DOI:10.12441/spyswjs.20230706004 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0021-10

米曲霉 FMME-S-38 基因组规模代谢网络模型重构与解析

高 聪[1] 袁炜佳[1] 叶 超[2] 刘 佳[1] 刘立明[1*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 南京师范大学食品与制药工程学院,江苏 南京 210023)

摘要:【目的】构建并解析 *L*-苹果酸高产菌株米曲霉(*Aspergillus oryzae*, *A. oryzae*)FMME-S-38 的基因组规模代谢网络模型(GSMM)。**【方法】**通过粗模型构建和模型精细优化 2 个步骤,构建 *L*-苹果酸高产菌株米曲霉 FMME-S-38 的 GSMM,命名为 *i*JW1333。**【结果】**该模型系统整合了 1 723 个生化反应、1 723 个代谢物以及 1 333 个功能基因,对底物代谢和菌体生长模拟的预测准确度分别为 94.6% 和 92.0%。通过比较基因组,发现还原磷酸戊糖途径(HMP)和氧化磷酸化基因突变是导致米曲霉 FMME-S-38 高产 *L*-苹果酸的生理原因。氮源与辅因子(NADH 和 ATP)是影响 *L*-苹果酸高效合成的关键因素,通过降低氮源质量浓度和溶氧(DO)水平,能弱化 HMP 并强化还原性三羧酸循环(rTCA)分支,使米曲霉 FMME-S-38 发酵生产 *L*-苹果酸的产量达到(154.2±1.8) g/L。**【结论】**该研究有利于确定米曲霉 FMME-S-38 高产 *L*-苹果酸关键路径和生理机制,为利用其生产其他有价值代谢产物奠定基础。

关键词:米曲霉 FMME-S-38;基因组规模代谢网络模型;*L*-苹果酸;流量平衡分析

Reconstruction and Analysis of Genome-scale Metabolic Model of *Aspergillus oryzae* FMME-S-38

GAO Cong[1] *YUAN Weijia*[1] *YE Chao*[2] *LIU Jia*[1] *LIU Liming*[1*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: [**Objective**] A genome-scale metabolic model (GSMM) of the high *L*-malic acid-producing strain *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) FMME-S-38 was constructed and analyzed. [**Method**] The new GSMM *i*JW1333 was established for *A. oryzae* FMME-S-38 through a two-step process of draft reconstruction and model refinement. [**Result**] The model integrated 1 723 biochemical reactions, 1 723 metabolites, and 1 333 functional genes, achieving the prediction accuracy of 94.6% for substrate metabolism and 92.0% for cell growth. Comparative genomic analysis revealed that mutations in the genes involved in the hexose monophosphate pathway (HMP) and oxidative phosphorylation underpinned the enhanced *L*-malic acid production of *A. oryzae* FMME-S-38. Nitrogen source and cofactors (NADH and ATP) were identified as key determinants of efficient *L*-malic acid biosynthesis. Reducing the mass concentration of nitrogen source and the level of dissolved oxygen (DO) attenuated HMP while strengthening the reductive tricarboxylic acid (rTCA) branch, enabling *A. oryzae* FMME-S-38 to achieve an *L*-malic acid titer of (154.2±1.8) g/L. [**Conclusion**] This study clarifies the critical pathways and physiological mechanisms responsible for high *L*-malic acid production, providing a solid

基金项目:江苏省科技重大专项项目(BG2025045);国家自然科学基金面上项目(21978113);国家自然科学基金重点项目(22038005)。

通信作者:刘立明(1976—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物制造工程研究。E-mail:mingll@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-07-06 **修回日期:**2023-09-15

foundation for employing *A. oryzae* FMME-S-38 in the biosynthesis of other valuable metabolites.
Keywords: *Aspergillus oryzae* FMME-S-38; genome-scale metabolic model; *L*-malic acid; flux balance analysis

L-苹果酸作为一种关键的食品酸味剂和化工原料，在多个工业领域具有重要应用价值[1]。微生物发酵法生产*L*-苹果酸的菌种资源丰富，包括细菌[2]、酵母菌[3]和丝状真菌[4]等多种微生物。其中，米曲霉凭借其高产特性及广泛的底物适应性，已成为工业化生产*L*-苹果酸的优势菌种。当前针对米曲霉生产*L*-苹果酸的研究主要集中在优良菌种选育、代谢途径改造和菌体形态调控这3个方向。例如，作者所在课题组在前期的研究中，借助^{60}Co-γ和常压室温等离子体（ARTP）复合诱变技术，筛选获得一株高产*L*-苹果酸的米曲霉突变菌株，其产量较诱变前的出发菌株提高了1.6倍[5]。随后通过发酵工艺优化（包括氮源选择、中和剂调控和通气条件改进等），使产量提升至109.9 g/L[6]，并通过调节发酵参数和改变菌株的细胞分裂蛋白表达水平等策略，调控米曲霉的菌球和菌丝体形态，使*L*-苹果酸产量提升至142.5 g/L[7]。

在前期的研究中，作者所在实验室以米曲霉NRRL3488为出发菌株，通过^{60}Co-γ和ARTP复合诱变筛选得到米曲霉FMME-S-38，并对其进行发酵优化，发酵144 h的*L*-苹果酸产量达130.0 g/L。然而，目前尚不清楚该米曲霉突变菌株高效生产*L*-苹果酸的具体机制。同时，现有米曲霉GSMM *i*WV1314的氨基酸代谢系统并不完整，这不利于菌株生长模拟。因此，在获得米曲霉FMME-S-38和出发菌株NRRL3488全基因组序列的基础上，构建米曲霉FMME-S-38的GSMM，有利于确定*L*-苹果酸高产关键路径和生理机制，并可为利用米曲霉FMME-S-38生产其他有价值代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

诱变之前的菌株为米曲霉NRRL3488，该菌株在中国典型培养物保藏中心（CCTCC）保存，编号为M2016401。高产*L*-苹果酸突变菌株为米曲霉FMME-S-38，该菌株在CCTCC保存编号为M2020294。

1.2 培养基

种子培养基：3 g/L酵母粉、60 g/L葡萄糖、980 mg/L $K_2HPO_4·3H_2O$、750 mg/L KH_2PO_4、100 mg/L $MgSO_4·7H_2O$、75 mg/L $CaCl_2$。

摇瓶发酵培养基：3 g/L胰蛋白胨、80 g/L葡萄糖、30 g/L $CaCO_3$、600 mg/L KH_2PO_4、100 mg/L $MgSO_4·7H_2O$、600 mg/L $K_2HPO_4·3H_2O$、8 mg/L $MnSO_4$、75 mg/L $CaCl_2$、1 mL/L微量元素溶液。

7.5 L发酵罐培养基：胰蛋白胨或硫酸铵（不同试验所需质量浓度不同）、130 g/L葡萄糖、60 g/L $CaCO_3$、600 mg/L KH_2PO_4、600 mg/L $K_2HPO_4·3H_2O$、100 mg/L $MgSO_4·7H_2O$、75 mg/L $CaCl_2$、8 mg/L $MnSO_4$、1 mL/L微量元素溶液。

微量元素溶液：5 g/L $ZnSO_4$、5 g/L NaCl、5 g/L $FeSO_4·7H_2O$。

1.3 培养条件

1）种子培养条件：将菌株接种于产孢板和筛选板，于35 ℃培养96 h。用含体积分数0.05%的吐温-80溶液对成熟菌落进行收集，制备孢子悬浊液。随后使用超声细胞破碎仪对悬浊液进行10 min间断处理（功率285 W、脉冲周期4 s、间隔4 s）。按$1.5×10^8$ CFU/mL的接种量，将处理后的孢子悬浊液接种至含150 mL种子培养基的500 mL锥形瓶中，在34 ℃条件下以200 r/min的转速振荡培养24 h。

2）摇瓶发酵培养条件：将培养好的种子培养物按照体积分数10%的接种量转接至250 mL锥形瓶（含发酵培养基50 mL）中，于36 ℃、200 r/min振荡培养120 h。为维持发酵过程中发酵液的葡萄糖质量浓度和pH稳定，分别在发酵24 h和72 h补加30 g/L葡萄糖和30 g/L碳酸钙。

3）7.5 L发酵罐培养条件：在7.5 L发酵罐中进行放大培养，按体积分数10%的接种量接种；工作体积为4.5 L。培养条件设置为：温度36 ℃，搅拌速度500 r/min，通气量9 L/min，总培养时间120 h。在发酵24 h和72 h分别补加60 g/L葡萄糖和30 g/L碳酸钙，以保证发酵液的葡萄糖质量浓度和pH稳定。

1.4 氮源利用能力验证

按摇瓶发酵培养基及培养条件，对种子培养

物培养24 h后测定其菌株干质量浓度（DCW）。随后，以20种必需氨基酸分别作为单一氮源进行氮源替代试验。每种必需氨基酸设置5个质量浓度（1、3、5、7、9 g/L），通过测定DCW分析菌株对该必需氨基酸的氮源利用能力。每组设3个平行以保证结果可靠性。

1.5　菌株生长预测能力验证

按7.5 L发酵罐培养基和培养条件开展试验，每2 h取一次发酵样品，测定发酵液中的底物消耗情况和DCW。菌株生长预测能力验证均以米曲霉FMME-S-38发酵过程中最大比生长速率、比糖耗速率值进行验证。

1.6　分析方法

参照文献[5]中的方法，测定葡萄糖质量浓度、DCW和有机酸质量浓度。在该研究的代谢网络模型中，碳流分布及相关氨基酸吸收速率的单位均以mmol/（g·h）表示。

1.7　基因组测序、组装和注释

将米曲霉成熟孢子接种至种子培养基中，于34 ℃恒温培养16 h至菌体进入对数生长期。收集菌体后，在12 000 r/min条件下离心10 min，弃去上清液，用无菌水重悬并洗涤2~3次，最后用液氮快速冷冻保存菌体样品，随后进行真菌DNA提取。经检测，米曲霉NRRL3488和FMME-S-38菌株的基因组DNA质量浓度分别为121 ng/μL和168 ng/μL，质检合格。全基因组测序工作委托深圳华大基因股份有限公司完成，均采用BIGSEQ和PacBio这2种测序平台进行。基因组数据的组装、编码基因预测及功能注释等生物学信息分析参照文献[8]所述的标准流程执行。

1.8　模型重构

1）初始模型构建：将米曲霉FMME-S-38的全基因组序列（FASTA格式）提交至RAST在线注释平台进行分析[9]，随后采用Model SEED系统构建初步代谢网络模型[10]。在此过程中，通过KEGG数据库检索并结合文献调研，补充模型中缺失的关键代谢反应，并对各反应进行代谢子系统分类标注。

2）模型参数设置：模型中的生物量组成参数及能量需求参数主要参照已发表的米曲霉基准代谢模型[11]，包括生长相关能量消耗和非生长相关维持能耗。转运反应则依据转运蛋白分类数据库（TCDB）[12]进行系统添加，同时根据模型需求补充必要的交换反应。

3）模型验证与优化：利用CELLO亚细胞定位数据库[13]和MetaCyc代谢途径数据库[14]分别对反应位点信息和反应可逆性进行验证。采用Cobra Toolbox 3.0软件包[15]开展代谢网络缺口填补和质量电荷平衡校验，最终通过人工校验完成模型的精细化调整[16]。

1.9　约束性代谢通量分析算法

采用MATLAB R2018a平台集成Cobra Toolbox 3.0工具包开展代谢网络分析，计算求解器选用glpk。基于流量平衡分析（FBA）方法[17]，研究代谢网络中物质流分布特征。为评估环境因素对代谢物的影响，在固定其他培养参数的条件下，重点考察不同氧摄取速率和氮源利用效率对*L*-苹果酸合成速率的调控作用。

1.10　模型的准确性验证

1）碳氮源利用验证：依据试验测定的葡萄糖平均消耗速率，将主要碳源摄取速率设定为2.0 mmol/（g·h），其余碳氮源摄取速率归零，以此验证模型对底物利用的预测能力。

2）生长预测验证：以试验测定的碳源消耗数据作为输入参数，将基础营养交换反应通量下限设为−1 000 mmol/（g·h）。以生物量合成方程为优化目标，通过比对模拟计算结果与实际培养数据，评估模型对菌体生长预测的准确性。

1.11　模型分析

1）米曲霉FMME-S-38高产*L*-苹果酸的生理机制分析：设置基础参数，将氧气和硫酸铵交换通量下限设为−1 000 mmol/（g·h）；采用试验数据约束，葡萄糖吸收、生物量合成、延胡索酸分泌、琥珀酸分泌及柠檬酸分泌等关键代谢通量均使用实际培养测定值；通过比较野生型与突变型菌株的代谢流差异，揭示*L*-苹果酸合成途径的调控机制。

2）胰蛋白胨质量浓度对米曲霉生产*L*-苹果酸的影响：将氧气摄取通量下限设为−1 000 mmol/（g·h），20种氨基酸交换通量统一限定为−0.004 mmol/（g·h），葡萄糖代谢通量采用试验测定值，菌体生长方程按实际数据设定，硫酸铵利用通量参照实际培养数据。

3）氧气对米曲霉生产*L*-苹果酸的影响：将硫酸铵交换反应的下限设定为−1 000 mmol/（g·h），20种氨基酸交换反应的下限设为−0.004 mmol/（g·h），胰

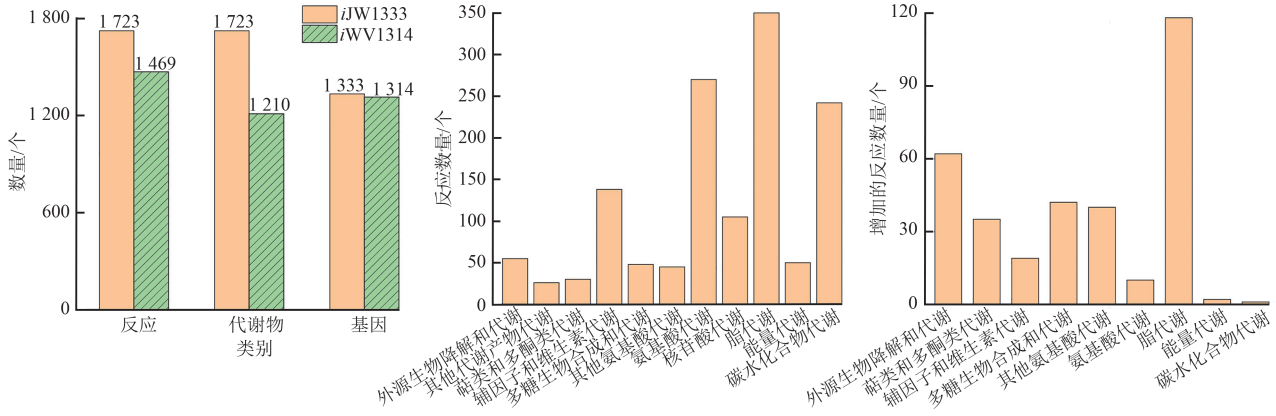
蛋白胨交换通量下限设为−1 000 mmol/(g·h)，葡萄糖交换反应及生物量方程根据试验拟合数据。

2 结果与讨论

2.1 GSMM *i*JW1333 的构建和验证

米曲霉 FMME-S-38 的初步代谢网络模型包含 1 357 个反应、1 525 个代谢物和 1 267 个基因。为了提升模型的精细化程度，采用了以下关键步骤：1）数据标准化：通过 KEGG ID 或 BIGG 数据库统一代谢物命名；2）通路注释：利用 KEGG KAAS 工具对基因组进行代谢通路分析，归类得到 393 个通路，并结合 KO 编号完成亚系统划分；3）反应扩充：基于 TCDB 数据库补充 54 个转运反应，同时依据代谢需求新增 119 个交换反应；4）网络完善：针对代谢漏洞，共添加 191 个反应，涵盖脂肪酸代谢（78 个）、氨基酸代谢（44 个）、碳水化合物代谢（37 个）等类别；关联 66 个基因，包括脂肪酸代谢基因（32 个）、碳水化合物代谢基因（13 个）、氨基酸代谢基因（11 个）等；5）核心反应设置：引入 ATP 水解反应和生物量方程以模拟能量维持与菌株生长；6）区室化建模：将反应分配至细胞膜、细胞质、线粒体和胞外区室，分别对应 31 个、1 555 个、18 个和 119 个反应。最终构建的 GSMM 命名为 *i*JW1333，包含 1 723 个反应、1 723 个代谢物及 1 333 个基因，基因覆盖率为 12.07%。

通过与米曲霉 *i*WV1314 模型[11]进行对比发现，新版 GSMM *i*JW1333 模型在多个方面呈现明显改进：1）在模型规模方面，反应数量、代谢物种类和基因数量分别增长了 17.3%、42.4% 和 1.4%，见图 1（a）；2）在 1 723 个生化反应中，有 1 543 个反应实现了基因−蛋白质关联；3）代谢网络包含 11 个功能子系统，其中碳水化合物代谢涉及 245 个反应，见图 1（b）；4）脂代谢途径的反应数量较 *i*WV1314 模型增长了 50.7%；5）核苷酸代谢途径较 *i*WV1314 模型缩减了 10.3%；6）*i*JW1333 模型新增了多糖生物合成和代谢、萜类和多酮类代谢等特色代谢模块，见图 1（c）。



(a) 2个模型的反应、代谢物和基因数量对比　(b) *i*JW1333在11个亚代谢系统中的反应分布　(c) *i*JW1333在不同亚代谢系统中增加的反应数量

图 1　米曲霉 GSMM *i*JW1333 特征

Fig. 1　Characteristics of the *A. oryzae* GSMM *i*JW1333

对 *i*JW1333 准确性的验证主要包括 2 个部分。第一，底物代谢能力评估。采用 2000 年后文献报道的米曲霉菌株可利用的碳氮源进行生长模拟测试，见表 1。结果表明，碳源利用预测准确率达 100.0%（12/12），氮源利用准确率为 84.0%（21/25），整体底物预测精度较 *i*WV1314 提升了 10.8%。针对试验已证实可利用但模型未预测到的底物（如组氨酸、赖氨酸等），通过补充 9 个关键反应，将氮源识别准确率提升至 94.6%，较 *i*WV1314 提高了 16.2%，见表 2。第二，生长与产物合成预测。基于 Origin 软件对米曲霉 FMME-S-38 发酵数据进行非线性拟合分析，结果见表 3。当以硫酸铵为氮源，葡萄糖吸收速率分别设为 1.26、3.70 mmol/(g·h)时，模型预测值与试验数据的偏差分别为 13.2%[25]和 2.8%，平均误差为 8.0%，预测准确率为 92.0%。相较于 *i*WV1314，新构建的 *i*JW1333 模型平均预测精度

表1　*i*JW1333定性验证结果

Table 1　Qualitative validation results of *i*JW1333

类别	底物	试验结果	*i*JW1333模拟	*i*WV1314模拟	参考文献
氮源	胰蛋白胨	+	+	+	[5]
	硫酸铵	+	+	+	[5]
	氯化铵	+	+	+	[18]
	硝酸钾	+	+	+	[18]
	尿素	+	+	−	[19]
	丙酮酸	+	−	+	本研究
	精氨酸	+	+	−	本研究
	天冬酰胺	+	+	+	本研究
	天冬氨酸	+	+	+	本研究
	半胱氨酸	+	+	−	本研究
	谷氨酸	+	+	+	本研究
	谷氨酸酰胺	+	+	+	本研究
	甘氨酸	+	+	+	本研究
	组氨酸	+	−	+	本研究
	异亮氨酸	−	−	−	本研究
	亮氨酸	+	+	−	本研究
	赖氨酸	−	−	−	本研究
	甲硫氨酸	+	−	−	本研究
	苯丙氨酸	+	−	−	本研究
	脯氨酸	+	+	−	本研究
	丝氨酸	+	+	+	本研究
	苏氨酸	+	+	+	本研究
	色氨酸	+	−	−	本研究
	酪氨酸	+	+	+	本研究
	缬氨酸	+	+	−	本研究
碳源	葡萄糖	+	+	+	[20]
	D-甘露醇	+	+	+	[20]
	甘油	+	+	+	[20]
	木糖	+	+	+	[20]
	半乳糖	+	+	+	[21]
	醋酸盐	+	+	+	[21]
	麦芽糖	+	+	+	[21]
	蔗糖	+	+	+	[22]
	淀粉	+	+	+	[22]
	乳糖	+	+	+	[22]
	果糖	+	+	+	[23]
	核糖	+	+	+	[24]

注：“+”表示可利用，“−”表示不可利用。

提升了31.5%，表明新模型更适用于米曲霉FMME-S-38菌株的发酵模拟。在模拟胰蛋白胨组分（限制20种氨基酸吸收速率为0.004 mmol/(g·h)）时[26]，*i*JW1333模型预测误差均为0.2%。在模拟*L*-苹果酸生产速率的过程中，当比生长速率为0.002 8 h^{-1}时，利用新模型*i*JW1333预测到的*L*-苹果酸产率为0.619 9 mmol/(g·h)，与实测值0.581 6 mmol/(g·h)的偏差为6.6%。结果表明，与*i*WV1314相比，该研究所构建的新模型*i*JW1333无论是对文献报道的*L*-苹果酸高产菌株[26]，还是对米曲霉FMME-S-38菌株，均表现出更优的预测准确性。

2.2　米曲霉FMME-S-38高产*L*-苹果酸的生理机制

将米曲霉FMME-S-38与野生型米曲霉菌株NRRL3488进行基因组注释对比，发现2株米曲霉菌株在基因层面仅存在细微区别。其中可能影响*L*-苹果酸合成的差异位点包括：1）在菌株FMME-S-38的HMP中，转醛醇酶编码基因发生缺失；2）在氧化磷酸化途径中，调控细胞色素c还原酶的基因*QCR9*存在过表达现象。

为解析米曲霉FMME-S-38高产*L*-苹果酸的生理机制，作者对米曲霉生长期和产酸期的代谢流量进行了预测。鉴于模型*i*JW1333能够准确预测高产菌株的生长和*L*-苹果酸合成过程，首先对文献[22]试验数据进行非线性拟合，再借助模型*i*JW1333开展FBA，分别预测米曲霉FMME-S-38生长阶段和*L*-苹果酸合成阶段的碳流分布情况，见图2。生长阶段中发酵3.85 h时为生长期，碳源吸收速率为−1.26 mmol/(g·h)，以生物量方程为目标函数；苹果酸合成阶段中发酵35.44 h时为产酸期，葡萄糖比吸收速率为−0.447 mmol/(g·h)、比生长速率为0.014 h^{-1}、延胡索酸合成速率为0 mmol/(g·h)、琥珀酸合成速率为0.026 mmol/(g·h)、柠檬酸合成速率为0.162 mmol/(g·h)，以*L*-苹果酸转运反应为目标函数。从生长阶段到*L*-苹果酸合成阶段，相关代谢途径的碳流比发生了显著变化：1）rTCA与三羧酸循环（TCA）的流量比增大，由生长期的0上升至产酸期的0.77，且碳流未经过乙醛酸分支；2）糖酵解途径（EMP）与HMP的碳流比由生长期的6.98上升到产酸期的52.12，提高了6.47倍。

在维持葡萄糖吸收速率为3.70 mmol/(g·h)的基础上，当氮源吸收速率从3.00 mmol/(g·h)下降至2.40 mmol/(g·h)时，EMP与HMP的碳流比提升了35.55%，*L*-苹果酸产量提高了88.71%，对应的最大比生长速率从约0.5 h^{-1}下降到约0.4 h^{-1}。由此可见，降低氮源吸收速率虽会适当降低菌株生长速率，但可以提高EMP与HMP的碳流比，进而

表 2 *i*JW133 填补代谢空缺添加的反应

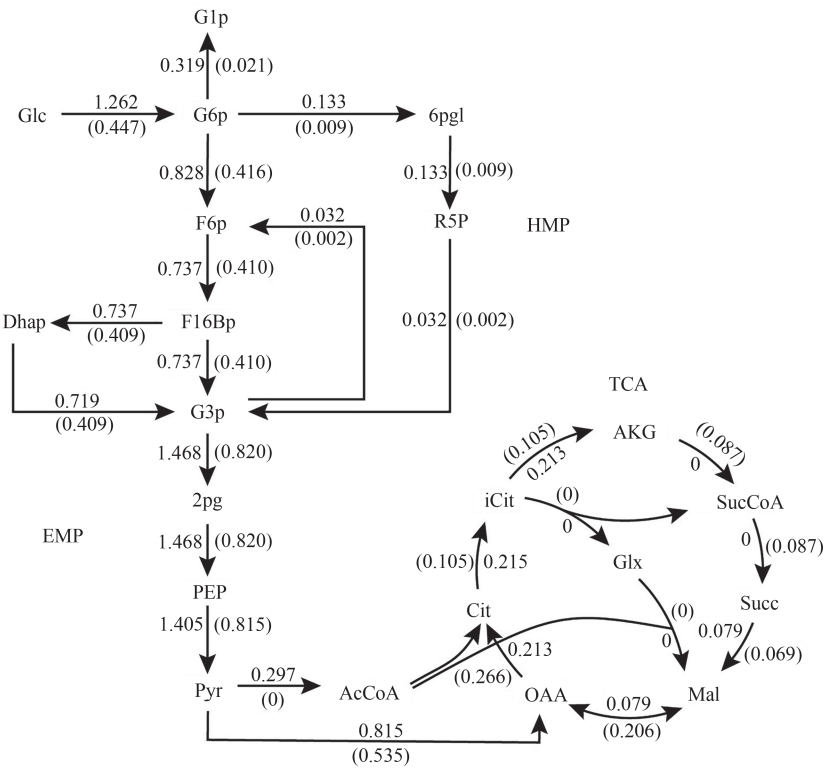
Table 2 Filling metabolic gaps in *i*JW1333

代谢路径	EC 号	反应
谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸代谢	2.6.1.44	ala__L[c]+glx[c]→gly[c]+pyr[c]
氰胺酸代谢	3.5.1.49	frmd[c]+h2o[c]→for[c]+nh4[c]
组氨酸代谢	4.2.1.49	urcan[c]+h2o[c]→4izp[c]
色氨酸代谢	4.1.1.45	2 h[c]+cmusa[c]→co2[c]+am6sa[c]
酪氨酸代谢	5.2.1.2	4mlacac[c]→4fumacac[c]
色氨酸代谢	1.5.1.-	amuco[c]+nadh[c]+h[c]+h2o[c]↔2oxoadp[c]+nh4[c]+nad[c]
酪氨酸代谢	3.7.1.2	4fumacac[c]+h2o[c]→fum[c]+acac[c]
色氨酸代谢	1.2.1.32	am6sa[c]+nad[c]+h2o[c]→amuco[c]+nadh[c]+h2o[c]
色氨酸代谢	1.2.4.2	2oxoadp[c]+nad[c]+h[c]+coa[c]→glutcoa[c]+co2[c]+nadh[c]+h[c]

表 3 *i*WV1314 和 *i*JW1333 的定量模拟结果

Table 3 Quantitative simulation results of *i*WV1314 and *i*JW1333

氮源	葡萄糖吸收速率/（mmol/(g·h)）	比生长速率试验值/h^{-1}	*i*WV1314		*i*JW1333		参考文献
			比生长速率/h^{-1}	误差值/%	比生长速率/h^{-1}	误差值/%	
硫酸铵	1.26	0.228 0	0.126 8	44.4	0.198 0	13.2	[25]
	3.70	0.569 0	0.372 3	34.6	0.585 4	2.8	本研究
胰蛋白胨	1.70	0.278 1	0.180 5	35.1	0.278 7	0.2	本研究
	1.96	0.319 0	0.206 0	35.4	0.318 4	0.2	本研究



带括号数字代表生长期数据；不带括号数字代表产酸期数据；F16Bp—果糖-1，6-二磷酸；Dhap—磷酸甘油酮；Glc—葡萄糖；G6p—葡萄糖-6-磷酸；G1p—葡萄糖-1-磷酸；G3p—甘油醛-3-磷酸；6pgl—6-磷酸葡萄糖酸；R5P—核糖-5-磷酸；F6p—果糖-6-磷酸；Pyr—丙酮酸；iCit—异柠檬酸；AKG—*a*-酮戊二酸；SucCoA—琥珀酸乙酰辅酶 A；Succ—琥珀酸；Mal—苹果酸；PEP—磷酸烯醇式丙酮酸；OAA—草酰乙酸；Cit—柠檬酸；Glx—乙醛酸。

图 2 模型预测米曲霉生长阶段和 *L*-苹果酸合成阶段碳流分布情况

Fig. 2 Predicted carbon flux redistribution in *A. oryzae* between cell growth and *L*-malic acid synthesis phases

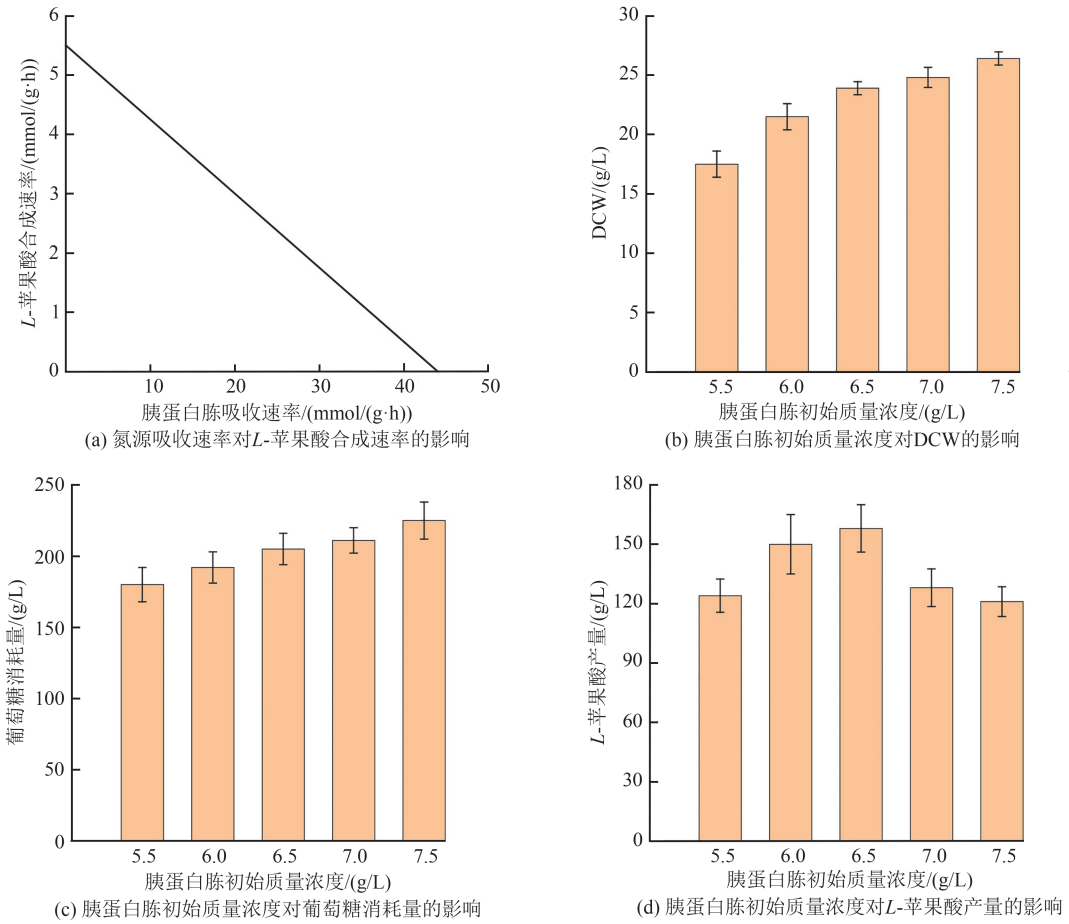
促进*L*-苹果酸积累。

对NADH和ATP影响*L*-苹果酸合成的分析显示：在葡萄糖吸收速率恒定为3.70 mmol/(g·h)的条件下，当*L*-苹果酸合成速率从1.02 mmol/(g·h)提升至1.93 mmol/(g·h)时，NADH合成速率从5.82 mmol/(g·h)增加至6.49 mmol/(g·h)；EMP途径的ATP合成速率由9.30 mmol/(g·h)提升至10.10 mmol/(g·h)；ATP总消耗速率从8.87 mmol/(g·h)提高到9.61 mmol/(g·h)。由于NADH可通过氧化磷酸化途径补充ATP，NADH合成速率的增加可能对*L*-苹果酸合成产生促进作用。

2.3　氮源对米曲霉FMME-S-38发酵生产*L*-苹果酸的影响

以胰蛋白胨为唯一氮源，通过鲁棒性分析模拟米曲霉氮源吸收速率对*L*-苹果酸合成速率的影响，结果见图3(a)。设定初始参数为：葡萄糖吸收速率3.70 mmol/(g·h)，细胞比生长速率0.015 0 h^{-1}。将*L*-苹果酸转运反应设为目标函数，当胰蛋白胨吸收速率从0 mmol/(g·h)提高到44.06 mmol/(g·h)时，*L*-苹果酸合成速率从5.51 mmol/(g·h)下降至0 mmol/(g·h)，表明维持较低的氮源吸收速率有助于*L*-苹果酸的合成。

采用发酵罐进行验证，以胰蛋白胨作为单一氮源，调控胰蛋白胨的初始质量浓度为5.5~7.5 g/L并进行培养测试。模型预测结果显示，在产酸初期(0~42 h)，菌体对氮源的利用呈现先降低后升高的趋势，即从初始的0.059 7 mmol/(g·h)先下降至0.006 7 mmol/(g·h)的谷值，随后回升至0.025 3 mmol/(g·h)。试验数据表明，随着初始氮源质量浓度的增加，DCW与葡萄糖消耗量最大分别增加了58.0%和32.5%，而*L*-苹果酸产量则呈现先增加后降低的趋势。当初始胰蛋白胨质量浓度为6.5 g/L时，DCW和葡萄糖消耗量分别为23.9 g/L和205 g/L，此时*L*-苹果酸产量与糖酸转化率均达到最高值，分别为158 g/L和0.78 g/g，见图3(b)~(d)。结果证明，调整氮源质量浓度能有效提高*L*-苹果酸产量和葡萄



(a) 氮源吸收速率对*L*-苹果酸合成速率的影响　(b) 胰蛋白胨初始质量浓度对DCW的影响

(c) 胰蛋白胨初始质量浓度对葡萄糖消耗量的影响　(d) 胰蛋白胨初始质量浓度对*L*-苹果酸产量的影响

图3　胰蛋白胨对米曲霉FMME-S-38发酵生产*L*-苹果酸的影响

Fig. 3　Effects of tryptone on fermentation parameters of *A. oryzae* FMME-S-38 for *L*-malic acid production

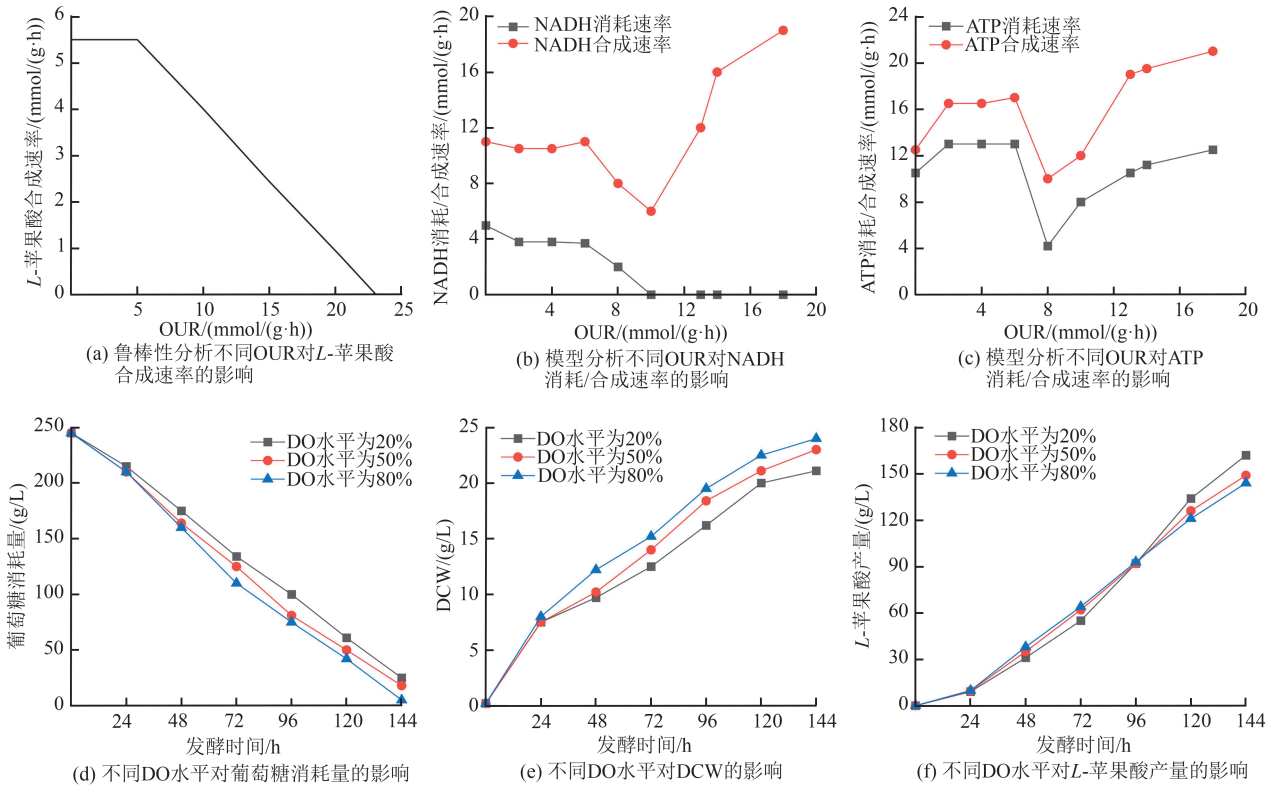
糖转化效率，与文献结果一致。

2.4　氧气对米曲霉 FMME-S-38 发酵生产 *L*-苹果酸的影响

通过鲁棒性分析模拟氧气摄取速率（OUR）对 *L*-苹果酸合成速率的影响，见图 4（a）。设定菌株的葡萄糖吸收速率为 3.7 mmol/（g·h），菌株比生长速率限定为 0.015 0 h^{-1}，并将 *L*-苹果酸转运反应设置为目标函数。研究表明，*L*-苹果酸的合成效率与 OUR 呈现明显的阶段依赖性关系：1）低氧阶段（OUR≤1.19 mmol/（g·h）），*L*-苹果酸合成速率随 OUR 增加显著提升，表明该阶段氧气供应是限制性因素；2）平台阶段（1.19 mmol/（g·h）<OUR≤4.7 mmol/（g·h）），*L*-苹果酸产量趋于稳定，OUR 变化不再影响产物合成，提示代谢流达到平衡；3）抑制阶段（OUR>4.7 mmol/（g·h）），过高的 OUR 会抑制 *L*-苹果酸积累，这可能与氧化应激或代谢途径重分配有关。

作者通过 FBA 深入探究了 OUR 对菌株能量代谢网络的动态调控机制，见图 4（b）~（c）。结果表明，在 OUR 为 0~18 mmol/（g·h）的梯度变化过程中，能量代谢呈现多阶段响应特征：1）NADH 代谢动态，苹果酸脱氢酶催化反应中，NADH 消耗速率从 4.98 mmol/（g·h）线性下降至 0 mmol/（g·h），EMP 和 TCA 的 NADH 合成呈现 3 阶段变化，即 NADH 合成速率先升至 11.39 mmol/（g·h）后回落至 6.22 mmol/（g·h），最终显著提升至 19.35 mmol/（g·h）；2）ATP 代谢特征，OUR 下降过程中，ATP 消耗速率呈现 3 阶段波动，达到 13.00 mmol/（g·h）峰值后，先缓慢降至 12.88 mmol/（g·h），再骤然降至 4.16 mmol/（g·h），最终回升至 13.41 mmol/（g·h），且 ATP 合成速率与 ATP 消耗速率保持同步变化趋势。上述模拟结果表明，加强 EMP 和 rTCA 分支，提高 NADH 与 ATP 的合成及消耗速率，有利于提高 *L*-苹果酸合成速率。

作者在发酵罐中开展湿试验，初始胰蛋白胨质量浓度设置为 6.5 g/L，通过调节搅拌速度和通气量，将发酵 DO 水平分别控制在 20% 水平（低水平）、50% 水平（中水平）和 80% 水平（高水平）。结果发现，葡萄糖吸收速率、DCW 和 *L*-苹果酸产量均随着 DO 水平的变化而改变，见图 4（d）~（e）。当 DO



(a) 鲁棒性分析不同OUR对*L*-苹果酸合成速率的影响　(b) 模型分析不同OUR对NADH消耗/合成速率的影响　(c) 模型分析不同OUR对ATP消耗/合成速率的影响

(d) 不同DO水平对葡萄糖消耗量的影响　(e) 不同DO水平对DCW的影响　(f) 不同DO水平对*L*-苹果酸产量的影响

图 4　氧气对米曲霉 FMME-S-38 发酵生产 *L*-苹果酸的影响

Fig. 4　Effects of DO levels on fermentation parameters of *A. oryzae* FMME-S-38 for *L*-malic acid production

水平降至20%时，*L*-苹果酸的产量显著提高至（154.2±1.8）g/L，较50% DO水平增产7%，糖酸转化效率（0.83 g/g）也提升了3.2%。然而，DO水平降低使DCW最大值下降6.0%（降至22.5 g/h），同时显著抑制副产物积累，其中柠檬酸、延胡索酸和琥珀酸的产量分别降低了11.4%、12.9%和15.1%。

3 结论

该研究基于高产*L*-苹果酸菌株米曲霉FMME-S-38的全基因组测序数据，构建了新一代米曲霉GSMM *i*JW1333。与首个米曲霉参考模型*i*WV1314相比，*i*JW1333在多个指标上有了实质性提升：生化反应数量增加17.3%、代谢物种类增加42.4%、基因数量增加1.4%。值得注意的是，模型*i*JW1333新增了多个独特的代谢子系统。经系统验证，新模型*i*JW1333在底物利用预测和菌体生长模拟中的准确率分别达到94.6%和92.0%，较*i*WV1314模型分别提高了16.2%和31.5%。

对米曲霉FMME-S-38全基因组进行KEGG和KOG注释，明确其高产*L*-苹果酸的生理机制与*L*-苹果酸合成途径和氧化磷酸化途径的特异性调控密切相关。进一步研究发现，氮源及辅因子（NADH和ATP）可通过改变EMP、HMP、TCA和rTCA等不同合成路径的代谢通量，从而促进*L*-苹果酸合成。在湿试验中，通过将氮源质量浓度和DO水平控制在较低水平，成功提高了EMP与HMP的比值以及rTCA途径与TCA途径的流量比，有效提高了*L*-苹果酸产量。

参考文献

[1] KÖVILEIN A，KUBISCH C，CAI L Y，et al. Malic acid production from renewables：a review [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology，2020，95（3）：513-526.

[2] HU G P，ZHOU J，CHEN X L，et al. Engineering synergetic CO_2-fixing pathways for malate production[J]. Metabolic Engineering，2018，47：496-504.

[3] CHEN X L，WANG Y C，DONG X X，et al. Engineering rTCA pathway and C4-dicarboxylate transporter for *L*-malic acid production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2017，101（10）：4041-4052.

[4] XU Y X，ZHOU Y T，CAO W，et al. Improved production of malic acid in *Aspergillus niger* by abolishing citric acid accumulation and enhancing glycolytic flux [J]. ACS Synthetic Biology，2020，9（6）：1418-1425.

[5] DING Q，LUO Q L，ZHOU J，et al. Enhancing *L*-malate production of *Aspergillus oryzae* FMME218-37 by improving inorganic nitrogen utilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2018，102（20）：8739-8751.

[6] 周洁，罗秋玲，丁强，等. 米曲霉形态对*L*-苹果酸生产的影响[J]. 食品与生物技术学报，2020，39（3）：24-31.
ZHOU J，LUO Q L，DING Q，et al. Effect of morphology of *Aspergillus oryzae* on *L*-malate production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39（3）：24-31.（in Chinese）

[7] CHEN X L，ZHOU J，DING Q，et al. Morphology engineering of *Aspergillus oryzae* for *L*-malate production [J]. Biotechnology and Bioengineering，2019，116（10）：2662-2673.

[8] SOSSAH F L，LIU Z H，YANG C T，et al. Genome sequencing of *Cladobotryum protrusum* provides insights into the evolution and pathogenic mechanisms of the cobweb disease pathogen on cultivated mushroom [J]. Genes，2019，10（2）：124.

[9] AZIZ R K，BARTELS D，BEST A A，et al. The RAST server：rapid annotations using subsystems technology[J]. BMC Genomics，2008，9：75.

[10] HENRY C S，DEJONGH M，BEST A A，et al. High-throughput generation，optimization and analysis of genome-scale metabolic models [J]. Nature Biotechnology，2010，28（9）：977-982.

[11] VONGSANGNAK W，OLSEN P，HANSEN K，et al. Improved annotation through genome-scale metabolic modeling of *Aspergillus oryzae* [J]. BMC Genomics，2008，9：245.

[12] SAIER M H Jr，TRAN C V，BARABOTE R D. TCDB：the transporter classification database for membrane transport protein analyses and information [J]. Nucleic Acids Research，2006，34：D181-D186.

[13] YU C S，CHEN Y C，LU C H，et al. Prediction of protein subcellular localization[J]. Proteins：Structure，Function，and Bioinformatics，2006，64（3）：643-651.

[14] CASPI R，BILLINGTON R，FERRER L，et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases[J].

Nucleic Acids Research，2016，44（D1）：D471-D480.

[15] HEIRENDT L，ARRECKX S，PFAU T，et al. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0[J]. Nature Protocols，2019，14（3）：639-702.

[16] 吴晓红，薛卫，张梁，等. 基因组规模代谢网络模型自动化修正[J]. 食品与生物技术学报，2017，36（9）：982-989.
WU X H，XUE W，ZHANG L，et al. Auto-refinement of genome-scale metabolic network model[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2017，36（9）：982-989.（in Chinese）

[17] ORTH J D，THIELE I，PALSSON B Ø. What is flux balance analysis?[J]. Nature Biotechnology，2010，28（3）：245-248.

[18] WANNAWILAI S，JEENNOR S，KHONGTO B，et al. Exploring differential traits of lipid-producing stages of the wild type and morphologically engineered strain of *Aspergillus oryzae* by comparative kinetic modeling[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2020，36（12）：183.

[19] NAILI B，SAHNOUN M，BEJAR S，et al. Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α-amylase production [J]. Food Science and Biotechnology，2016，25（1）：185-192.

[20] WANG J，YANG X，YANG Y Z，et al. Characterization of a protease-resistant α-galactosidase from *Aspergillus oryzae* YZ1 and its application in hydrolysis of raffinose family oligosaccharides from soymilk[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2020，158：708-720.

[21] CARLSEN M，NIELSEN J. Influence of carbon source on alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2001，57（3）：346-349.

[22] ZHAO G Z，DING L L，PAN Z H，et al. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*[J]. Food Chemistry，2019，271：606-613.

[23] SEREY M，VERA C，GUERRERO C，et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β-galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2021，167：1564-1574.

[24] DÖRSAM S，FESSELER J，GORTE O，et al. Sustainable carbon sources for microbial organic acid production with filamentous fungi[J]. Biotechnology for Biofuels，2017，10：242.

[25] KNUF C，NOOKAEW I，REMMERS I，et al. Physiological characterization of the high malic acid-producing *Aspergillus oryzae* strain 2103a-68 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2014，98（8）：3517-3527.

[26] BOGHIGIAN B A，ARMANDO J，SALAS D，et al. Computational identification of gene over-expression targets for metabolic engineering of taxadiene production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2012，93（5）：2063-2073.

（责任编辑：刘冬梅）