

# 基于代谢流分析的 L-组氨酸产生菌定向选育

杜建涛, 魏伟, 徐庆阳, 谢希贤, 陈宁

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 基于谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 代谢网络和 L-组氨酸合成代谢流分析, 对 L-组氨酸产生菌谷氨酸棒杆菌 TQ2223 (Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>, 8-AG<sup>f</sup>, SG<sup>f</sup>, CIN<sup>f</sup>) 进行多次硫酸二乙酯 (DES) 定向诱变, 依次赋予其 6-MP<sup>f</sup>、5-MT<sup>f</sup>、2-TA<sup>f</sup> 和 L-Hisase<sup>-</sup> (L-组氨酸酶缺陷) 遗传标记后得到突变株 TL1106(5-MT<sup>f</sup>, SG<sup>f</sup>, 5-FT<sup>f</sup>, 8-AG<sup>f</sup>, 6-MP<sup>f</sup>, 2-TA<sup>f</sup>, Hisase<sup>-</sup>)。经验证突变株 TL1106 可在 10% 葡萄糖的发酵培养基上积累 L-组氨酸 6.0 g/L, 比出发菌株提高了 2.5 倍。结果表明: 通过赋予目的遗传标记而改变代谢流分布, 能够促进 L-组氨酸的合成与积累。

**关键词:** L-组氨酸; 谷氨酸棒杆菌; 硫酸二乙酯诱变; 代谢网络; 代谢流量分析

文章编号: 1673-9078(2010)1-5-5

## Application of Metabolic Flux Analysis for Screening of L-Histidine-Producing Strains

DU Jian-tao, WEI Wei, XU Qing-yang, XIE Xi-xian, CHEN Ning

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** According to the theory of metabolic flux analysis, TL1106(5-MT<sup>f</sup>, SG<sup>f</sup>, 5-FT<sup>f</sup>, 8-AG<sup>f</sup>, 6-MP<sup>f</sup>, 2-TA<sup>f</sup>, Hisase<sup>-</sup>) was obtained by diethyl sulfate (DES) mutagenesis derived from the original strain *Corynebacterium glutamicum* TQ2223 (Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>, 8-AG<sup>f</sup>, SG<sup>f</sup>, CIN<sup>f</sup>). TL1106 can produce 6.0 g/L of L-Histidine in 10% glucose medium which was 2.5 times higher than that by TQ2223. Accordingly, the metabolic flux of *C. glutamicum* TQ2223 and its mutants TL1106 was determined, compared and analyzed in L-Histidine synthesis. Therefore, the great change of metabolic flux distribution might be caused by the introduction of genetic markers, which was useful in L-Histidine synthesis.

**Key words:** L-Histidine; *Corynebacterium glutamicum*; Metabolic flux analysis; DES mutagenesis; Breeding

L-组氨酸的化学名为 L- $\alpha$ -氨基- $\beta$ -咪唑丙酸, 是分子中含有咪唑核的碱性氨基酸。L-组氨酸具有多种生理功能, 广泛用于医药、饲料及食品行业, 尤其在医学研究中的作用日益受到重视。L-组氨酸对婴幼儿为必需氨基酸, 幼儿缺乏 L-组氨酸可导致贫血、发育迟缓、易生湿疹等疾病。目前, L-组氨酸是市场上急需的氨基酸品种, 也是影响我国实现氨基酸输液原料国产化目标的 4 种氨基酸之一, L-组氨酸生产已经成为制约我国氨基酸行业发展的瓶颈之一<sup>[1,2]</sup>。

我国到目前为止, 多采用随机诱变和定向筛选的方法进行 L-组氨酸育种, 随着代谢工程和分子生物学的发展, 开始把它们结合起来进行 L-组氨酸育种。代谢流量分析 (Metabolic Flux Analysis, MFA) 是一种研

收稿日期: 2009-09-04

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2008BA163B01); 国家科技重大专项课题 (2008ZX09401-05)

作者简介: 杜建涛 (1982-), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向: 代谢控制发酵

究胞内代谢的方法, 根据胞内主要反应的化学计量模型和胞内代谢产物的质量平衡来计算胞内的代谢流量<sup>[3]</sup>。通过测定胞外代谢产物的浓度, 计算未知途径的流量, 对于理解细胞的代谢调控机制具有重要意义。

本文从代谢工程和网络的观点出发, 进行 L-组氨酸设计育种, 以谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) TQ2223 (Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>, 8-AG<sup>f</sup>, SG<sup>f</sup>, CIN<sup>f</sup>) 为出发菌株, 通过多次硫酸二乙酯 (DES) 诱变, 依次赋予出发菌株 6-MP<sup>f</sup>、5-MT<sup>f</sup>、2-TA<sup>f</sup> 和 L-Hisase<sup>-</sup> 等遗传标记, 得到突变株 TL1106 (5-MT<sup>f</sup>, SG<sup>f</sup>, 5-FT<sup>f</sup>, 8-AG<sup>f</sup>, 6-MP<sup>f</sup>, 2-TA<sup>f</sup>, Hisase<sup>-</sup>)。应用代谢流量分析原理测定胞外的代谢产物浓度, 计算出发菌株及突变菌株各途径的反应速率, 得到代谢流量分布, 并对流量分配初步进行比较和分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

菌种: 谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) TQ2223

(Phe<sup>-</sup>, Tyr<sup>-</sup>, 8-AG<sup>r</sup>, SG<sup>r</sup>, CIN<sup>r</sup>)，天津科技大学代谢工程研究室保藏。

主要试剂：硫酸二乙酯 (DES)，天津化学试剂六厂产品。L-组氨酸 (L-His)、2-噻唑丙氨酸 (2-TA) 和 6-巯基嘌呤 (6-MP)，美国 Sigma 公司产品。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基 (g/L)

葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 5, NaCl 2.5, 琼脂 20, pH 7.0~7.2。

1.2.2 基本培养基 (g/L)

葡萄糖 10, 硫酸铵 10, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.4, 硫酸锰 0.01, 硫酸亚铁 0.01, V<sub>BI</sub> 100 μg, V<sub>H</sub> 100 μg, 琼脂粉 15, pH 7.0~7.2。

1.2.3 种子培养基 (g/L)

葡萄糖 30, 硫酸铵 3, 玉米浆 50 mL, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.4, 硫酸锰 0.01, 硫酸亚铁 0.01, V<sub>BI</sub> 300 μg, V<sub>H</sub> 200 μg, pH 7.0~7.2。

1.2.4 发酵培养基 (g/L)

葡萄糖 100, 硫酸铵 10, 玉米浆 30 mL, 磷酸二氢钾 1.5, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.015, 硫酸亚铁 0.01, V<sub>BI</sub> 200 μg, V<sub>H</sub> 50 μg, 碳酸钙 30 (分消), pH 7.0~7.2。

1.3 诱变方法

硫酸二乙酯 (DES) 诱变。将菌在肉汤培养基中培养至对数期后，离心洗涤制成菌悬液，取 20 mL 菌悬液，加入 0.2 mL DES，处理 20~23 min，用 25% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液终止反应，离心洗涤收集菌体，转入液体筛选培养基中，2~3 h 后加入 300 U/mL 青霉素去除野生型，浓缩缺陷型。培养过夜，得菌悬液。筛选备用。

1.4 目的突变株的筛选

1.4.1 6-MP<sup>r</sup>、5-MT<sup>r</sup>、2-TA<sup>r</sup> 突变株的筛选

把诱变所得的菌悬液适度稀释涂布于含有一定浓度 6-MP (6-巯基嘌呤抗性)、5-MT (5-甲基色氨酸) 和 2-TA (2-噻唑丙氨酸) 的基本培养基，能够生长的菌落即为 6-MP<sup>r</sup>、5-MT<sup>r</sup> 和 2-TA<sup>r</sup> 突变株。

1.4.2 L-Hisase<sup>-</sup> (L-组氨酸酶缺陷) 突变株的筛选

采用逐个检出法进行营养缺陷型菌株的筛选。将诱变后的菌液涂布于完全培养基，长出菌落后，用牙签按一定顺序逐个将菌落点接到基本培养基和无糖含 L-组氨酸的基本培养基，培养一定时间后，在基本培养基上生长，而在无糖含组氨酸基本培养基上不长的菌株可能就是 L-组氨酸分解代谢支路被切断的菌株，即 L-Hisase<sup>-</sup> 突变株。

1.5 L-组氨酸产生菌谷氨酸棒杆菌 TQ2223 代谢网络的建立

由文献可知，L-组氨酸生产菌谷氨酸棒杆菌的中心代谢途径包括糖酵解途径 (EMP)、三羧酸循环 (TCA 循环) 和戊糖磷酸途径 (HMP)。TCA 循环是谷氨酸菌属发酵过程中的主要氧化途径，磷酸烯醇丙酮酸羧化酶催化的反应是 TCA 循环的主要回补反应<sup>[4]</sup>。

由文献<sup>[5,6]</sup>，忽略菌体生长并假定 L-组氨酸积累最快的阶段处于拟稳态，各种中间代谢物积累速度为 0，途径末端代谢物的积累速率近似等于该代谢产物合成途径的反应速率。建立 L-组氨酸合成的相关代谢网络如图 1 所示。

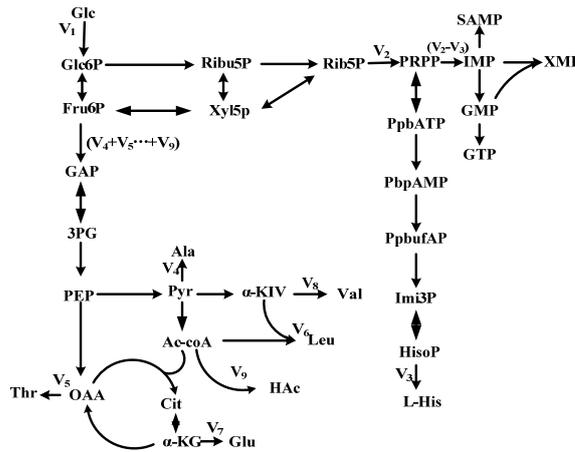


图 1 L-组氨酸合成相关的代谢网络

Fig.1 Metabolic subnet relating to L-histidine bio-synthesis

Glc6P: 6-磷酸葡萄糖; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; F6P: 6-磷酸果糖; GAP: 3-磷酸甘油醛; Ri5P: 5-磷酸核酮糖; Xyl5P: 5-磷酸木酮糖; Rib5P: 5-磷酸核糖; Ribu5P: 5-磷酸核酮糖; OAA: 草酰乙酸; AcCoA: 乙酰辅酶 A; PRPP: 5-磷酸核糖焦磷酸; PpbATP: 5-磷酸核糖-ATP; PpbuFAP: 5-磷酸核酮糖亚氨基-5-氨基咪唑羧酸核苷酸; Imi3P: 咪唑甘油酸; HisoP: L-组氨酸磷酸; IMP: 肌苷酸; Pyr: 丙酮酸

根据 L-组氨酸代谢网络分析得出，测出 6 种氨基酸 (L-His、L-Glu、L-Thr、L-Ala、L-Val 和 L-Leu) 和 HAc 的速率可确定代谢网络中的流量分布。根据代谢流量分布对 L-组氨酸产生菌—谷氨酸棒杆菌进行诱变改造，改变其代谢流分布，提高 L-组氨酸的产量。

1.6 分析和测定方法

OD 测定：将菌液稀释 20 倍，利用 752 分光光度计在 620 nm 下测定；残糖测定：采用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定；L-组氨酸测定：用 Elite-AAA 氨基酸分析仪测定；其它有机酸测定：高效液相色谱法。

2 结果和讨论

2.1 诱变出发菌株对药物最大抗性浓度的确定

确定出发菌株分别对 6-MP、5-MT 和 2-TA 三种药物最大抗性浓度。结果如图 2 所示。

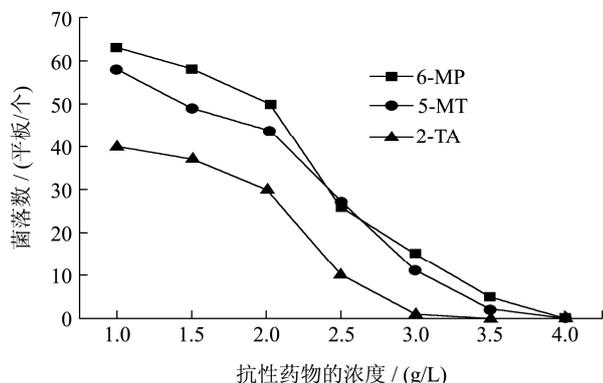


图 2 TQ2223 对 6-MP, 5-MT, 2-TA 的抗药程度

Fig.2 Resistance degree of TQ2223 to 6-MP,5-MT ,2-TA

由图 2 可知，涂布后出发菌株分别在 4 g/L 6-MP、3.6 g/L 5-MT 和 3.0 g/L 2-TA 药物平板上菌落数均为 0，因此本实验采用抗性药物的浓度分别是 4 g/L 6-MP，4 g/L 5-MT 和 3.5 g/L 2-TA。

选用以 L-组氨酸为唯一碳源的基本培养基平板（基本培养基中的葡萄糖以 10 g/L 的 L-组氨酸替换）筛选 L-Hisase<sup>r</sup> 突变株。

### 2.2 出发菌株谷氨酸棒杆菌 TQ2223 代谢流量分析

测定出发菌株发酵到 30~32 h 时（此阶段 L-组氨酸积累速率达到最大）发酵液中的还原糖、L-组氨酸、谷氨酸、亮氨酸、缬氨酸等氨基酸及乙酸等的胞外浓度，按下式

$$V = \frac{(C_{32h} - C_{30h}) \times 1000}{MW \times 2}$$

计算出上述各代谢物的积累或消耗速率，其中 V 为代谢物积累或者消耗速率（还原糖为消耗速率，其它物质为积累速率）。

设  $V_1, V_2, V_3, \dots$  分别为图 1 所示代谢网络各相关代谢途径的反应速率，由质量平衡： $(V_1 - V_2) = (V_4 + V_5 + V_6 + V_7 + V_8 + V_9)$  计算它们在胞外的积累或消耗速率，得到相关代谢途径的近似反应速率，建立出发菌株产 L-组氨酸的代谢流分布。如表 1 所示。

表 1 L-组氨酸形成阶段途径中的各途径代谢流量(以葡萄糖消耗速率  $V_1$  为 100 计)

Table 1 Metabolic flux of the pathways of *C.glutamicum* TQ2223 and TL1106

菌株编号	$V_1$	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_5$	$V_6$	$V_7$	$V_8$	$V_9$
出发菌株	100	17.5	9.3	11.3	12.2	13.8	3.1	12.4	39.7
突变菌株	100	21.7	14.2	11.1	11.3	9.5	9.3	8.1	39.2

### 2.3 基于代谢流分析进行 L-组氨酸菌种改造和选育

的结果

由代谢网络和代谢流分布可知，PRPP 是合成 L-组氨酸的前体，增加 PRPP 的代谢流量有利于 L-组氨酸的合成，PRPP 作为 L-组氨酸合成的前体，不仅受 L-组氨酸的反馈抑制而且还受到嘧啶嘌呤类的反馈抑制。为了增加通向 HMP 和 PRPP 途径的流量，通过多次 DES 诱变，依次赋予出发菌株 6-MP<sup>r</sup>、5MT<sup>r</sup>、2-TA<sup>r</sup> 和 L-Hisase<sup>r</sup> 等遗传标记，得到突变株经过 64 h 摇瓶发酵能够产酸 6.0 g/L，比出发菌提高 2.5 倍，菌株选育结果见图 3。

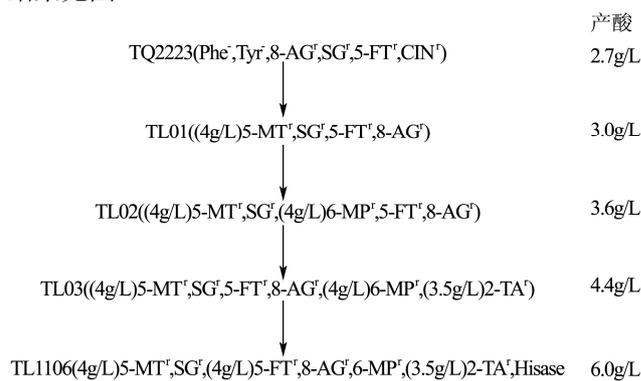


图 3 L-组氨酸菌种选育谱系

Fig.3 Schematic chart of mutagenesis procedure for *C.glutamicum*

### 2.4 出发菌株与突变株的代谢流量分析

在代谢网络中，由两个或者多个不同途径的分支汇合点称为节点。由表 1 可知，出发菌株与突变菌株相比，L-组氨酸合成网络中有很多途径的代谢流量发生了变化，多个节点处流量重新进行了分配。本文根据出发菌株和突变菌株各途径的代谢流量，对其中影响 L-组氨酸合成的两个主要节点 Glc6P 和节点 PRPP 的流量分配变化进行分析和比较。

#### 2.4.1 Glc6P 节点的代谢流量变化

以葡萄糖为原料合成 L-组氨酸涉及 EMP 途径、TCA 循环和 HMP 途径等。当碳源（葡萄糖）进入细胞内后，大部分主要通过 EMP 途径生成乙酰辅酶 A，然后进入 TCA 循环，合成生物体所需的小分子物质和 ATP；如图 4 所示，另一小部分通过 HMP 途径合成中间产物 D-核酮糖经磷酸戊糖异构酶生成 D-核糖，再由磷酸核糖焦磷酸激酶作用下生成磷酸核糖焦磷酸（PRPP），PRPP 是合成 L-组氨酸的前体物，同时也是合成嘧啶、嘌呤类核苷酸的前体物，因此它不但受到组氨酸的反馈抑制，同时也受到各种嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸或者色氨酸的调节。因此赋予出发菌株对嘌呤结构类似物、嘧啶类似物、色氨酸机构类似物和组氨酸结构类似物的抗性，可以解除对合成 PRPP 及嘧

呤核苷酸的调节而促进二者的生成。

在谷氨酸棒杆菌的葡萄糖代谢中，HMP 途径越活跃越有利于 L-组氨酸的生成。由图 4A 和 4B 可以看出，6-磷酸-葡萄糖进入 HMP 途径和 EMP 途径的流量分配由出发菌株 TQ2223 的 EMP:HMP=82.5:17.5=4.7:1 变为突变株 TL1106 的 EMP:HMP=78.3:21.7=3.61:1，HMP 途径的流量由 17.5 增加到 21.7，使更多的 6-磷酸-葡萄糖流入 HMT 途径，增加了 L-组氨酸的前体物 PRPP 合成量，有利于增加 L-组氨酸的合成。

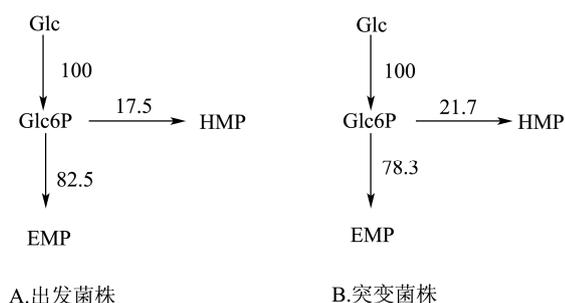


图 4 出发菌株 TQ2223 与突变菌株 TL1106 的 Glc6P 节点处的流量分配

Fig.4 Flux distribution around the Glc6P node in TQ2223

### 2.4.2 PRPP 节点的流量变化

葡萄糖经数步反应生成 PRPP (5-磷酸核糖焦磷酸)，在关键酶 ATP 磷酸核糖基转移酶的作用下，PRPP 与 ATP 结合，生成 PpbATP(Phosphoribosyl-ATP)，再经过数步反应直接生成 L-组氨酸，PRPP 与 ATP 为 L-组氨酸提供全部的碳架。PRPP 不仅仅是组氨酸的前体物，同时也是合成嘌呤核苷酸的前体，因此，PRPP 往 IMP (肌苷酸) 途径的流量越少，就越有利于组氨酸的生成。为了便于分析和比较其流量分配情况，将 HMP 途径中的流量转化为 100，则出发菌株与突变菌株在 PRPP 节点的流量分布如图 5 所示。

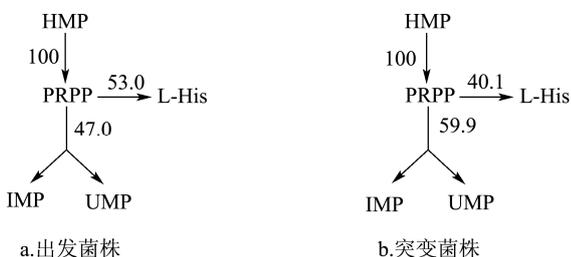


图 5 出发菌株 TQ2223 与突变菌株 TL1106 的 PRPP 节点处的流量分配

Fig.5 Flux distribution around the PRPP node in TQ2223 and TL1106

由图 5，突变菌株与出发菌株相比，PRPP 生成 L-组氨酸的流量有所减少，即流向合成 IMP 和 UMP

途径的流量增加，但是从 L-组氨酸的产量有大的提高，主要是因为突变株具备了 L-Hisase 遗传标记切断了 L-组氨酸分解代谢途径，使 L-组氨酸得以积累。而积累的组氨酸又会对其前体物 PR-ATP 的生成产生反馈抑制作用，使得生成 L-组氨酸的流量减少，即 L-组氨酸的合成速度减慢。

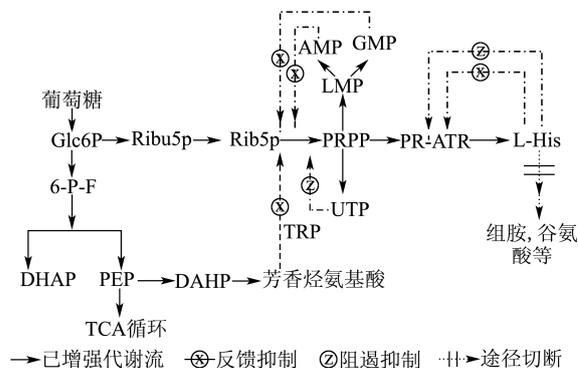


图 6 L-组氨酸育种相关的途径及调节  
Fig.6 Pathways and regulation related to breeding of strains for L-histidine biosynthesis

### 3 结论

基于出发菌株谷氨酸棒杆菌 TQ2223 代谢网络与代谢流分布，将经目的性诱变和选育获得的突变株 TL1106 与出发菌株进行相比可知，所得突变株的 Glc6P 和 PRPP 节点的流量分配朝着有利于 L-组氨酸合成的方向变化。这是育种操作过程造成菌种代谢途径及调节机制 (如图 6) 发生变化的结果。

(1) 组氨酸对其合成途径的第一个酶—5-磷酸核糖-ATP 焦磷酸化酶既有反馈抑制又有反馈阻遏，赋予出发菌株 2-TA<sup>r</sup> 标记，能够进一步解除组氨酸对其合成途径上的酶的抑制或阻遏作用。

(2) L-组氨酸的前体还受到嘧啶核苷酸、嘌呤核苷酸以及色氨酸的反馈抑制和调节，赋予谷氨酸棒杆菌的嘌呤类似物 6-MP<sup>r</sup>(6-巯基嘌呤)的抗性标记，能够解除嘌呤核苷酸等对 PRPP 的反馈抑制和调节；赋予色氨酸结构类似物 5-MT<sup>r</sup>(5-甲基色氨酸)的抗性标记，解除色氨酸对组氨酸合成途径的反馈抑制和调节作用。

(3) 在谷氨酸棒杆菌中，L-组氨酸具有很强的分解机制。L-组氨酸合成后，组氨酸转氨酶可以把 L-组氨酸脱氨形成尿酞酸，再通过一系列的反应生成谷氨酸，从而被再次利用，这是组氨酸分解的主要途径。此外还有一个微弱分解途径—脱羧，其主要产物是组胺。而赋予突变菌株 L-Hisase 遗传标记，能够切断或减弱 L-组氨酸的分解代谢途径，有利于 L-组氨酸的积累。

(下转第 27 页)