

适合龟裂链霉菌¹³C代谢通量分析合成培养基的优化及应用

王龙, 赵宏图, 于岚, 郭美锦, 储炬, 张嗣良

华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

王龙, 赵宏图, 于岚, 等. 适合龟裂链霉菌¹³C代谢通量分析合成培养基的优化及应用. 生物工程学报, 2014, 30(4): 679-683.
Wang L, Zhao HT, Yu L, et al. Optimization and application of chemically defined medium for ¹³C metabolic flux analysis of *Streptomyces rimosus* M4018. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 679-683.

摘要: 为开发一种适合龟裂链霉菌¹³C代谢通量分析的合成培养基, 以龟裂链霉菌模式菌株 M4018 为研究对象, 比较其在各种有机氮源和无机氮源的生长和土霉素合成特性。首次筛选到以硝酸钾为主要氮源的合成培养基, 通过响应面分析法进一步优化, 将土霉素合成能力由 75.2 mg/L 提高到 145.6 mg/L。并应用到 100% 的 1-¹³C 葡萄糖标记实验, 首次从同位素标记代谢流分析上证实了龟裂链霉菌中不存在 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸裂解途径 (Entner-Doudoroff pathway, ED), 为龟裂链霉菌¹³C代谢通量分析提供了重要基础。

关键词: 龟裂链霉菌, 合成培养基, 土霉素, ¹³C代谢通量分析

Optimization and application of chemically defined medium for ¹³C metabolic flux analysis of *Streptomyces rimosus* M4018

Long Wang, Hongtu Zhao, Lan Yu, Meijin Guo, Ju Chu, and Siliang Zhang

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: The aim of this study is to develop a synthetic medium suitable for ¹³C metabolic flux analysis (¹³C-MFA) of *Streptomyces rimosus*. The cell growth rate and oxytetracycline production by *S. rimosus* M4018 were compared when M4018 cells were growth on the optimized chemically defined media with organic nitrogen sources or inorganic nitrogen sources. First, a synthetic medium contained KNO₃ as the main nitrogen source was screened, then optimized by a response surface method. Using this new medium, the oxytetracycline yield was increased from 75.2 to 145.6 mg/L. Furthermore, based on the ¹³C-MFA, we identified that Entner-Doudoroff pathway does not exist in *S. rimosus* cells cultured in a chemically defined medium with feed of 100% 1-¹³C labeled glucose. This study is helpful for subsequent ¹³C-MFA application of *S. rimosus*.

Keywords: *Streptomyces rimosus*, chemically defined media, oxytetracycline, ¹³C-metabolic flux analysis

Received: September 4, 2013; **Accepted:** September 30, 2013

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB200904), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2012AA021201, 2014AA021705).

Corresponding author: Meijin Guo. Tel: +86-21-64251131; Fax: +86-21-64253702; E-mail: guo_mj@ecust.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB200904), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA021201, 2014AA021705) 资助。

网络出版时间: 2013-12-06

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131206.0848.005.html>

龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus* 是工业化生产土霉素 (Oxytetracycline, OTC) 的主要生产菌株。自 1950 年以来,有大量报道关于龟裂链霉菌培养条件的优化^[1-2]、菌株诱变^[3-4]以及基因水平改造^[5]等手段以显著提高其土霉素生产能力。本课题组深入研究了磷酸戊糖途径 (PPP) 中 *zwf* 基因^[6-8]对土霉素合成的影响,并发现当增加土霉素合成的初始复合酶体系 MiniPKS 的表达量时^[9],土霉素产量显著提高。但对基因改造后变化的内在机制并未详细解释,主要是由于缺乏龟裂链霉菌初级代谢和次级代谢途径之间变化的相关信息。由于龟裂链霉菌代谢网络信息的匮乏,且没有可用于标记实验的合成培养基等条件限制,目前尚未有关于龟裂链霉菌中代谢通量分析的报道。

关于龟裂链霉菌合成培养基研究的相关文献较少,主要是 Zygmunt 在 20 世纪 60 年代进行了初步探索^[10-13]。Zygmunt 认为有机氮源的添加是促进土霉素合成所必需的,并确定了以葡萄糖和天冬氨酸为碳氮源的 S-3 合成培养基,其土霉素产量最高达 150 mg/L。由于 S-3 合成培养基中含有 1% 的天冬氨酸,在龟裂链霉菌中天冬氨酸的代谢途径尚不清楚,从而降低构建的龟裂链霉菌代谢网络的可信度。同时天冬氨酸也可作为碳源进入中心碳代谢途径,导致增加标记信息分析和代谢通量估计的复杂度。

因此本论文通过采用不同氮源对天冬氨酸进行替换,试图筛选出合适氮源,随后应用响应面方法对合成培养基各组分进行优化,以期获得适合龟裂链霉菌生长和土霉素合成并不干扰 ¹³C 示踪分析中氨基酸标记信息的合成培养基。

1 材料与方法

1.1 菌种

龟裂链霉菌模式菌株 M4018,由英国 Strathclyde 大学 Iain S Hunter 教授惠赠。

1.2 培养基

MS 斜面培养基:豆粉 2%,甘露醇 2%,琼脂 2%。

初始合成培养基:葡萄糖 1%,磷酸氢二铵 0.02%,天冬氨酸 1%,氯化钠 0.5%,磷酸氢二钾 0.2%,硫酸镁 0.1%,无水氯化钙 0.03%,硫酸亚铁

0.002%,硫酸锌 0.001%,pH 7.1-7.2。

天冬氨酸替换实验的设计思路:考虑到各个氨基酸的可溶性和等电点,选取谷氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、精氨酸、甘氨酸、苏氨酸、组氨酸、丙氨酸、酪氨酸、赖氨酸和尿素作为有机氮源,硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、甲酸铵、乙酸铵、硝酸钙、磷酸二氢铵、硝酸钾和硝酸钠作为无机氮源,初始 pH 均调节至 7.1 左右,均以 1% 的含量进行添加,其余成分保持不变。

1.3 摇瓶发酵

将-20℃保存的甘油孢子液划线于 MS 培养基中,分离纯化单菌落后接种于 MS 培养基,30℃培养 5-7 d,获得成熟的孢子。收集孢子,过滤,并稀释至合适倍数进行平板计数。然后以 1×10^6 个孢子/mL 接种量,接种至合成培养基中,30℃、220 r/min 摇瓶发酵 5 d。过程中定时取样,每个样品做 3 个平行。

1.4 细胞干重的测定

取一定体积发酵液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,菌体沉淀放置于 85℃烘箱中,烘干至恒重,称重。

1.5 土霉素含量的测定

取 1 mL 发酵液,添加 9 mol/L 盐酸调节 pH 至 1.5-1.7,放置 5 min,过滤后采用高效液相色谱法 (HPLC) 分析^[9]。

1.6 响应面试验设计

首先设计 Plackett-Burman 试验,考察合成培养基中各组分对土霉素效价影响的显著性;随后设计影响最显著因素的最陡爬坡实验,并根据实验结果确定中心组合设计试验的因素和水平,以确定显著性因素的最佳值。

1.7 菌体蛋白氨基酸标记信息

菌体蛋白处理和测前衍生参照文献[14],衍生后的样品过滤后进行 GC-MS 测定。

GC-MS 测定:GC 采用 HP5MX 柱,起始柱温 160℃,保持 1 min,以 20℃/min 升温至 310℃,保持 0.5 min;进样口温度 280℃;载气为高纯氦气,恒流,载气流速 1.5 mL/min,分流比 1:10;进样量 1 μL;MS 条件为:EI 电离方式,离子源温度 230℃,全扫描模式,扫描质量范围 180-550。

1.8 氨基酸特征碎片总同位素标记丰度 (SFL) 的计算

$$SFL = \frac{\sum_{i=0}^n i \cdot m_i}{\sum_{i=0}^n m_i}$$

其中 n 是氨基酸的碳原子数, m_i 是氨基酸含有 i 个标记原子的质量同位素丰度。

2 结果与分析

2.1 合适氮源的筛选

龟裂链霉菌 M4018 在 12 种有机氮源和 9 种无机氮源合成培养基中的生长以及土霉素合成如图 1 所示。从图中可知 M4018 在含有天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、丙氨酸和脯氨酸等有机氮源的培养基中都能生长并产素; 在含有苏氨酸或者酪氨酸的培养基中生长缓慢, 基本不产素; 在含有硝酸钾、硝酸钠、硝酸钙和磷酸二氢铵的培养基中均能良好的生长, 并产生一定量的土霉素 (50–80 mg/L 之间); 而在含有硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、甲酸铵和乙酸铵等常规无机氮源的培养基中均无法生长。

结果证实了与无机氮源相比有机氮源的添加确实有利于龟裂链霉菌的生长以及土霉素的合成, 但

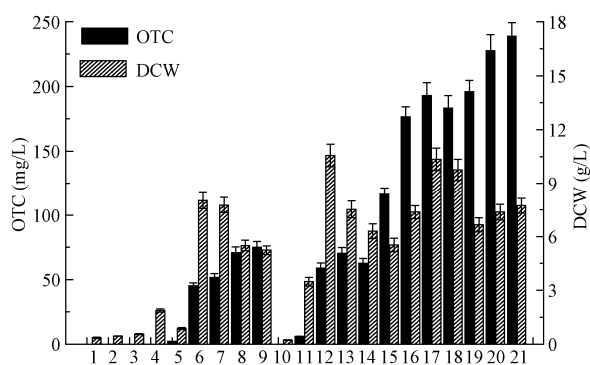


图 1 不同氮源对 M4018 生长和产素的影响

Fig. 1 Effect of different nitrogen sources on OTC production and cell growth of *S. rimosus* M4018. 1: HCOONH_4 ; 2: $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; 3: NH_4Cl ; 4: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5: NH_4NO_3 ; 6: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 7: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 8: NaNO_3 ; 9: KNO_3 ; 10: tyrosine; 11: threonine; 12: histidine; 13: arginine; 14: asparagine; 15: urea; 16: proline; 17: alanine; 18: lysine; 19: glycine; 20: glutamate; 21: aspartate.

首次发现有机氮源的添加并非是促进土霉素合成所必需的。因此考虑通过对筛选得到的硝酸钾、硝酸钠、硝酸钙和磷酸二氢铵这 4 种无机氮源做进一步优化以获得合适的培养基。

2.2 无机氮源的进一步确定

对上述 4 种无机氮源进行重复摇瓶发酵验证, 培养过程中每隔 24 h 取样 1 次, 观察菌体生长和土霉素合成变化规律。结果表明龟裂链霉菌 M4018 在以磷酸二氢铵为氮源的培养基中生长较好, 而在以硝酸钾和硝酸钠为氮源的培养基中土霉素产量较高, 分别为 75.18 mg/L 和 68.57 mg/L, 此时二者土霉素的相对效价分别为 10.83 mg/g DCW 和 11.68 mg/g DCW。根据实验结果, 硝酸钠和硝酸钾是适合龟裂链霉菌生长和产素, 由于培养基中同时含有大量的氯化钠, 因此选择硝酸钾为合成培养基中的主要氮源。并添加 3-吗啉丙磺酸 (3-Morpholinopropanesulfonic acid, MOPS) 和磷酸二氢钾作为缓冲体系。

2.3 响应面法优化无机氮源合成培养基

2.3.1 Plackett-Burman 试验设计

本实验选取培养基中的 8 种成分作为考察因素, 以土霉素效价为评价指标, 采用 Design-Expert 软件进行 $n=12$ 的 Plackett-Burman 试验设计。表 1 显示培养基中对土霉素效价影响显著 (可信度 > 95%) 的 3 个因素为: 葡萄糖、硝酸钾和氯化钠。

2.3.2 中心组合试验进一步优化

筛选获得影响土霉素合成的显著因素: 葡萄糖、

表 1 Plackett-Burman 试验设计的因子水平及效价评价
Table 1 Factor levels and efficiency evaluation in Plackett-Burman design

Factors	Level	Level		Estimated value	P (Prob>F)
		-1	1		
X1	Glucose	5.0	15.0	27.543	0.001
X2	KNO_3	5.0	15.0	-11.337	0.012
X3	K_2HPO_4	1.0	4.0	3.838	0.163
X4	NaCl	4.0	6.0	-8.133	0.030
X5	MgSO_4	0.5	2.0	-6.550	0.052
X6	CaCl_2	0.1	0.5	-2.374	0.338
X7	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.1	0.4	0.649	0.776
X8	Trace	$\times 4$	$\times 1$	-2.587	0.304

Trace: 0.04 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.02 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\times n$ means the dilution ratio.

硝酸钾和氯化钠后, 通过最陡爬坡实验获得中心组合设计的中心点。随后设计 3 因素 3 水平响应面分析实验, 以土霉素效价为响应值, 试验设计和结果见表 2。

运用 SAS 和 Design-Expert 软件对中心组合试验结果进行统计分析, 得到葡萄糖 (A)、硝酸钾 (B)、氯化钠 (C) 与土霉素效价 (Y) 的关系, 其多元二次回归方程: $Y=142.75+0.69A+5.46B-2.58C+3.98AB+2.08AC+3.97BC-10.31A^2-12.00B^2-4.16C^2$ 。由表 3 的方差分析结果表明: 该模型是极显著 ($P<0.0001$); 失拟项不显著 ($P=0.1351$); 方程的决定系数 R^2 为 98.9%, $AdjR^2$ 为 97.8%, 因此可以认为该拟合方法和建立的模型对于效价的统计分析是有效的。通过

表 2 中心组合设计设计表及试验结果

Table 2 Design and result of Central Composite Design experiment

No.	A-Glucose (g/L)	B-KNO ₃ (g/L)	C-NaCl (g/L)	Y-OTC (mg/L)
1	20	2.5	1.5	124.32±3.74
2	20	2.5	2.7	105.01±4.07
3	20	4.5	1.5	116.53±3.44
4	20	4.5	2.7	119.38±4.10
5	28	2.5	1.5	109.04±0.66
6	28	2.5	2.7	104.35±4.21
7	28	4.5	1.5	123.46±5.32
8	28	4.5	2.7	128.34±1.07
9	17.3	0	2.1	110.74±2.93
10	30.7	0	2.1	116.38±1.76
11	24	1.8	2.1	100.04±0.75
12	20	5.2	2.1	117.61±3.96
13	24	3.5	1.1	136.60±1.40
14	24	3.5	3.1	125.30±3.85
15	24	3.5	2.1	141.93±1.55
16	24	3.5	2.1	144.61±2.18
17	24	3.5	2.1	142.46±3.83
18	24	3.5	2.1	144.80±4.53
19	24	3.5	2.1	141.24±3.88
20	24	3.5	2.1	141.48±2.22

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 ANOVA of quadratic polynomial model

Source	SS	df	MS	F	P (Prob>F)
Model	4 141.45	9	460.16	95.93	<0.0001
Lack of fit	35.61	5	7.12	2.88	0.1351
AB	126.61	1	126.61	26.39	0.0004
AC	34.68	1	34.68	7.23	0.0227
BC	125.98	1	125.98	26.26	0.0004
Residual	47.97	10	4.80		
Pure error	12.36	5	2.47		
Total	4 189.42	19			

响应面优化得到最优值为葡萄糖 24.2 g/L, 硝酸钾 3.7 g/L, 氯化钠 2.0 g/L。

通过 Design-Expert 软件对中心组合试验结果进行响应面分析, 葡萄糖、硝酸钾和氯化钠显著因素相互之间交互作用强, 最优值均落在实验考察的区间内。

2.3.3 验证性实验

按照优化后的最佳合成培养基配方 (命名为 S-4), 分 5 批进行摇瓶发酵验证, 所得的土霉素效价平均值为 145.60 mg/L, 与最高预测理论值 143.58 mg/L 非常接近, 说明所设模型与真实情况相符, 回归模型可靠。此时菌体干重平均值为 6.32 g/L, 相比于最初的 5.87 g/L, 菌体干重也轻微提高 7.7%。

2.4 100%的 1-¹³C 葡萄糖标记实验

为了进一步验证获得的 S-4 合成培养基可以用于 ¹³C 示踪分析, 将 S-4 合成培养基中的葡萄糖用 100%的 1-¹³C 葡萄糖替换, 接种龟裂链霉菌 M4018 孢子后发酵培养, 在对数生长期取样分析。

如图 2 所示, 在以 100%的 1-¹³C 葡萄糖为唯一碳源的合成培养基中进行培养时, 若葡萄糖仅通过糖酵解途径 (EMP) 利用, 会产生 50%的 3-¹³C 丙酮酸; 若葡萄糖仅通过 ED 途径利用, 则会产生 50%的 1-¹³C 丙酮酸; 若葡萄糖仅通过 PPP 途径, 一位标记的碳原子以 ¹³CO₂ 形式释放, 无标记丙酮酸产生。因此通过比较丙酮酸各碳原子 (Pyr₁、Pyr₂ 和 Pyr₃) 的 SFL^[15-16] 即可定性比较葡萄糖 3 大代谢途径通量的相对大小。

丙氨酸和缬氨酸的所有碳骨架都是来自于丙酮酸, 因此丙酮酸的 SFL 值可从丙氨酸和缬氨酸的

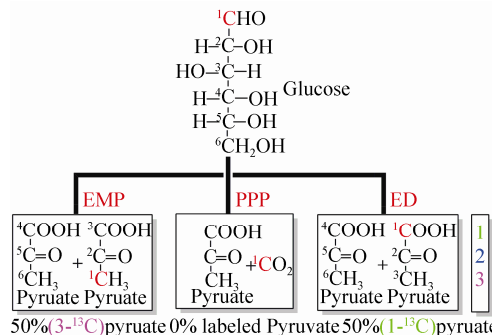


图 2 1-¹³C 葡萄糖在 EMP、PPP 和 ED 途径中碳原子的代谢转移

Fig. 2 Metabolism of the carbon atoms of 1-¹³C glucose via the EMP, PPP and ED pathways.

SEL 值相应得到, $\text{Pyr}_1 = \text{Pyr}_{1-2-3} - \text{Pyr}_{2-3}$ 。从表 4 中计算得到 Pyr_1 的 SFL 值为 1.23%, 与丙酮酸的天然同位素丰度 1.1% 非常接近, 即可认为丙酮酸的一位碳并未携带标记。即通过标记实验结果表明, 在龟裂链霉菌 M4018 中不存在 ED 途径。

表 4 丙酮酸族氨基酸的 SFL 值

Table 4 Summed fractional labellings (SFLs) of pyruvate-derived amino acid fragments

Amino acid	Fragment	Carbon atoms	SFL value (%)
Alanine	M-15(302)	1,2,3	31.8
Alanine	M-57(260)	1,2,3	33.3
Alanine	M-85(232)	2,3	30.5
Alanine	M-159(158)	2,3	31.4
Valine	M-15(330)	1,2,2,3,3	63.2
Valine	M-57(288)	1,2,2,3,3	64.9
Valine	M-85(260)	2,2,3,3	62.4
Valine	M-159(186)	2,2,3,3	64.0

3 讨论

通过比较龟裂链霉菌在不同有机氮源和无机氮源的生长和产素情况, 首次发现龟裂链霉菌也能在以硝酸钾为主要氮源的合成培养基上生长, 在此基础上对初始无机氮源合成培养基进行响应面优化实验, 得到最优的合成培养基 S-4 配方 (g/L): 葡萄糖 24.2, 硝酸钾 3.7, 氯化钠 2.0, 磷酸氢二钾 4.0, 硫酸镁 0.5, 氯化钙 0.1, 磷酸氢二铵 0.4, MOPS 7, 硫酸亚铁 0.02, 硫酸锌 0.01。在此培养基上菌体干重最高达 6.32 g/L, 土霉素效价由起始的 75.2 mg/L 提高到 145.6 mg/L, 提高 193.6%, 土霉素产量基本接近有机氮源的发酵水平, 并成功排除在 ^{13}C 示踪实验中额外碳源的干扰, 为后续龟裂链霉菌各突变株中碳代谢途径通量的分析提供良好的理论和技术基础。

采用 100% 的 $1-^{13}\text{C}$ 葡萄糖标记试验, 结果表明龟裂链霉菌 M4018 中葡萄糖是通过 EMP 途径和 PPP 途径进行代谢, 而不存在 ED 途径。这与已经报道的天蓝色链霉菌^[17]的代谢网络模型一致。即首次从代谢流组学水平证实了在龟裂链霉菌中 ED 途径不存在。龟裂链霉菌 M4018 的基因组测序已经由本课题组和英国 Strathclyde 大学 Hunter 教授课题组共同完成 (尚未公开), 基因比对的结果表明, 龟裂链霉菌只存有 ED 途径的第 2 步基因 *eda*, 从基因组水平上证实了该结果的可靠性。

REFERENCES

- [1] Yang SS, Yueh CY. Oxytetracycline production by immobilized *S. rimosus*. J Microbiol Immunol Infect, 2001, 34(4): 235-242.
- [2] Papanagioutou PA, Quinn H, Molitor JP, et al. The use of phase inversion temperature micro-emulsion technology to enhance oil utilisation during *S. rimosus* fed-batch fermentations to produce oxytetracycline. Biotechnol Lett, 2005, 27(20): 1579-1585.
- [3] Lazim H, Slama N, Mankai H, et al. Enhancement of oxytetracycline production after gamma irradiation-induced mutagenesis of *S. rimosus* CN08 strain. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26(7): 1317-1322.
- [4] Guo MJ, Tu GQ, Cao XX. Studies on mutation and selection of protoplasts from *S. rimosus*. Chin J Antibiot, 2000, 25(4): 260-262 (in Chinese). 郭美锦, 涂国全, 曹秀香. 龟裂链霉菌原生质体诱变与筛选研究. 中国抗生素杂志, 2000, 25(4): 260-262.
- [5] Petkovic H, Cullum J, Hranueli D, et al. Genetics of *S. rimosus*, the oxytetracycline producer. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(3): 704-728.
- [6] Tang ZY, Xiao CY, Zhuang YP, et al. Improved oxytetracycline production in *S. rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway. Enzyme Microb Technol, 2011, 49(1): 17-24.
- [7] Zheng ZJ, Yu L, Tang ZY, et al. Disruption of *zwf1* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances oxytetracycline biosynthesis in industrial *S. rimosus*. Chin J Antibiot, 2012, 37(1): 35-38 (in Chinese). 郑子静, 于岚, 唐振宇, 等. 龟裂链霉菌工业菌中 *zwf1* 基因的阻断对土霉素生物合成影响. 中国抗生素杂志, 2012, 37(1): 35-38.
- [8] Liu ZY, Guo MJ, Zhuang YP, et al. Disruption of *zwf2* gene to improve oxytetracycline biosynthesis in *S. rimosus* M4018. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(1): 21-25 (in Chinese). 刘志勇, 郭美锦, 庄英萍, 等. 龟裂链霉菌 *zwf2* 基因阻断提高土霉素生物合成. 微生物学报, 2008, 48(1): 21-25.
- [9] Yu L, Cao N, Wang L, et al. Oxytetracycline biosynthesis improvement in *S. rimosus* following duplication of minimal PKS genes. Enzyme Microb Technol, 2012, 50(6/7): 318-324.
- [10] Zygmunt WA. Oxytetracycline formation by *S. rimosus* in chemically defined media. Appl Microbiol, 1961, 9(6): 502-507.
- [11] Zygmunt WA. Selective inhibition in *S. rimosus*. J Bacteriol, 1962, 84(5): 1126.
- [12] Zygmunt WA. Nutritional factor relating to growth and oxytetracycline formation by *S. rimosus*. Can J Microbiol, 1964, 10: 389-395.
- [13] Zygmunt WA. Influence of inorganic phosphorus on oxytetracycline formation by *S. rimosus*. Appl Microbiol, 1964, 12: 195-196.
- [14] Zamboni N, Fendt SM, Ruhl M, et al. ^{13}C -based metabolic flux analysis. Nat Protoc, 2009, 4(6): 878-892.
- [15] Gunnarsson N, Mortensen UH, Sosio M, et al. Identification of the Entner-Doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycete species. Mol Microbiol, 2004, 52(3): 895-902.
- [16] Borodina I, Scholler C, Eliasson A, et al. Metabolic network analysis of *Streptomyces tenebrarius*, a *Streptomyces* species with an active Entner-Doudoroff pathway. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5): 2294-2302.
- [17] Borodina I, Krabben P, Nielsen J. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. Genome Res, 2005, 15(6): 820-829.

(本文责编 陈宏宇)