

Genome shuffling 筛选 ϵ -聚赖氨酸高产菌及其对代谢流量分配的影响

李双¹ 颜鹏¹ 曾晨¹ 张宏建² 毛忠贵² 唐蕾^{1,2*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】从代谢流量分配的角度,探讨 Genome shuffling 导致链霉菌 ϵ -聚赖氨酸合成量提升的原因。【方法】从葡萄糖耐受型的亲本菌株 *Streptomyces* sp. AS32 和 ϵ -聚赖氨酸耐受型的亲本菌株 *Streptomyces albulus* F15 出发,进行三轮 Genome shuffling,筛选得到 ϵ -聚赖氨酸产量提高的链霉菌株 *Streptomyces* sp. AF3-44,采用通量分析方法构建链霉菌 ϵ -聚赖氨酸合成代谢网络,并对上述 3 株菌的代谢通量进行比较。【结果】AF3-44 的 ϵ -聚赖氨酸摇瓶产量为 3.1 g/L,较 AS32 和 F15 分别提高了 34%和 29%。3 株菌株中 AS32 三羧酸循环(TCA)的代谢通量最高;F15 磷酸戊糖途径(PPP)代谢通量最高;AF3-44 流向赖氨酸合成前体天冬氨酸以及 ϵ -聚赖氨酸的通量最高,TCA 和 PPP 通量位于两亲本菌株的中间水平,其中 TCA 中流向异柠檬酸的通量分别为 AS32 和 F15 的 77%和 116%,PPP 中流向 5-磷酸核酮糖的通量分别为 AS32 和 F15 的 149%和 92%。【结论】Genome shuffling 导致了代谢流的重新分布,流向前体赖氨酸和 ϵ -聚赖氨酸通量的增加,以及 PPP 和 TCA 通量配比的改变是链霉菌 ϵ -聚赖氨酸合成量增加的重要因素。

关键词: Genome shuffling, 代谢通量, 代谢网络, ϵ -聚赖氨酸

Effect of genome shuffling on ϵ -poly-L-lysine synthesis and metabolic flux

LI Shuang¹ YAN Peng¹ ZENG Chen¹ ZHANG Hong-Jian²
MAO Zhong-Gui² TANG Lei^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] To explain the reason of the improvement of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) in *Streptomyces* by genome shuffling (GS) through the analysis of ϵ -PL metabolic flux distribution between the parent strains and the high yield strain. [Methods] Glucose tolerant *Streptomyces* sp.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21376106); 111 Project (No. 111-2-06)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

Received: December 29, 2015; Accepted: March 31, 2016; Published online (www.cnki.net): April 18, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21376106); 111 引智计划(No. 111-2-06)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-12-29; 接受日期: 2016-03-31; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-04-18

AS32 and ϵ -PL tolerant *Streptomyces albulus* F15 were selected as parent strains for GS. Three rounds of GS were carried out and a higher ϵ -PL producing shuffled strain *Streptomyces* sp. AF3-44 was obtained. The ϵ -PL synthetic network was constructed by metabolic flux analysis method and the metabolic fluxes among the above strains were compared. **[Results]** Shuffled strain, AF3-44, had a flask yield of 3.1 g/L which was increased by 34% and 29% compared with those of parent strains AS32 and F15 respectively. The fluxes to the tricarboxylic acid cycle (TCA) were highest in AS32, whereas and the fluxes to the pentose phosphate pathway (PPP) are highest in F15. AF3-44 had highest fluxes from oxaloacetic acid to aspartic acid and ϵ -PL synthesis, while it had moderate TCA and PPP fluxes, where the flux to isocitrate in TCA was 77% and 116% of those in AS32 and F15 respectively, and the flux to ribulose-5-phosphate was 149% and 92% of those in AS32 and F15 respectively. **[Conclusion]** Genome shuffling led to increase of flux to the precursor lysine and ϵ -PL, and the redistribution of metabolic fluxes in PPP and TCA which contributed to the improvement of ϵ -PL in the shuffled strain.

Keywords: Genome shuffling, Metabolic flux, Metabolic network, ϵ -poly-L-lysine

ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)是一种由25–30个赖氨酸残基经 α -COOH和 ϵ -NH₂形成酰胺键连接而成的赖氨酸聚合物,具有抗菌谱广、耐高温、有效作用域pH较广等优点^[1]。Hiraki等^[2]通过¹⁴C-放射法研究证实了 ϵ -PL作为食品添加剂的高安全性。2014年我国已批准 ϵ -PL为食品添加剂新品种(2014年第5号,关于批准 ϵ -聚赖氨酸等4种食品添加剂新品种等的公告)^[3]。

目前 ϵ -PL的生产菌株以链霉菌为主,野生型菌株的合成能力偏低,摇瓶产量大多低于1 g/L,因此采用不同的育种方法获得产量提高的突变菌株,降低生产成本成为 ϵ -PL工业发酵研究的一个重要方面^[4]。在菌种改造中最有成效的当数Hiraki等^[5]的研究报道,即通过常规诱变手段,筛选L-Lys结构类似物S-(2-氨基)-L-半胱氨酸抗性突变株,降低L-Lys对天冬氨酸激酶的反馈抑制,提高单体赖氨酸的合成量,从而将白色链霉菌(*Streptomyces albulus*) ϵ -PL产量增加至2.11 g/L。但是后续的研究报告指出,仅增加赖氨酸量已不能进一步提升 ϵ -PL产量^[6]。Genome shuffling(GS)是一种通过多轮递进式原生质体融合,快速提高融合子表型的一种高效育种方法,近年来已成功应用于提高次级代谢产物产量、增强毒性物质耐受性等方面^[7],本课题组率先将该方法用于 ϵ -PL的菌种改造中,提高了 ϵ -PL的产量^[8],然而对于GS导致产量提升的机理尚不明确。

由于GS是基于菌株全基因组水平上的一种重组方式,因此从合成代谢流整体通量变化的角度应更能反应出GS菌株表型变化的原因。代谢通量分析是利用胞内主要化学反应的化学计量模型及胞内的物料平衡计算胞内物质的代谢流量,为代谢网络定量分析的基本方法之一^[9]。近十几年,随着¹³C标记、核磁共振以及多种分析方法联用和计算机技术的应用使得代谢通量分析迅速发展,逐渐成为代谢工程中强有力的分析方法^[10]。

本文试图从已有不同表型的 ϵ -PL菌株出发,在进行GS获得高产菌株的同时,采用代谢通量分析手段构建 ϵ -PL代谢网络及流量平衡方程,比较亲本菌株与GS菌株在代谢通量上的变化,从代谢流分布的角度提出GS菌株产量提升的原因,进而为 ϵ -PL生产菌株的进一步遗传改造打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种:葡萄糖耐受型*Streptomyces* sp. AS32和 ϵ -PL耐受型*Streptomyces albulus* F15为本实验室保藏菌株, ϵ -PL摇瓶产量分别为2.30±0.08 g/L和2.40±0.05 g/L。

1.1.2 培养基:斜面和平板培养基(BTN)、液体再生培养基(LRM)、固体再生培养基(SRM)和半固体再生培养基(SSRM)参照文献^[11]。

筛选培养基(g/L): 甘油 60.0, 酵母粉 8.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 6.7×10^4 Pa 灭菌 15 min。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, 酵母粉 8.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5, 6.7×10^4 Pa 灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0, K_2HPO_4 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 2 mL 微量元素溶液(成分同 LRM), 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 用 50% (体积比)氨水调 pH 至 6.9。

1.1.3 主要试剂和仪器: ϵ -PL 样品, 河南郑州拜纳佛生物工程有限公司, 纯度 95%; 溶菌酶, 上海生工生物工程有限公司; 其它试剂均为分析纯, 中国医药集团上海试剂公司。UV-2100 分光光度计, 尤尼柯上海仪器有限公司; GI100T 型立式自动压力蒸汽灭菌器, 厦门致微仪器有限公司; SW-CJ-1FD 型超净台, 苏州泰安空气技术有限公司; 3K15 台式冷冻离心机, 上海实维实验仪器技术有限公司; KLF2000 比欧发酵罐, 瑞士比欧生物工程公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法: 斜面和平板培养: 用接种环或无菌牙签挑取少量孢子接种于斜面或平板上, 放入培养箱中, 30 °C 培养 10–14 d。

菌种初筛: 将孢子(两环)接种至含有 40 mL 筛选培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、200 r/min 培养 4 d, 取 10 mL 培养液, 4 500 r/min 离心 10 min, 取上清测定 ϵ -PL 含量。

菌种复筛: 将孢子(两环)接种至含有 40 mL 筛选培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、200 r/min 培养 24–38 h, 转接 3 mL 种子液至含有 40 mL 筛选培养基的 250 mL 摇瓶中(每株 3 瓶), 30 °C、200 r/min, 培养 72 h。同上取上清测定 ϵ -PL 含量。

种子培养: 将孢子(两环)接种至含有 40 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、200 r/min 培养 24–28 h。

分批发酵: 将 80 mL 种子液接入 3 L 发酵罐, 罐中预装已灭菌的发酵培养基 2.3 L (接种量约为 3%), 初始通风量 2 L/min, 初始搅拌转速 200 r/min, 温度 30 °C, pH 电极实时监测发酵液中的 pH, 溶氧电极实时监测发酵液中的溶氧(DO), 最高转速为 700 r/min, 此过程中随着转速的提高, 菌体形态由丝状出现部分菌球形态。当 pH 值从 6.9 自然下降到 4.0 时, 反馈式自动补加碱液使 pH 值保持在 4.0。其中碱液为体积比浓度为 50% 的氨水。每隔 4 h 取样进行葡萄糖、 ϵ -PL、菌体干重和胞外游离氨基酸的测定, 直至葡萄糖耗尽。

1.2.2 GS: 以 AS32 和 F15 作为对象制备原生质体, 将菌株进行种子培养后, 分别转入不含有有机氮源的筛选培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h, 取 10 mL 菌液, 4 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 10 mL 无菌水, 振荡混匀, 再次离心去上清。用 PB 高渗液^[11]洗涤两次菌体, 加入 PB 高渗液定容至 5 mL。参照文献^[11], 菌株 AS32 和菌株 F15 分别采用 0.5% 的溶菌酶, 30 °C 酶解 120 min, 随后菌株 AS32 于 70 °C 热灭活 60 min, 菌株 F15 使用 15 W 紫外灭活 70 min, 30% PEG6000 于 37 °C 温育 10 min。将融合菌液分为两部分, 一部分采用双层平板法再生, 28 °C 培养 7–10 d 以获得单菌落, 并且进一步测定其 ϵ -PL 产量来验证其是否有所提高; 另一部分加入含有 1 g/L 的 ϵ -PL 的 LRM 中培养并收集菌丝体进行下一轮 GS。以此类推进行 3 轮 GS, 具体流程如图 1 所示。

1.2.3 分析方法: ϵ -PL 浓度的测定参考文献^[12]。葡萄糖浓度的测定: 4 500 r/min, 10 min 离心发酵液, 取上清(300 μ L), 加入无水乙醇(700 μ L), 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清用 HPLC 法(DIONEX, U-2000, USA); Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm \times 7.8 mm, 9 μ m, Hercules, CA); RI 检测器(Shodex RI-101, Japan); 流动相 5 mmol/L 硫酸; 柱温 55 °C; 流速 0.6 mL/min; 进样量 10 μ L) 进行测定。菌体干重的测定: 将 10 mL 发酵液 4 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 菌体用已称重的

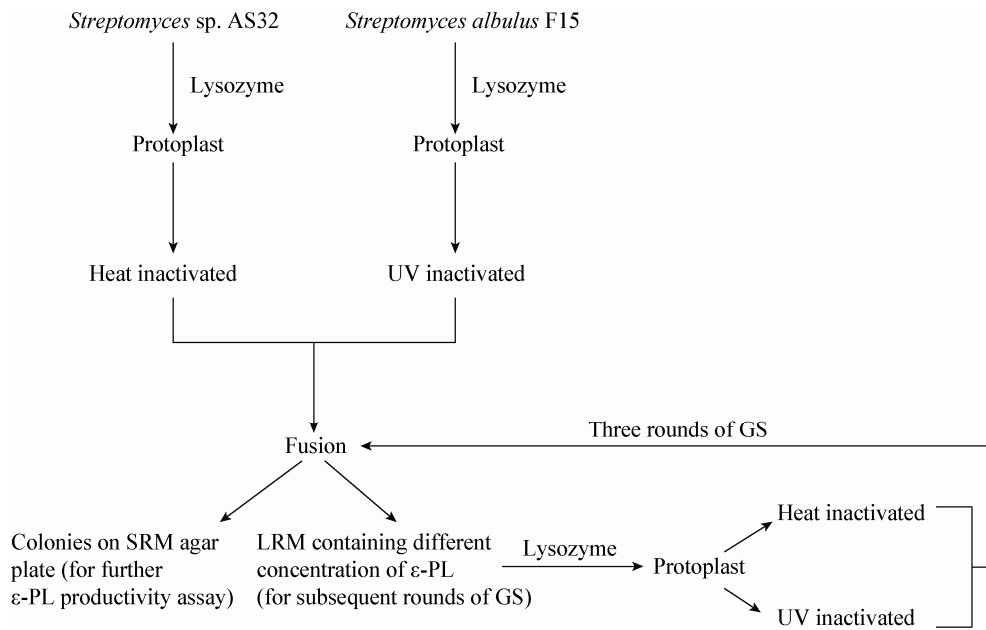


图 1 GS 流程图

Figure 1 The flow chart of genome shuffling

滤纸($\Phi 7$ cm, 中速, SCRC)进行抽滤, $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜至恒重后对菌体的干重(DCW)进行测定。氨基酸浓度测定: 将 10 mL 发酵液 $4\ 500\text{ r/min}$ 离心 10 min , 取上清按 $1:1$ 比例加入 10% 的三氯乙酸, 混匀静置 $1\text{--}2\text{ h}$, $12\ 000\text{ r/min}$, 离心 10 min , 取上清用 HPLC 法(AGI100, U-2000, USA); 色谱柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$, ODS HYPERSIL); DAD 检测器(1260 Infinity, America); 流动相 A 相(称取 8 g 结晶乙酸钠溶解并定容至 1 L , 再加入 $325\ \mu\text{L}$ 三乙胺, 搅拌并滴加 5% 醋酸使 pH 调至 7.20 ± 0.05 ; 加入 5 mL 四氢呋喃, 混合后备用), B 相(称取 8 g 结晶乙酸钠溶解并定容至 400 mL , 搅拌并滴加 2% 醋酸使 pH 调至 7.20 ± 0.05 , 将此溶液加入 800 mL 乙腈和 800 mL 甲醇, 混合后备用); 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速 $200\ \mu\text{L/min}$; 进样量 $1\ \mu\text{L}$)进行测定。

2 结果与讨论

2.1 GS 及融合子筛选

GS 是将不同表型的亲本进行多轮递进式原生质体融合及筛选, 以获得目的性状菌株的一种育种方式。GS 虽可在较大范围内对亲本菌株进行优化

组合, 但其定向性不强, 筛选强度大。本文选用了前期研究获得的具有底物葡萄糖耐受的 AS32 和具有产物 ϵ -PL 耐受的 F15, 以 ϵ -PL 为筛子, 在连续 3 轮的 GS 中, 逐步提高 LRM 中 ϵ -PL 浓度。挑选每一轮在 SRM 中形成的融合子进行 ϵ -PL 测定, 当把 LRM 中 ϵ -PL 浓度提升至 7 g/L 进行第四轮融合时, 培养基中融合子较难再生, GS 终止。 ϵ -PL 作为一种抑菌剂, 在高浓度时对生产菌自身也会产生影响, 进而抑制菌体活力和产物 ϵ -PL 的合成。鉴于筛选赖氨酸结构类似物的方法基于单体赖氨酸的合成, 对 ϵ -PL 产量进一步提升的局限性^[6], 本文采用筛选终产物 ϵ -PL 耐受型菌株, 从中获得产量提高者的策略。结果显示(表 1), 随着 LRM 中 ϵ -PL 浓度的升高, ϵ -PL 高产融合子所占的数量逐渐增高, 而且 ϵ -PL 产量逐步提升。

融合子经初筛与复筛最终获得了高产且稳定的 GS 菌株 AF3-44。该菌株在摇瓶中 ϵ -PL 的产量达到了 $3.10\pm 0.07\text{ g/L}$ 较亲本菌株 AS32 和 F15 分别提高了 34% 和 29% 。对 AF3-44 进行传代实验, 结果显示其 ϵ -PL 产量稳定在 3.0 g/L (表 2)。

表 1 3 轮 GS 中菌株的筛选

Table 1 Strains screened during three rounds of genome shuffling

Rounds of shuffling	Concentration of ϵ -PL (g/L)	Frequency of shuffled strains with higher ϵ -PL productivity (%) ^A	Mean production (g/L) ^B	The highest productivity (g/L)
1st round	1	7.27 (8/110)	2.47±0.08	2.56±0.05
2nd round	3	15.45 (19/123)	2.67±0.12	2.84±0.02
3rd round	5	27.69 (18/65)	2.94±0.09	3.42±0.03

注: ^A: 括号中的数字为产量高于亲本 F15 的 GS 菌株/筛选的菌株数目; ^B: 产量高于 F15 的 GS 菌株 ϵ -PL 产量的平均值; 数据为平均值±标准差。

Note: ^A: Numbers in parentheses mean the number of shuffled strains producing more ϵ -PL than the highest starting strain F15 and the number of colonies screened, respectively; ^B: Mean production shows the mean value of yield of shuffled strains, which can produce more ϵ -PL than that of F15; Data represent the mean ± standard deviations.

表 2 AF3-44 的传代稳定性

Table 2 The stability of shuffled strain AF3-44

Subculture times	ϵ -PL (g/L)
1	3.10±0.05
2	3.07±0.02
3	2.95±0.02
4	3.00±0.02
5	3.03±0.03

2.2 代谢通量分析

2.2.1 *Streptomyces* sp. 代谢网络的构建: 由于细胞代谢所涉及的代谢网络非常复杂, 对其进行简化处理十分必要, 以葡萄糖作为唯一碳源进行分批发酵, 参照研究室的前期研究工作^[13-14]加以进一步的完善, 构建链霉菌代谢网络(图 2)。该网络主要包括糖酵解途径(EMP)、戊糖磷酸途径(PPP)、回补途径、三羧酸循环(TCA)、生物量及二氨基庚二酸途径(DAP)等代谢途径。其中假设:

- (1) 细胞内中间代谢物在整个反应中不积累;
- (2) 只考虑 NADPH 供需平衡, 不考虑 ATP 平衡;
- (3) 不考虑除代谢网络简图以外的循环;
- (4) 固定比例的反应及无分支点的反应都认为是一步反应;
- (5) 因 ϵ -PL 的分子量非定值, 为方便计算, 将其视为赖氨酸单体处理;



- (6) 假设生物质成分均由细胞中心代谢系统的 11 种前体合成得到, 且菌体组成部分的含量在细胞

生长过程中不变。因缺少链霉菌细胞组成前体需求系数的相关数据, 根据相关文献报道细胞组成成分高达 20% 的差异对 *Streptomyces lividans* 代谢通量的分布不会造成影响^[15], 以及马红武^[16]在研究枯草芽孢杆菌的需求系数误差对计算结果的影响时得出的结论, 即流向生物大分子的支流即 11 种前体的需求速率与碳代谢流的主干中心代谢网络相比较小, 因而需求系数的误差对计算结果的影响较小, 同时考虑到枯草芽孢杆菌能够合成 γ -聚谷氨酸与链霉菌合成 ϵ -PL 一样均属于非核糖体酶合成体系^[17], 因此本文选取枯草芽孢杆菌作为参考文献^[16]。

2.2.2 *Streptomyces* sp. 代谢网络流量平衡方程: 代谢网络计量学模型的基础为准稳态假设, 假设细胞内的中间代谢物均处于拟稳态^[18], 即其浓度变化速率为 0。该网络则有:

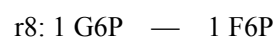
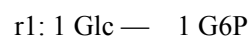
$$dX_{\text{met}}/dt=0$$

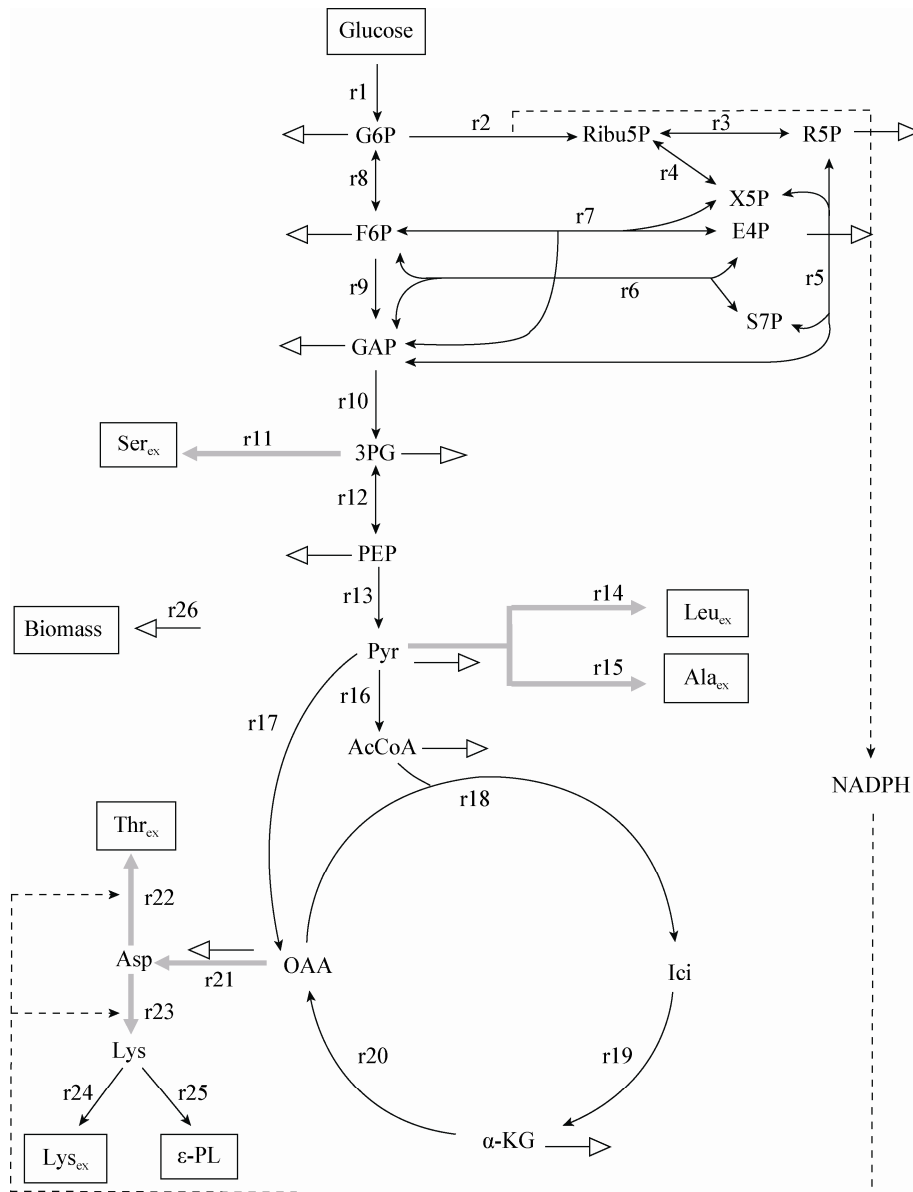
其中, X_{met} 为胞内中间代谢物的浓度向量。采用矩阵形式表示如下:

$$S \cdot r = 0$$

式中, S 为该网络的计量矩阵 $m \times n$, m 为胞内反应的个数, n 为中间代谢物的个数, r 为代谢反应速率向量。可得到如下方程(速率均针对碳摩尔数)^[19]:

EMP:



图2 *Streptomyces* sp.合成 ϵ -PL 代谢网络Figure 2 Metabolic network of ϵ -PL synthesis by *Streptomyces* sp.

注: (1) G6P: 6-磷酸葡萄糖; (2) Ribu5P: 5-磷酸核酮糖; (3) R5P: 5-磷酸核糖; (4) X5P: 5-磷酸木酮糖; (5) E4P: 4-磷酸赤藓糖; (6) S7P: 7-磷酸景天庚酮糖; (7) F6P: 6-磷酸果糖; (8) GAP: 3-磷酸甘油醛; (9) 3PG: 3-磷酸甘油酸; (10) Ser: 丝氨酸; (11) PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; (12) Pyr: 丙酮酸; (13) Leu: 亮氨酸; (14) Ala: 丙氨酸; (15) AcCoA: 乙酰辅酶A; (16) Ici: 异柠檬酸; (17) α -KG: α -酮戊二酸; (18) OAA: 草酰乙酸; (19) Asp: 天冬氨酸; (20) Thr: 苏氨酸; (21) Lys: 赖氨酸; (22) ϵ -PL: ϵ -聚赖氨酸; (23) NADPH: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸; 黑色箭头表示中心碳代谢流向; 灰色箭头表示氨基酸的合成; 空心箭头表示生物质合成; 黑色框内为胞外代谢物; 下标 ex 表示分泌到胞外的代谢物。

Note: (1) G6P: Glucose-6-phosphate; (2) Ribu5P: Ribulose-5-phosphate; (3) R5P: Ribose-5-phosphate; (4) X5P: Xylulose-5-phosphate; (5) E4P: Erythrose-4-phosphate; (6) S7P: Sedoheptulose-7-phosphate; (7) F6P: Fructose-6-phosphate; (8) GAP: Glyceraldehyde-3-phosphate; (9) 3PG: 3-phosphoglycerate; (10) Ser: Serine; (11) PEP: phosphoenol pyruvate; (12) Pyr: Pyruvate; (13) Leu: Leucine; (14) Ala: Alanine; (15) AcCoA: Acetyl coenzyme A; (16) Ici: Isocitrate; (17) α -KG: α -ketoglutarate; (18) OAA: Oxaloacetate; (19) Asp: Aspartate; (20) Thr: Threonine; (21) Lys: Lysine; (22) ϵ -PL: ϵ -poly-L-lysine; (23) NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; Black arrows represent carbon fluxes within the central metabolism of *Streptomyces* sp.; Grey arrows represent carbon fluxes of amino acid synthesis; Hollow arrows represent carbon fluxes of biomass synthesis; Extracellular substances are included in boxes with solid lines; The subscript ex indicates extracellular pools of products.

r9: 1 F6P — 2 GAP
 r10: 1 GAP — 1 3PG
 r12: 1 3PG — 1 PEP
 r13: 1 PEP — 1 Pyr
 PPP :
 r2: 1 G6P — 1 Ribu5P+2 NADPH
 r3: 1 Ribu5P — 1 R5P
 r4: 1 Ribu5P — 1 X5P
 r5: 1 X5P+1 R5P — 1 S7P+1 GAP
 r6: 1 S7P+1 GAP — 1 F6P+1 E4P
 r7: 1 X5P+1 E4P — 1 F6P+1 GAP
 回补途径 :
 r17: 1 Pyr — 1 OAA
 TCA 循环 :
 r16: 1 Pyr — 1 AcCoA
 r18: 1 AcCoA+1 OAA — 1 Ici
 r19: 1 Ici — 1 α -KG
 r20: 1 α -KG — 1 OAA
 氨基酸合成途径 :
 r11: 1 3PG+1 Glu — 1 Ser_{ex}+1 α -KG
 r14: 1 Glu+1 AcCoA+2 Pyr — 1 Leu_{ex}+1 α -KG
 r15: 1 Pyr+1 Glu — Ala_{ex}+1 α -KG
 r21: 1 OAA+1 Glu — 1 Asp+1 α -KG
 r22: 1 Asp+2 NADPH — 1 Thr_{ex}
 r23: 1 Asp+1 Glu+1 Pyr+2 NADPH — 1 Lys+1 α -KG
 r24: 1 Lys — 1 Lys_{ex}
 产物合成 :
 r25: 1 Lys — 1 ϵ -PL
 细胞物质组成 :
 r26: 0.001 071 α -KG+0.001 923 OAA+0.016 06 NADPH+
 0.002 132 AcCoA+0.003 09 Pyr+0.000 711 PEP+
 0.000 194 GAP+0.000 19 F6P+0.000 154 G6P+0.000 816
 R5P+0.000 308 E4P+0.001 353 3PG— Biomass^[16]

Streptomyces sp. ϵ -PL 代谢网络中的各个组分, 都符合质量守恒定律, 对每一种组列出质量平衡方程(表 3)。

表 3 质量平衡方程
 Table 3 The mass balance equation

Extracellular substance	The mass balance equation
G6P	1 r1-1 r2-1 r8-0.000 154 r26=0
Ribu5P	1 r2-1 r3-1 r4=0
X5P	1 r4-1 r5-1 r7=0
R5P	1 r3-1 r5-0.000 816 r26=0
S7P	1 r5-1 r6=0
E4P	1 r6-1 r7-0.000 308 r26=0
F6P	1 r6+1 r7+1 r8-1 r9-0.000 19 r26=0
GAP	1 r5+1 r7+2 r9-1 r6-1 r10-0.000 194 r26=0
3PG	1 r10-1 r11-1 r12-0.001 353 r26=0
PEP	1 r12-1 r13-0.000 711 r26=0
Pyr	1 r13-2 r14-1 r15-1 r16-1 r17-1 r23-0.003 09 r26=0
AcCoA	1 r16-1 r14-1 r18-0.002 132 r26=0
Ici	1 r18-1 r19=0
α -KG	1 r11+1 r14+1 r15+1 r19+1 r21+1 r23-1 r20-0.001 071 r26=0
OAA	1 r17+1 r20-1 r18-1 r21-0.001 923 r26=0
Asp	1 r21-1 r22-1 r23=0
Lys	1 r23-1 r24-1 r25=0
NADPH	2 r2-2 r22-2 r23-0.016 06 r26=0

其中, 方程组为 18 个, 未知数为 26 个, 方程自由度为 26-18=8 个, 即测得 8 个代谢组分的代谢速率即可求解方程。

2.2.3 亲本与 GS 菌株代谢流量分布: 对亲本菌株及 GS 菌株进行分批发酵, 结果如图 3 所示, 在对数生长中期, ϵ -PL 产物积累速率较快, 生物量快速增加。本实验室前期研究也证明菌体的生长与 ϵ -PL 产物的合成密切相关^[13], 因此可认为该阶段细胞处于拟稳态。

分别以对应菌株的葡萄糖的摄取率[AS32 : 1.46 mmol/(g DCW·h) ; F15 : 0.64 mmol/(g DCW·h) ; AF3-44 : 1.37 mmol/(g DCW·h)]假定为 100, 测定 Glucose、Ser_{ex}、Leu_{ex}、Ala_{ex}、Thr_{ex}、Lys_{ex}、 ϵ -PL

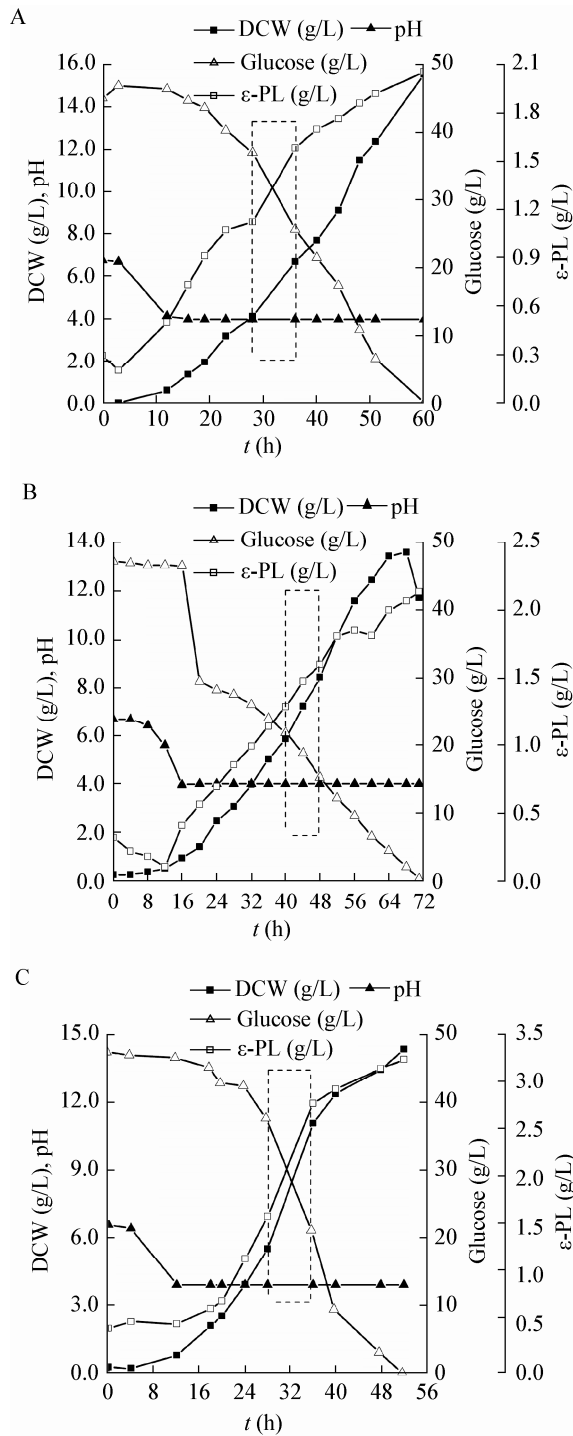


图3 菌株 AS32 (A)、F15 (B)和 AF3-44 (C)控制 pH 4.0 分批发酵参数

Figure 3 pH 4.0 control strategy of batch fermentation by AS32 (A), F15 (B) and AF3-44 (C)

注: 虚线框时间段为对数生长期。

Note: Mid-log phase is included in boxes with dotted lines.

和 Biomass 的浓度变化, 计算其代谢速率(表 4), 再根据表 3 质量平衡方程通过 Matlab 7.0 软件计算出代谢网络中各反应的代谢速率^[20], 得出菌株的代谢流量分布(表 5)。

由表 5 可知, 亲本菌株 AS32 TCA 通量最高, F15 PPP 通量最高。AF3-44 ϵ -PL 合成的通量最高, 而 TCA 和 PPP 通量位于两亲本菌株的中间水平。PPP 为合成 ϵ -PL 的前体物 Lys 提供 NADPH (图 2)。Kawai 等^[21]研究表明 ϵ -PL 的合成是以赖氨酸的腺苷酸化为第一步, 而 TCA 为 Lys 合成 ϵ -PL 提供腺苷酸化所需的 ATP。Xu 等^[22]研究发现添加 0.5% 的正十二烷提高溶氧, 能够增大回补途径以及 TCA 代谢通量, 使更多的碳流量流向 OAA, 为 ϵ -PL 的合成提供了更多的碳源以及 ATP, 最终提高了 ϵ -PL 产量。李凤^[23]通过考察野生菌株 *Streptomyces padanus* LS-L5 与融合菌 F2-7 代谢通量分布发现融合菌较野生菌从 OAA 流向 L-Asp 的代谢通量得到提高, 使更多的碳流量流向 ϵ -PL 合成途径, 进一步提高了 ϵ -PL 产量。本文的研究结果表明, 高的 ϵ -PL 合成通量、以及 PPP 和 TCA 的重新分配导致了 AF3-44 ϵ -PL 产量的提高。

2.2.4 亲本与 GS 菌株关键节点流量分析: G6P 是代谢流向 EMP 和 PPP 的分流节点, 其中 PPP 是细胞产生还原力(NADPH)的主要途径, 同时也是细胞内不同结构糖分子的重要来源, 包括核糖及其衍生物等。同时氨基酸的合成与 NADPH 的利用紧密相关^[24]。但若不断增强 PPP 通量会造成底物碳源物质的损失, Bommarreddy 等通过改变甘油醛 3-磷酸脱氢酶的特异性来提供 NADPH, 在不改变 PPP 代谢通量的情况下, 增加了谷氨酸棒杆菌中赖氨酸的产量^[24]。本研究的代谢通量分析显示, 在 3 种菌株中 F15 流向 PPP 的通量最高(r2), GS 菌株 AF3-44 次之, AS32 最低(图 4A)。AF3-44 流向 5-磷酸核酮糖的通量分别为 AS32 和 F15 的 149% 和 92%。

OAA 是代谢流向天冬氨酸的节点, 也是 ϵ -PL 代谢的关键节点之一^[25], 由图 4B 可知 AF3-44 流向

表 4 菌株 AS32, F15 和 AF3-44 代谢产物浓度变化及代谢流速
Table 4 Variation rate of metabolites and metabolic flux of AS32, F15 and AF3-44

Extracellular substance	AS32 (Mid-log phase 28–36 h)		F15 (Mid-log phase 40–48 h)		AF3-44 (Mid-log phase 28–36 h)	
	Change in the concentration (g/L)	Metabolic flux	Change in the concentration (g/L)	Metabolic flux	Change in the concentration (g/L)	Metabolic flux
Glucose	11.38	100	6.61	100	16.52	100
Ser _{ex}	2.55×10 ⁻³	0.09	0.59×10 ⁻³	0.015	0.06×10 ⁻³	0.00
Leu _{ex}	8.11×10 ⁻³	0.29	9.38×10 ⁻³	0.194	4.47×10 ⁻³	0.04
Ala _{ex}	2.03×10 ⁻³	0.07	18.57×10 ⁻³	0.567	1.90×10 ⁻³	0.02
Thr _{ex}	2.90×10 ⁻³	0.11	2.36×10 ⁻³	0.054	2.64×10 ⁻³	0.02
Lys _{ex}	9.12×10 ⁻³	0.33	11.58×10 ⁻³	0.215	8.73×10 ⁻³	0.06
ε-PL	0.46	4.97	0.31	5.81	1.17	8.71
Biomass	2.60	4.11	2.57	6.99	5.55	6.05

注：下标 ex 表示分泌到胞外的代谢物。

Note: The subscript ex indicates extracellular pools of products.

表 5 菌株 AS32, F15 和 AF3-44 代谢流分布
Table 5 Metabolic flux distribution in AS32, F15 and AF3-44

Metabolic pathway	Reaction No.	AS32	F15	AF3-44	
EMP	r1	100	100	100	
	r8	60.94	36.65	41.71	
	r9	83.12	72.31	74.89	
	r10	176.28	160.68	164.84	
	r12	170.62	151.19	156.66	
	r13	161.15	132.07	143.09	
PPP	r2	38.43	62.27	57.36	
	r3	15.47	25.28	23.03	
	r4	22.96	36.99	34.33	
	r5	12.11	19.57	18.09	
	r6	12.11	19.57	18.09	
	r7	10.85	17.42	16.23	
	Anaplerotic pathway	r17	6.55	14.15	9.27
r16		142.60	103.67	115.72	
TCA	r18	133.54	88.56	102.79	
	r19	133.54	88.56	102.79	
	r20	140.30	93.94	113.95	
	r11	0.09	0.01	0	
Amino acid synthesis	r14	0.30	0.19	0.04	
	r15	0.07	0.57	0.02	
	r21	5.40	6.08	8.80	
	r22	0.10	0.05	0.02	
	r23	5.30	6.02	8.77	
	r24	0.33	0.21	0.06	
	ε-PL synthesis	r25	4.96	5.81	8.71
	Biomass synthesis	r26	4.11	6.99	6.05

天冬氨酸的通量最高(r21), 分别为 AS32 和 F15 的 162%和 145%, 从而为 ε-PL 提供了合成前体 L-Lys 所需的高代谢通量。TCA 是绝大多生物体主要的分解代谢途径, 许多合成代谢中都利用 TCA 的中间产物作为生物合成的前体来源, 而且 TCA 提供了 ε-PL 合成所需的 ATP。但 TCA 通量也并不是越高越好, TCA 增大会相应减小 PPP 通量, 造成前体赖氨酸合成所需 NADPH 的不足。图 4B 节点分析显示, 由 OAA 流向异柠檬酸的通量 AS32 最高(r18), F15 最低, GS 菌株 AF3-44 处于中间水平, 分别为 AS32 和 F15 的 77%和 116%。

3 结论

通过 GS 的方法筛选得到一株高产菌株, 应用代谢通量分析方法构建了 ε-PL 合成代谢网络, 通过 GS 菌株与亲本菌株进行代谢通量分析表明: GS 菌株 AF3-44 实现了亲本 F15 的高 PPP 通量和亲本 AS32 高 TCA 通量的重新分配, 以及流向前体赖氨酸和 ε-PL 通量的增加, 使得 ε-PL 产量在原有基础上进一步提高。本研究证实了通过 GS 方式获得代谢流重新分布, 进而提高产物产量的实例, 为进一步通过代谢工程方式改良菌种奠定了基础。

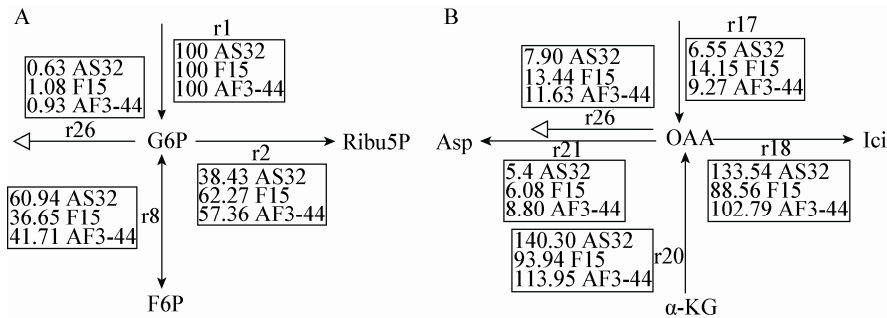


图4 亲本与GS菌株关键节点G6P(A)和OAA(B)处流量分配

Figure 4 Flux distribution of parent strains and shuffled strain at key nodes G6P (A) node and OAA (B)

注:空心箭头代表流向合成生物物质的碳流量;黑色框内数值为中心碳代谢通量值。

Note: Hollow arrows represent carbon fluxes of biomass synthesis; Flux values in the central metabolism are included in boxes with solid lines.

参考文献

- [1] Shima S, Sakai H. Poly-L-lysine produced by *Streptomyces*. Part II. Taxonomy and fermentation studies[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1981, 45(11): 2497-2502
- [2] Hiraki J, Ichikawa T, Ninomiya SI, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003, 37(2): 328-340
- [3] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Announcement on the approval of ϵ -polylysine and other four new food additives (No. 5, 2014)[J]. China Food Additives, 2014(3): 213-221 (in Chinese)
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于批准 ϵ -聚赖氨酸等 4 种食品添加剂新品种等的公告(2014 年第 5 号)[J]. 中国食品添加剂, 2014(3): 213-221
- [4] Guo JX, Xu SX, Liu JL, et al. Improved ϵ -polylysine production progress[J]. China Brewing, 2013, 32(3): 13-15 (in Chinese)
郭稼祥, 徐淑霞, 刘教练, 等. 提高 ϵ -聚赖氨酸产量的研究进展[J]. 中国酿造, 2013, 32(3): 13-15
- [5] Hiraki J, Hatakeyama M, Morita H, et al. Improved ϵ -poly-L-lysine production of an S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutant of *Streptomyces albulus*[J]. Seibutsu-kogaku Kaishi, 1998, 76(12): 487-493
- [6] Hirohara H, Takehara M, Saimura M, et al. Biosynthesis of poly(ϵ -L-lysine)s in two newly isolated strains of *Streptomyces* sp.[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73: 321-331
- [7] Gong JX, Zheng HJ, Wu ZJ, et al. Genome shuffling: progress and applications for phenotype improvement[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(6): 996-1005
- [8] Li S, Li F, Chen XS, et al. Genome shuffling enhanced ϵ -poly-L-lysine production by improving glucose tolerance of *Streptomyces graminearus*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(2): 414-423
- [9] Zhang B. Metabolic Engineering[M]. Tianjin: Tianjin University Press, 2003 (in Chinese)
张蓓. 代谢工程[M]. 天津: 天津大学出版社, 2003
- [10] Li XJ, Chen T, Chen X, et al. Advances in ^{13}C metabolic flux analysis[J]. Progress in Chemistry, 2006, 18(7): 995-1001 (in Chinese)
李晓静, 陈涛, 陈洵, 等. ^{13}C 代谢通量分析[J]. 化学进展, 2006, 18(7): 995-1001
- [11] Zhou YP. Genome shuffling and metabolic regulation analysis of ϵ -poly-L-lysine producing strains[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
周永鹏. ϵ -聚赖氨酸产生菌的基因组重排与代谢调控分析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- [12] Itzhaki RF. Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 50(2): 569-574
- [13] Chen XS. Enhancement of ϵ -poly-L-lysine production through carbon source supply strategy optimization and fermentation process regulation by *Streptomyces* sp. M-Z18[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2011 (in Chinese)
陈旭升. *Streptomyces* sp. M-Z18 发酵生产 ϵ -聚赖氨酸的碳源供给策略与过程调控研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2011
- [14] Liao LJ. Isolation and breeding of ϵ -poly-L-lysine producing strain and enhancement on production process[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2010 (in Chinese)
廖莉娟. ϵ -聚赖氨酸的菌种选育及合成过程强化[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2010
- [15] Daae EB, Ison AP. Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *Streptomyces lividans*[J]. Metabolic Engineering, 1999, 1(2): 153-165
- [16] Ma HW. Metabolic network analysis by stoichiometric relationship based on fermentation and genomic information[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2001 (in Chinese)
马红武. 由发酵实验数据和基因组信息基于计量关系分析代谢网络[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2001
- [17] Shi QS, Feng FP. Advanced in studying of cyanophycin[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences), 2004, 26(6A): 82-86 (in Chinese)
施庆珊, 冯方平. 蓝细菌肽研究进展[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2004, 26(6A): 82-86
- [18] Yan SQ, Li J, Fang HS. Development and software application of flux balance analysis[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2015, 22(3): 269-274 (in Chinese)
颜思奇, 李娟, 方慧生. 通量平衡分析的进展与应用[J]. 药物生物技术, 2015, 22(3): 269-274
- [19] D'Huys PJ, Lule I, Vercammen D, et al. Genome-scale metabolic flux analysis of *Streptomyces lividans* growing on a complex medium[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 161(1): 1-13
- [20] Song C. Application of metabolic network in the astaxanthin biosynthesis[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Polytechnic University, 2010 (in Chinese)
宋超. 代谢网络在虾青素生物合成中的应用[D]. 大连: 大连工业大学硕士学位论文, 2010
- [21] Kawai T, Kubota T, Hiraki J, et al. Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 311(3): 635-640
- [22] Xu ZX, Bo FF, Xia J, et al. Effects of oxygen-vectors on the synthesis of epsilon-poly-lysine and the metabolic characterization of *Streptomyces albulus* PD-1[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 94: 58-64
- [23] Li F. ϵ -poly-L-lysine producing strain breeding by genome shuffling[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2012 (in Chinese)
李凤. Genome shuffling 技术选育 ϵ -聚赖氨酸高产菌[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012
- [24] Bommarreddy RR, Chen Z, Rappert S, et al. A de novo NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase[J]. Metabolic Engineering, 2014, 25: 30-37
- [25] Zhang Y, Feng XH, Xu H. Biosynthesis of ϵ -poly-L-lysine—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(10): 1291-1296 (in Chinese)
张扬, 冯小海, 徐虹. ϵ -聚赖氨酸生物合成研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1291-1296