

## 研究报告

# *Actinobacillus succinogenes* 抗氟乙酸突变株的选育及其代谢流量分析

刘宇鹏<sup>1</sup>, 郑璞<sup>1</sup>, 倪晔<sup>1</sup>, 董晋军<sup>1</sup>, 韦萍<sup>2</sup>, 孙志浩<sup>1</sup>

1 江南大学生物工程学院; 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122

2 南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009

**摘要:** 琥珀酸是一种用于合成树脂、可降解塑料及许多化学中间体的重要绿色化工原料。为了提高琥珀酸的发酵产率, 基于 *Actinobacillus succinogenes* 的代谢流量分布情况对其育种机制进行了研究。以 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593 为原始菌株进行 NTG 诱变, 挑选在含有 50~100 mmol/L 氟乙酸平板生长较快的菌落, 经过初筛和复筛, 发现 SF-9 菌株产生更多琥珀酸且积累乙酸较少。以 50 g/L 的葡萄糖为碳源, 在 5 L 发酵罐上进行分批发酵, 该菌株发酵 32 h 时琥珀酸产量(34.8 g/L)提高了 23.4%, 琥珀酸/乙酸比率为 9:1, 副产物乙酸量比原始菌株降低了约 50%。代谢流量分析(MFA)结果表明, PEP 是影响琥珀酸合成的关键节点, PYR 是影响乙酸等杂酸生成比例的关键节点, 并且这两个节点均非刚性节点。通过氟乙酸抗性诱变, 成功地筛选出了流向乙酸、甲酸和乳酸等杂酸的流量相对减少, 而流向琥珀酸的流量明显增强的突变菌株 SF-9。

**关键词:** 琥珀酸, 育种, 氟乙酸, 代谢流量分析(MFA)

## Breeding of Monofluoroacetate-resistant Strains of *Actinobacillus succinogenes* and the Mechanism Based on Metabolic Flux Analysis

Yupeng Liu<sup>1</sup>, Pu Zheng<sup>1</sup>, Ye Ni<sup>1</sup>, Jinjun Dong<sup>1</sup>, Ping Wei<sup>2</sup>, and Zhihao Sun<sup>1</sup>

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China

2 College of Life and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

**Abstract:** Succinic acid has received a great deal of attention as an important green chemical stock for the manufacture of synthetic resins, biodegradable polymers and chemical intermediates. In this paper, the breeding mechanism of *Actinobacillus succinogenes* based on metabolic flux analysis was demonstrated to improve the yield of succinic acid by fermentation. After the NTG treatment, mutants from *A. succinogenes* CGMCC 1593 which were able to grow in medium containing concentrations of about 50~100 mmol/L of sodium monofluoroacetate were obtained. Among them, a mutant SF-9 was selected for producing more succinic acid and less acetic acid. When fermentations were conducted in a 5 L bioreactors, the final succinic acid concentration of SF-9 (34.8 g/L)

**Received:** June 28, 2007; **Accepted:** October 17, 2007

**Supported by:** the Natural Science Foundation of Jiangsu of China (No. BK2005201), the State Key Basic Research and Development Plan of China (No. 2003CB716008) and Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT0532).

**Corresponding author:** Zhihao Sun. Tel: +86-510-85918252; Fax: +86-510-85918252; E-mail: sunw@publi1.wx.js.cn

国家 863 项目 (No. 2006AA02Z235), 江苏省自然科学基金前期预研项目 (No. BK2005201), 长江学者和创新团队发展计划资助 (No. IRT0532) 资助。

increased 23.4%, and the mass ratio of succinic acid/acetic acid increased from 3.3 to 9 compared with those of the parent strain. Based on the metabolic flux analysis of *A. succinogenes*, PEP was found to be a key node which has an important effect on the production of succinic acid, and the flux ratio of by-productions (acetic, formic, lactic acid) was influenced by PYR node. Compared with the parent strain, the flux to succinic acid of mutant (*A. succinogenes* SF-9) was significantly increased, while the flux to by-productions had an obvious decline. Therefore, PEP and PYR are not rigid nodes in the metabolic regulation of *A. succinogenes*.

**Keywords:** succinic acid, breed, monofluoroacetate, metabolic flux analysis

琥珀酸(succinic acid)又称丁二酸,是一种重要的化工产品,广泛应用于医药,农药,染料,香料,油漆,食品,塑料和照相材料工业<sup>[1]</sup>。化学合成的琥珀酸因依赖石化原料等原因,存在生产成本增高的趋势,从而使微生物发酵可再生原料生产琥珀酸的方法倍受重视。发酵法生产琥珀酸是以可再生糖源(如葡萄糖)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,使得琥珀酸发酵成为一个新兴的、很有发展潜力的绿色工艺,成为近年来国内外的研究热点<sup>[1,2]</sup>。

代谢工程的实质在于对细胞代谢流量及其控制进行定量分析,并在此基础上对代谢进行合理改造,以最大限度地提高目的代谢产物的产率<sup>[3]</sup>。代谢流量分析(metabolic flux analysis, MFA)是代谢工程基础研究中最重要的计算代谢途径中各种物质流量的手段。对于工业微生物细胞而言,在特定的生理条件下,其代谢表型(Metabolic phenotype)可以通过胞内代谢网络中各种代谢物的流量来进行表征。MFA为更好地设计反应器、调节发酵培养基组分和优化控制策略打下良好的基础;对未知途径而言,可以鉴别是否为主要代谢途径,以及了解副产物的产生途径,以达到提高目的产物积累、去除副产物产生途径的目的<sup>[4]</sup>。

在利用微生物发酵产生有机酸的代谢过程中,经常容易发生副产物乙酸的积累,不仅造成碳源的浪费,而且会抑制菌体生长,降低细胞得率和微生物的产酸能力<sup>[5]</sup>。在本文中,通过亚硝基胍(NTG)诱变筛选到一株氟乙酸抗性突变株,并首次根据代谢流量分析模型对诱变育种前后菌种的流量进行了比较,以研究基于代谢流量分布的育种机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

琥珀酸放线杆菌(*A. succinogenes*)CGMCC 1593,

由本实验室从牛的瘤胃中分离获得<sup>[6]</sup>。

#### 1.1.2 试剂和气体

亚硝基胍(NTG)为 Sigma 公司产品,氟乙酸钠为 Fluka 公司产品,TSB(大豆胰酪胨蛋白)为宜兴永信生物工程公司产品,CSL(玉米浆,55%固型物)购自华北制药康鑫有限公司,其余试剂购自国药集团化学试剂有限公司。CO<sub>2</sub> 气体购自无锡市新南气体公司,实验用水为去离子水。

#### 1.1.3 培养基和培养条件

(1) 氟乙酸(钠)筛选平板培养基: TSB 25 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 8 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3 g, 琼脂 20 g, 定容至 1 L。在此培养基中加 10~100 mmol/L 氟乙酸钠,并将培养基的 pH 调至 7.0~7.2,即为相应的筛选平板培养基。

以上平板培养基经涂布接种后,置于 100% CO<sub>2</sub> 环境中 37℃ 厌氧培养 3~7 d。

(2) 诱变育种中间培养基: TSB 20 g, 酵母膏 5 g, CSL 5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 8 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3 g, pH 调至 7.2, 定容至 1 L。

(3) 培养瓶厌氧发酵条件: 种子培养基: 葡萄糖 10 g, 酵母膏 5 g, CSL 5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 9.6 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 20.3 g, NaHCO<sub>3</sub> 10 g, 定容至 1 L, pH 自然, 115℃ 灭菌 15 min。发酵培养基: 葡萄糖 50 g, 酵母膏 10 g, CSL 6 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaCl 1 g, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g; 另加混合维生素溶液 3 mL, 其组分为(/L): 叶酸 20 mg, 硫胺素 20 mg, 烟酸 20 mg, 硫辛酸 20 mg, 核黄素 20 mg, VB<sub>12</sub> 20 mg, VB<sub>6</sub> 20 mg, 泛酸 50 mg。将培养基定容至 1 L, pH 调 6.5, 115℃ 灭菌 20 min。

将菌种先接种到液体种子培养基进行活化培养 16 h 后,按 5% 接种量接种于装有 50 mL 发酵培养基的厌氧瓶(培养瓶容积 150 mL)中进行发酵,充入 100% CO<sub>2</sub>,并在接种前加入膜滤过的无菌 Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (终浓度 0.02%),以保证绝对的厌氧环境。置于 100% CO<sub>2</sub> 环境中 37℃ 厌氧培养 48~60 h。

(4) 搅拌罐厌氧发酵条件: 在 5 L 搅拌发酵罐 (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) 中进行厌氧发酵, 装液量 3.5 L, 培养基成份和厌氧瓶发酵培养基相同。接种量 5%, 发酵温度 37°C, 使用两组圆盘六平直叶涡轮搅拌桨, 搅拌转速 200 r/min, 通气为 100% CO<sub>2</sub>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 诱变育种

将处于对数生长期的细胞离心 (8000×g, 20 min), 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤两次, 将打散的细胞悬浮于含有一定浓度亚硝基胍 (NTG) 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中, 使得 NTG 最终浓度为 0.2 mg/mL, 在 37°C 的摇床上振荡处理 20 min。取 10 mL 处理后的菌悬液用 0.16 mol/L 硫代硫酸钠溶液稀释 10 倍中止反应, 离心收集细胞, 用无菌生理盐水洗涤后将其接入中间培养基中培养 24 h, 而后稀释涂布于氟乙酸筛选平板, 置于 100% CO<sub>2</sub> 环境中 37 °C 厌氧培养 3~7 d, 挑取在氟乙酸平板上生长较快的菌落。

### 1.2.2 发酵产物分析

采用离子排斥 HPLC 法分析葡萄糖、琥珀酸、乙酸、乳酸、甲酸等发酵产物<sup>[7]</sup>。美国 Waters1512 二元泵, Waters 2414 RI 检测器, Breeze 色谱工作站; BioRad 公司 Aminex HPX-87H 离子色谱柱 (300 mm × 7.8 mm, 9 μm); 流动相 10 mmol/L 硫酸; 柱温 55 °C; 流速 0.5 mL/min; 进样量 10 μL。

生物量以 660 nm 处的吸光度来表示 (OD<sub>660</sub>), 每 1.0 个 OD 值单位相对应的菌体干重为 (510±18) mg。

琥珀酸的产率 (yield) 定义为每消耗 1 克葡萄糖所产生琥珀酸的克数<sup>[8]</sup>。

### 1.2.3 *A. succinogenes* 菌株发酵合成琥珀酸过程的代谢网络构建

根据相关文献<sup>[8,9]</sup>, 该菌株以葡萄糖为碳源时合成琥珀酸的代谢网络主要包括糖酵解 (EMP)、磷酸戊糖 (PP)、部分 TCA (TCA 氧化支路和还原支路)、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、维持消耗以及生物量的合成途径; 构建代谢网络时作了以下假设和简化: (1) EMP 途径和丙酮酸氧化是产生 NADH 的主要途径; PP 途径是产生 NADPH 的主要途径。由于琥珀酸发酵是在厌氧条件下进行, 因此假定产生的 NADH 全部用于代谢产物的合成; NADPH 则全部用于微生物自身的生物量合

成, 均没有被彻底氧化。(2) 细胞的组成参考文献数据<sup>[10]</sup>。(3) 没有支路的代谢反应合并为一个反应。(4) 在代谢过程中, 一般会有部分碳源用于细胞的维持、产能、CO<sub>2</sub> 放出以及分泌其它一些未知的代谢产物等, 造成碳源的不平衡现象, 该部分流量 ( $r_{LEA}$ ) 可以通过碳平衡计算得出 ( $r_{LEA} = 6r_1 - 3r_{12} - r_7 - 2r_8 - 3r_9 - 2r_{10}$ ), 在进行代谢流计算时将其并入生物量中。(5) 尽管存在 *A. succinogenes* 代谢途径中可能存在部分的 TCA 循环:



但是根据 McKinlay 等人<sup>[11]</sup>的研究, 基于该途径的流量很微弱, 因此笔者构建的代谢网络数据计算时忽略了这部分反应。根据以上假设, 琥珀酸发酵代谢网络简化为 20 个代谢反应 ( $r_1 \sim r_{20}$ ), 如图 2 所示。此外, *A. succinogenes* 菌株在基本培养基上不能生长, 在全合成培养基上生长非常微弱, 所以本文使用了加有有机氮源的培养基进行发酵, 而在代谢流量计算时我们忽略了复合氮源对生物量代谢流量的贡献。

### 1.2.4 代谢流量的计算<sup>[12]</sup>

MFA 是根据代谢途径中各反应的计量关系以及实验的某些底物、产物的流量及细胞组成等确定整个代谢的流量分布。比如, 某代谢网络中经由  $n$  个中间代谢途径物进行  $k$  个胞内代谢反应, 其质量平衡式如下:

$$\frac{dX_{met}}{dt} = r_{met} - \mu X_{met} \quad (1)$$

在式 1 中,  $X_{met}$  是途径中间代谢物 (或胞内代谢物) 的浓度向量,  $r_{met}$  是一个包含在  $n$  个反应中的中间代谢物形成的净速率向量。对于大多数中间代谢物来说, 都具有很高的周转速度, 因此可以假定途径代谢物处于拟稳态状态。这意味着没有中间代谢物的积累。如果再忽略由于菌体生长对代谢物库的稀释作用 ( $\mu X_{met}$ ), 于是可以得到更简单的平衡式:

$$0 = r_{met} = G \times r = G_m \times r_m + G_c \times r_c \quad (2)$$

在式 2 中,  $G$  是  $n \times k$  阶的代谢反应总行列矩阵,  $r$  是  $k \times 1$  阶的反应速度的向量。针对琥珀酸放线杆菌的代谢网络,  $n$  表示中间代谢物的个数 ( $n=15$ )。通过矩阵的分割将  $G$  转化为两个矩阵  $G_c$  和  $G_m$ 。  $G_c$  中包含的是与待测反应流量 ( $c$ ) 有关的系数,  $G_m$  中则包含与已知流量 ( $m$ ) 相关的系数。而  $k$  则表示反应速度的

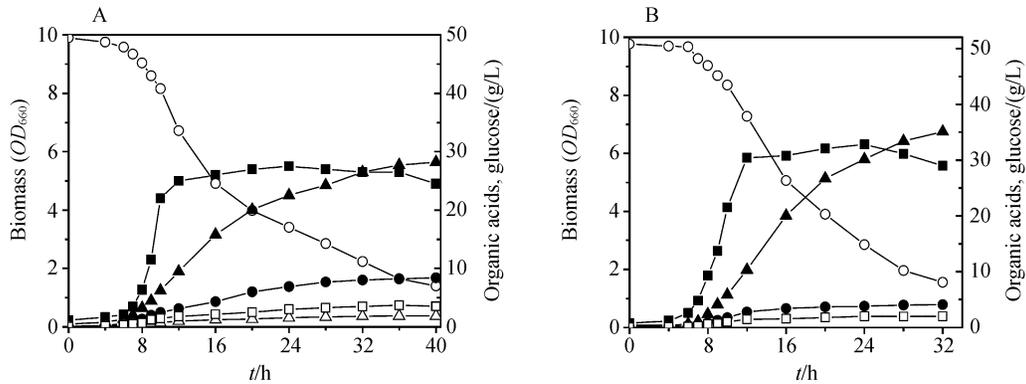


图 1 *A. succinogenes* CGMCC1593 (A) and SF-9 (B) 搅拌罐分批发酵图

Fig. 1 The time courses of the batch fermentation of *A. succinogenes* CGMCC1593 (A) and SF-9 (B)

Cells were grown anaerobically in stirred bioreactors with an initial glucose concentration of 50 g/L, Symbols are  $OD_{660}$  (■), glucose (○), succinic acid (▲), acetic acid (●), formic acid (□), and lactic acid (△)

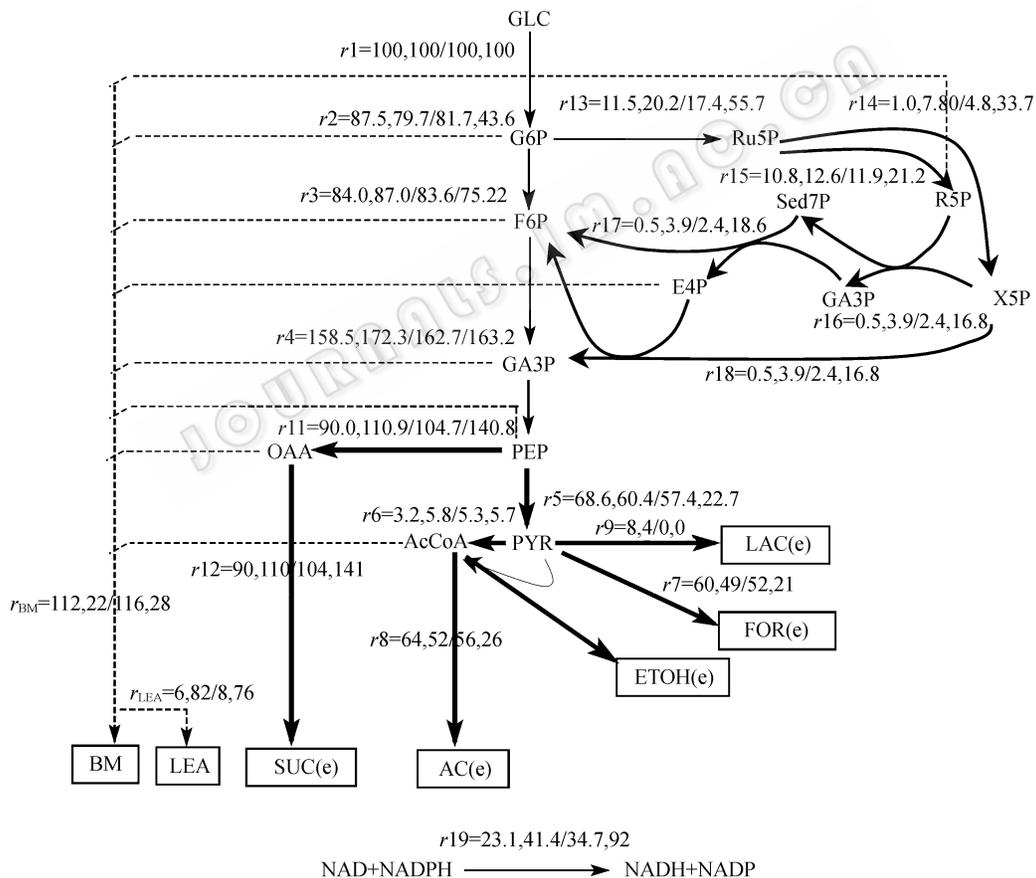


图 2 *A. succinogenes* CGMCC1593 和 SF-9 不同发酵时期代谢流量比较(CGMCC1593 8 h, 20 h/SF-9 8 h, 20 h)

Fig. 2 Comparison of the metabolic flux distributions between *A. succinogenes* CGMCC1593 and SF-9 in the batch fermentation (CGMCC1593 8 h, 20 h / SF-9 8 h, 20 h)

总个数( $k=20$ ), 它是待测的反应流量  $c$  个数( $c=13$ )与起始/终端物质速率的个数之和。 $k$  个总反应速度中有  $m(m=7)$  个是可测的, 即葡萄糖的消耗速度  $r_1$ 、甲酸的生成速率  $r_7$ 、乙酸生成速率  $r_8$ 、乳酸生成速率

$r_9$ 、乙醇生成速率  $r_{10}$ 、琥珀酸生成速率  $r_{12}$  和生物量的生成速率  $r_{20}$ , 对应的可测速率向量为  $r_m$  (3):

$$r_m = [r_1, r_7, r_8, r_9, r_{10}, r_{12}, r_{20}]^T \quad (3)$$

$c$  是其他 13 个未知的反应速率流量, 对应的未知

速率向量为  $r_c$  (5-4):

$$r_c = [r_2, r_3, r_4, r_5, r_6, r_{11}, r_{13}, r_{14}, r_{15}, r_{16}, r_{17}, r_{18}, r_{19}]^T \quad (4)$$

$G, G_m, G_c$  矩阵如下所示:

对于式 2, 其自由度为:  $F = k - n$ 。如果  $m = F$ , 则  $G_c$  为一方阵, 则代谢网络是一个确定系统, 可以利用式 5 和可测速度变量对不可测速度向量  $r_m$  进行惟一求解计算。

$$r_c = -G_c^{-1} \times G_m \times r_m \quad (5)$$

而在琥珀酸代谢网络中, 一共有  $m(7)$  个代谢流量是可以测量的, 即  $m > F$ 。所以  $G_c$  为一个  $15 \times 13$  的矩阵, 该系统为超定系统, 不能根据式 5 直接求解。在这里, 笔者通过最小二乘法进行方程求解计算。即通过利用求系数矩阵  $G_c$  的 Moore-Penrose 广义拟矩阵  $(G_c)^\#$ , 可以得到  $r_c$  的一个简单解<sup>[13]</sup>。

$$(G_c)^\# = (G_c^T \times G_c)^{-1} \times G_c^T \quad (6)$$

$$r_c = -(G_c)^\# \times G_m \times r_m \quad (7)$$

$$G = \begin{pmatrix} r_1 & r_2 & r_3 & r_4 & r_5 & r_6 & r_7 & r_8 & r_9 & r_{10} & r_{11} & r_{12} & r_{13} & r_{14} & r_{15} & r_{16} & r_{17} & r_{18} & r_{19} & r_{20} \\ 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0016 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & -0.0055 \\ 0 & 0 & 2 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 & -0.0547 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0028 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0115 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.00371 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.073 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 2 & 0 & 0 & -1 & -2 & 0 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ -1 & 0 & -1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.7957 \end{pmatrix} \begin{matrix} \\ \\ G6P \\ F6P \\ GA3P \\ PEP \\ PYR \\ AcCoA \\ OAA \\ Ru5P \\ R5P \\ X5P \\ Sed7P \\ E4P \\ NADH \\ NADPH \end{matrix}$$

$$G_c = \begin{pmatrix} r_2 & r_3 & r_4 & r_5 & r_6 & r_{11} & r_{13} & r_{14} & r_{15} & r_{16} & r_{17} & r_{18} & r_{19} \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 2 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & -1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

$$G_m = \begin{pmatrix} r_7 & r_8 & r_9 & r_{10} & r_{12} & r_{20} \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0016 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0055 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0547 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.0028 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 0 & -0.0115 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -0.00371 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -0.073 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & -2 & -2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -0.7957 \end{pmatrix}$$

在本章代谢流量的计算中, 均以 100 mmol/gDCW/h 的葡萄糖为计算基准, 所有代谢流量  $r$  的单位均为 mmol/gDCW/h; 矩阵计算软件采用 Excel 2003。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氟乙酸抗性突变株的筛选

野生型菌株 *A. succinogenes* CGMCC1593 发酵产生的杂酸量较高, 为了降低乙酸等杂酸的积累,

提高琥珀酸产量, 对原始菌株进行诱变育种选育氟乙酸抗性突变株。

通过 NTG 诱变, 在 50~100 mmol/L 的氟乙酸平板上有少量菌落能够生长, 但生长均较缓慢, 培养 5~7 d 后, 大多数抗性菌落直径在 0.2~2 mm 之间。挑取较大的单菌落于含有 50~100 mmol/L 的氟乙酸平板上反复划线纯化, 最终筛选出一株乙酸产量明显较原始菌株降低的氟乙酸抗性突变菌株 SF-9。

以 50 g/L 的葡萄糖为初始底物浓度, 在厌氧瓶中 37 °C 厌氧培养 48 h(100% CO<sub>2</sub>), 原始株和突变株的发酵产酸情况如表 1 所示。

从表 1 中可以看出, 在 *A. succinogenes* CGMCC1593 厌氧发酵产物中, 琥珀酸产量较低, 琥珀酸/乙酸(W/W)约为 3.3:1, 乳酸和甲酸产量也较高。而 SF-9 菌株的琥珀酸产量(35.2 g/L)比原始菌株提高了 21.8%, 琥珀酸/乙酸为 8:1, 未检测出乳酸的生成, 琥珀酸产率也从 67%提高到 83%。与原始菌株相比, 原来流向乙酸、甲酸和乳酸的部分碳源改为分布到琥珀酸, 每 100 mol 的葡萄糖所产生的琥珀酸从 102 mol 增加到了 129 mol, 且生物量也较原始菌株有所提高。

表 1 氟乙酸抗性突变株发酵产酸情况<sup>a</sup>

Table 1 The fermentation results of mutant resistant to monofluoroacetate

Strains	Mol products/100 mol glucose consumed					Succinic acid yield/%
	Biomass <sup>b</sup>	Succinic acid <sup>c</sup>	Acetic acid	Lactic acid	Formic acid	
CGMCC 1593	36 (2.2) <sup>d</sup>	102 (28.9)	60 (8.7)	7 (1.6)	51 (3.7)	67
SF-9	45 (2.7)	129 (35.2)	31 (4.5)	0	32 (2.2)	83

<sup>a</sup> Cells were grown in anaerobic bottles, and each value is the mean of three parallel replicates.

<sup>b</sup> Carbon compound incorporated into the cells was calculated using the cell composition formula CH<sub>2</sub>O<sub>0.5</sub>N<sub>0.2</sub> (24.967 g/mol)<sup>[10]</sup>.

<sup>c</sup> Carbon compound in succinic acid was calculated as 3 mol carbon/mol product because of CO<sub>2</sub> fixation during succinic acid formation<sup>[8]</sup>.

<sup>d</sup> The concentrations of products(g/L) were shown in the parentheses

## 2.2 搅拌罐分批发酵

在 5 L 发酵罐中对 *A. succinogenes* CGMCC1593 菌株和 SF-9 突变株分批发酵进行研究, 实验结果如图 1 所示。在发酵罐厌氧培养条件下, 厌氧瓶实验结果得到了较好的重现。培养 4~8 h 时, 原始株与突变株的生长均达到指数生长期, 其中 *A. succinogenes* CGMCC1593 发酵 40 h 产酸的情况为: 琥珀酸 28.2 g/L, 乙酸 8.5 g/L, 乳酸 1.7 g/L, 甲酸 3.8 g/L; 琥珀酸产率 66%。而 SF-9 突变株的延迟期较 *A. succinogenes* 1593 明显缩短, 发酵 32 h 时产生 34.8 g/L 琥珀酸, 3.9 g/L 乙酸, 1.8 g/L 甲酸; 与原始菌株比较, 琥珀酸产量提高了 23.4%, 琥珀酸/乙酸比率提高到了 9:1, 副产物乙酸和甲酸产量降低了 50%左右。

## 2.3 *A. succinogenes* CGMCC1593 及 SF-9 分批发酵时的代谢流量比较

分别考察了 *A. succinogenes* CGMCC1593 和

SF-9 在分批发酵时指数生长期(8 h)和中后期(20 h)的代谢流量分布情况。在培养过程(图 1)中, 分别取 7、7.5、8、8.5、9、19、19.5、20、20.5 和 21 h 的生物量、葡萄糖以及各有机酸数据, 根据方程的拟合求导就可以得到在 8 h 和 20 h 时各组分的浓度变化速率(mmol/gDCW/h), 结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 无论是 *A. succinogenes* CGMCC1593 还是 SF-9 菌株, 合成细胞的速率均在发酵初期(8 h)为最高, 在此阶段较多的碳源用于合成菌体组分; 而在发酵中后期(如 20 h)消耗很少的碳源用于菌体的合成, 琥珀酸的产生速率均较高。根据表 2 中的数据, 以 100 mmol/gDCW/h 消耗葡萄糖的速率为计算基准, 可以计算得到 *A. succinogenes* CGMCC1593 及 SF-9 在分批发酵过程中的代谢流量分布(见图 2)。模型中使用的缩略词含义见附录, 胞内主要代谢反应方程见参考文献[8, 9]。

从上图可以看出, 无论是 *A. succinogenes* CGMCC1593 还是 SF-9 菌株, 合成细胞的流量均在指数生长期(8 h)为最高, 对葡萄糖的 mol 转化率分别达到了 112%和 116%。这说明在此阶段较多的碳源用于合成菌体组分; 而在发酵中后期(如 20 h)则消耗很少的碳源用于菌体的合成。琥珀酸对葡萄糖的 mol 转化率在指数生长期分别达到 90%和 104%, 而在中后期两菌株的琥珀酸转化率则分别达到 110%和 141%; 至于乙酸、甲酸等其它代谢产物的代谢流量, 均在指数生长期处于较高的值, 而在发酵中后期流量呈明显下降趋势。

从 *A. succinogenes* 的代谢网络中可以看出, PEP 是影响琥珀酸合成的关键节点, PYR 是影响乙酸等杂酸生成比例的关键节点, 在该两个节点处的代谢流量分布见表 3 所示。结果表明, 突变菌株琥珀酸发酵性能有了很大提高的主要原因是其代谢途径中关键节点处的流量分布发生较大变化的原因。在指数生长期(如 8 h), 原始株和突变株在 PEP 和 PYR 节点处的代谢流量分布变化不大。然而, 与原始株相比, 发酵中后期(如 20 h)突变株在 PEP 节点处流向丙酮酸(PYR)的流量( $r_5$ )从原始菌株的 35.3%降低到了 13.9%, 流向草酰乙酸(OAA)的流量( $r_{11}$ )提高了 21.4%, 使得琥珀酸的产量得到了明显的提高; 在 PYR 节点, 流向乳酸的流量则降低为 0, 而甲酸流量则变化不大。

表3 *A. succinogenes* CGMCC1593 和 SF-9 在 PEP 和 PYR 节点处的代谢流量分布<sup>a</sup>

Table 3 Metabolic flux partitioning at PEP and PYR nodes in the fermentation of *A. succinogenes* CGMCC1593 and SF-9

Strains	Time /h	Flux at PEP node ( $r_4=100$ )		Flux at PYR node ( $r_5=100$ )		
		$r_5$	$r_{11}$	$r_6$	$r_7$	$r_9$
CGMCC1593	8	36.9	63.1	4.5	84.3	11.2
	20	35.3	64.7	9.9	83.3	6.8
SF-9	8	35.4	64.6	9.2	90.8	0
	20	13.9	86.1	21.3	78.7	0

<sup>a</sup>Cells were grown anaerobically in the batch fermentation of stirred bioreactors

在由大量代谢节点所构成的代谢网络中, 主要存在以下 3 种节点: 柔性节点、刚性节点和弱刚性节点。对于流经刚性节点的代谢流, 仅仅改变该节点下游的反应的酶水平或活性, 是不可能对代谢流进行顺利导向的。由以上结果可以看出, 在琥珀酸放线杆菌的代谢网络中, PEP 和 PYR 节点均不是刚性节点, 而是柔性或弱刚性节点。在本实验中, 通过氟乙酸抗性诱变, 成功地筛选出了流向乙酸、甲酸和乳酸等杂酸的流量相对减少, 而流向琥珀酸流量明显增强的突变菌株 SF-9。

此外, 作者还分析了代谢网络中 NADH 的供应情况, 结果如表 4 所示。

在琥珀酸发酵代谢网络中, 每生成 1 mol 琥珀酸需要 2 mol NADH, 而生成乙酸和甲酸则不需要消耗还原力。因此, 对于突变菌株 SF-9 来说, 为了

积累了更多的琥珀酸, 就必须需要更多的还原力。从表 4 可以看出, 突变株 SF-9 在代谢过程中积累了更多的 NADH, 因而能够满足生成更多琥珀酸所必须的还原力; 在 GA3P→PEP 途径( $r_4$ )中生成的 NADH 在总还原力所占的比例较原始菌株明显降低, 即有更多的还原力来自于磷酸戊糖(PP)途径。

表4 *A. succinogenes* CGMCC1593 和 SF-9 发酵时 NADH 产生途径的流量分配<sup>a</sup>

Table 4 Flux distribution of NADH generation pathway with different strains

Strains	Time /h	Total NADH flux (mmol/gDCW/h)	Total NADH flux <sup>b</sup> =100		
			$r_4$	$2r_6$	$r_{19}$
CGMCC1593	8	188.0	84.3	3.4	12.3
	20	225.3	76.5	5.1	18.4
SF-9	8	208.0	78.2	5.1	16.7
	20	266.6	61.2	4.3	34.5

<sup>a</sup>Cells were grown anaerobically in the batch fermentation of stirred bioreactors.

<sup>b</sup>Total NADH flux= $r_4 + 2r_6 + r_{19}$

### 3 结论

通过 NTG 诱变, 在 50~100 mmol/L 的氟乙酸筛选平板上选出一株乙酸产量明显较原始菌株降低的氟乙酸抗性突变菌株 SF-9。MFA 分析结果表明, *A. succinogenes* 在分批发酵前期以合成细胞为主, 流向琥珀酸的流量较低; 而在稳定期琥珀酸的代谢流量较高。至于流向乙酸、甲酸等其它代谢产物的代谢流量, 均在指数生长期处于较高的值, 而在稳定期流量呈明显下降趋势。在 *A. succinogenes* 的代谢

附录: 缩略语表

#### Appendix: Abbreviations and Symbols

AC (e)	extracellular acetate	NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
AcCoA	acetylCoA	NADH	nicotinamide adenine dinucleotide, reduced
ADP	adenosine-5'-diphosphate	NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ATP	adenosine-5-triphosphate	NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced
CoA	coenzyme A	OAA	oxaloacetate
E4P	erythrose 4-phosphate	PEP	phosphoenolpyruvate
ETOH (e)	extracellular ethanol	PYR	pyruvate
F6P	fructose 6-phosphate	R5P	ribose 5-phosphate
FOR (e)	extracellular formate	Ru5P	ribulose 5-phosphate
G6P	glucose 6-phosphate	Sed7P	sedoheptulose 7-phosphate
GA3P	glyceraldehyde 3-phosphate	SUC (e)	extracellular succinate
GLC	glucose	X5P	xylulose 5-phosphate
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -ketoglutarate	BM	biomass
LA (e)	extracellular lactate	LEA	life maintainance, energy and amino acids, etc

