

基于代谢组学分析的 *O*-琥珀酰-L-高丝氨酸发酵调控

陈晨, 刘彦来, 陶方稳, 汤晓玲, 柳志强*

浙江工业大学生物工程学院, 浙江 杭州 310014

陈晨, 刘彦来, 陶方稳, 汤晓玲, 柳志强. 基于代谢组学分析的 *O*-琥珀酰-L-高丝氨酸发酵调控[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4783-4799.

CHEN Chen, LIU Yanlai, TAO Fangwen, TANG Xiaoling, LIU Zhiqiang. Regulation of fermentation for *O*-succinyl-L-homoserine production based on metabolomics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4783-4799.

摘要: 【目的】*O*-琥珀酰-L-高丝氨酸(*O*-succinyl-L-homoserine, OSH)是合成 L-蛋氨酸、L-草铵膦等重要前体, 在医药、农药、食品等领域具有重要的应用前景, 其绿色高效制造受到广泛关注。本研究通过解析 OSH 发酵过程代谢途径和代谢产物变化规律, 建立 OSH 发酵调控策略, 提升其产量和糖酸转化率。【方法】运用代谢组学技术, 系统考察 OSH 生产菌在发酵不同时间段的代谢物变化情况, 探究与 OSH 合成显著关联的代谢途径, 通过在不同时间外源添加关键代谢物, 平衡关键代谢物及其前体通量, 减少旁路途径对前体的竞争性利用。【结果】在 5 L 发酵罐中产量达 70.1 g/L, 糖酸转化率达 0.52 g/g (葡萄糖)。【结论】研究结果表明, 基于代谢组学分析技术的 OSH 发酵体系优化和发酵过程调控显著提升了目标产物生产效率, 奠定了 OSH 的产业化基础。

关键词: 代谢组学; *O*-琥珀酰-L-高丝氨酸; 细胞工厂; 发酵调控

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400).

*Corresponding author. E-mail: microliu@zjut.edu.cn

Received: 2023-05-12; Accepted: 2023-09-05

Regulation of fermentation for *O*-succinyl-L-homoserine production based on metabolomics

CHEN Chen, LIU Yanlai, TAO Fangwen, TANG Xiaoling, LIU Zhiqiang*

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *O*-Succinyl-L-homoserine (OSH), an important precursor for the synthesis of L-methionine, L-glufosinate-ammonium and other chemicals, has wide applications in the pharmaceutical, pesticide, and food industries. The green and efficient production of OSH has attracted a great deal of attention. This study investigated the metabolic pathway and metabolite changes during the microbial fermentation for production of OSH, aiming to establish an efficient regulation strategy to increase both the yield and sugar-acid conversion of OSH. [Methods] Metabolomics was employed to systematically investigate the metabolic changes during the fermentation, and the key metabolic pathways associated with OSH biosynthesis were determined. The key metabolites were added at different fermentation stages to balance the metabolic flux and reduce the competitive utilization of precursors. [Results] The efficient bio-production of OSH was realized in a 5 L fermentation tank. The titer reached 70.1 g/L with the conversion of 0.52 g/g (glucose). [Conclusion] The optimization of OSH fermentation system and regulation of fermentation process based on metabolomics have significantly improved the production of OSH, laying a foundation for the industrialization of OSH.

Keywords: metabolomics; *O*-succinyl-L-homoserine; microbial cell factory; regulation of fermentation

O-琥珀酰-L-高丝氨酸 (*O*-succinyl-L-homoserine, OSH)是一种重要的 C4 平台化合物, 可用于合成 L-蛋氨酸、L-草铵膦、异丁醇、 γ -丁内酯和 1,4-丁二醇等, 在食品、医药、农业等多个领域具有广阔的应用前景^[1-4]。目前化学合成由于反应条件苛刻、操作危险性大、三废排放高等问题, 难以实现规模化生产^[5]。随着合成生物学的快速发展, 构建微生物细胞工厂成为 OSH 绿色高效生产的重要手段, 具有工艺简单、原子经济性高、环境友好等优势^[6-8]。近年来, OSH 细胞工厂的构建与调控受到了广泛关注。Kim 等通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*) W3110 中敲除编码胱硫醚- γ -合酶的 *metB* 基因阻断 OSH 的消耗途径, 敲除编码高丝氨酸激酶的 *thrB* 基因使高丝氨酸不再流向苏氨酸的合成, 获得了 1 株在 40 g/L

葡萄糖的培养基中产量为 1.8 g/L 的菌株^[9]。Hong 等在敲除了 *metB* 基因和 *thrB* 基因的基础上引入了来自于链霉菌的蔗糖酶基因, 通过以蔗糖为碳源补料发酵 OSH, 相较于改造之前产量提高了 65.5%^[1]。Huang 等以产 L-蛋氨酸的菌株出发, 过表达 *metL* 基因, 敲除了 *metB* 基因, 最终使得摇瓶产量达到了 9.3 g/L^[2]。

在前期研究中, 本课题组应用代谢改造策略构建大肠杆菌底盘细胞, 通过强化前体物质的通量、增强辅助因子的供给, 获得了高产 OSH 的细胞工厂^[10], 但是在发酵过程中仍存在周期长、糖酸转化率低等问题。要进一步提升目标产物的合成效率, 对发酵体系和过程的优化与调控必不可少。

微生物代谢组学分析是研究微生物代谢谱系、代谢产物及其调控的重要方法, 可以揭示微

生物在不同环境下代谢途径和代谢产物的变化规律, 从而为发酵过程的优化和调控提供理论支持, 在发酵工业中具有重要应用^[11]。近年来, 通过微生物代谢组学分析, 指导微生物发酵过程的优化, 实现目标化合物的高效生产屡有报道。如 Zhao 等在微生物代谢组学分析的基础上, 优化吸湿性链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的发酵条件及培养基, 并结合外源添加和分批补料的发酵方式, 增加前体物的合成, 从而提高了雷帕霉素的产量^[12]。Ding 等通过气相色谱-飞行时间-质谱(gas chromatography-time of flight-mass spectrometry, GC-TOF-MS)技术分析了酿酒酵母在工业酒精发酵过程中的细胞代谢特征, 将发酵过程分为 3 个阶段, 阐述了酵母细胞在生产过程中受到的影响, 以此为依据实现乙醇的高效生产^[13-15]。

本研究基于前期构建的 OSH 生产菌, 建立了基于代谢组学分析的发酵调控策略, 通过揭示不同培养阶段细胞的显著代谢物差异, 确定影响 OSH 合成的关键代谢物及其变化规律。基于此, 优化了 OSH 发酵培养基和发酵过程中添加关键代谢物的时间, 通过调控相关代谢物及其前体的通量, 减少旁路途径对代谢物的竞争性利用等, 从而显著提高了 OSH 的发酵产量和糖酸转化率, 为实现 OSH 的高效生物制造奠定了重要基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究中所涉及的 OSH 大肠杆菌高效细胞工厂由实验室前期构建^[10], 标记为 OSH-1。

1.1.2 培养基

基础发酵培养基组成(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 2.5, (NH₄)₂SO₄ 16, KH₂PO₄ 2, L-苏氨酸 0.23, L-蛋氨酸 0.1, 柠檬酸 2, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·4H₂O 0.01, MnSO₄ 0.005, ZnSO₄ 0.002 5, L-精氨酸 0.004, L-谷氨酸 0.003, pH 自然。

补料培养基组成(g/L): 葡萄糖 500, 硫酸铵 16, L-苏氨酸 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·4H₂O 0.01, MnSO₄ 0.005, ZnSO₄ 0.002 5, L-精氨酸 0.004, L-谷氨酸 0.003, pH 自然。

外源添加物(g/L): 丙酮酸 1, 草酰乙酸 1.5, 天冬氨酸 2。

1.2 发酵方法

摇瓶发酵: 按 5% (体积分数)的接种量将试管活化好的菌液, 接种到装有基础发酵培养基的 500 mL 摇瓶中(装液量为 20 mL), 然后分别加入无菌 CaCO₃ 0.3 g 和终浓度为 50 mg/L 卡那霉素, 在 37 °C、200 r/min 下进行培养。在发酵 12 h 分别加入终浓度为 1.5 g/L 的草酰乙酸和 2.0 g/L 的天冬氨酸, 发酵 36 h 加入终浓度为 1.0 g/L 的丙酮酸。当菌体 OD₆₀₀ 为 0.6–1.0, 再加入终浓度为 0.5 mmol/L 的乳糖诱导, 随后在 30 °C、200 r/min 恒温摇床发酵至 72 h。

5 L 发酵罐发酵: 将培养好的种子液转接到 5 L 发酵罐中(装液量 2 L), 接种量为 10% (体积分数), 同时加入终浓度为 50 mg/L 的卡那霉素。初始培养温度设置为 37 °C, 搅拌速度为 400 r/min, 通气量设置为 2 vvm, 利用体积比浓度为 50% 的氨水和 50% 的磷酸自动调节发酵 pH 值并维持在 6.80, 控制溶氧在 30%–50%。在发酵 12 h 时分别加入终浓度为 1.5 g/L 的草酰乙酸和 2.0 g/L 的天冬氨酸, 发酵 36 h 时加入终浓度为 1.0 g/L 的丙酮酸。当菌体 OD₆₀₀ 为 10 左右时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的乳糖诱导, 调节发酵温度为 30 °C。当发酵培养基中的葡萄糖耗完, 发酵液中的 pH 值和溶氧升高开始进行补料, 控制残糖的浓度为 0–5 g/L, 保持溶氧在 20% 左右。每隔 6 h 取样并实时检测发酵液中残糖浓度和生物量 OD₆₀₀, 对样品进行处理后利用氨基酸分析仪检测 OSH 含量。

1.3 代谢组分析

1.3.1 代谢组测定样品制备

取 10 mL 24、48、72、96、120 h 的发酵

液，于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后，放置于冰浴中在超净工作台中弃上清并加入 8 mL 预冷的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 重悬菌体，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。得到的样品在液氮中快速冷冻，并置于干冰或 -80 °C 超低温冰箱，每个样本准备 6 个平行样品，制备的样品送至杭州联川生物技术股份有限公司进一步处理和测定代谢组数据。

1.3.2 色谱质谱采集条件

超高效液相色谱条件：色谱柱为 T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters, Milford)；柱温 35 °C，流速 0.4 mL/min，进样量 2 μL；流动相 A 相为水和 0.1% 甲酸，流动相 B 相为乙腈和 0.1% 甲酸；梯度洗脱条件设置如下：0–0.5 min, 5% B；0.5–7 min, 5% 至 100% B；7–8 min, 100% B；8–8.1 min, 100% 至 5% B；8.1–10 min, 5% B。

质谱条件：电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI) 温度 450 °C，质谱电压 5 500 V (positive)、-4 500 V (negative)，离子源气体 I (GSI) 40 psi，气体 II (GSII) 55 psi，气帘气 (curtain gas, CUR) 35 psi，碰撞诱导电离

(collision-activated dissociation, CAD) 参数设置为中。在三重四极杆 (Qtrap) 中，每个离子对根据优化的去簇电压 (declustering potential, DP) 和碰撞能 (collision energy, CE) 进行扫描检测。

1.3.3 代谢组学分析流程

通过液相色谱 - 质谱仪 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS) 可以对样品进行精确定性和定量。代谢组学分析由两方面组成：一是代谢组学实验，二是数据分析。其中代谢组学实验是设计实验、采集及处理样本、提取代谢物以及检测代谢物等部分组成。经实验部分获取的代谢数据则可以用于后面的数据分析，其主要涉及代谢物的差异筛选和代谢途径的解析。具体操作是对代谢物进行鉴定并对样本数据进行质控，选出一些有代谢差异的物质，从而对样本中代谢物的相关机理进行预测和分析，总体流程见图 1。

1.4 生理参数的确定

1.4.1 菌体浓度检测

将发酵罐中菌体浓度根据不同时期的发酵情况进行稀释，以超纯水为空白对照，测定发酵液的 OD_{600} 值 (测量值在 0.3–0.8 范围内)。

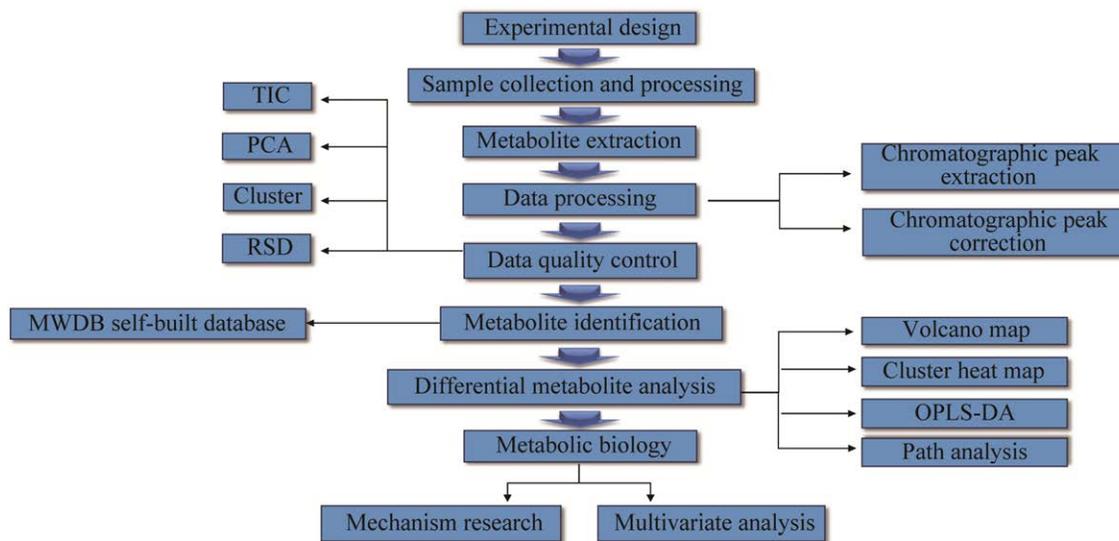


图 1 代谢组分析流程

Figure 1 The process of metabolome analysis. TIC: Total ion chromatogram; PCA: Principal components analysis; RSD: Relative standard deviation; OPLS-DA: Orthogonal partial least squares discriminant analysis.

1.4.2 葡萄糖浓度检测

将葡萄糖配制成浓度为 10 g/L 的母液, 加入超纯水梯度稀释成浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 g/L 的标准液, 测定吸光值 A, 制作葡萄糖标准曲线。

取 1 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取 100 μ L 稀释 10 倍后的上清液, 加入 200 μ L DNS 试剂, 对照组为 100 μ L 超纯水和 200 μ L DNS 试剂。水浴煮沸 3 min 后立即置于冰上冷却, 加入超纯水定容至 2 mL, 在波长 540 nm 处测定葡萄糖浓度, 每个样品测量 3 组平行。根据标准曲线测定发酵液中葡萄糖浓度。

1.4.3 OSH 检测

氨基酸分析仪(日立-LA8080)检测法: 配制 5 g/L 的 OSH 标准溶液稀释 100 倍后, 用滤膜(0.22 μ m)过滤至液相进样瓶中保存待检, 采用日立-LA8080 氨基酸分析仪进行分析, 得到标准品的出峰时间及峰面积。取发酵液样品, 于 12 000 r/min 离心 5 min 后获取上清液, 将上清根据浓度稀释 100–500 倍, 检测前处理方式参考标准品, 计算发酵液中 OSH 浓度。

色谱条件: 色谱柱为日立专用阳离子交换树脂色谱柱(4.6 mm ID \times 60 mm, 3 μ m); 进样量 20 μ L; 输液泵压力 3.4×10^4 Pa; 分离柱温度为 57 $^{\circ}$ C; 反应柱温度 135 $^{\circ}$ C; 泵 1 流速 0.40 mL/min; 泵 2 流速为 0.35 mL/min; 检测器波长为 570 nm 和 440 nm。

1.4.4 有机酸检测方法

有机酸标品制备: 取一定量的丙酮酸、 α -酮戊二酸、乙酸和乳酸分别配制成浓度为 5 g/L 的母液, 加入超纯水梯度稀释成浓度为 0.5、1、2.5、5 g/L 的标准液, 用 0.22 μ m 的水膜过滤至液相瓶中用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测, 制作各有机酸的标准曲线。

样品检测: 取制备好的发酵液样品进行

HPLC 检测。所用色谱柱为 Aminex[®] HPX-87H 色谱柱 (300 mm \times 7.8 mm, 0.25 μ m, Catalog #1250140), 流动相为 0.008 N H₂SO₄ 溶液, 柱温 60 $^{\circ}$ C, 流速 0.6 mL/min, 进样量 20 μ L, 时间 18 min, 在 210 nm 波长的紫外检测器中检测, 时间常数为 1.0 s。

2 结果与讨论

2.1 OSH 发酵过程中代谢物关联途径分析

利用高分辨率的质谱仪对发酵样品进行检测, 通过 XCMS 软件对检测物质进行监控。由 metaX 软件对经 XCMS 处理获得的物质的 *m/z* 与京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行比对, 得到一级代谢物的鉴定结果, 并利用 in-house 二级质谱库与代谢物质谱数据进行匹配, 代谢途径总分布气泡图如图 2 所示。

通过代谢途径总分布气泡图分析可知, OSH 发酵过程产生的代谢物总共涉及 35 条信号通路。代谢物富集较多的信号通路主要有中心代谢途径通路、次级代谢产物的生物合成通路、氨基酸的生物合成通路和 2-氧代羧酸代谢通路等。

2.2 OSH 发酵过程代谢物分析

利用 XCMS 软件获取不同样品中每个物质的信息强度, 并使用 metaX 软件进行质量检查。通过删除低质量峰(多于 50% 缺失的 QC 样本或多于 80% 缺失的实际样本的峰)、利用 K-最近邻 (K-nearest neighbors, KNN) 方法填充缺失值以及采用概率商归一化 (probabilistic quotient normalization, PQN) 和 QC 稳健的样条曲线批次校正 (QC-robust spline batch correction, QC-RSC) 进行归一化数据处理, 得到代谢物主要物质分析结果 (图 3A) 和代谢化合物热图 (图 3B)。

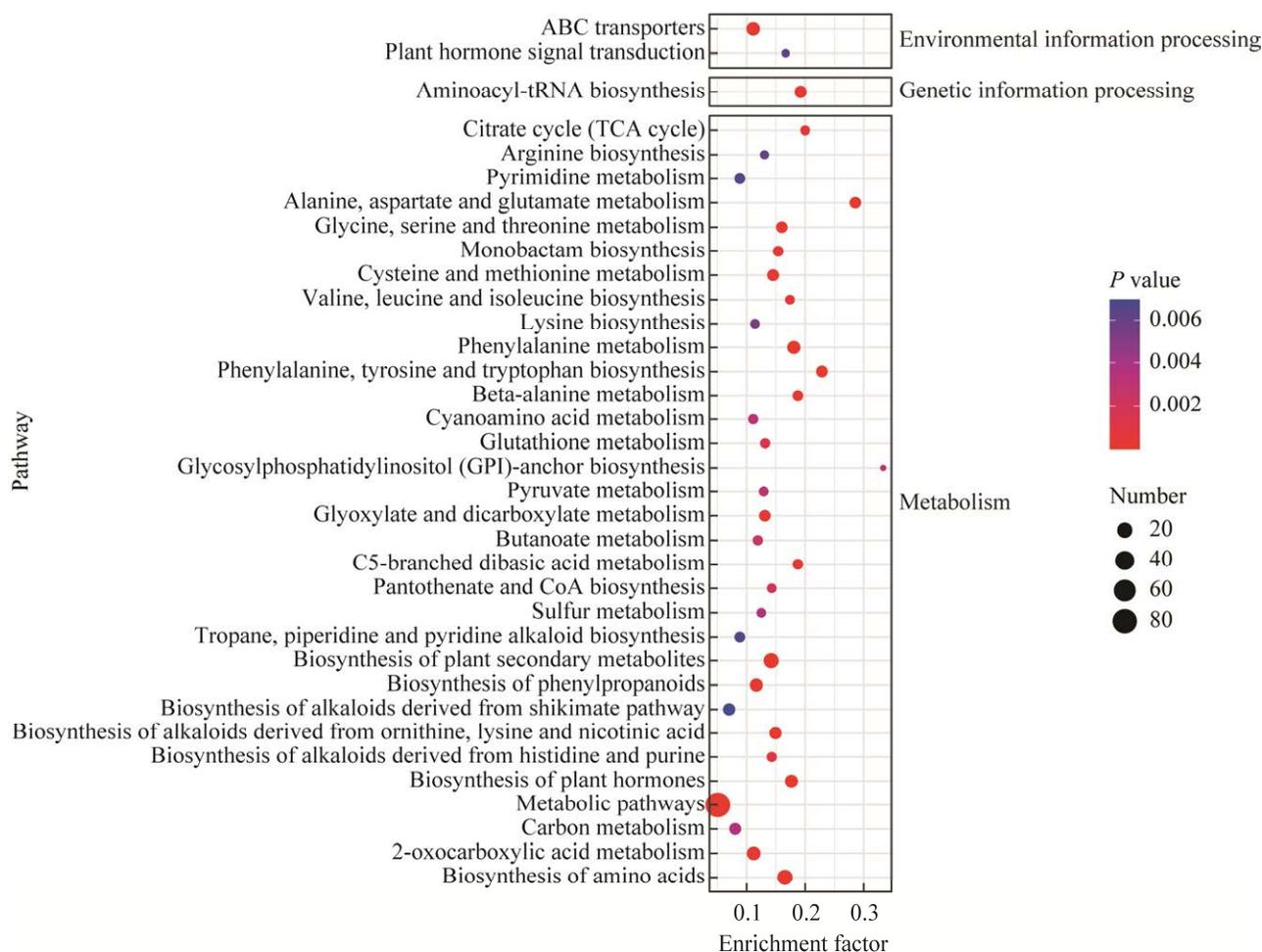


图 2 OSH 发酵过程代谢物参与信号通路总分布气泡图

Figure 2 Total bubble distribution of metabolites involved in signaling pathways during OSH fermentation.

结果显示, OSH 生产菌发酵过程中代谢物与发酵时间具有较高的相关性。随着发酵时间的延长, 发酵过程中各类代谢化合物的富集程度越来越高, 说明随着时间增加使得菌体通过代谢反应利用发酵液中底物的能力越来越强, 产生的代谢物种类越来越多, 含量越来越高。

按发酵时间将代谢物进行分类, 可大致分为 13 类: 生物碱及其衍生物、苯环类化合物、均质非金属化合物、碳氢化合物、木质素相关化合物、脂类和类脂分子、核苷酸和类似物、有机酸及其衍生物、有机氮化物、有机氧化

物、有机杂环化合物、有机硫化物、苯丙烷和聚酮类及未知类。

2.3 OSH 发酵过程差异代谢物分析

采用 BH 校正单变量分析差异倍数和 *t*-test 统计的检验结果, 进而得到 *q*-value, 结合多变量统计分析 PLS-DA 得到对投影很重要的变量 (variable important for the projection, VIP) 值, 筛选差异表达的代谢离子。差异代谢离子同时满足: (1) $\text{ratio} \geq 2$ 或 $\text{ratio} \leq 1/2$; (2) $Q \text{ value} < 0.05$; (3) $\text{VIP} \geq 1$, 得到如表 1 所示不同发酵时间相互比较的差异代谢离子统计表(注: 比较组 A/B, B 为对照)。

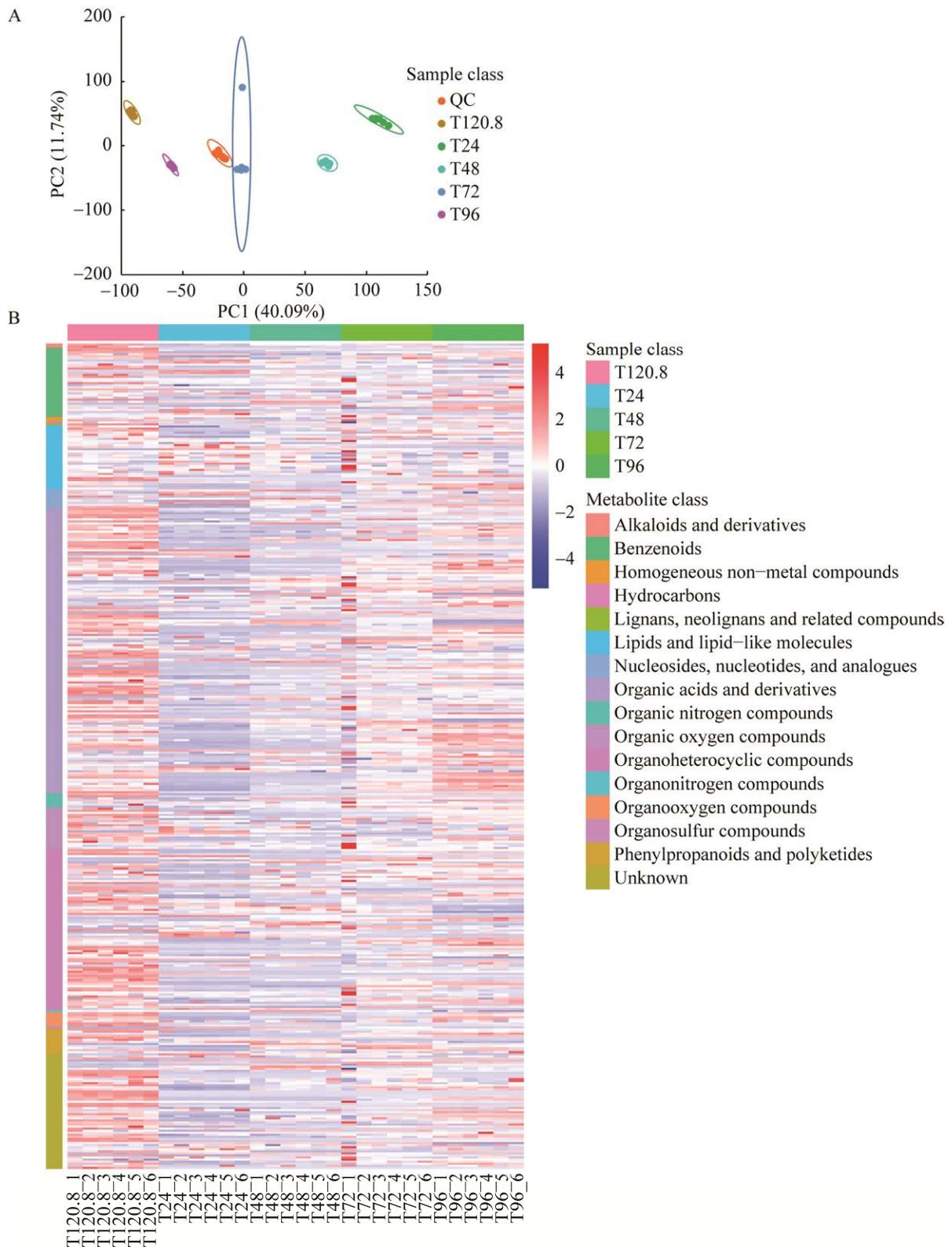


图 3 OSH 发酵过程代谢物分析

Figure 3 Metabolite analysis of OSH fermentation process. A: Principal component analysis of the OSH fermentation process (PCA graph). B: Heat map of differential metabolites during the OSH fermentation process.

表 1 OSH 发酵过程差异代谢物统计表

Table 1 Statistical table of differential metabolites in the OSH fermentation process.

Comparison	All	Up	Down
T48/T24	1 909	1 596	313
T72/T48	1 649	1 128	521
T96/T72	1 567	942	625
T120.8/T96	2 276	920	1 356

结果表明, OSH 生产菌发酵过程中共检测到 7 401 种差异代谢离子, 随着发酵时间的延长, 发酵液中处于上调状态差异代谢物的数量越来越少, 而代谢物种类却增多, 和图 3 代谢物热图显示结果相符合。

如表 2 所示差异物质在不同发酵液样品中的表达情况不尽相同, 为了明确每发酵 24 h 内差异显著代谢物参与的代谢途径, 将显著不同的代谢物与 KEGG 中收录的代谢通路进行对比并富集处理, 并用差异代谢物 KEGG 气泡图进行展示(图 4)。

由表 2 可以看出, 在发酵 24 h 与 48 h 的发酵液之间有 5 大类 19 种代谢物存在明显的差异。L-高丝氨酸、3-甲基-2-氧戊酸、天冬氨酸盐、N-乙酰-L-苯丙氨酸和 N-乙酰基-L-谷氨酸等有机酸及衍生物类和脂质类代谢物的含量在 48 h 显著高于 24 h。说明此时菌株已度过生长阶段, OSH 生产的相关前体物质开始积累^[10]; 在 48 h 与 72 h 的发酵液之间有 5 大类 10 种代谢物存在显著差异, 其中 N-乙酰基-L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、黄嘌呤和 N-乙酰基-L-天冬氨酸等有机酸及衍生物含量在 72 h 高于 48 h, 且有机氧化物类、脂质和类脂质分子类和苯甲酸类的显著代谢差异物的含量也升高, 说明这几类差异代谢物所在代谢途径的代谢活动增强^[16], OSH 生产相关物质进一步积累^[17]; 在 72 h 与 96 h 的发酵液之间有 4 大类 8 种代谢物存在显著

差异, 正酪氨酸、L-苯丙氨酸、2-酮基-3-脱氧-D-葡萄糖酸等的含量在发酵 96 h 显著高于 72 h, 差异代谢物的种类及数量较上一个比较组差异不大, 说明此时 OSH 生产菌进入发酵稳定期, 发酵液中差异物成分组成变化不大; 在 96 h 与 120 h 的发酵液之间有 5 大类 15 种代谢物存在显著差异, 96 h 后, 代谢物的含量和类型均有明显增加, 说明进入发酵后期有较多的代谢产物在该阶段累积。

由图 4 可以看出 OSH 生产菌在发酵 24 h 和 48 h 的显著差异代谢物主要富集在氨酰-tRNA 生物合成、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、单内酰胺生物合成和精氨酸生物合成等代谢途径中; 48 h 与 72 h 的代谢物差异主要体现在氨酰-tRNA 生物合成、嘧啶和吡啶生物碱生物合成、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成和苯并酮生物合成等代谢途径中; 72 h 与 96 h 的显著差异代谢物主要参与氨酰-tRNA 生物合成、苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成、嘧啶和吡啶生物碱生物合成、ABC 转运蛋白和硫代葡萄糖苷生物合成等; 而在发酵 96 h 和 120 h 的显著差异代谢物主要由氨酰-tRNA 生物合成、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、ABC 转运蛋白、单内酰胺生物合成和苯丙氨酸代谢等代谢途径产生, 这也与上面检测到的显著差异代谢物相符合。

2.4 OSH 发酵过程关键代谢物通路分析

将筛选得到的 OSH 发酵过程中的显著差异化合物映射到 KEGG 数据库中, 获得各差异代谢物参与的主要中心代谢合成途径, 并根据代谢物随发酵时间发生的相应的含量变化, 绘制 OSH 生产菌在不同发酵时间内中心代谢途径中关键代谢产物含量变化的代谢组学分析图(图 5)。

表 2 OSH 发酵不同时间组间的显著差异代谢物

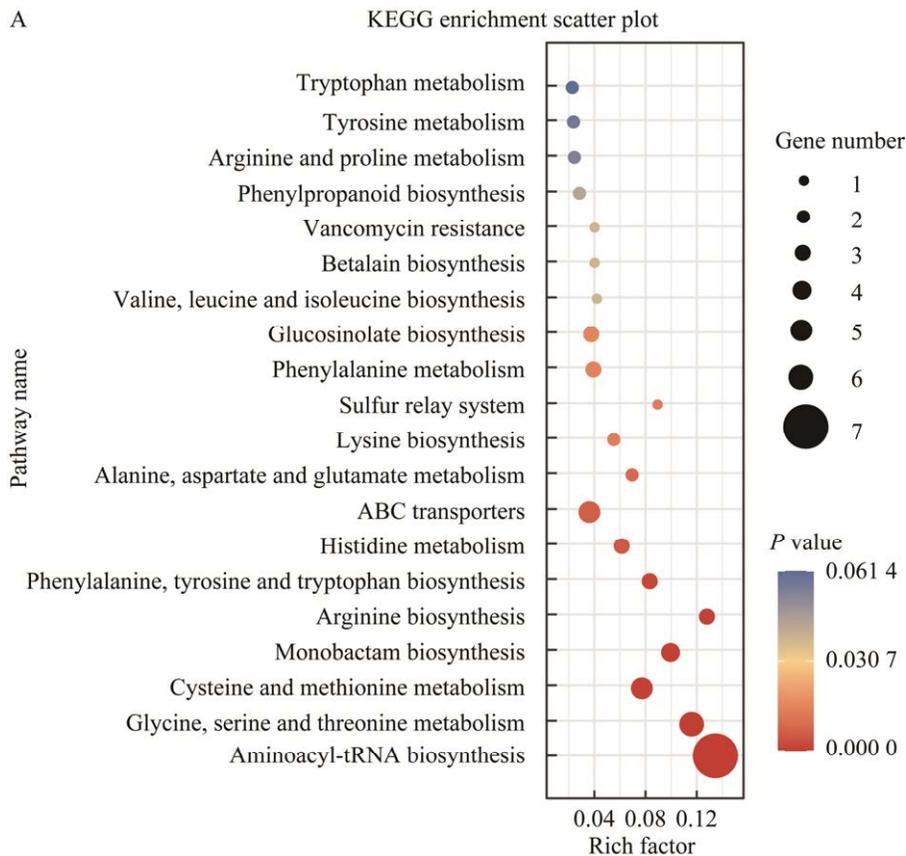
Table 2 Significantly different metabolites between different groups of the OSH fermentation

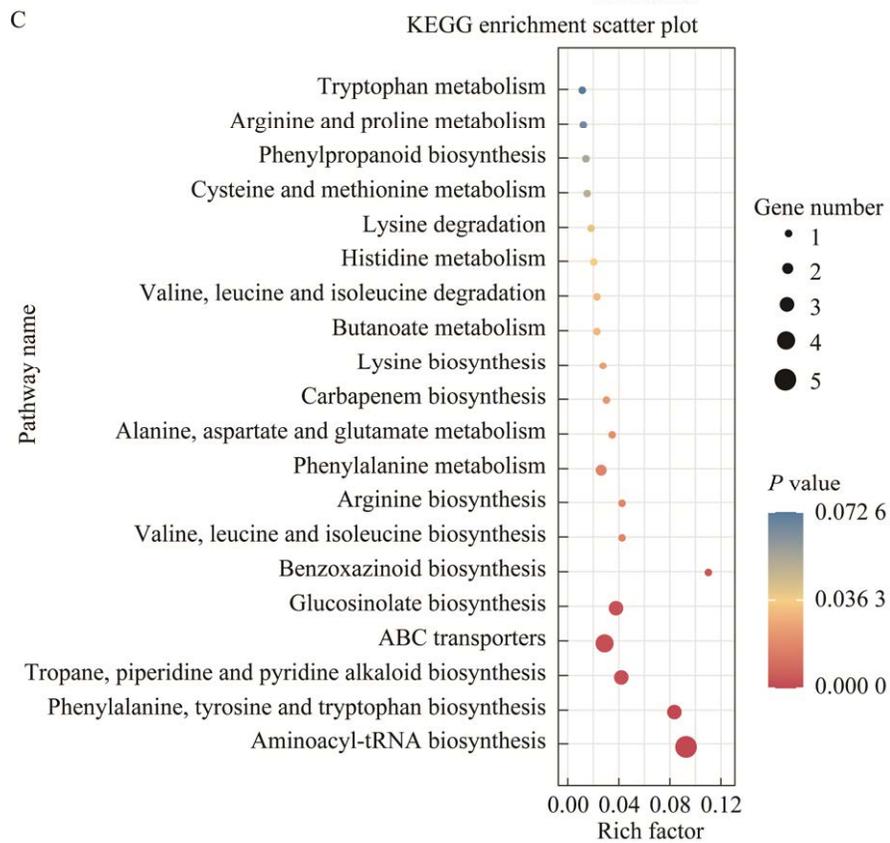
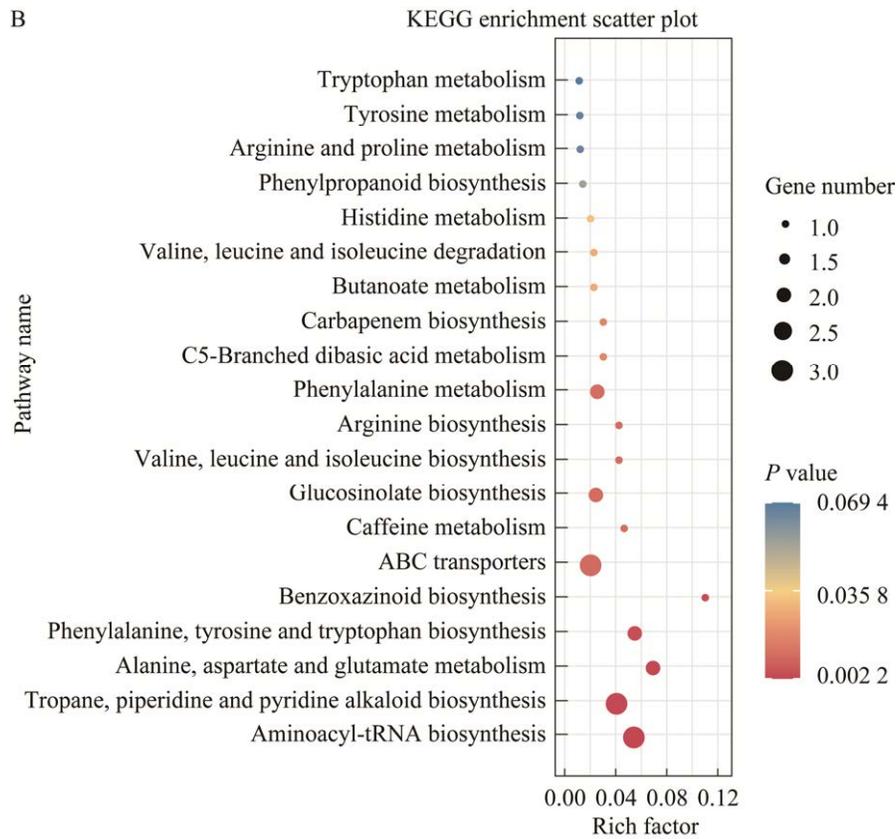
Comparison groups	Metabolite classification	Metabolite	VIP value	Ratio	P value	Variation trend	
Between 24 h and 48 h	Organic acids and derivatives	Acetic anhydride	1.235	0.455	0.002	Down	
		L-homoserine	2.004	4.204	0.002	Up	
		3-methyl-2-oxopentanoic acid	2.234	6.625	0.002	Up	
		Aspartate	2.733	13.879	0.002	Up	
		3-hydroxyoctanoic acid	1.133	2.198	0.002	Up	
		Hydroxydodecanoic acid	1.986	0.153	0.002	Up	
		N-acetyl-L-phenylalanine	1.052	2.002	0.002	Up	
		DL-dopa	1.535	3.710	0.002	Up	
		N-acetyl-L-glutamate	2.172	4.550	0.002	Up	
		Organic heterocyclic compounds	Xanthine	1.200	0.436	0.002	Down
	Orotate		1.584	2.630	0.002	Up	
	L-gulonolactone		1.173	2.408	0.002	Up	
	3-hydroxyadipic acid-3,6-lactone		3.317	0.096	0.002	Down	
	Organic oxygen compounds	D-tagatose	1.493	0.408	0.002	Down	
		Lipids and lipid-like molecules	2,3-dihydroxyvaleric acid	1.099	2.550	0.002	Up
	Methylglutaric acid		1.535	2.372	0.002	Up	
	2-hydroxyadipic acid		1.294	2.477	0.002	Up	
	Benzoic acids	Indan-1-ol	1.000	2.070	0.002	Up	
		Phenyl acetate	2.049	0.353	0.002	Down	
	Between 48 h and 72 h	Organic acids and derivatives	3-hydroxyoctanoic acid	1.952	0.248	0.002	Down
Hydroxydodecanoic acid			1.674	0.197	0.002	Down	
L-phenylalanine			1.412	4.391	0.002	Up	
N-acetyl-L-aspartate			1.768	2.546	0.002	Up	
N-acetyl-L-glutamate			1.157	2.271	0.002	Up	
Organic heterocyclic compounds		Xanthine	2.398	5.574	0.002	Up	
		6-deoxyinosine 6-deoxyfagomine	1.486	3.557	0.002	Up	
Organic oxygen compounds		2,3,4,5-tetrahydroxypentanoic acid	1.853	3.948	0.002	Up	
		Lipids and lipid-like molecules	2,3-dihydroxyvaleric acid	1.659	4.847	0.002	Up
Benzoic acids			Phenylacetic	2.147	9.454	0.002	Up
			Indan-1-ol	1.007	2.125	0.002	Up
Between 72 h and 96 h		Organic acids and derivatives	3-hydroxyoctanoic acid	1.839	0.284	0.002	Down
	Positive tyrosine		2.509	4.631	0.002	Up	
	L-phenylalanine		1.862	4.141	0.002	Up	
	2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid		1.139	3.355	0.002	Up	
	Organic heterocyclic compounds	Mukonal	1.240	2.266	0.002	Up	
		Benzoic acids	Phenylacetic	1.316	3.553	0.002	Up
	Catechol		1.166	0.336	0.008	Down	
	Others	<i>O</i> -acetylsalicylhydroxamic acid	1.743	3.907	0.002	Up	

(待续)

(续表 2)

Comparison groups	Metabolite classification	Metabolite	VIP value	Ratio	P value	Variation trend
Between 96 h and 120 h	Organic acids and derivatives	3-hydroxyoctanoic acid	2.047	4.652	0.002	Up
		(R)-3-hydroxybutyric acid	1.532	2.811	0.002	Up
		3-methyl-2-oxopentanoic acid	1.965	5.234	0.002	Up
		Acetic anhydride	1.794	3.434	0.002	Up
		Aspartate	1.204	3.373	0.002	Up
		N-acetyl-L-glutamate	1.126	2.204	0.002	Up
		N-acetyl-L-methionine	2.311	5.974	0.002	Up
	Organic heterocyclic compounds	Hydroxydodecanoic acid	2.933	19.266	0.002	Up
		5-ethyl-5-methyl-2,4-oxazolinedione	2.082	3.610	0.002	Up
		3-hydroxyadipic acid-3,6-lactone	1.114	2.438	0.002	Up
	Benzoic acids	Xanthine	2.367	0.170	0.002	Up
		Phenylacetic	1.019	3.024	0.002	Up
	Lipids and lipid-like molecules	Catechol	2.078	4.887	0.002	Down
		(+)-2-hydroxyisocaproic acid	1.628	2.762	0.002	Up
	Organic oxygen compounds	D-tagatose	1.611	2.876	0.002	Up





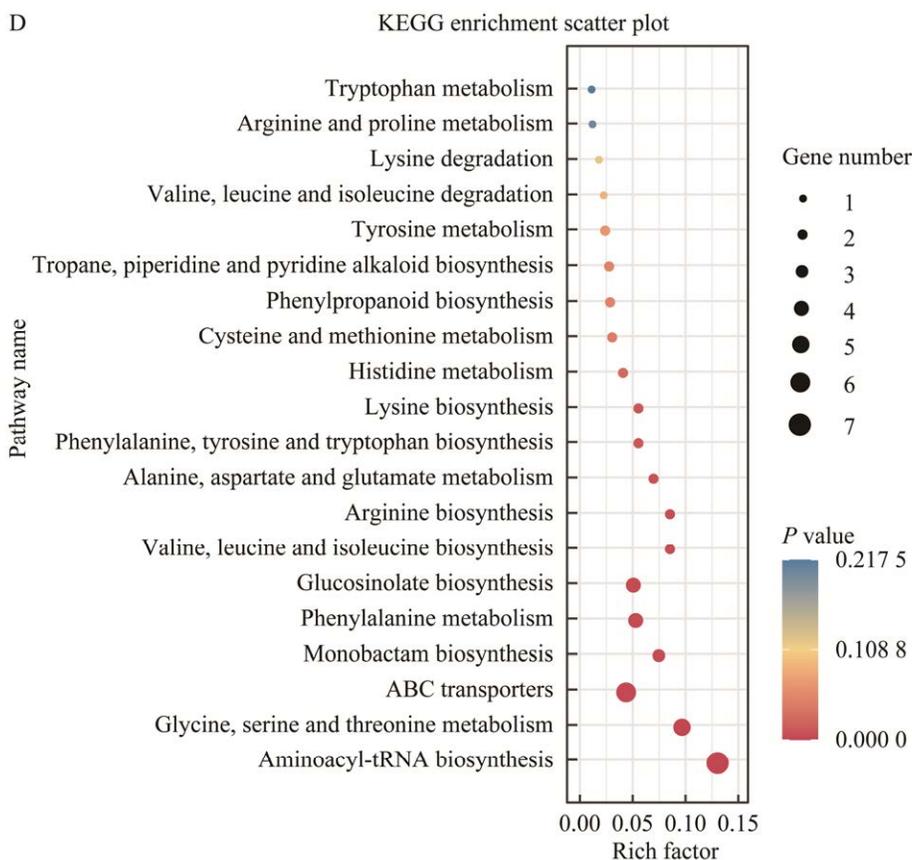


图 4 OSH 发酵不同时间的差异代谢物比较 KEGG 气泡图

Figure 4 KEGG bubble diagram of differential metabolites in different comparison groups of OSH fermentation. A: 24 h and 48 h. B: 48 h and 72 h. C: 72 h and 96 h. D: 96 h and 120 h.

根据 KEGG 分类和富集分析表明, 代谢产物的差异主要与次生代谢物的生物合成、微生物在不同环境中的代谢、辅因子的生物合成等有关。由图 5 可以看出, 糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)循环和各类氨基酸的合成代谢途径等都对 OSH 生产菌的生长代谢起关键调控作用。通过对生产菌的代谢途径进行分析, 发现丝氨酸的代谢途径很活跃, 会竞争中心碳代谢流向丙酮酸的通量, 这可能导致丙酮酸代谢产生乙酰 CoA 的量减少, 从而影响 OSH 及其前体物的生成; 草酰乙酰的含量从发酵 48 h 后一直处于较低水平, 而草酰乙酸作为合成天冬氨酸族氨基酸的前体, 与 OSH 的合成密切相关; 在发酵

24–96 h 阶段, 天冬氨酸的含量都较低, 而赖氨酸在 24–48 h 的含量较高, 说明此阶段赖氨酸代谢水平及合成速率明显高于高丝氨酸, 使天冬氨酸更多地用于合成赖氨酸。其中, 丙酮酸、草酰乙酸和天冬氨酸也是 OSH 合成途径中的共同差异代谢物, 这些共同差异代谢物被认为是关键的代谢物。所以需要在合适的时间对这 3 种物质进行外源添加以满足菌体的需求。

2.5 外源添加关键代谢物对 OSH 发酵的影响

通过对 OSH 生产菌在发酵过程中主通路上代谢物的含量变化的分析, 筛选到外源添加可能提高产量的中间代谢物分别为丙酮酸、草酰乙酸和天冬氨酸。将这些中间代谢物用于外源添加验证其对 OSH 产量的影响。

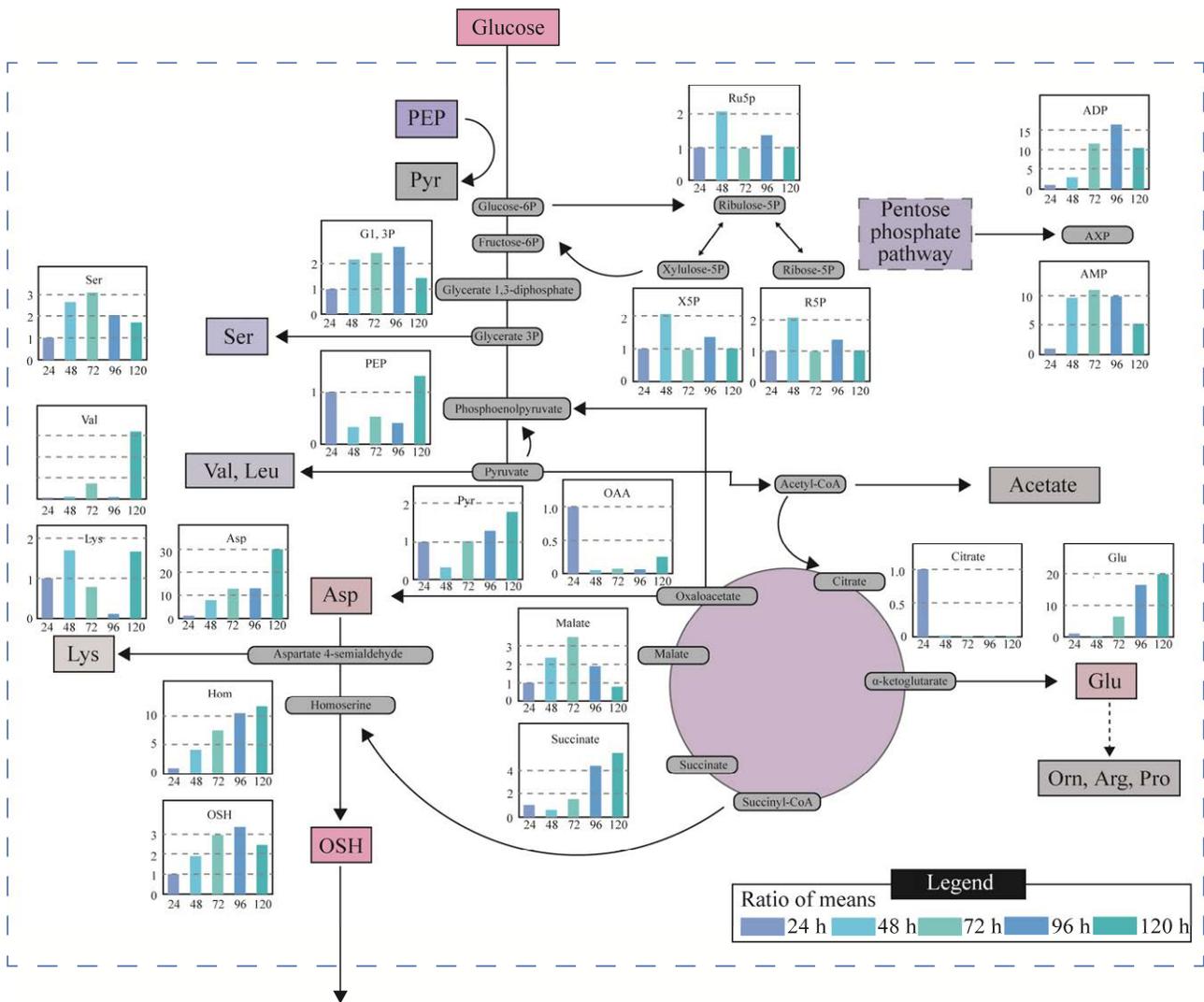


图5 OSH生产菌中心代谢途径的代谢组学分析

Figure 5 Metabolomic analysis of metabolic pathways at the center of OSH cell factories.

结果显示,除了60 h外,在不同发酵时间添加适量的丙酮酸对 OSH 生产菌的生物量和 OSH 产量都有促进作用。在36 h添加1.0 g/L 丙酮酸,此时生物量和 OSH 产量都达到最大值,生物量 OD_{600} 为13.8,比没有添加丙酮酸时提高50.4% (图6A), OSH 产量从原来的9.7 g/L 提高到13.5 g/L,但随着丙酮酸添加浓度的增加,对生物量和 OSH 的合成都有着负面影响(图6B)。

随着发酵过程的进行,葡萄糖不断消耗,限制了菌体的生长和产物的生成。适量补充丙酮酸后,提高了草酰乙酸和琥珀酰 CoA 的积累,增加了 OSH 合成途径上的物质流。但在发酵后期随着丙酮酸添加浓度的增加,过量的丙酮酸会导致乙酰 CoA 的代谢溢出向着乙酸合成途径,产生较多的有机酸副产物,改变了体系的 pH 影响了菌体的生长以及引起 OSH 产量下降。

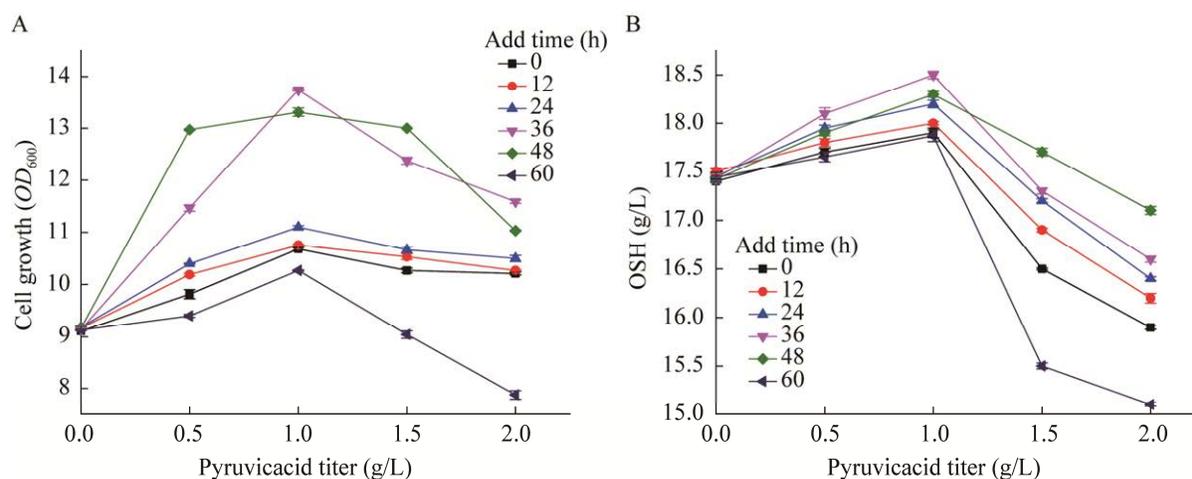


图 6 外源添加丙酮酸对 OSH 生产菌生物量(A)和 OSH 产量(B)的影响

Figure 6 Effect of exogenous addition of pyruvic acid on biomass (A) and OSH titer (B) of the producing strain. Data are shown as the mean of three replicates, with error bars representing the standard error of the mean might.

此外，发酵初期(12 h 和 24 h)加入草酰乙酸对 OSH 生产菌的生物量(图 7A)和 OSH 产量(图 7B)都起到促进作用。其中，在发酵 12 h 添加 1.5 g/L 的草酰乙酸时，OSH 产量达到最高为 14.3 g/L；但在发酵中后期(36、48 和 60 h)加入草酰乙酸对菌体生长和 OSH 产量并无明

显促进作用。说明在发酵初期添加适量的草酰乙酸有利于菌体生长；而在中后期菌体生长达到稳定状态，添加过量的草酰乙酸反而会增加丙酮酸脱羧支路的流量，导致代谢流朝其他副产物合成的方向进行，改变了体系的 pH，进而引起 OSH 产量下降。

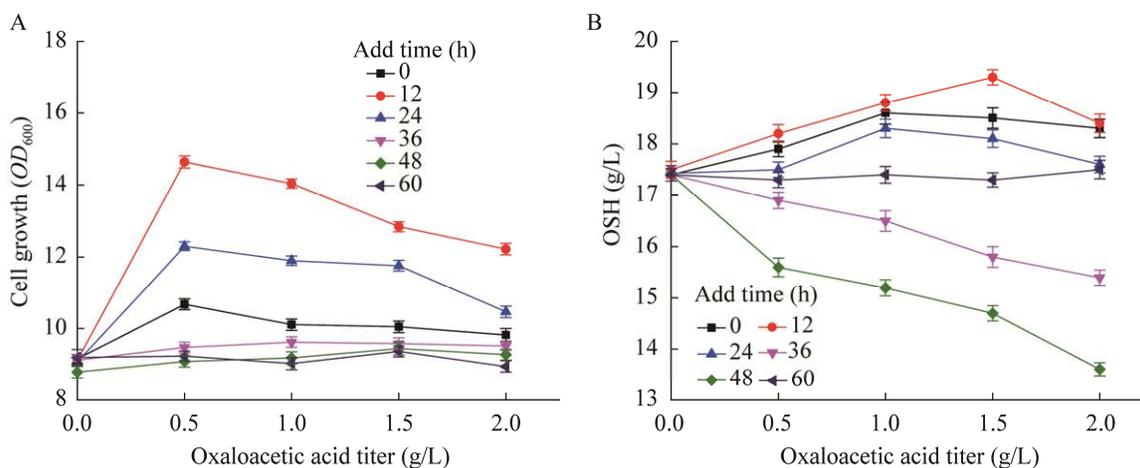


图 7 外源添加草酰乙酸对 OSH 生产菌生物量(A)和 OSH 产量(B)的影响

Figure 7 Effect of exogenous addition of oxaloacetic acid on biomass (A) and OSH titer (B) of the producing strain. Data are shown as the mean of three replicates, with error bars representing the standard error of the mean might.

在发酵不同时间添加适量的天冬氨酸对 OSH 生产菌的生长起到促进作用(图 8A), 但对于 OSH 产量来说, 在 0–24 h 阶段, 随着天冬氨酸添加浓度的增加 OSH 产量也增加, 且在 12 h 添加 2.0 g/L 的天冬氨酸时, OSH 产量达到最高为 13.4 g/L; 而在 36–60 h 阶段添加量超过 1.5 g/L 时, OSH 产量明显降低(图 8B)。说明当外源添加的天冬氨酸过量时, 可能会激发某些代谢途径产生反馈调节, 影响菌体生长和 OSH 合成, 且发酵后期菌龄过老, 添加物的作用时间短, 可能

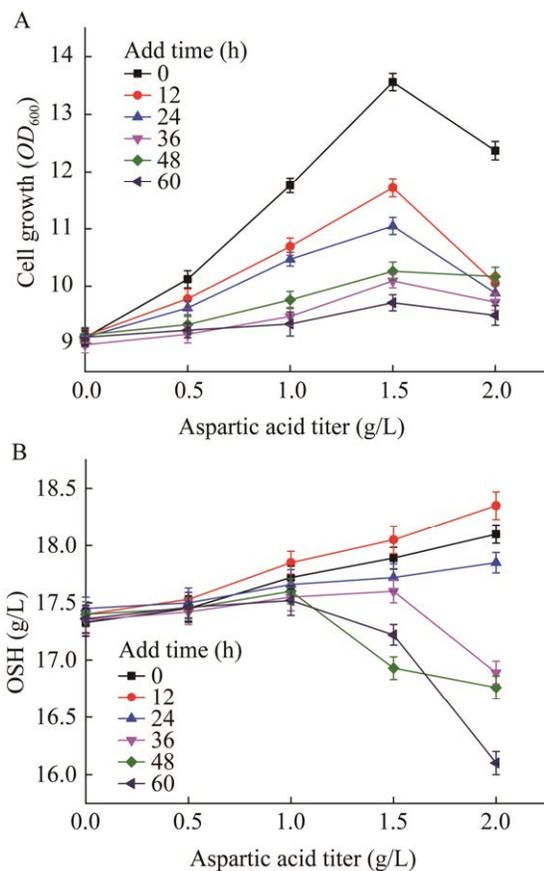


图 8 外源添加天冬氨酸对 OSH 生产菌生物量(A)和 OSH 产量(B)的影响

Figure 8 Effect of exogenous addition of aspartic acid on biomass (A) and OSH titer (B) of the producing strain. Data are shown as the mean of three replicates, with error bars representing the standard error of the mean might.

是引起 OSH 产量下降的原因之一。但适量添加天冬氨酸则能增加 OSH 前体高丝氨酸的合成量, 进而提高 OSH 的产量(图 8)。

2.6 组合优化 OSH 发酵培养体系

通过关键代谢物添加的组合优化, 最后确定在发酵 12 h 分别加入 1.5 g/L 的草酰乙酸和 2.0 g/L 的天冬氨酸, 发酵 36 h 加入 1.0 g/L 的丙酮酸。在此条件下, OSH 的产量从原来的 9.7 g/L 增加到 16.7 g/L, 细胞生物量(OD_{600})从 9.2 增加到 13.1, 分别比原来提升了 72.2%和 43.9%, 说明该优化添加策略有利于 OSH 生产菌菌体生长和产酸, 能较好地满足其生长代谢需求(图 9)。

2.7 优化前后 5 L 发酵罐发酵结果对比

基于代谢组学分析建立了 5 L 发酵罐中 OSH 的发酵优化, 结果见图 10。通过关键代谢物的添加, 可提高对数期菌体生长的速率, 在 12 h 添加终浓度为 1.5 g/L 的草酰乙酸和 2.0 g/L 的天冬氨酸, 36 h 添加终浓度为 1.0 g/L 的丙酮酸, 可以看到菌体的生长以及 OSH 产量得到了显著提高。在 90 h 生物量达到最高, OD_{600} 为 48.8

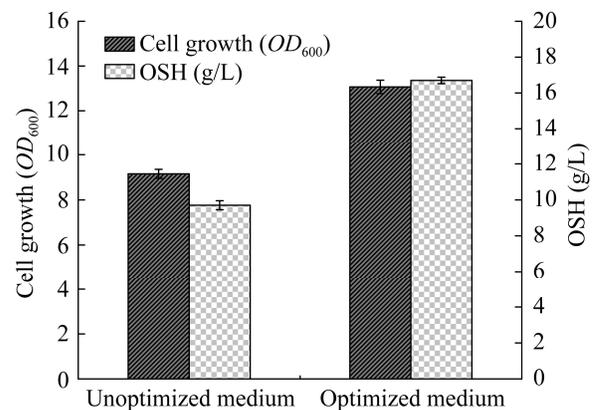


图 9 OSH 生产菌在不同培养条件下的生物量及产量
Figure 9 Comparison of cell growth and acid production of OSH producing bacteria in different media. Data are shown as the mean of three replicates, with error bars representing the standard error of the mean might.

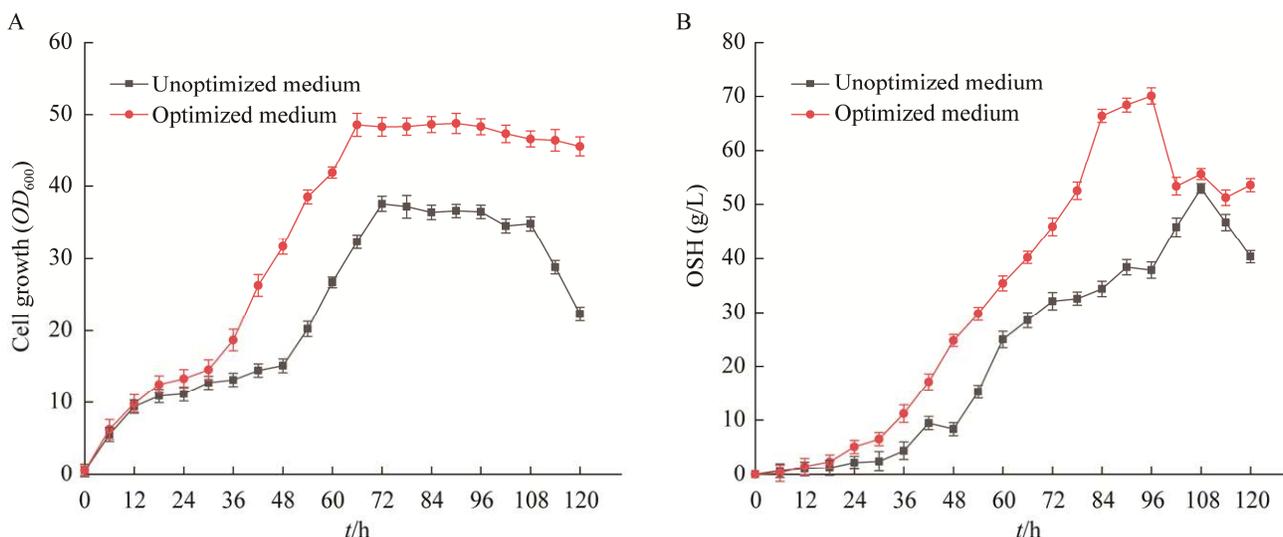


图 10 5 L 发酵罐中 OSH 生产菌优化前后的生物量(A)和 OSH 产量(B)

Figure 10 Biomass (A) and OSH titer (B) producing strain optimized before and after in 5 L bioreactor. Data are shown as the mean of three replicates, with error bars representing the standard error of the mean might.

(图 10A), OSH 产量达到 70.1 g/L, 糖酸转化率为 0.52 g/g 葡萄糖(图 10B)。与未优化前相比较, 生物量提高了 33.2%, OSH 产量提高了 32.5%, 糖酸转化率提高了 30.0%, 为 OSH 的产业化奠定了重要基础。

3 结论

通过对 OSH 生产菌发酵过程的代谢组学分析, 比较分析了发酵各阶段产生的代谢差异物及参与的主要的代谢途径, 揭示了对 OSH 生物合成具有重要作用的关键代谢物, 建立了基于代谢组学分析的发醇调控策略, 通过在不同阶段外源添加不同浓度草酰乙酸、天冬氨酸和丙酮酸, 平衡细胞生长与生产, 减少竞争性途径对 OSH 合成前体的利用, 显著提高了 OSH 产量, 为推进 OSH 规模化生产奠定了基础。

参考文献

[1] HONG KK, KIM JH, YOON JH, PARK HM, CHOI SJ, SONG GH, LEE JC, YANG YL, SHIN HK, KIM JN, CHO KH, LEE JH. *O*-succinyl-L-homoserine-based

C4-chemical production: succinic acid, homoserine lactone, γ -butyrolactone, γ -butyrolactone derivatives, and 1,4-butanediol[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2014, 41(10): 1517-1524.

- [2] HUANG JF, ZHANG B, SHEN ZY, LIU ZQ, ZHENG YG. Metabolic engineering of *E. coli* for the production of *O*-succinyl-L-homoserine with high yield[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(7): 1-9.
- [3] KASE H, NAKAYAMA K, KINOSHITA S. Production of *O*-succinyl-L-homoserine by auxotrophic mutants of *Aerobacter aerogenes*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1970, 34(2): 274-281.
- [4] TANG XL, LI N, LIU YL, LI JP, ZHAO KX, LIU ZQ, ZHENG YG. Engineering *O*-succinyl-L-homoserine mercaptotransferase for efficient L-methionine biosynthesis by fermentation-enzymatic coupling route[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2023, 365(7): 1048-1057.
- [5] FLAVIN M. [195b] Preparation of *O*-Succinyl-L-homoserine[M]. *Metabolism of Amino Acids and Amines Part B*. Amsterdam: Elsevier, 1971: 418-422.
- [6] AJIKUMAR PK, XIAO WH, TYO KEJ, WANG Y, SIMEON F, LEONARD E, MUCHA O, PHON TH, PFEIFER B, STEPHANOPOULOS G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.

- [7] NIELSEN J, KEASLING JD. Engineering cellular metabolism[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1185-1197.
- [8] CHOI S, SONG CW, SHIN JH, LEE SY. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 223-239.
- [9] KIM SY, CHOI KM, SHIN YU, UM HW, CHOI KO, CHANG JS, CHO YW, PARK YH. Microorganism producing L-methionine precursor and method of producing L-methionine and organic acid from the L-methionine precursor[P]. United States Patent: US9029105B2.2015.
- [10] ZHU WY, NIU K, LIU P, FAN YH, LIU ZQ, ZHENG YG. Enhanced *O*-succinyl-L-homoserine production by recombinant *Escherichia coli* Δ IJBB*TrcmetL/pTrc-metAfbr-Trc-thrAfbr-yjeH via multilevel fermentation optimization[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 130(6): 1960-1971.
- [11] HIMMELREICH U, MALIK R, KÜHN T, DANIEL HM, SOMORJAI RL, DOLENKO B, SORRELL TC. Rapid etiological classification of meningitis by NMR spectroscopy based on metabolite profiles and host response[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5328.
- [12] ZHAO SM, HUANG D, QI HS, WEN JP, JIA XQ. Comparative metabolic profiling-based improvement of rapamycin production by *Streptomyces hygroscopicus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(12): 5329-5341.
- [13] DING MZ, CHENG JS, XIAO WH, QIAO B, YUAN YJ. Comparative metabolomic analysis on industrial continuous and batch ethanol fermentation processes by GC-TOF-MS[J]. *Metabolomics*, 2009, 5(2): 229-238.
- [14] DING MZ, ZHOU X, YUAN YJ. Metabolome profiling reveals adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* during repeated vacuum fermentations[J]. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 42-55.
- [15] DING MZ, WANG X, YANG Y, YUAN YJ. Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation[J]. *Metabolomics*, 2012, 8(2): 232-243.
- [16] HUANG JF, SHEN ZY, MAO QL, ZHANG XM, ZHANG B, WU JS, LIU ZQ, ZHENG YG. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranch and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of L-methionine biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2577-2589.
- [17] LIU P, ZHANG B, YAO ZH, LIU ZQ, ZHENG YG. Multiplex design of the metabolic network for production of L-homoserine in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(20): e01477-e01420.