



## 基于比较代谢组学的理性优化方法提高阿维菌素产量

曹鹏, 胡栋, 张君, 张变强, 高强\*

工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

**摘要:**【目的】利用比较代谢组学的分析方法, 研究不同发酵培养基中阿维链霉菌的胞内代谢差异, 揭示合成阿维菌素的关键代谢物和代谢途径, 再通过理性优化添加主要关键代谢物, 提高阿维菌素产量。

【方法】对 M1 和 M2 培养基中生长的菌体进行基于 GC-MS 的胞内代谢组学分析, 通过理性添加强化前体代谢物, 确定阿维菌素高产培养基。【结果】GC-MS 共检测到 232 种物质, 能够精确匹配 70 种胞内代谢物, 通过 PCA 和 PLS 分析, 最终确定了 21 种已知的胞内代谢物与阿维菌素的生物合成密切相关。其中乳酸、丙酮酸、琥珀酸、苏氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和油脂类物质对阿维菌素的产量影响较为显著。通过单独或组合优化添加这些前体, 阿维菌素的产量从 5.36 g/L 提高到了 5.92 g/L, 增加了 10.4%。

【结论】基于比较代谢组学分析的理性优化培养基的方法可有效提高阿维菌素的产量, 并为提高当下生物基产品的产量提供了新思路。

**关键词:** 阿维链霉菌, 阿维菌素, 代谢组学, 理性优化

阿维菌素<sup>[1]</sup>(Avermectin, AVM)是由日本北里大学大村智教授和美国默克公司开发的、由阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)发酵产生的一类具有杀虫活性的化合物, 其基本碳骨架为 1 个十六元内酯环, 外接 3 个基团, 包括 1 个齐墩果糖, 1 个六氢化苯丙咪喃环和 1 个含 2 个六元环的螺旋缩酮结构。天然阿维菌素可分为 8 个组分, 即 A1a/A1b、B1a/B1b、A2a/A2b 和 B2a/B2b, 其中 B1a 的活性最高, 目前商品化的阿维菌素产品也以 B1a 组分为主。

作为新型杀虫杀螨剂, 阿维菌素具有高效、

低毒、低残留的特点, 在农业与畜牧业等方面的生产中越来越得到重视。自从 1985 年美国默克公司作为生物农药投放市场后, 阿维菌素的年销售额逐步扩大, 全球年使用量已达上千吨的规模。我国现已成为世界上唯一的阿维菌素原料药的生产国, 但阿维菌素生产仍存在着产量偏低、发酵周期偏长与成本较高等不足之处。虽然传统的培养基优化和诱变筛选可在一定程度上提高阿维菌素产量, 但却不能在很大程度上提高胞内关键代谢物的水平。当前关于阿维链霉菌的基因

基金项目: 国家“973 项目”(2013CB734004); 国家自然科学基金(31370075, 31471725)

\*通信作者。Tel: +86-22-60602715; E-mail: gaoqiang@tust.edu.cn

收稿日期: 2016-07-18; 修回日期: 2016-09-07; 网络出版日期: 2016-09-18

工程改造方法大部分只关注阿维菌素生物基因簇合成机制<sup>[2-3]</sup>, 缺乏对合成基因簇相关代谢机制的系统研究。而非基因工程的手段, 如随机诱变、底物或产物耐受菌筛选<sup>[4]</sup>都有自身的限制性。另一方面, 培养基成分对微生物的生长繁殖和代谢产物的影响是非常复杂的<sup>[5]</sup>, 培养基优化方法只关心发酵培养基的配方和发酵终止时目标产物的产量, 对整个动态发酵过程缺乏真正的认识。响应面法<sup>[6]</sup>通过对模型参数的拟合, 使得胞外培养基的营养成分接近于最充足状态, 与传统培养基优化相比, 是提高目标产物产量行之有效的方法, 但整个优化过程中大多采用的是“经验模型”, 如果到发酵终点时的目标产物的产量很高, 则该过程所使用的培养基就是最佳培养基。在优化过程中, 微生物内部营养物质的变化规律相当复杂, 很少被人们所知, 因而无法挖掘阿维菌素合成过程中关键代谢产物和关键代谢途径的不足。代谢组学可以定量分析生物体内所有的低分子量代谢物组分与含量及其变化规律, 从系统生物学的角度集中解读生物体代谢的全方位信息, 为发掘生物标志物、进一步阐明生物体的代谢机理以及提高生物基产品的产量提供新思路和新方法。

本研究利用比较代谢组学的方法, 比较阿维链霉菌在不同培养基状态下的胞内代谢差异, 结合阿维链霉菌的代谢合成途径, 解析阿维菌素合成的限制因素和阿维菌素高产机理, 通过胞内代谢物和代谢途径的不足性分析, 提出理性优化添加前体代谢物的策略, 以提高阿维菌素的产量。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种: 高产阿维菌素的阿维链霉菌

(*Streptomyces avermitilis*) 9-39 菌株由中国科学院微生物研究所提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 吡啶购于天津市科密欧化学试剂有限公司, 氘代琥珀酸购于北京西格玛生物技术有限公司, 甲氧基胺盐酸盐购于天津市赢达稀贵化学试剂厂, N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺(MSTF)购于天津市化学试剂一厂, 以上试剂均为色谱纯, 其它化学试剂均为分析纯。气相色谱-质谱联用仪(GC-MS) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), ZWYR-D2403 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司), 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)。

**1.1.3 培养基:** 发酵培养基 M1 (g/L): 淀粉液化液 150, 黄豆饼粉 28, 酵母粉 9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25, CoCl<sub>2</sub> 0.02, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.022, MnSO<sub>4</sub> 0.0023, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COONa 0.19212, PEG6000 2, 维生素 B<sub>1</sub> 0.1, CaCO<sub>3</sub> 0.8 (调 pH 后加入), pH 7.4, 121 °C 灭菌 25 min。发酵培养基 M2 是 M1 培养基经过 Plackett-Burman 优化和响应面优化后的培养基, 其成分为(g/L): 淀粉液化液 192.2, 黄豆饼粉 16.5, 酵母粉 4.1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.245, CoCl<sub>2</sub> 0.02, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.022, MnSO<sub>4</sub> 0.0023, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COONa 0.188, PEG6000 2, 维生素 B<sub>1</sub> 0.1, CaCO<sub>3</sub> 0.8 (调 pH 后加入), pH 7.4, 121 °C 灭菌 25 min。培养方法见文献[7]。

### 1.2 菌体制备及淬灭

每隔 2 d (即第 2、4、6、8 天)分别取 M1 和 M2 发酵液 20 mL, 8000 r/min 离心 5 min, 在离心后的细胞沉淀中加入 20 mL 4 °C 预冷的 0.6% (W/V) NaCl 水溶液并振荡悬浮, 6000 r/min、4 °C 离心 5 min, 去除上清液, 保留下层细胞沉淀, 反复 4 次以去除细胞表面的培养基成分。将清洗后的细胞置于液氮中淬灭 5 min, -80 °C 保存备用<sup>[8]</sup>, 每个

样品取 5 个生物学平行。

### 1.3 细胞破碎

将淬灭后的细胞液氮研磨 20 min 至细粉状, 称取 50 mg 于 1.5 mL 离心管中用于小分子代谢物的提取<sup>[9]</sup>。

### 1.4 胞内小分子物质提取

液氮研磨后的样品加入 1 mL 预冷的 2 : 2 : 1 (V/V) 的氯仿 : 乙醇 : 水, 涡旋振荡 1 min 至均匀, 液氮冻融, 每次冷冻 2 min, 重复 4 次<sup>[10]</sup>。

### 1.5 样品衍生化和 GC-MS 检测

样品衍生化和 GC-MS 检测条件见参考文献<sup>[11]</sup>。

### 1.6 数据处理

将 GC-MS 所得到的数据导入 MSD 增强型化学工作站, 提取离子峰并用 NIST08 谱库进行比对和定性, 将离子峰与内标物的峰面积相比较, 使数据标准化, 再对数据进行归一化并导入 SIMICA v11.5 软件进行主成分分析(PCA)和最小二乘法分析(PLS)<sup>[12-13]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 阿维链霉菌发酵过程中胞内代谢物的分析

由于阿维链霉菌在 M1 和 M2 培养基中的阿维菌素产量有明显差异, 推测其在 2 种培养基中的代谢也存在着差异。通过 GC-MS 数据分析, 共定量检测出 232 种化合物。通过与 NIST08 谱库比对分析, 能够精确匹配 70 种胞内代谢物, 其中包括氨基酸(18 种)、有机酸(11 种)、脂肪酸(8 种)和糖类(15 种), 以及一些核酸类和其它物质。将检测到的峰进行分类统计, 见表 1。

从表 1 可知, 本研究建立的方法覆盖了阿维

链霉菌生物合成阿维菌素过程中的柠檬酸循环(TCA)、糖酵解途径(EMP)、脂肪酸代谢、氨基酸代谢和核苷酸代谢等生物合成途径, 可以有效地反映阿维链霉菌在 2 种不同培养基中合成阿维菌素时不同的胞内代谢状态。

### 2.2 多元统计分析阿维链霉菌胞内代谢差异

对 M1 和 M2 培养菌体的胞内代谢物相对含量进行标准化和归一化后, 通过无监督的主成份分析进行降维, 预览各组的分类及不同培养状态下菌体胞内代谢物的动态变化情况, 结果如图 1 所示。图 1 是 PCA 得分图, 图中的每一个位置均代表了一种代谢状态。由图 1 可以看出每个样品点的 5 个平行样本紧密结合, 说明实验样品组内差异小, 重复性好; 8 个样本点存在明显的离散分组现象, 表明相同的培养基不同培养阶段及不同培养基相同培养阶段下胞内物质都存在着显著差异。同时, PCA 模型的  $R^2(X)$  和  $R^2(Y)$  值分别是 0.988 和 0.979, 表明了 PCA 模型具有较高(>0.8)的可信度<sup>[14]</sup>。

图 2 是不同培养基条件下胞内代谢物的 PCA 载荷图, 每个点代表 1 种胞内代谢物, 这 232 种物质可以很明显地被分类, 距离原点越远, 则反映它在整个发酵过程中的变化越大, 可能是对发酵进行影响比较大的物质。通过分析发现, 与原点显著分离的代谢物分别为 6-磷酸葡萄糖、乳酸、7-磷酸景天庚酮糖、苏氨酸、酪氨酸、亮氨酸、未知物 1、未知物 2、未知物 3、未知物 4、丙氨酸、丙酮酸、色氨酸、柠檬酸、甘氨酸、赖氨酸、脯氨酸、谷氨酸、十六烷酸、十七烷酸、油酸、十八烷酸、磷酸、草酰乙酸、海藻糖和肌醇, 剩下的代谢物则离原点较近, 说明这些物质对于区分 M1 和 M2 的影响较小。

表 1. GC-MS 检测到的胞内代谢物

Table 1. Intracellular metabolites identified by GC-MS

Class	Identified metabolites		
Amino acids	Alanine	Glutamine	Proline
	Aspartic acid	Glycine	Sarcosine
	Cysteine	Isoleucine	Serine
	Aspartic acid	Leucine	Valine
	Tyrosine	Tryptophan	Lysine
	Glutamic acid	Methionine	Threonine
	Organic acids	Acetic acid	Lactic acid
Gluconic acid		Malic acid	Pyruvic acid
Citric acid		Fumaric acid	Succinic acid
Oxalic acid		$\alpha$ -Ketoglutaric acid	Oxaloacetic acid
Fatty acids		9,12-Octadecadienoic acid	Heptadecanoic acid
	9-Octadecenoic acid	Hexadecanoic acid	Palmitic acid
	Pentanoic acid	Oleic acid	
Saccharides	Galactose	Glucose	Fructose
	Mannitol	Trehalose	Lactose
	Talose	Lyxose	Glucopyranose
	Erythrose-4-phosphate	7-Sedoheptulose-phosphate	3-Phosphoglycerate
	Cellobiose	Glucose-6-phosphate	Xylulose-5-phosphate
	Others	Inositol	Methanediimine
Adenine		Furanone	Urea
5-Methyluridine		Ribitol	Lyxose
$\beta$ -Hydroxypyruvic acid		2-Oxoadipic acid	Guanine
1-Hexanol		Imidazoleacetic acid	Phosphate
Estrone		Succinylacetone	Arabinofuranose

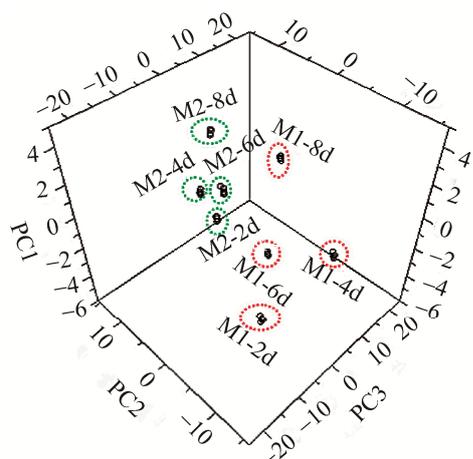


图 1. 不同培养条件下阿维菌素生物合成 PCA 得分图  
Figure 1. PCA score plots of avermectin biosynthesis production in different culture media.

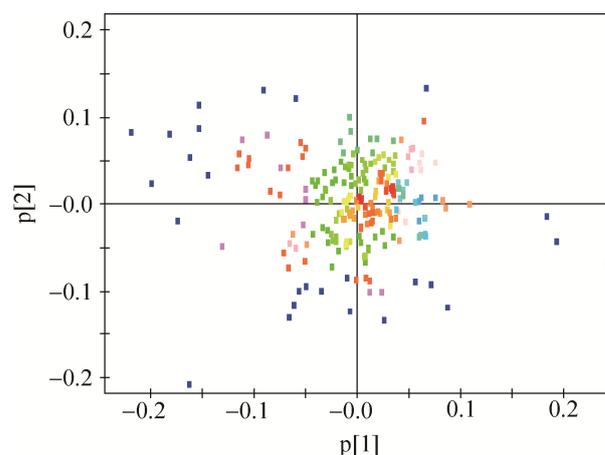


图 2. 不同培养条件下阿维菌素生物合成 PCA 载荷图  
Figure 2. PCA loading plots of avermectin biosynthesis production in different culture media.

从 PLS 得分图 3 可以看出, 40 个样品点明显被分为 8 组, 在相同培养基相同时间的样品聚集在一起, 在不同培养基于不同时间的样品分散开来, 平行样品相互聚集, 不同批次样品相互分离。进一步表明, 不同培养状态下胞内代谢物的差异是导致阿维菌素产量出现差异的主要原因。

图 4 是 PLS 分析的 VIP 图, 表明了与阿维菌素合成最相关的 26 种物质。它们分别为: 葡萄糖、6-磷酸葡萄糖、乳酸、丙酮酸、4-磷酸赤藓糖、5-磷酸木酮糖、 $\alpha$ -酮戊二酸、柠檬酸、草酰乙酸、丙酸、酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、十六烷酸、十七烷酸、油酸、未知物 1、未知物 2、未知物 3、未知物 4 和未知物 5。VIP 值越大则表明相关性越强, 对阿维菌素生物合成的贡献值越大, 一般认为, VIP > 1 则关联性较强。

### 2.3 结合代谢网络分析不同培养条件下阿维链霉菌代谢特征

为了更加直观分析和理解这 21 种关键代谢物与关键代谢途径之间的交互作用关系, 并结合 PLS 分析结果, 对阿维链霉菌分别在 M1 和 M2 培养条件下胞内代谢物相对含量变化进行深入分析, 包括糖酵解途径(EMP)、三羧酸循环(TCA)、氨基酸代谢和脂肪酸代谢等生物合成途径, 结合胞内物质的相对含量变化规律分析了影响阿维菌素生物合成的具体方式。

**2.3.1 与中心碳代谢相关的代谢物变化:** 从图 5 可知, 在 4 d 时 M1 中胞内丙酮酸的相对含量由 15.5 增长至 19.0, 乳酸的相对含量由 20.20 增长至 26.80, 而 M2 中丙酮酸和乳酸开始消耗, 丙酮酸的相对含量由 22.5 迅速下降至 8.0, 乳酸的相对含量由 30.20 迅速下降至 9.68, 同时丙酸、丙酮酸和乳酸这 3 种

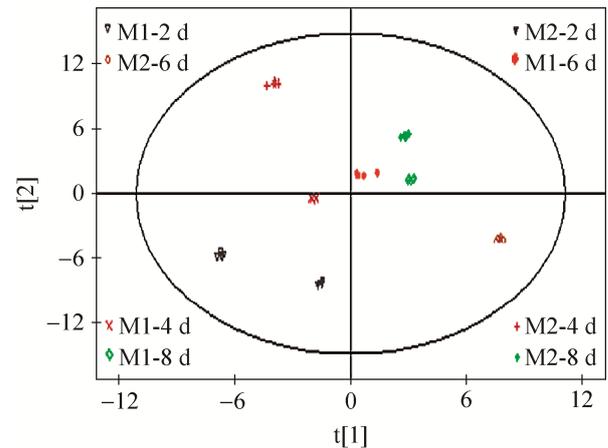


图 3. 不同培养条件下阿维菌素生物合成 PLS 得分图  
Figure 3. PLS score plots analysis of avermectin biosynthesis process.

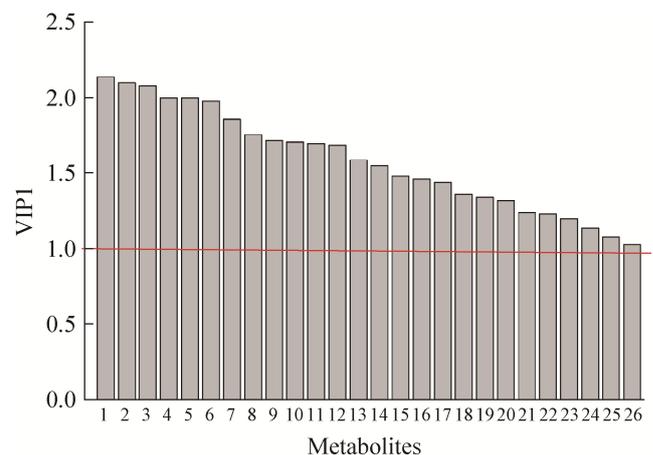


图 4. 胞内代谢物第一主成分 VIP 图  
Figure 4. Variable importance of the projection plots for intracellular metabolites along component 1 (VIP1) plot generated by PLS. X-axis represents each metabolite. 1: glucose; 2: glucose-6-phosphate; 3: lactose; 4: pyruvic acid; 5: erythrose-4-phosphate; 6: xylulose-5-phosphate; 7:  $\alpha$ -ketoglutaric acid; 8: citric acid; 9: oxaloacetic acid; 10: propionic acid; 11: tyrosine; 12: leucine; 13: phenylalanine; 14: threonine; 15: lysine; 16: proline; 17: valine; 18: isoleucine; 19: hexadecanoic acid; 20: heptadecanoic acid; 21: oleic acid; 22: unknown 1; 23: unknown 2; 24: unknown 3; 25: unknown 4; 26: unknown 5.

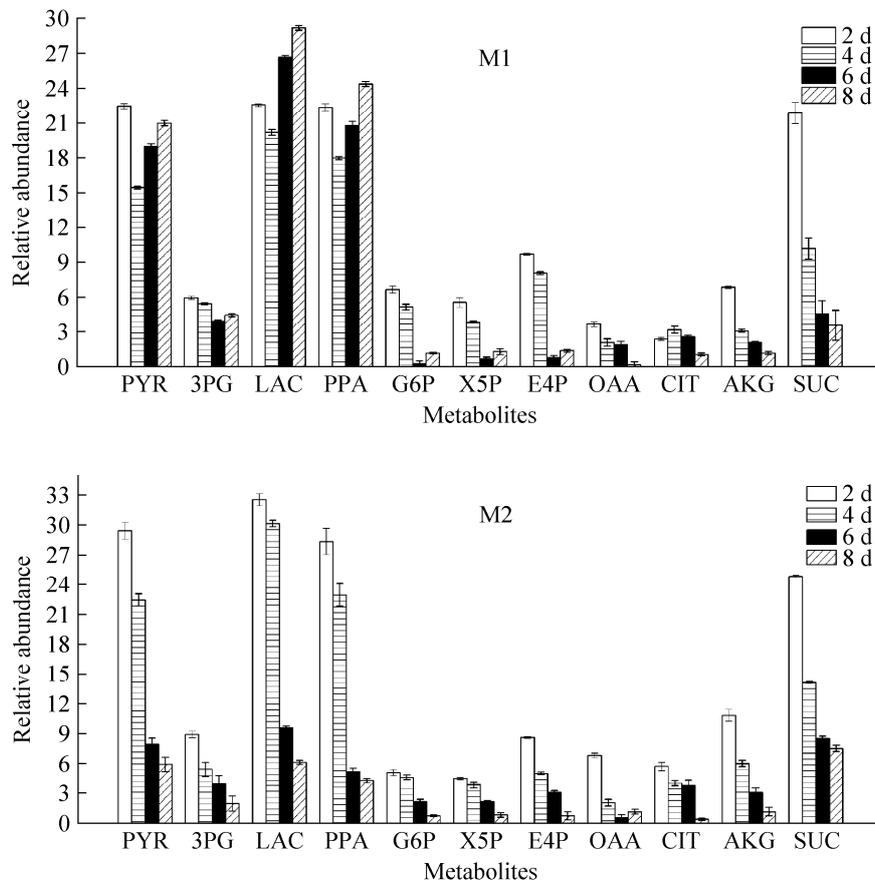


图 5. M1 和 M2 发酵条件下中心碳代谢的胞内代谢物水平

Figure 5. Variations of metabolites associated with glycolysis pathway in different culture media. PYR: pyruvic acid; 3PG: 3-phosphoglyceric acid; LAC: lactic acid; PPA: propionic acid; G6P: glucose-6-phosphate; X5P: xylulose-5-phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; OAA: oxaloacetic acid; CIT: citric acid; AKG:  $\alpha$ -oxoglutarate; SUC: succinic acid. Each value is the mean of five replicates  $\pm$  SD.  $P < 0.05$ .

物质之间的变化趋势相同，丙酮酸流向乳酸、丙酸或者通过乙酰 CoA 进入 TCA 循环，这些物质之间彼此竞争。4 d 之后丙酮酸、乳酸和丙酸的相对含量迅速下降，表明 M2 培养下更多的丙酮酸和乳酸转化成了乙酰 CoA，而乙酰 CoA 是合成阿维菌素最直接的前体<sup>[15]</sup>，这可能是 M2 比 M1 高产的原因之一。在 M1 中，4 d 之后丙酮酸、乳酸、丙酸的相对含量出现增加的现象，而 HMP 代谢途径中的赤藓糖-4-磷酸和木酮糖-5-磷酸的相对含量在 4 d 后迅速下降并接近于零，这种现象可以被

认为是细胞对自身代谢流的一种调整。在 M2 培养下，柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、草酰乙酸的相对含量均比 M1 高，表明 M2 培养下的 TCA 循环要增强。

**2.3.2 与氨基酸代谢相关的代谢物变化：**图 6 表明，除芳香族氨基酸外，M2 中的氨基酸含量要高于 M1，特别是缬氨酸、异亮氨酸、苏氨酸。2 d 时 M2 中的缬氨酸、L-异亮氨酸、苏氨酸分别是 M1 中 1.49 倍、2.46 倍和 2.68 倍，4 d 时 M2 中的缬氨酸、L-异亮氨酸、苏氨酸分别是 M1 中 1.96 倍、

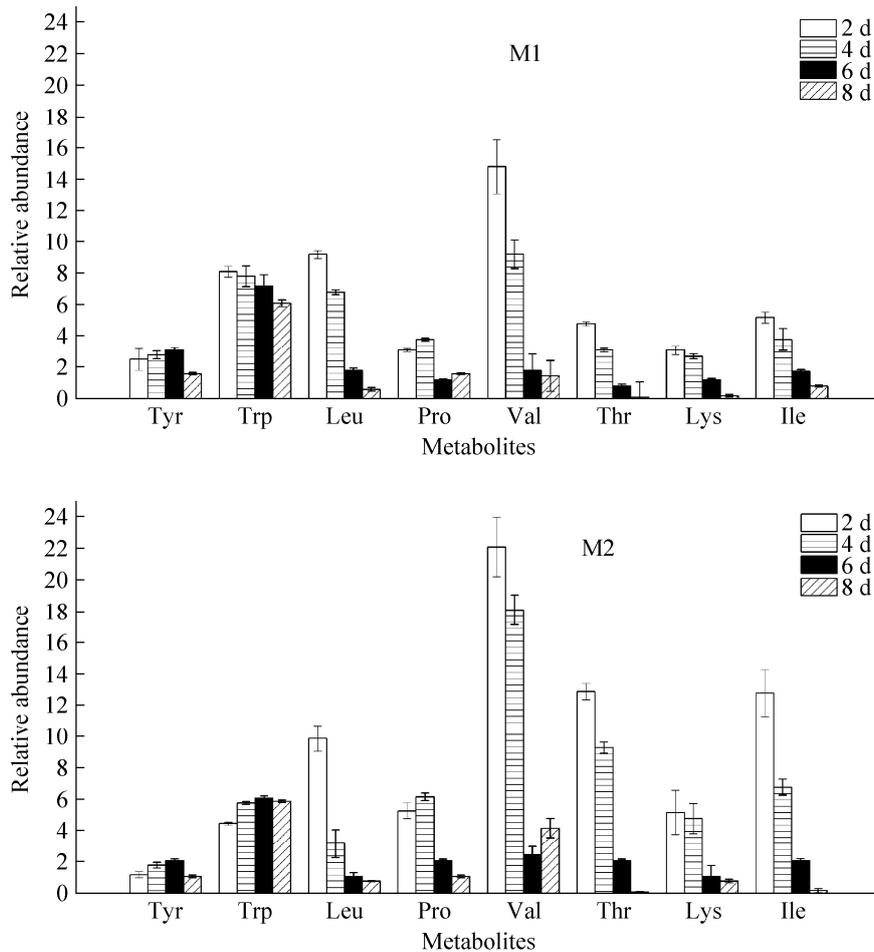


图 6. M1 和 M2 培养条件下阿维链霉菌胞内氨基酸含量的变化

Figure 6. Variations of amino acids identified in *S. avermitilis* in different culture media. Tyr: tyrosine; Trp: tryptophane; Leu: leucine; Pro: proline; Val: valine; Thr: threonine; Lys: lysine; Ile: isoleucine. Each value is the mean of five replicates $\pm$ SD.  $P < 0.05$ .

1.79 倍和 3 倍，同时在阿维菌素快速合成时期，它们的含量均迅速下降。在阿维菌素生物合成过程中，需要大量的前体物质 2-甲基丁酰辅酶 A(MB-CoA)、2-甲基丙二酰辅酶 A(MM-CoA)和丙二酰辅酶 A(Malonyl-CoA)，苏氨酸可以转化成 L-异亮氨酸，而氨基酸特别是 L-异亮氨酸和缬氨酸可转化为 MB-CoA，进而再转化为 MM-CoA 和 Malonyl-CoA，并且其他几种支链氨基酸也可以在微生物细胞内转化成丙酰 CoA<sup>[16-17]</sup>，丙酰 CoA 通过羧化和转羧基反应，生成 MM-CoA，因此，

M1 与 M2 中缬氨酸、异亮氨酸、苏氨酸差异比较明显，可能是导致阿维菌素产量产生差异的主要原因。

**2.3.3 与脂肪酸代谢相关的代谢物的变化：**阿维菌素属于聚酮类抗生素，脂肪酸在其生物合成中直接相关。研究表明大多聚酮类与脂肪酸合成基因来源于共同祖先，从生物进化上来看，两者具有共同的起源<sup>[18]</sup>。如图 7 所示，M2 条件下胞内十六烷酸、十七烷酸和油酸代谢水平显著高于 M1 条件下的这 3 种脂肪酸的水平，并且在 4 d 时胞内

脂肪酸的含量最大，在阿维菌素快速合成期，这3种脂肪酸的相对含量都有显著下降。Novák 等<sup>[18]</sup>在研究脂肪酸对阿维菌素发酵影响实验中发现，脂肪酸分解产生的短链脂肪酸可以作为阿维菌素生物合成的前体，对阿维菌素的生物合成具有促进作用。因此在 M2 条件下，高浓度的脂肪酸对阿维菌素合成具有促进作用。所以在后期优化实验中，可以以脂肪酸类物质为调控的关键节点，考虑在培养基中添加脂质类物质以提高阿维菌素产量。

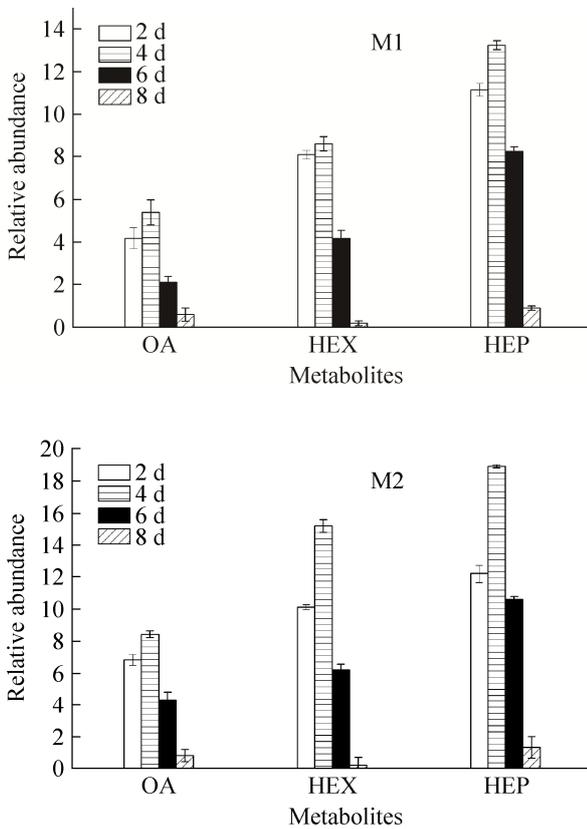


图 7. M1 和 M2 发酵条件下阿维链霉菌胞内脂肪酸含量的变化

Figure 7. Variations of fatty acids identified in *S. avermitilis*. HEX: hexadecanoic acid; HEP: heptadecanoic acid; OA: oleic acid. Each value is the mean of five replicates $\pm$ SD.  $P < 0.05$ .

## 2.4 代谢轮廓分析指导下的理性强化

### 2.4.1 中心碳代谢途径(EMP, PPP, TCA)理性强化：

在 M2 培养基中分别添加 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 的乳酸和丙酮酸，强化 EMP 途径，并对每种添加浓度和添加时间(0、12、24、36、48 和 60 h)进行优化。如图 8 所示，在 36 h 添加 0.5 g/L 的乳酸，

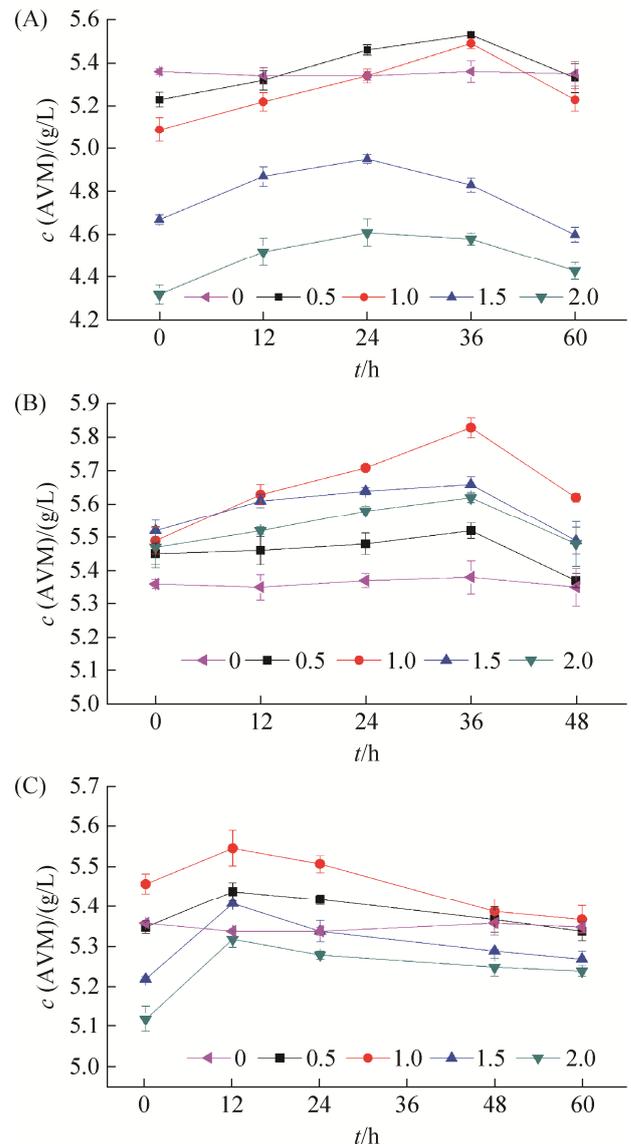


图 8. 外源添加中心碳代谢物前体对阿维菌素产量的影响

Figure 8. The effect of adding precursors of central carbon metabolism on avermectin production. Each value is the mean of three replicates $\pm$ SD.  $P < 0.05$ . A: lactate; B: pyruvate; C: sodium succinate.

阿维菌素的产量最高, 从原来的 5.36 g/L 提高到了 5.53 g/L。添加的乳酸超过 1.0 g/L 后, 对阿维菌素的合成具有抑制作用, 这可能是因为一定量的乳酸在胞内积累会导致细胞质酸化和胞内酸根离子的聚集, 使得糖酵解相关的酶也受到显著抑制, 而不利于菌体的生长和阿维菌素的合成<sup>[19]</sup>。在培养基中添加不同浓度的丙酮酸均能提高阿维菌素的产量, 特别是在 36 h 添加 1.0 g/L 的丙酮酸, 阿维菌素的产量达到最高, 从原来的 5.36 g/L 提高到 5.83 g/L。在 M2 培养基中, 分别添加 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 的琥珀酸钠, 并对每种添加浓度进行添加时间(0、12、24、48 和 60 h)优化, 以强化 TCA 循环。当在 12 h 添加 1.0 g/L 的琥珀酸钠时, 阿维菌素的产量最高, 从原来的 5.36 g/L 提高到了 5.55 g/L。当 48 h 以后添加琥珀酸钠, 阿维菌素的产量几乎没有变化, 这说明添加时间对于营养的外源添加非常的重要。

**2.4.2 氨基酸代谢途径的理性强化:** 根据代谢组学分析, 胞内氨基酸特别是苏氨酸、异亮氨酸和缬氨酸被认为是控制阿维菌素合成的关键瓶颈。

在 M2 培养基中分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 的苏氨酸、异亮氨酸和缬氨酸, 并对添加时间进行优化。图 9 结果显示, 缬氨酸和异亮氨酸均可以明显提高阿维菌素的产量, 异亮氨酸的最适添加时间为 72 h, 苏氨酸和缬氨酸的最适添加时间为 96 h, 而且当 96 h 添加终浓度为 1.5 g/L 的缬氨酸时, 阿维菌素的产量为 5.75 g/L, 当 72 h 添加 1.5 g/L 异亮氨酸时, 阿维菌素的产量为 5.68 g/L。

**2.4.3 脂肪酸代谢途径的理性强化:** 在 M2 培养基中分别添加 0.5、1.5、1.0、2.0 g/L 的豆油, 强化脂肪酸途径, 并对每种添加浓度的添加时间(0、24、48、72、96 h)进行优化。图 10 结果显示, 在 0 h 以后添加 1.5 g/L 和 2.0 g/L 的豆油时, 目标产

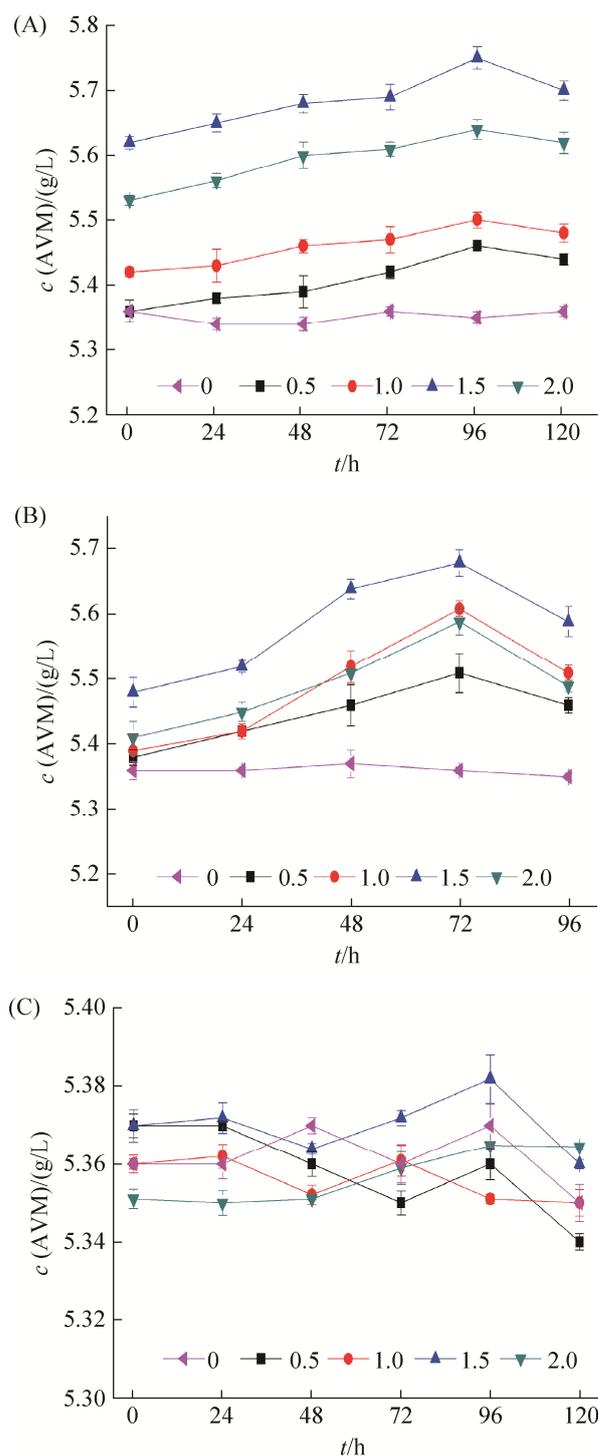


图 9. 外源添加氨基酸代谢物前体对阿维菌素产量的影响

Figure 9. The effect of adding precursors of amino acid metabolism on avermectin production. Each value is the mean of three replicates $\pm$ SD.  $P < 0.05$ . A: valine; B: isoleucine; C: threonine.

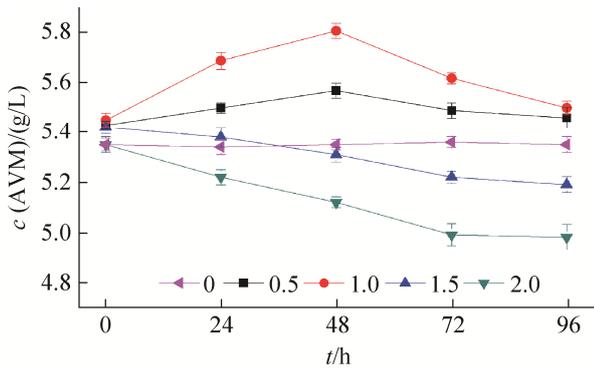


图 10. 外源添加豆油对阿维菌素产量的影响

Figure 10. The effect of adding soybean oil on avermectin production. Each value is the mean of three replicates  $\pm$ SD.  $P < 0.05$ .

物阿维菌素产量没有提高,反而下降,这可能是由于细胞膜的成分主要是酯类物质,培养基中过量的脂肪酸会溶解酯类物质使细胞膜溶解破裂,造成菌体生长受到抑制甚至死亡;在 48 h 时添加 1.0 g/L 的豆油时,阿维菌素的产量最高,达到 5.81 g/L。

**2.4.4 M2 组合优化及 M3 培养基验证:**在 M2 培养基的基础上,为了从总体上使更多的初级代谢物流向阿维菌素的前体,通过理性添加得到培养基 M3:在 12 h 添加 1.0 g/L 的琥珀酸钠,36 h 添加 0.5 g/L 的乳酸和 1.0 g/L 丙酮酸,48 h 添加 1.0 g/L 的豆油,72 h 添加 1.5 g/L 异亮氨酸,96 h 添加 1.5 g/L 的缬氨酸。结果如图 11 所示,M3 培养基中阿维菌素的产量为 5.92 g/L,与原来的 5.36 g/L 相比提高了 10.4%。

### 3 讨论

由比较代谢组学分析发现,在 M2 培养下,阿维链霉菌糖酵解途径(EMP)、三羧酸循环(TCA)、氨基酸代谢和脂肪酸代谢水平整体高于 M1,磷酸戊糖途径(HMP)代谢水平要低于 M1。说明阿维链霉菌在两种培养条件下,胞内代谢的

确存在着差异,而这种差异导致了 M2 产阿维菌素比 M1 高。通过 PCA 与 PLS 的多元统计分析得知,很有可能是葡萄糖、6-磷酸葡萄糖、乳酸、丙酮酸、4-磷酸赤藓糖、5-磷酸木酮糖、 $\alpha$ -酮戊二酸、柠檬酸、草酰乙酸、丙酸、酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、十六烷酸、十七烷酸和油酸导致了代谢的差异。胞内氨基酸如苏氨酸、异亮氨酸和缬氨酸在阿维菌素的合成过程中被快速消耗,被认为是控制阿维菌素合成的关键瓶颈。乳酸、丙酮酸、柠檬酸则对 TCA 和 EMP 循环代谢途径的影响较大,通过增加这些物质,可以加强 TCA 循环和 EMP 循环,从而产生更多阿维菌素前体。沈兆兵等<sup>[20]</sup>研究了豆油在红霉素发酵过程中的作用机制,油类物质可以提高细胞内脂肪酸水平。豆油在阿维菌素合成中,一方面可减缓细胞内脂肪酸合成与阿维菌素合成的竞争作用,另一方面使更多的脂肪酸进入  $\beta$  氧化途径生成乙酰-CoA,用于阿维菌素的合成。

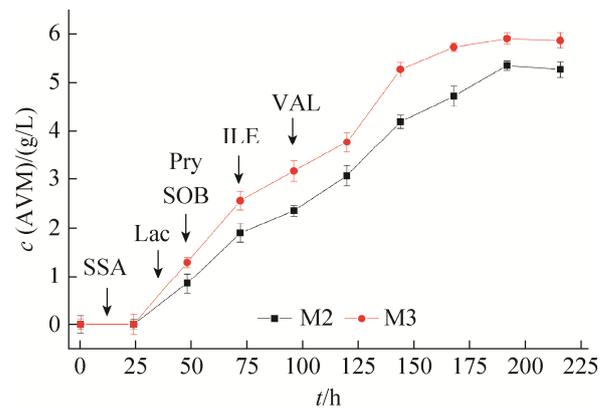


图 11. 不同培养基(M2 和 M3)条件下阿维菌素产量的动态变化

Figure 11. The dynamic changes of avermectin production in M2 and M3. SSA: succinic acid disodium salt, LAC: lactic acid, PYR: pyruvic acid, SOB: soybean oil, ILE: isoleucine, VAL: valine. Each value is the mean of three replicates  $\pm$ SD.  $P < 0.05$ .

对于目标产物阿维菌素的合成具有正效应的物质, 以提高这几种代谢物胞内浓度进而改进代谢途径更多地向目的产物流入为切入点, 提出了对 M2 培养基的改进策略。通过外源前体添加得到 M3 培养基, 阿维菌素的产量比 M2 提高了 10.4%, 达到了 5.92 g/L。

本实验结果表明, 多元统计关于关键代谢物的假设同理性添加策略得到的结果几乎完全一致, 进一步证实了代谢组学对于微生物胞内代谢物分析的可靠性。

## 致谢

本研究在菌种等诸多方面得到了中国科学院微生物研究所张立新研究员的大力支持, 在此表示衷心感谢!

## 参考文献

- [1] Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Ōmura S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1979, 15(3): 361-367.
- [2] Yoon YJ, Kim ES, Hwang YS, Choi CY. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 626-634.
- [3] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, Ōmura S. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(17): 9509-9514.
- [4] Chen JS, Liu M, Liu XT, Miao J, Fu CZ, Gao HY, Müller R, Zhang Q, Zhang LX. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2016, 1(1): 7-16.
- [5] Ryu YG, Butler, MJ, Chater KF, Lee KJ. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7132-7139.
- [6] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008, 76(5): 965-977.
- [7] Gao H, Liu M, Liu JT, Dai HQ, Zhou XL, Liu XY, Zhuo Y, Zhang WQ, Zhang LX. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2009, 100(17): 4012-4016.
- [8] Ding MZ, Zhou X, Yuan YJ. Metabolome profiling reveals adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* during repeated vacuum fermentations. *Metabolomics*, 2010, 6(1): 42-55.
- [9] Bo T, Liu M, Zhong C, Zhang Q, Su QZ, Tan ZL, Han PP, Jia SR. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of  $\epsilon$ -poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(19): 4454-4465.
- [10] Guo G, Tian PP, Tang D, Wang XX, Yang HJ, Cao P, Gao Q. Metabolomics analysis between wild-type and industrial strains of *Streptomyces avermitilis* based on gas chromatography-mass spectrometry strategy//Zhang TC, Nakajima M. *Advances in applied biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer, 2015: 477-485.
- [11] Guo G, Tang D, Tian PP, Shi XF, Cao P, Gao Q. Optimized sample preparation for metabolome studies on *Streptomyces avermitilis* by GC-MS. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(5): 61-67. (in Chinese)  
郭刚, 唐丹, 田萍萍, 石秀峰, 曹鹏, 高强. 基于 GC-MS 的阿维链霉菌代谢物组学研究方法的建立. *生物技术通报*, 2015, 31(5): 61-67.
- [12] Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(1/2): 155-171.
- [13] Aa JY. Analysis of metabolomic data: principal component analysis. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 15(5): 481-489. (in Chinese)  
阿基业. 代谢组学数据处理方法-主成分分析. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(5): 481-489.
- [14] Wold S, Geladi P, Esbensen K, Öhman J. Multi-way principal components-and PLS-analysis. *Journal of Chemometrics*, 1987, 1(1): 41-56.
- [15] Dikbas N. Determination of antibiotic susceptibility and fatty acid methyl ester profiles of *Bacillus cereus* strains

- isolated from different food sources in Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(11): 1641-1647.
- [16] Dotzlaf JE, Metzger LS, Foglesong MA. Incorporation of amino acid-derived carbon into ty lactone by *Streptomyces fradiae* GS14. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984, 25(2): 216-220.
- [17] Chen TS, Inamine ES. Studies on the biosynthesis of avermectins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 270(2): 521-525.
- [18] Novák J, Hájek P, Rezanka T, Vaněk Z. Nitrogen regulation of fatty acids and avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 72(1): 57-61.
- [19] Madden T, Ward JM, Ison AP. Organic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources. *Microbiology*, 1996, 142(11): 3181-3185.
- [20] Shen ZB, Chen GH, Chen CH. Study on effect of soybean oil on fermentation of erythromycin and its mechanism. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31(11): 657-660. (in Chinese)
- 沈兆兵, 陈国豪, 陈长华. 豆油在红霉素发酵中的作用及作用机制的研究. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(11): 657-660.

## Enhanced avermectin production by rational feeding strategies based on comparative metabolomics

Peng Cao, Dong Hu, Jun Zhang, Bianqiang Zhang, Qiang Gao\*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** [Objective] In order to reveal key metabolites and metabolic pathways of avermectin, comparative metabolomics approach was used to analyze the difference of key intracellular metabolites of *Streptomyces avermitilis* in different fermentation media. Then the rational feeding approach was used to enhance avermectin production. [Methods] Mycelial samples in M1 and M2 media were analyzed by GC-MS based comparative intracellular metabolomics. Based on the deficiency of relative metabolic pathways, single precursor supplement and combined precursors supplement were exerted, and the optimized medium M3 was obtained to enhance avermectin production. [Results] In total 232 intracellular metabolites were identified and 70 of them were accurately matched, and 21 metabolites influencing avermectin biosynthesis were finally verified by PCA and PLS analyses. Among them, lactic acid, pyruvic acid, succinic acid, threonine, isoleucine, valine and lipids determined the avermectin titer more obviously. When supplying with these precursors together to M2 at different time points, the titer increased by 10.4% from 5.36 g/L to 5.92 g/L. [Conclusion] The production of avermectin increased apparently with the help of comparative metabolomics analysis and rational feeding optimization. It also provides a new approach to enhance the yield of bioproducts.

**Keywords:** *Streptomyces avermitilis*, avermectin, metabolomics, rational feeding

(本文责编：张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program (973 Program) of China (2013CB734004) and by the National Natural Science Foundation of China (31370075, 31471725)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-60602715; E-mail: gaoqiang@tust.edu.cn

Received: 18 July 2016; Revised: 7 September 2016; Published online: 18 September 2016