

# 核磁共振技术在微生物代谢研究中的应用\*

刘 玮<sup>1</sup> 林建强<sup>2</sup> 刘相梅<sup>2</sup> 林建群<sup>2\*\*</sup>

(中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003)<sup>1</sup> (山东大学微生物国家重点实验室 济南 250100)<sup>2</sup>

**摘要:** 介绍了核磁共振的种类, 并结合具体实例阐述了核磁共振技术在微生物代谢研究领域的应用。主要包括在代谢工程、环境保护及生态学研究、以及人与动物健康几个方面的应用。

**关键词:** 核磁共振, 微生物代谢, 代谢工程, 环境保护

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0157-04

## Application of NMR in Microbiology Metabolism Research\*

LIU Wei<sup>1</sup> LIN Jian-Qiang<sup>2</sup> LIU Xiang-Mei<sup>2</sup> LIN Jian-Qun<sup>2\*\*</sup>

(College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)<sup>1</sup>

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)<sup>2</sup>

**Abstract:** The sorts of NMR were explained and the applications of NMR were illustrated with the examples in the field of microbial metabolism. The examples were related to metabolic engineering, environmental protection, and human and animal health, respectively.

**Key words:** NMR, Microbial metabolism, Metabolic engineering, Environmental protection

微生物代谢是细胞内所有生物化学过程的总称, 包括物质代谢和能量代谢两个方面。对微生物代谢途径的研究具体来讲是指对细胞内代谢反应中的反应物、中间物或产物的研究。微生物细胞内的代谢途径非常复杂。例如, 微生物对葡萄糖的分解代谢途径 (主要包括糖酵解途径、三羧酸循环以及磷酸戊糖途径和糖醛酸途径) 涉及到多种酶、辅酶, 几十种代谢中间产物, 并伴随着能量的产生和释放。

核磁共振 (NMR) 技术是利用高磁场中原子核对射频辐射的吸收光谱鉴定化合物结构的分析技术。20 世纪 60 年代, 核磁共振技术开始应用于代谢研究。最初, 这类研究主要集中在医学领域。直到 20 世纪 70 年代, 核磁共振技术才开始应用于微生物代谢研究。利用高分辨率 NMR 技术对细胞内许多微量代谢组分进行检测, 可得到相应的生物体代谢物信息, 研究这些组分的 NMR 图谱, 综合分析这些信息所反映的生物学意义, 可以了解生物体代谢的规律。与其他分析技术相比, 核磁

共振技术具有以下优点: (1) 无损性, 不破坏样品的结构和性质, 无辐射损伤; (2) 不需提取分离或只需简单预处理即可同时测定多种成分; (3) 实验方法灵活多样。

## 1 核磁共振的种类

在生命科学领域中常用的是碳谱 (<sup>13</sup>C NMR)、磷谱 (<sup>31</sup>P NMR) 及氢谱 (<sup>1</sup>H NMR) 3 种。以下对这 3 种技术作一简短介绍。

**1.1 核磁共振碳谱 (<sup>13</sup>C NMR)** <sup>13</sup>C 是一种自旋量子数为 1/2 的稳定性同位素。<sup>13</sup>C 的自然丰度为 1.1% 相对于自然丰度为 100% 的 <sup>31</sup>P 和 <sup>1</sup>H 来说比较难检测。然而, <sup>13</sup>C 这种极低的天然丰度也可以被看作是优点, 这使应用 <sup>13</sup>C 标记的底物进行稳定性同位素示踪实验成为可能。同位素示踪法是研究物质代谢途径最有效和最常用的方法。相对于传统的放射性同位素示踪法, <sup>13</sup>C 等稳定性同位素无放射性, 对实验操作者无害, 同时也不会对环境造成污染, 代谢反应中被标记的中间产物或

\* 国家基础研究发展计划资助项目 (No. 2004CB619202)

\*\* 通讯作者 Tel: 86-531-88364429, Fax: 86-531-88565610, E-mail: jianqunlin@sdu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-22, 修回日期: 2006-05-12

产物可以利用核磁共振技术被直接检出,不需要再进行纯化及其他繁琐的实验操作。

1972年, Eakin等<sup>[1]</sup>首次报道了应用<sup>13</sup>C NMR研究微生物代谢。他们在产阮假丝酵母(*Candida utilis*)的细胞悬液中添加<sup>13</sup>C标记的葡萄糖,应用1.4T核磁共振仪动态监测了酵母菌在代谢葡萄糖过程中所产生的各种代谢中间产物浓度的变化。

Eakin等的实验为我们提供了利用核磁共振技术研究微生物代谢的重要思路:在微生物培养体系中添加<sup>13</sup>C标记的代谢底物,然后利用核磁共振仪检测<sup>13</sup>C标记在各种代谢产物中的分布,从而推测出这一代谢底物在细胞中的代谢途径。<sup>13</sup>C标记示踪与核磁共振技术的结合提供了一种深入研究微生物有机物代谢途径的全新方法。到目前为止,<sup>13</sup>C NMR已经应用细菌<sup>[2]</sup>、酵母<sup>[3]</sup>、丝状真菌<sup>[4]</sup>、支原体<sup>[5]</sup>等多种微生物的代谢研究。

**1.2 核磁共振磷谱(<sup>31</sup>P NMR)** <sup>31</sup>P的天然丰度为100%。从理论上讲,<sup>31</sup>P适合应用于核磁共振检测。含磷化合物在细胞内含量较高,而且与细胞的能量代谢密切相关,如ATP储存和消耗,所以<sup>31</sup>P NMR在微生物能量代谢研究方面应用广泛。由于微生物代谢过程中许多重要的中间反应都涉及到磷酸基团的转移,因而<sup>31</sup>P NMR可以用于研究含磷代谢中间产物浓度的变化以及研究催化这些反应的酶的代谢动力学。与<sup>13</sup>C NMR相比,<sup>31</sup>P的化学位移较窄,细胞内许多有机磷酸在核磁共振磷谱上表现出相似的化学位移,因此对有些复杂磷谱很难进行准确解析,从一定程度上限制了<sup>31</sup>P NMR在微生物代谢研究中的应用。

<sup>31</sup>P核磁共振技术主要用于研究细胞内酶的动力学性质,比如可以检测底物浓度、可能存在的抑制剂、pH值、离子的组成及酶和底物间的隔离作用等因素对酶动力学性质的影响,这对了解酶在微生物细胞内代谢过程中所起的作用具有重要意义。1977年Brown等<sup>[6]</sup>首次利用<sup>31</sup>P NMR测定了ATP酶在活体中的动力学性质。他们在有氧条件下测定了大肠杆菌中ATP与Pi之间交换的动力学性质,发现二环己碳二亚胺可以抑制ATP酶的活性,从而导致ATP与Pi之间交换变慢。除此之外,<sup>31</sup>P NMR在微生物代谢研究的其它领域也有应用。Rager<sup>[7]</sup>等利用<sup>31</sup>P NMR研究了巴斯德杆菌(*Pasteurella multocida*)中葡萄糖的代谢途径,他

们通过对含有磷酸基团的代谢产物的监测分析发现,在败血性巴氏杆菌中,6-磷酸果糖不仅可以在磷酸果糖激酶的作用下变为1,6-二磷酸果糖,还可以在磷酸果糖还原酶的作用下生成1-磷酸甘油醇。此外,<sup>31</sup>P NMR还可以用于研究外界环境因素对细胞生理状态的影响<sup>[8]</sup>。

**1.3 核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)** <sup>1</sup>H,天然丰度100%,是所有常用核中最灵敏的一种。<sup>1</sup>H NMR的谱峰与样品中各化合物的氢原子是一一对应的,所测样品中的每一个氢在图谱中都有其相关的谱峰,图谱中信号的相对强弱反映了样品中各组分的相对含量。由于<sup>1</sup>H NMR的化学位移范围较窄,因而以前很少应用于代谢研究,近年来才开始广泛应用于对细胞提取液及发酵液中代谢产物的分析研究。Manuela da Silva等<sup>[9]</sup>利用<sup>1</sup>H NMR研究了丝状真菌对联苯等芳香族化合物的代谢过程。Abel等<sup>[10]</sup>利用<sup>1</sup>H NMR研究了链霉菌 *Streptomyces citricolor* 培养物中的代谢产物,如海藻糖、琥珀酸盐、尿苷等。<sup>1</sup>H NMR波谱中积分曲线高度与引起该峰氢核数成正比,这使<sup>1</sup>H NMR不仅能用于结构分析,同样也可用于定量分析。

<sup>1</sup>H NMR可以很方便的与HPLC以及MS技术联用,这是其优于<sup>13</sup>C、<sup>31</sup>P NMR的一个特点。

## 2 核磁共振技术在研究微生物代谢研究中的应用

**2.1 在代谢工程中的应用** 对微生物细胞代谢网络的分析不仅在基础研究中意义重大,也是利用基因工程手段改良生产菌株的前提。

精确的研究某一基因缺失后微生物代谢的变化对研究微生物代谢调控意义重大。在大肠杆菌中,糖酵解途径、磷酸戊糖途径和TCA循环是整个代谢网络的中心,为其它代谢途径提供底物、能量、还原力。如果敲除掉中心代谢某种酶的编码基因,那么细胞会利用代谢补偿机制来弥补这一缺陷。Lifeng Peng等<sup>[11]</sup>利用<sup>13</sup>C示踪法结合二维核磁共振技术以及气质联用技术研究了PEP羧化酶基因缺失的大肠杆菌突变株(简称ppc突变株)的中心代谢途径的变化,发现ppc基因的缺失使18.9%的碳源通过乙醛酸支路进行代谢,同时磷酸戊糖途径的代谢流量明显降低。Zhao Jiao等<sup>[12]</sup>同样应用核磁共振技术研究了敲除gnd基因(6-磷

酸葡萄糖酸盐脱氢酶基因)后大肠杆菌代谢情况的变化。6-磷酸葡萄糖酸盐脱氢酶基因是磷酸戊糖途径的关键酶,它的缺失使 ED 途径代谢流量增加。另外,丙酮酸激酶基因的敲除对大肠杆菌代谢所产生的影响也已有报道<sup>[13]</sup>。

目前,利用生物技术生产精细化工用品和日用品,如燃料、溶剂、聚合物等,有逐步替代传统化学工业技术的趋势,而这主要是通过对生物体特定基因的改造来实现的。在分析细胞代谢网络的基础上,理性化设计细胞代谢途径,并通过 DNA 重组技术实现遗传修饰,从而定性改变细胞代谢流走向,调整原有代谢网络,进而提高特定代谢物的产量。

**2.2 在环境与生态学研究中的应用** 核磁共振技术可以解析微生物降解环境污染物的生物降解过程以及中间产物,提供污染物有效降解的信息。Haroun 等<sup>[14]</sup>研究了紫红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 对 2-巯基苯并噻唑 (2-Mercapto-benzothiazole, MBT) 的降解作用。MBT 是一种主要应用于橡胶工业的剧毒难降解污染物。Nicolas 等人首次以细菌紫红红球菌的纯培养物完成了对 MBT 的生物转化,并利用核磁共振技术和质谱技术分析了降解 MBT 所产生的代谢物。Girbal 等<sup>[15]</sup>研究了谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 对甲基内吸磷 (demeton-S-methyl) 的降解作用。Ansedé 等人<sup>[16]</sup>报道了一株从海水中分离出的可产生二甲基磺基丙酯 (Dimethylsulfoniopropionate, DMSP) 裂解酶的菌对  $[1-^{13}\text{C}]$ -二甲基磺基丙酯 ( $[1-^{13}\text{C}]$  dimethylsulfoniopropionate) 和  $[1-^{13}\text{C}]$ -丙烯酸 ( $[1-^{13}\text{C}]$  acrylate) 的降解作用。另外,<sup>19</sup>F 核磁共振技术在检测环境中的含氟污染物<sup>[17]</sup>及研究污染物降解方面<sup>[18]</sup>也有一定应用。

活性污泥经常用于处理工业废水。Pereira 等<sup>[19]</sup>研究了  $^{13}\text{C}$  标记的乙酸在活性污泥系统中的转化。Lemos 等<sup>[20]</sup>应用  $^{13}\text{C}$  和  $^{31}\text{P}$  技术研究了在生物除磷过程中活性污泥对  $[3-^{13}\text{C}]$ -丙酸的代谢。这方面的研究阐明了在微生物法富集磷的过程中碳代谢与磷代谢的关系,为我们在实际生产中进一步优化污水处理系统提供了指导。

土壤微生物代谢研究是系统土壤微生态系统研究中的重要组成部分。由于土壤中的微生物与土壤基质结合非常紧密,而且许多土壤微生物无

法获得纯培养,因此应用传统的菌种分离再进行研究的操作流程不仅步骤繁琐,而且无法如实的反映土壤中微生物的代谢情况。核磁共振技术具有不需要进行样品的提取、纯化的优点,可以对土壤微生物的代谢情况进行原位监测,是研究土壤微生物代谢的一种极具吸引力的方法。目前,利用 NMR 对土壤微生物代谢途径的研究多集中于对土壤中碳素转化及循环的研究。如研究  $^{13}\text{C}$  标记的底物 (乙酸、葡萄糖、氨基乙酸) 在土壤中的代谢过程<sup>[21]</sup>。

### 2.3 在与人类和动物健康相关领域研究中的应用

病原微生物是对人类和动物的健康有很大危害,有必要对其进行深入研究。类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 是一种能引起肠胃炎的病原微生物。Rager 等<sup>[22]</sup>利用  $^{31}\text{P}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 研究了类志贺邻单胞菌对甘露糖的代谢。Matsuda 等<sup>[5]</sup>利用  $^1\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR 以及质谱技术针对可能与类风湿性关节炎以及艾滋病相关的病原体发酵支原体 (*Mycoplasma fermentans*) 进行了研究。另外, NMR 也可用于研究抗菌药物对各类病原微生物代谢的影响。这对各类药物的开发及应用有一定的指导作用<sup>[23]</sup>。

哺乳动物的消化系统中存在大量正常菌群,这些菌群与哺乳动物的健康息息相关。消化道菌群的代谢直接影响着哺乳动物的生理状态。Marion 等<sup>[24]</sup>研究了四株分离于人类肠道的产乙酸的葡萄糖代谢途径。他们的研究既包括了对代谢终产物的研究,同时也包括了利用休止细胞体系所进行的代谢中间产物监测。Kazunari 等<sup>[25]</sup>研究了猪消化道微生态系统中 L- $[3-^{13}\text{C}]$ -乳酸的代谢。他们将猪后肠中的消化物用含有 L- $[3-^{13}\text{C}]$ -乳酸的磷酸盐缓冲液进行稀释,并将此混合物在 37℃ 下振荡培养 24 小时,在此过程中定时取样分析培养体系中短链脂肪酸的产生情况。结果表明在猪肠道菌群可以代谢 L- $[3-^{13}\text{C}]$ -乳酸生成  $[3-^{13}\text{C}]$ -丙酸,  $[2-^{13}\text{C}]$ -乙酸,  $[2-^{13}\text{C}]$ -丙酸,  $[2-^{13}\text{C}]$ -丁酸,和  $[4-^{13}\text{C}]$ -丁酸等物质。近期也有关于人肠道菌群对于乳酸代谢的研究<sup>[26]</sup>。

NMR 技术在食物营养与安全方面也有所应用。甘露糖是一种对人体健康有一定促进作用的多元醇。Caspar 等<sup>[27]</sup>通过基因工程手段得到了一株高

产甘露醇的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*), 应用<sup>13</sup>C NMR 研究了该菌株代谢葡萄糖产生甘露醇的途径及效率, 并以此为依据提出了提高甘露醇产量的策略。2-氨基-3-甲磺酸 [4, 5-f] 喹啉 (2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline, IQ) 是在肉类和鱼类烹饪过程中所产生的一种致癌物。在人体摄入之后, IQ 主要是通过肝脏的相关酶类来代谢, 但人体内的微生物也有可能参与了 IQ 的生物转化。Humboldt 等<sup>[28]</sup>利用<sup>1</sup>H NMR 研究了人体内微生物群代谢 IQ 的途径, 发现人体肠道中的优势菌群可以将 IQ 转化为 7-羟基-IQ。

### 3 研究展望

随着微生物分子生物学的不断发展, 人们对微生物的了解已经深入到了基因组学以及蛋白质组学的层次。微生物的代谢活动不仅受其遗传背景的影响, 还受其所处环境及自身的生理状态的影响, 仅仅依靠对其自身基因转录和蛋白表达的研究无法阐述微生物体内的代谢活动。因此需要一种能在限定的培养条件下“原位”研究微生物细胞代谢途径的技术。NMR 技术的特点符合这一要求, 因此已经深入到微生物代谢研究的各个领域。

虽然 NMR 技术具有无损性等优点, 利用 NMR 技术可以定量的监测胞内代谢物, 可以在未经纯化的复杂混合物中检测某一具体代谢物的浓度, 但 NMR 技术与其它技术相比, 存在分辨率相对较低、仪器昂贵等缺点。因此要更加准确地研究微生物代谢, 不仅要依靠 NMR 技术的不断完善, 也要注重 NMR 技术与其它分析技术的有机结合, 如与 HPLC, MS 技术联合使用可以更准确地分析代谢物的结构。近期的研究已呈现出这种趋势, 如 Moody 等<sup>[29]</sup>利用了 NMR, HPLC, GC/MS, 紫外-可见光吸收分析等多种方法研究了分枝杆菌 *Mycobacterium vanbaalenii* 对苯并 [a] 芘 (benz [a] anthracene) 的降解作用。分析手段的不断进步与交叉必将进一步推动微生物代谢研究。

### 参考文献

- [1] Eakin R T, Morgan L O, Gregg C T, et al. FEBS Lett, 1972, 28: 259 ~ 264.
- [2] Torres J C, Guixé V, Babut J. Biochem, 1997, 327: 675 ~ 684.
- [3] Maasheimo H, Fiaux J, Coker Z P, et al. Eur J Biochem, 2001, 268 (8): 2464 ~ 2479.
- [4] Werner I, Bacher A, Eisenreich W. J Biol Chem, 1997, 272 (41): 25474 ~ 25482.
- [5] Matsuda K, Ishizuka I, Kasama T, et al. Biochim Biophys Acta, 1997, 1349 (1): 1 ~ 12.
- [6] Brown T R, Ugurbil K, Shulman R G. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74 (12): 5551 ~ 5553.
- [7] Rager M N, Binet M R, Bouvet O M. Eur J Biochem, 1999, 263 (3): 695 ~ 701.
- [8] Lohmeier-Vogel F M, Ung S, Turner R J. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (12): 7342 ~ 7347.
- [9] da Silva M, Esposito E, Moody J D, et al. Chemosphere, 2004, 57 (8): 943 ~ 952.
- [10] Abel C B, Lindon J C, Noble D, et al. Anal Biochem, 1999, 270 (2): 220 ~ 230.
- [11] Peng L, Arauzo-Bravo M J, Shimizu K. FEMS Microbiol Lett, 2004, 235 (1): 17 ~ 23.
- [12] Jiao Z, Baba T, Mori H, et al. FEMS Microbiol Lett, 2003, 220 (2): 295 ~ 301.
- [13] Emmerling M, Dauner M, Ponti A, et al. J Bacteriol, 2002, 184 (1): 152 ~ 164.
- [14] Haroune N, Combourieu B, Besse P, et al. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (10): 6315 ~ 6319.
- [15] Girbal L, Hilaire D, Leduc S, et al. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (3): 1202 ~ 1204.
- [16] Ansedé J H, Pellechia P J, Yoch D C. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (7): 3134 ~ 3139.
- [17] Prenafeta-Boldú F X, Luykx D M, Vervoort J, et al. Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (3): 1030 ~ 1034.
- [18] Boersma M G, Solyanikova I P, Van Berkel W J, et al. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 26 (1 ~ 2): 22 ~ 34.
- [19] Pereira H, Lemos P C, Reis M A M, et al. Water Res, 1996, 30 (9): 2128 ~ 2138.
- [20] Lemos P C, Serafim L S, Santos M M, et al. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (1): 241 ~ 251.
- [21] Lundberg P, Ekblad B, Nilsson M. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33: 621 ~ 632.
- [22] Rager M N, Binet M R, Ionescu C, et al. Eur J Biochem, 2000, 267 (16): 5136 ~ 5141.
- [23] Daoubi M, Deligeorgopoulou A, Macias-Sanchez A J, et al. J Agric Food Chem, 2005, 53 (15): 6035 ~ 6039.
- [24] Leclerc M, Bernalier A, Lelait M, et al. FEMS Microbiol Lett, 1997, 146: 199 ~ 204.
- [25] Kazunari U, Seiko H, Katsumi A. Ecology in Health and Disease, 2002, 14: 241 ~ 246.
- [26] Bourriaud C, Robins R J, Martin L, et al. J Appl Microbiol, 2005, 99 (1): 201 ~ 212.
- [27] Gaspar P, Neves A R, Ramos A, et al. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (3): 1466 ~ 1474.
- [28] Humboldt C, Combourieu B, Vaisanen M L, et al. Appl Environ Microbiol, 2005, 71 (9): 5116 ~ 5123.
- [29] Moody J D, Freeman J P, Cerniglia C E. Biodegradation, 2005, 16 (6): 513 ~ 526.