} - 1 \cdot J_{17} = 0$
16	Ac-P	$1 \cdot J_{18} - 1 \cdot J_{19} = 0$
17	AC.H.	$1 \cdot J_{20} - 1 \cdot J_{21} = 0$
18	Pyr	$1 \cdot J_{11} + 1 \cdot J_{16} - 1 \cdot J_{17} - 1 \cdot J_{12} - 1 \cdot J_{22} - 1 \cdot J_{23} - 1 \cdot J_{38} = 0$
19	AcCoA	$1 \cdot J_{12} - 1 \cdot J_{13} - 1 \cdot J_{18} - 1 \cdot J_{20} + 1 \cdot J_{22} - 1 \cdot J_{39} = 0$
20	[H]	$1 \cdot J_{15} - 1 \cdot J_{19} - 1 \cdot J_{11} + 1 \cdot J_{12} - 1 \cdot J_{20} - 1 \cdot J_{21} - 1 \cdot J_{23} + 2 \cdot J_{24} - 1 \cdot J_{42} = 0$
21	ATP	$1 \cdot J_{15} - 1 \cdot J_{12} - 0.5 \cdot J_{14} + 1 \cdot J_{16} - 1 \cdot J_{17} + 1 \cdot J_{18} + 1 \cdot J_{19} - 1 \cdot J_{41} = 0$
22	Glc(consumed in the broth)	$1 \cdot J_{45} = \Delta(\text{Glc})$
23	Glycoxylate cycle Flux are small	$1 \cdot J_{17} = 0$
24	Biomass _{G6P}	$1 \cdot J_{30} - 0.005349 \cdot J_{44} = 0$
25	Biomass _{F6P}	$1 \cdot J_{31} - 0.001644 \cdot J_{44} = 0$
26	Biomass _{Ro5P}	$1 \cdot J_{32} - 0.008948 \cdot J_{44} = 0$
27	Biomass _{E4P}	$1 \cdot J_{33} - 0.003184 \cdot J_{44} = 0$
28	Biomass _{G3P}	$1 \cdot J_{34} - 0.001291 \cdot J_{44} = 0$
29	Biomass _{3PG}	$1 \cdot J_{36} - 0.01788 \cdot J_{44} = 0$
30	Biomass _{PEP}	$1 \cdot J_{37} - 0.006889 \cdot J_{44} = 0$
31	Biomass _{Pyr}	$1 \cdot J_{38} - 0.03604 \cdot J_{44} = 0$
32	Biomass _{AcCoA}	$1 \cdot J_{39} - 0.004139 \cdot J_{44} = 0$
33	Biomass _{OAA}	$1 \cdot J_{40} - 0.01959 \cdot J_{44} = 0$
34	Biomass _{ATP}	$1 \cdot J_{41} - 0.06125 \cdot J_{44} = 0$
35	Biomass _{NADPH}	$1 \cdot J_{42} - 0.01754 \cdot J_{44} = 0$
36	Biomass _{NH3}	$1 \cdot J_{43} - 0.1020 \cdot J_{44} = 0$
37	Suc	$1 \cdot J_{11} = \Delta(\text{Suc})$
38	Cit	$1 \cdot J_{13} - 1 \cdot J_{14} = \Delta(\text{Cit})$
39	Isoc	$1 \cdot J_{14} - 1 \cdot J_{15} - 1 \cdot J_{16} = \Delta(\text{Isoc})$
40	α -Ket	$1 \cdot J_{15} = \Delta(\alpha\text{-Ket})$
41	Ace	$1 \cdot J_{19} = \Delta(\text{Ace})$
42	EtOH	$1 \cdot J_{21} = \Delta(\text{EtOH})$
43	For	$1 \cdot J_{22} = \Delta(\text{For})$
44	Lac	$1 \cdot J_{23} = \Delta(\text{Lac})$
45	Biomass	$1 \cdot J_{44} = \Delta(\text{Biomass})$

1.5 Pta 酶活降低定向选育

1.5.1 软 X 射线诱变条件的确立

无菌制备 10^7 个/mL 菌悬液, 取 5 μL 均匀涂于直径为 5 mm 的纤维素膜片上, 再将膜片装于样品架, 然后放入同步辐射软 X 射线线路的真空舱。利用真空抽机将真空舱抽至 $1.6 \times 10^{-3} \text{Pa}$, 用同步辐射软 X 射线对样品进行辐射 3 min, 软 X 射线 NK 边对放线杆菌的致死率为 70%~80%, 将辐射后的膜片放入无菌小管内, 加 1 mL 生理盐水, 充分振荡, 进行下步筛选或保存于冰箱待用。

1.5.2 Pta 途径缺陷型菌株的筛选^[23,24]

将诱变后的细胞涂布于含有高浓度氟乙酸的平板上, 筛选获得的那些氟乙酸抗性突变株的 PTA 酶活极可能大大降低, 从而副产物乙酸的流量得到有效降低。

1.5.3 pta 基因突变前后对比分析

对磷酸乙酰转移酶活力降低的阳性突变株进行 PTA 基因克隆分析, 原始株及突变株克隆引物相同, F1: 5'-ATGTCTCGTACATTTATTCT-3', F2: 5'-TTAAGCTTGCCTAGCCTGAA-3'。PCR 反应: 25 μL PCR 反应基本体系中, 10 \times Buffer 为 2.5 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 为 2 μL , F1(20 pmol) 为 1 μL , F2(20 pmol) 为 1 μL , Taq 为 0.2 μL , 模板 DNA 为 1 μL , 用水补足到 25 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 100 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物回收、连接、转化、测序及分析: 使用试剂盒纯化 DNA; 取 1 μL 回收的 PCR 产物, 按照 pMD18T 载体试剂盒说明书, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 1 h 以上; 取连接混合物 3.5 μL 加到 200 μL 感受态细胞液中, 冰浴 30 min 后热击转化; 再对阳性克隆株进行 PCR 鉴定; 序列测定由大连宝生物工程公司完成。

1.6 adh 定点突变选育

1.6.1 adh 基因克隆

ADH 克隆引物为 H₁: 5'-ATGAACTCGAAAC CCTTTC-3', H₂: 5'-TTATTTCGAATCTGAGTTGGA-3', PCR 反应、产物回收、连接、转化、测序操作同 1.5.4。

1.6.2 胞外定点突变

将所获得的 ADH 基因片段进行定点突变, 设置 2 个突变点, 一个在基因片段靠前 79 位, 一个在基因片段靠后 973 位, 突变后均为 TAA 三联终止密码

子, 其中 79 位的突变引物为: Forward: 5'-CACAAACACCTTGATTATGATTAAAACAGTCAGGAACAAAAC-3', Reverse: 5'-GGTTTGTTCCTGACTGTTTTATCATAATCAAGGTGTTGTG-3', 973 位的突变引物为: Forward: 5'-GTTTTTCGATTTCCGGTAACTTG AAGACGCG-3', Reverse: 5'-CGCGTCTTCAAGTTA CCGGAAATCGAAAAC-3', 突变过程由普洛麦格(北京)生物技术有限公司完成。

1.6.3 导入胞内重组

定点突变基因片段用低复制载体 pLG338 连接, 之后电穿孔(取 50 μ L 放线杆菌与质粒 DNA 混合, 电极槽采用 25 μ F、2.5 kV、200 Ω 电场处理 4 ms) 导入放线杆菌细胞内, 由于载体携带 *adh* 突变片段与染色体 *adh* 片段具有高度同源性, 易发生同源重组。

1.6.4 阳性重组体筛选

利用载体 pLG338 抗药性筛选重组细胞, 突变前菌株的 Adh 酶活很强, 与丙烯醇结合后产生对细胞有致死效应的丙烯醛, 一旦重组细胞内载体所带的突变 *adh* 片段与染色体上的高度同源的 *adh* 片段发生交换、对接等重组, 则 Adh 酶活就可能迅速降低, 从而利用平板内添加丙烯醇能够进一步筛出阳性重组细胞。

1.6.5 重组细胞 *adh* 基因测序

所用引物及相关操作与 1.6.1 相同, 确认所获菌株的 *adh* 基因突变情况。

2 结果

2.1 代谢通量分析

所得代谢过程及通量数据见图 1。

通过图 1 出发菌株的代谢通量结果可以发现, 流量分析显示产物琥珀酸的流量速率为 1.78 (mmol/g/h), 丙酮酸及乙酰辅酶 A 下游的代谢通量绝大部分被乙酸及乙醇分流, 主要副产物乙酸与乙醇的流量速率分别为 0.60 (mmol/g/h) 和 1.04 (mmol/g/h), 大量乙酸及乙醇的代谢增加了乙酰辅酶 A 的流量, 这必然导致丙酮酸通向琥珀酸的代谢流的降低, 尤其是乙醇的代谢更是加剧了细胞内部的 H 电子供体的不足, 毕竟由草酰乙酸到苹果酸以及由富马酸到琥珀酸各自分别净消耗一个 NADH, 因此菌株的进一步选育应围绕乙酰辅酶 A 下游副产物乙酸及乙醇的代谢流降低实施。

2.2 Pta 酶活缺陷株的筛选

2.2.1 诱变筛选

将出发菌株制备菌悬液, 采用软 X 射线同步辐射 NK 边对菌体进行辐照, 进行抗氟乙酸平板筛选获得 6 株突变株, 其中 S.JST1 菌株的初步发酵显示琥珀酸代谢流量明显增加, 副产物乙酸代谢流量明显降低, 琥珀酸代谢通量由 1.78 (mmol/g/h) 升为 2.27 (mmol/g/h) 流量结果见图 1。

2.2.2 突变株的代谢及酶活分析

对突变株的进一步代谢流量分析表明, 在整体代谢框架不变的情况下, 终端产物产率显示琥珀酸产量由 47.3 (g/L) 增至 56.2 (g/L), 产物产量结果见图 3-A, Pta 酶活大幅降低, 与出发株的酶比活力比较见图 3-B。

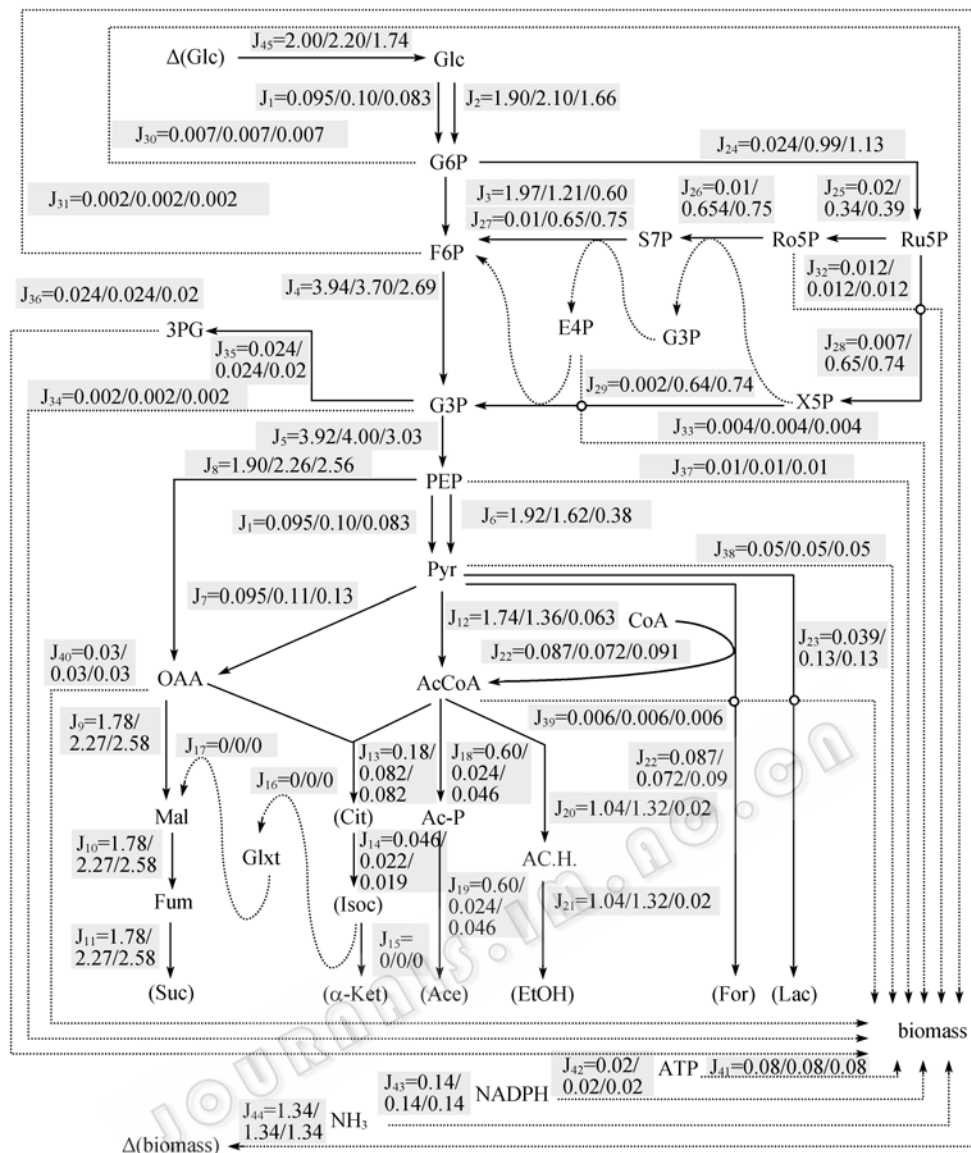
2.2.3 突变株的 *pta* 克隆分析

对出发株 *pta* 基因分析表明(GenBank Accession No. EU256480), 该基因有 2142 个碱基序列, 属于磷酸转酶系列的乙酰磷酸转移酶; 将该基因序列在数据库中进行同源性搜索后, 发现本基因片的最高同源性片段是 *Actinobacillus succinogenes* 130Z 菌株内的 *pta* 基因序列(GenBank Accession No. CP000746: 1823344-1825485), 其同源性超过 99%, 这也表明产琥珀酸放线杆菌这一类细菌中广泛表达磷酸转乙酰酶, 若想提高该类菌株的琥珀酸产量, 对 Pta 途径实施选育是必需的。对突变株的 *pta* 基因分析结果表明(GenBank Accession No. EU284747): 突变株 *pta* 基因序列第 259 位的 T 被突变为 G, 相应编码氨基酸第 87 位的亮氨酸被突变为缬氨酸, 序列第 1480 位的 G 被突变为 T, 相应编码氨基酸第 494 位的缬氨酸被突变为亮氨酸, 而生物信息学分析表明这两个位置都处于 *pta* 基因酶活性位点的保守区域, 可能这些突变造成了其酶活的直接降低。

2.3 *adh* 定点突变选育

2.3.1 *adh* 克隆分析

对 *adh* 基因片段克隆测序(GenBank Accession No. EU256479) 分析, 该基因有 1044 个碱基序列, 同源性搜索结果表明, 该基因是在革兰氏阴性厌氧细菌中最广泛存在的锌离子激活型乙醇脱氢酶, 普遍表现酶活较高, 其高达 99.5% 同源性的片段是 ATCC55618 菌株内的 *adh* 基因序列(GI:150840531), 在掌握该酶基因序列的基础上进行定点突变是可行的。



Note: Flux unit($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), Left flux form parent strain, Middle flux from mutant strain S.JST1, Right flux from mutant strain S.JST2

图 1 代谢网络中的通量分布

Fig. 1 Flux distribution in the metabolic networks

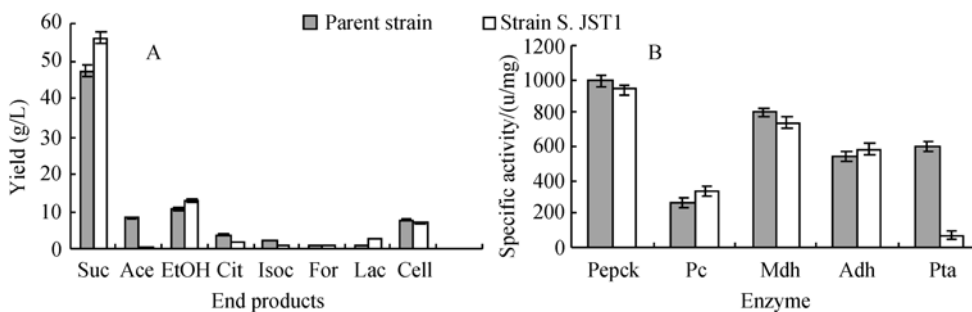


图 2 突变株与出发株的终端产物(A)及酶比活力(B)比较

Fig. 2 The comparison of the end products (A) and enzyme activity (B) of mutant strain s.sjt1 with that of parent strain

2.3.2 *adh* 基因胞外定点突变及胞内重组

针对所得的 *adh* 序列涉及两个突变点一个是靠前的 79 位的 G 突变为 T, 一个是靠后的 973 位的 C 突变为 T, 突变引物见 1.6.2, 将突变了 ADH 基因片段克隆入低拷贝载体 pLG338, 此时载体 DNA 作为破坏载体用于转化, 采用电穿孔法将带有突变 *adh* 片段的载体 pLG338 导入放线杆菌突变株 S.JST1 细胞内, 由于该片段与染色体上的 ADH 片段高度同源, 因此容易发生同源性重组。

2.3.3 阳性重组细胞的筛选及鉴定

利用 pLG338 质粒载体所具有的 Amp 抗性筛选阳性转化子, 并通过丙烯醛的致毒效应从阳性转化子中筛选 *adh* 突变株, 其中突变株 S.JST2 的生长特征及发酵特性优良。于是对其 *adh* 基因克隆测序 (GenBank Accession No. EU284746), 结果表明破坏载体携带的突变 *adh* 片段与放线杆菌染色体的 *adh* 片段只是进行了部分交换重组, 因为序列对比表明该基因片段只有一个突变点, 但由于突变位点开始设计的就是终止密码子, 因此一个突变点足以让该基因酶活丧失。

2.3.4 酶活与流量对比分析

对重组复合突变株 S.JST2 的进一步代谢流量分析表明, 在整体代谢框架不变的情况下, 产物产量结果见图 4-A, 终端产物产率显示琥珀酸产量增至 65.7 (g/L)。流量结果见图 1。琥珀酸代谢通量升为 2.58 (mmol/g/h), 数据见图 1, 副产物乙醇累积明显下降。Adh 酶比活力大幅降低, 与出发菌株的酶比活力比较见图 4-B。

3 讨论

Actinobacillus succinogenes 是一种从瘤胃中分离、耐渗透压的兼性厌氧细菌, 它可以在厌氧下利用和同化很多糖类同时伴随有乙醇、乙酸和甲酸等副产物产生^[25]; 包括其他产琥珀酸的微生物在内, 由于大部分琥珀酸产生菌的产酸量很低^[26]。所以琥珀酸的发酵在很长的一段时间内都不为人们所重视。

本研究对牛瘤胃中分离的一株产琥珀酸放线杆菌进行了代谢过程分析, 并完成了代谢通量方程的构建与细胞代谢通量的计算, 针对主要副产物的降低实施了定向选育研究, 最终琥珀酸代谢流量获得大幅提高。

就代谢主要途径列出相应代谢方程后, 利用拟稳态条件下的矩阵计算了各代谢中间体的流量分布, 发现电子供体不足是琥珀酸流量低的主要因素, 细胞为了满足电子供体代谢平衡增大了乙酰辅酶 A 的流量, 但高流量乙酰辅酶 A 也增加了其下游乙酸、乙醇等副产物的流量, 尤其乙醇不但分流了琥珀酸的 C 流量, 更是加剧了细胞代谢过程中电子供体的不足。因此围绕乙酸、乙醇的降低实施定向选育是获得高产菌株的必要手段。

经过软 X 同步辐射诱变后, 利用平板筛出的氟乙酸抗性突变株 S.JST1 的乙酸流量明显降低, 主要由于氟乙酸对菌株柠檬酸循环的致死效应的完成须通过 Pta 途径实现, 一旦突变株对氟乙酸具有抗性, 则 Pta 酶活可能非常微弱, 进一步的酶活分析证实了这一点, 且序列分析表明突变株 S.JST1 的 *pta* 基

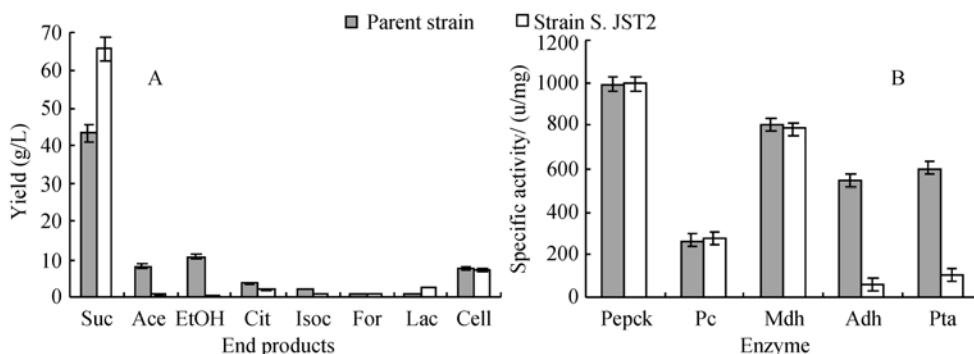


图 3 复合突变株 S.JST2 与出发菌株终端产物(A)及酶比活力(B)比较

Fig. 3 The comparison of the end products (A) and the enzyme activity (B) of mutant strain S.JST2 with that of parent strain

因发生一个序列的突变。在突变株 S.JST1 的基础上进行复合突变选育, 对于 *adh* 实施了胞外定点突变, 且人为地以终止密码子的方式进行突变, 通过 Amp 抗性筛选电穿孔方式导入的转化子, 利用丙烯醇与 Adh 的结合产物丙烯醛对细胞生长的毒性特征进行阳性突变株筛选, 大大降低了工作量, 获得的复合突变株 S.JST2 的乙醇代谢流量得到了有效降低, 且最终琥珀酸的累积浓度达到 65.7 g/L。

REFERENCES

- [1] Gopal Chotani, Tim Dodge, Amy Hsu, *et al.* The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1543**: 434–455.
- [2] Lee SY, Hong SH, Lee SH, *et al.* Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. *Macromol Biosci*, 2004, **4**: 157–164.
- [3] Soon Ho Hong, Jin Sik Kim, Sang Yup Lee, *et al.* The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nature Biotechnol*, 2004, **22**: 1275–1281.
- [4] Lee JW, Lee SY, Song H, *et al.* The proteome of mannheimia succiniciproducens, a capnophilic rumen bacterium. *Proteomics*, 2006, **6**(12): 3550–3566.
- [5] Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microbial Technol*, 2006, **39**: 352–361.
- [6] Lata Agarwal, Jasmine Isar, Rajendra K. Rapid screening procedures for identification of succinic acid producers. *J Biochem Biophys Methods*, 2005, **63**: 24–32.
- [7] Lee PC, Lee SY, Hong SH, *et al.* Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **58**: 663–668.
- [8] Cotelesage JJ, Prasad L, Zeikus JG, *et al.* Crystal structure of anaerobiospirillum succiniciproducens PEP carboxykinase reveals an important active site loop. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, **37**(9): 1829–1837.
- [9] Mariet J, Guettler MV, Mahendra KJ, *et al.* Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp 130Z. *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 332–342.
- [10] Guettler MV, Denise Rumler, Mahendra KJ. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 207–216.
- [11] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(11): 6651–6656.
- [12] McKinlay JB, Shachar HY, Zeikus JG, *et al.* Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of C-13-labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng*, 2007, **9**(2): 177–192.
- [13] Varma A, Palsson BO. Metabolic flux balancing basic concepts, scientific and practical use. *Bio Technol*, 1994, **12**: 994–998.
- [14] Bianco C, Imperlini E, Calogero R, *et al.* Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2006, **152**(8): 2421–2431.
- [15] Lee DY, Yun H, Park S, *et al.* MetaFluxNet: the management of metabolic reaction information and quantitative metabolic flux analysis. *Bioinformatics*, 2003, **19**: 2144–2146.
- [16] Kholodenko BN, Westerhoff HV. *Metabolic Engineering in the Post Genomic Era*. Publisher: Horizon Bioscience, 2004, pp.357–375.
- [17] Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and corynebacterium glutamicum for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9**: 268–274.
- [18] Cox SJ, Levanon SS, Sanchez A, *et al.* Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: a succinate production case study. *Metab Eng*, 2006, **8**: 46–57.
- [19] Gianchandani EP, Brautigam DL, Papin JA. Systems analyses characterize integrated functions of biochemical networks. *Trends Biochem Sci*, 2006, **31**(5): 284–291.
- [20] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 1715–1727.
- [21] Ailen M, Sanchez, George N, *et al.* Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metabo Eng*, 2005, **7**: 229–239.
- [22] Lin JH, Wei WL, Peng XX. *Laboratory Exercises in up to date Biology*. Beijing: Higher Education Press, 2001, pp.69–71.
林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2001, 69–71.
- [23] Mayer MAG, Bronnenmeier K, Schwarz WH, *et al.* Isolation and properties of acetate kinase- and phosphotransacetylase-negative mutants of *Thermoanaerobacter thermo-hydrisulfuricus*. *Microbiology*, 1995, **141**: 2891–2896.
- [24] Liu YP, Zheng P, Ni H, *et al.* Breeding of monofluoroacetate-resistant strains of *Actinobacillus succinogenes* and the mechanism based on metabolic flux analysis. *Chin J Biotechnol*, 2008, **24**(3): 460–467.
刘宇鹏, 郑璞, 倪晔, 等. 抗氟乙酸突变株的选育及其代谢流量分析. 生物工程学报, 2008, **24**(3): 460–467.
- [25] Wang QZ, Zhao XM. The research progress of succinic acid fermentation strains. *Chin J Biotechnol*, 2007, **23**(4): 570–576.
王庆昭, 赵学明. 产琥珀酸菌种研究进展. 生物工程学报, 2007, **23**(4): 570–576.
- [26] Xie X, Chen KQ, Liu ZM, *et al.* Construction and anaerobic fermentation of metabolically engineered *Escherichia coli* producing succinate. *Chin J Biotechnol*, 2008, **24**(1): 101–105.
谢鑫, 陈可泉, 刘忠敏, 等. 产丁二酸工程菌的构建及其厌氧发酵. 生物工程学报, 2008, **24**(1): 101–105.