

· 工业生物技术 ·

比较代谢组学分析阿维拉霉素高产突变株代谢途径

吴江雪, 刘华华, 陈敏*, 徐俊辰, 季雯艳

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

吴江雪, 刘华华, 陈敏, 徐俊辰, 季雯艳. 比较代谢组学分析阿维拉霉素高产突变株代谢途径[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1868-1881.

WU Jiangxue, LIU Huahua, CHEN Min, XU Junchen, JI Wenyan. Comparative metabolomics analysis of metabolic pathways in the high-yielding mutant strain of avilamycin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1868-1881.

摘要: 阿维拉霉素(avilamycin, AVI)是一种寡糖类抗生素, 因其具有较强的革兰氏阳性细菌抑制能力, 被广泛应用于畜禽养殖。但传统的育种技术与不成熟的发酵工艺已成为限制其国产化的关键因素。基于已获得的利用核糖体工程技术改造的高产阿维拉霉素突变菌株, 本研究采用比较代谢组学技术探究其与出发菌株的胞内代谢差异。利用 GC-MS 技术对发酵至第 4、6、8 天的菌丝体进行分析, 共检测出 112 种化合物, 经 NIST 谱库对比后精确匹配到 29 种胞内代谢物。二维主成分分析(principal component analysis, PCA)表明突变菌株与出发菌株的不同时间点代谢物有明显差异, 通过正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)得到 11 种胞内差异代谢物。KEGG 代谢通路富集显示阿维拉霉素的合成主要与碳水化合物代谢和氨基酸代谢密切相关, 且进一步筛选出 6 种关键差异代谢物: L-缬氨酸、L-丝氨酸、L-丙氨酸、D-半乳糖、D-纤维二糖和 D-葡萄糖。突变菌株中这些代谢物的上调增强了其代谢流, 使其在罐上发酵 8 d 时, 阿维拉霉素产量较出发菌株提高 76.86%。本研究的开展为后续阿维拉霉素发酵工艺理性优化提供了参考。

关键词: 代谢组学; 阿维拉霉素; 差异代谢物; 代谢途径

资助项目: 浙江省科技厅专项项目基金(LGN18C010001); 校企合作研发项目(2023330101001582); 浙江省“十四五”省级大学生校外实践基地建设项目(浙教办函[2023] 41 号); 国家一流专业平台项目(1110XJ0520120)

This work was supported by the Special Project Foundation of Zhejiang Provincial Department of Science and Technology (LGN18C010001), the Cooperative Research and Development Project of College and Institution (2023330101001582), the Zhejiang Province “14th Five-year” Provincial College Students’ Off-campus Practice Education Base Construction Project (Zhejiang Education Office Letter [2023] No. 41), and the National First-class Professional Platform Project (1110XJ0520120).

*Corresponding author. Tel: +86-571-28008970, E-mail: chenmin@mail.zjgsu.edu.cn

Received: 2023-10-10; Accepted: 2024-01-17

Comparative metabolomics analysis of metabolic pathways in the high-yielding mutant strain of avilamycin

WU Jiangxue, LIU Huahua, CHEN Min*, XU Junchen, JI Wenyan

College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: Avilamycin (AVI) is an oligosaccharide antibiotic that has strong inhibitory effect on Gram-positive bacteria. It is widely used in livestock and poultry farming. However, the use of traditional breeding techniques and immature fermentation process have become the key factors limiting its commercialization. In this study, we used comparative metabolomics techniques to examine the difference in intracellular metabolism between a high-yield AVI mutant strain modified by ribosome engineering technology and the parental strain. GC-MS analysis was conducted on mycelia samples taken on days 4, 6, and 8 of fermentation, resulting in the detection of a total of 112 compounds. After comparison with the NIST library, 29 intracellular metabolites were accurately identified. Two-dimensional principal component analysis (PCA) revealed significant differences in metabolites between the mutant strain and the parental strain at different time points. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) identified 11 intracellular metabolites that were closely related to AVI biosynthesis. KEGG metabolic pathway enrichment analysis showed that avilamycin synthesis was closely related to carbohydrate metabolism and amino acid metabolism. Six key differential metabolites were selected: L-valine, L-serine, L-alanine, D-galactose, D-cellobiose, and D-glucose. Upregulation of these metabolites in the mutant strain enhanced its metabolic flow for AVI synthesis. After 8 days of fermentation, the mutant strain produced 76.86% more AVI than the parental strain. The findings of this study serve as reference for the future rational optimization of avilamycin fermentation.

Keywords: metabolomics; avilamycin; differential metabolites; metabolic pathways

阿维拉霉素又名卑霉素、肥拉霉素，是由一个双氯晚霉素酸分子(残基 A)和 7 个糖链残基(残基 B、C: D-橄榄糖; 残基 D: 2-脱氧-D-异缬氨酸酚酞糖; 残基 E: 4-氧甲基-D-岩藻糖; 残基 F: 2,6-双氧甲基-D-甘露糖; 残基 G: 2-氧异丁酰基-L-来苏糖; 残基 H: 甲基 Eurekaate)组成的一种寡糖类抗生素。它是由绿色产色链霉菌分泌的胞内产物, 作为一种蛋白质抑制剂, 通过阻遏细菌蛋白质的合成, 进而抑制革兰氏阳性细菌的生长。我国农业农村部于 2002 年批

准进口^[1], 已被广泛应用于畜禽类养殖中。阿维拉霉素共有 A-N 共 14 种组分, 其中组分 A 的活性最高, 可达到 1 451 U/mg, 其次是 B 组分, 活性约为 908 U/mg^[2]。1997 年, Gaisser 等^[3]完成了阿维拉霉素生物合成基因簇的测序。之后, Weitnauer 等^[4]率先从绿色产色链霉菌中解读出长为 60 kb 的 DNA 片段, 包括阿维拉霉素合成基因簇。随着对阿维拉霉素及其生产菌的深入研究, 目前其合成过程基本已被阐明。

代谢组学技术是一种通过考察生物体受刺

激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后)代谢产物的变化来研究生物体代谢途径的技术。作为系统生物学的重要组成部分,代谢组学能够对生物体内广谱代谢产物进行定量分析,通过不同条件下代谢产物的变化,从而明确生物体不同代谢产物与相应生理、病理状态的关系^[5]。随着微生物代谢组学技术的发展,通过比较不同条件下微生物代谢物的差异来优化发酵过程和提高发酵目标产物得率逐渐成为趋势。曹鹏等^[6]利用比较代谢组学方法,研究不同发酵培养条件下阿维链霉菌的胞内代谢产物差异,揭示了其关键代谢产物及代谢途径,使阿维菌素的产量增加 10.4%。刘桂君等^[7]在对虫草素的合成途径研究中比较了蛹虫草出发菌株 CM08、高产虫草素正突变菌株 CM09 和低产虫草素负突变菌株 CM10 等 3 种不同菌株的代谢物差异,最后得到共有差异代谢物 30 种,基于此初步推测了虫草素的合成路径。

现阶段,阿维拉霉素的生产技术受国外公司的控制与垄断,国内尚未实现阿维拉霉素的工业化生产,阿维拉霉素发酵产量较低仍然是限制其工业化生产的主要因素。本研究基于对阿维拉霉素突变菌株和出发菌株上罐发酵过程中胞内代谢物的分析,结合已报道的阿维拉霉素合成途径,深入分析突变菌株高产 AVI 机制,为阿维拉霉素发酵工艺优化提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 菌种

出发菌株:本实验室选育保藏的绿色产色链霉菌菌株(*Streptomyces viridoehrongenes*) 77。

高产突变菌株:*S. viridoehrongenes* gs77 经核糖体工程选育后获得,命名为 *S. viridoehrongenes* gs77-54。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):琼脂 20.0,可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 5.0, K₂HPO₄ 2.5, MgSO₄·7H₂O 2.5, NaCl 2.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, pH 7.2-7.4。

种子培养基(%):酵母粉 0.25,葡萄糖 0.5,黄豆饼粉 1.5,麦芽糊精 2.0, CaCO₃ 0.1, CaCl₂ 0.2, 灭菌前 pH 调至 7.5-7.7。

发酵培养基(%):大豆油 1.0,甘露醇 2.5,葡萄糖 1.8,黄豆饼粉 1.25,玉米淀粉 4.0, CaCl₂ 1.8, CaCO₃ 0.5, NaCl 0.1, NaNO₃ 0.45, MnCl₂ 0.002, FeSO₄·7H₂O 0.002, MgSO₄·7H₂O 0.002, ZnSO₄ 0.002, CuSO₄ 0.001, CoCl₂ 0.001, (NH₄)₂SO₄ 0.02,消泡剂 0.03,灭菌后 pH 调至 7.2。

1.3 主要仪器和试剂

5 L 机械搅拌通风立式发酵罐,上海赛多生物工程有限公司;SHP-250 生化培养箱、DELTA320 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺、甲氧基胺盐酸盐等由上海麦克林生化科技有限公司提供。

1.4 培养方法

将 *S. viridoehrongenes* gs77-54 菌株和 *S. viridoehrongenes* gs77 菌株经平板培养 10 d 左右,无菌操作切 1 cm² 菌种块接种至含有 30 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,180 r/min、28 °C 下摇床培养 24 h 得到一级种子培养液。再将一级种子按接种量 10% (体积分数)接种到含有 100 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中,继续 180 r/min、28 °C 下摇床培养 24 h 得到二级种子。再将该二级种子液以 10% (体积分数)的接种量分别接入到含 3 L 发酵培养基的 2 个 5 L 发酵罐中培养 8 d,控制搅拌转速、通气量等条件一致。每天取样测定 pH、菌浓、阿维拉霉素,4、6、8 d 时取样测定胞内代谢产物。

1.5 分析方法

1.5.1 pH 值测定

取样后,直接使用 pH 计进行测定。

1.5.2 菌浓测定

取样后,取一定量体积的发酵液经 8 000 r/min 离心 5 min 后准确测量上清液体积为 V_1 , 发酵液初始体积为 V_2 。

菌浓(%)= $(V_2 - V_1)/V_2 \times 100\%$ 。

1.5.3 总糖浓度测定

采用 DNS 法测定发酵液上清中总糖浓度^[8]

1.5.4 HPLC 法测定阿维拉霉素含量

样品处理:取样后用移液管量取一定体积的发酵液,按照发酵液:甲醇=1:5 (体积比)于 37 °C 过夜浸提后备用。

HPLC 检测条件^[9]:柱型为依利特 C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(色谱级):0.2%磷酸二氢铵=51:49 (体积比), 检测流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 214 nm, 进样量为 20 μL, 柱温箱温度为 30 °C, 检测时间为 35 min。

1.5.5 胞内小分子代谢物的提取及衍生化^[10]

菌体制备:取 30 mL 发酵液,8 000 r/min、4 °C 离心 5 min 后弃去上清液,接着加入 30 mL 蒸馏水进行旋涡振荡,8 000 r/min、4 °C 离心 5 min。重复洗涤 3 次,备用。

胞内代谢物提取条件:取适量液氮加入菌丝体中淬灭并研磨至细粉状(研磨过程中添加 2 次液氮),称取 2.0 g 粉末于 1 号 50 mL 离心管中,样品加入 40 mL 预冷的氯仿:甲醇:水溶液(2:2:1, 体积比),涡旋振荡均匀,28 °C 浸提 3 h; 10 000 r/min、4 °C 离心 5 min 后取上清置于 2 号离心管。然后向 1 号离心管中加入适量液氮冻融挥干,重复 3 次。接着将 2 号管中的上清液倒入 1 号管中,涡旋振荡均匀,28 °C 浸提 3 h。最后,10 000 r/min 离心 5 min,取上清备用。

样品衍生化:取 2 mL 上清于 EP 管中氮吹、衍生。采用 N-甲基-N-(三甲基硅烷)三氟乙酰胺[N-methyl-N-(trimethylsilane)trifluoroacetamide, MSTFA]法对样品进行衍生化,加入 50 μL 甲基铵盐酸盐/吡啶溶液(20 mg/mL)到 EP 管中,充分混合后置于 40 °C 水浴中反应 80 min;再加 80 μL MSTFA,轻微摇晃混合均匀,封口膜密封置于 40 °C 水浴中,反应 80 min,向 EP 管中加入 400 μL 吡啶溶液进行稀释,室温放置 2 h,稀释液经过 0.22 μm 膜过滤加入进样瓶中,进行 GC-MS 检测。

1.5.6 GC-MS 检测条件

GC 条件:Agilent HP5 30 m×0.25 mm×0.25 μm 毛细管柱,进样口温度为 280 °C。升温程序:初始温度 70 °C 保持 2 min,以 5 °C/min 程序升温至 290 °C 保持 5 min。载气:高纯氦气,恒压模式 91 kPa,流速 1 mL/min。进样量 1 μL,柱后分流比 10:1。

MS 条件:接口温度为 280 °C;电离方式:电子轰击电离(electrons bombard ionization, EI+);离子源温度:250 °C;电子轰击能量为 70 eV;电子电流:40 μA;扫描质量范围:50–800 *m/z*。

1.5.7 小分子代谢物的定性、定量分析

利用 Mzmine 进行 GC-MS 数据解谱和峰对齐,通过 AMDIS 库进行去卷积,一般认为峰宽 2.0 s 以上、信噪比在 10 以上的峰,即为代谢物峰。将 GC-MS 检测峰与质谱库 NIST 数据库进行对比,匹配得到相应的代谢产物(要求匹配度在 80 以上)。通过 GC-MS 内置程序,对所得总离子流图中的各代谢产物峰自动积分,并经手动修正,得到各个代谢物峰面积数据。

1.5.8 代谢物数据分析

使用 Metabolomics Data Analysis (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) 在线分析平台对检测到的代谢物进行二维主成

分分析(principal component analysis, PCA)和聚类热图分析。采用 R 语言 ropls 包进行正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)分析, 以 $P \leq 0.05$ 、VIP ≥ 1 的条件对代谢物进行筛选。

2 结果与分析

本研究考察了核糖体工程技术选育的一株高产阿维拉霉素的链霉素抗性突变菌株 *S. viridoehrongenes* gs77-54^[11], 以出发菌株 *S. viridoehrongenes* gs77 为对照, 对其上罐分批发酵过程中发酵参数变化、菌株代谢物进行分析, 比较两者间的差异。

2.1 两菌株发酵过程代谢曲线

如图 1 所示, 发酵至 24 h 时, 两菌株发酵液体系 pH 较初始均有略微下降, 24 h 后达到低点后开始反弹。整个发酵过程两菌株 pH 维持在 7.2–7.6 之间, 各取样点突变菌株发酵液的 pH 略高于出发菌株。分析原因是发酵初始体系中葡萄糖含量较高, 菌株处于延滞期, 糖的利

用较慢, pH 下降。之后, 菌株进入快速生长期, 体系中总糖的消耗速率明显增加, 发酵液 pH 回升, 且突变菌株发酵液中总糖较出发菌株消耗得快。发酵结束时, 出发菌株发酵体系中总糖含量为 4.8 g/L, 而突变菌株中仅为 1.9 g/L。另外, 发酵前 4 天发酵液中菌浓增长迅速, 之后缓慢增加, 趋于不变; 发酵过程中出发菌株菌浓略低于突变菌株, 发酵终点两菌株生物量接近。分析两菌株胞内产物阿维拉霉素合成情况, 发酵过程中突变菌株中的含量明显高于出发菌株; 至发酵终点, 突变株产量达到 1 962.14 mg/L, 而出发株仅为 1 109.5 mg/L。由此可见, 采用核糖体工程改造菌株, 由链霉素抗性引入的突变改变了 *S. viridoehrongenes* 的代谢过程, 使得其在相近的生物量情况下产素差异较大。

图 1 表明发酵至 4 d 时两菌株的糖消耗速率加快, 生物量增长迅速, 阿维拉霉素的产量明显增加, 且突变菌株和出发菌株的产素出现显著差异。4 d 时两菌株发酵液 pH 相差较大, 突变菌株发酵液中 pH 为 7.46, 而出发菌株中仅为 7.28。

潜媛媛等^[12]研究发现发酵液中 pH 在 7.5 左右时有利于阿维拉霉素的合成。4 d 时突变株所在的 pH 环境更有利于其产素。发酵 6 d 时, 两菌株生物量增长缓慢, 出发菌株产素减缓, 而突变菌株仍在迅速增长, pH 几乎不发生变化。因此, 选择发酵至第 4、6、8 天的菌丝体样品进行代谢组学分析。

2.2 GC-MS 检测发酵过程中胞内代谢物

根据 1.5.5 的方法对 *S. viridoehrongenes* gs77-54 与 *S. viridoehrongenes* gs77 菌株的 3 个取样点菌丝体分别进行代谢物提取、衍生及检测分析。GC-MS 检测到共有有效峰 137 个, 其中 112 种是已知化合物; 通过 NIST 谱库精确匹配到 42 种共有胞内代谢物, 其中氨基酸类 11 种, 糖类

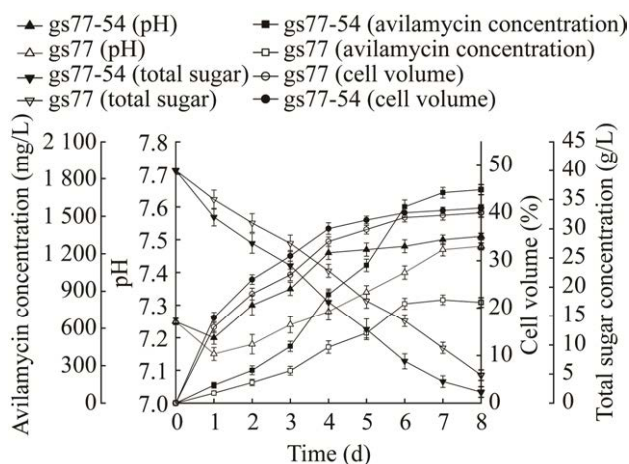


图 1 绿色产色链霉菌 gs77-54 与绿色产色链霉菌 gs77 菌株发酵过程曲线

Figure 1 Fermentation profiles of *Streptomyces viridoehrongenes* gs77-54 and *Streptomyces viridoehrongenes* gs77 strains.

9 种, 脂肪酸类 6 种, 有机酸类 4 种, 其他类物质 12 种(包括醇类、核酸类), 结果见表 1。

表 1 表明, GC-MS 检测到的小分子代谢物基本覆盖了阿维拉霉素合成中的糖酵解(Embden-Meyerhof-Parnas, EMP)途径、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、氨基酸代谢和脂肪酸代谢等生物合成途径。对这些途径中的关键代谢物进行多元化统计分析, 可有效反映目标菌株在发酵产阿维拉霉素时不同的胞内代谢状态。

表 1 GC-MS 检测到的两菌株共有胞内代谢物
Table 1 Intracellular metabolites identified by GC-MS

Classification	Identified metabolites	
Amino acids	L-alanine	L-valine
	Glycine	L-serine
	L-glutamic acid	L-threonine
	Pyroglutamic acid	L-lysine
	L-5-oxoproline	Glycylglutamic acid
	L-tyrosine	
	Organic acids	Pentanedioic acid
	Butanedioic acid	D-gluconic acid
Fatty acids	Palmitic acid	Stearic acid
	Pentadecanoic acid	Heptadecanoic acid
	Oleic acid	β -gentiobiose
		Maltose
Saccharides	Sucrose	
	D-glucose	3- α -mannobiose
	D-(+)-cellobiose	D-(+)-trehalose
	Galactinol	D-galactose
	β -gentiobios	
	Others	Inositol
	Cyclhexene	2-D-glucopyranosidronic acid
	Glycerol	L-threitol
	Ethanolamine	Ribonic acid
	D-glucitol	Xylitol
	Glycerol monostearate	Maltitol

2.3 多元统计分析两菌株胞内代谢物

对检测到的两菌株共有胞内代谢物进行无监督的二维主成分分析, 由图 2 的 PCA 得分图可知 2 个主成分共解释 85% 的差异, 其中横坐标 PC1 解释 59.4%, 纵坐标 PC2 解释 25.6%。图中 6 个不同样本点之间相互分离, 同样本的 3 个重复点相互聚集, 证明该样本组内差距较小, 且不同菌株不同时间点胞内代谢物有明显差异。从纵轴上来看, *S. viridoehrongenes* gs77 菌株的 3 个时间点的样品均位于纵坐标上方, 在 PC2 主成分的解释下得分较高; 而 *S. viridoehrongenes* gs77-54 的 3 个时间点样品均位于纵坐标下方, 在 PC2 主成分的解释下得分较低。

对检测到的 29 种糖类、氨基酸类、有机酸类和脂肪酸类共有胞内代谢物进行可视化聚类热图分析(图 3)。从图中可看出, 除麦芽糖、 β -龙胆糖、D-海藻糖和 L-含氧脯氨酸外, 其余两菌株的共有糖类和氨基酸类物质的相对含量均随着发酵时间的延长而逐渐下降, 且突变菌株

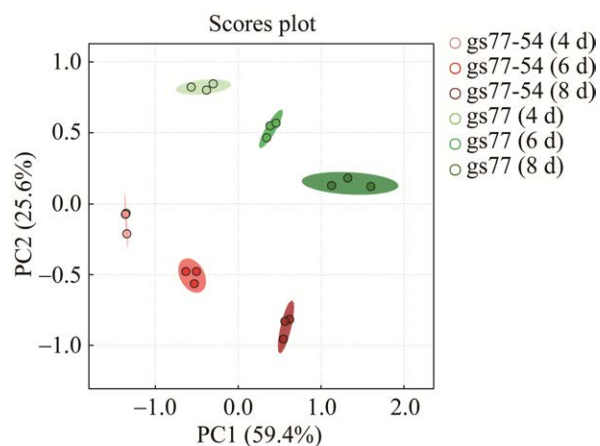


图 2 绿色产色链霉菌 gs77 菌株和绿色产色链霉菌 gs77-54 菌株 PCA 得分图

Figure 2 PCA scores of *Streptomyces viridoehrongenes* gs77 and *Streptomyces viridoehrongenes* gs77-54 strains.

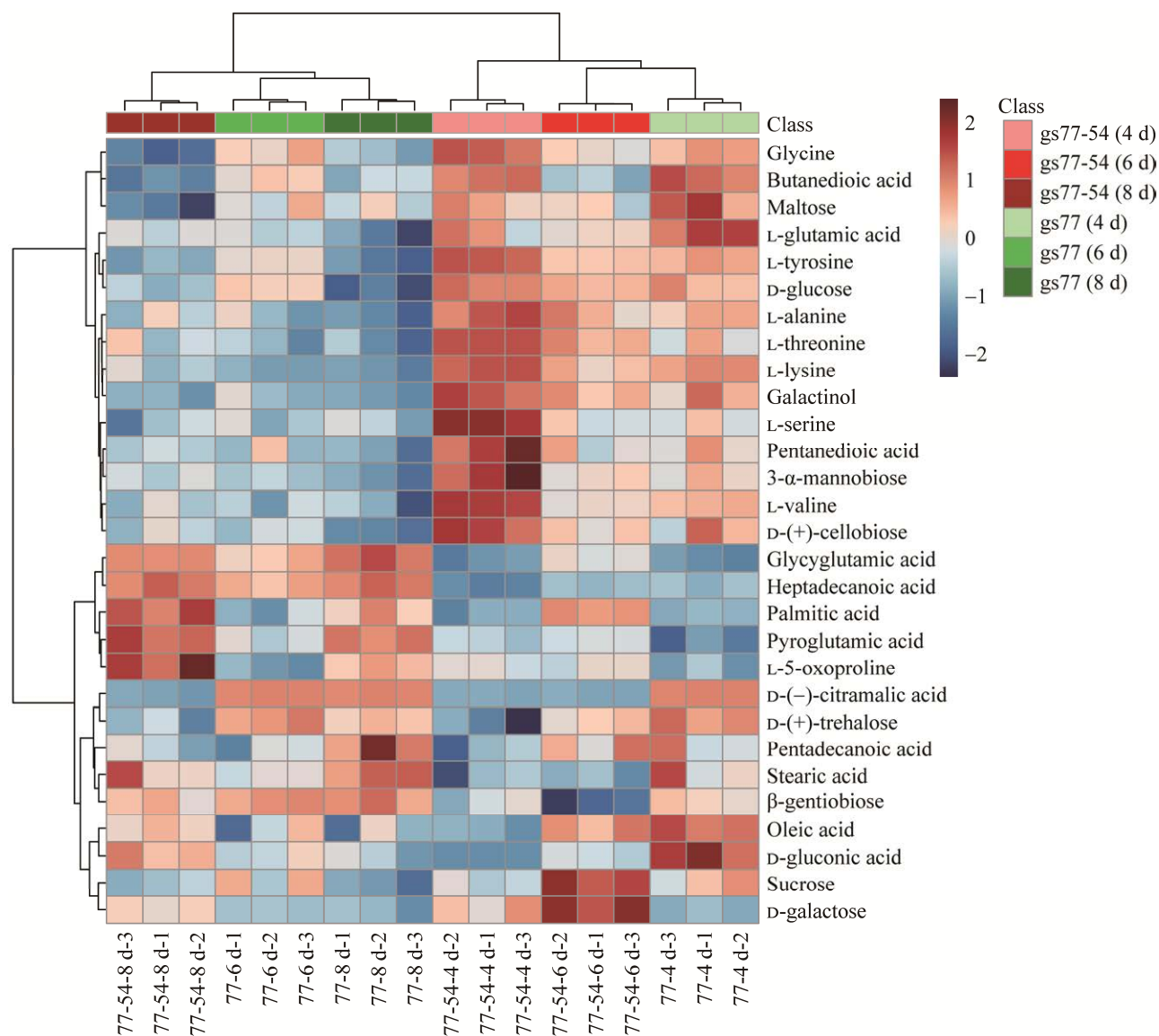


图3 绿色产色链霉菌 *gs77* 菌株和绿色产色链霉菌 *gs77-54* 菌株 29 种胞内代谢聚类热图

Figure 3 Cluster heat maps of 29 intracellular metabolism of *Streptomyces viridoehrongenes* *gs77* and *Streptomyces viridoehrongenes* *gs77-54* strains.

下降幅度更为显著。而两菌株共有脂肪酸和有机酸类物质，除油酸外，其他共有物质的相对含量变化不明显。比较两菌株间各类共有代谢物含量差异，3 个取样时间点的突变菌株中糖类和氨基酸类物质的相对含量较出发菌株均上调，在发酵 4 d 时最为明显；其中 3- α -甘露二糖、D-纤维二糖、L-缬氨酸和 L-丝氨酸上调最

为显著。但因突变菌株发酵过程中上述物质的相对含量下降迅速，所以发酵结束时两菌株中相对含量差异不明显。分析两菌株共有脂肪酸和有机酸的差异，在发酵 4 d 时，除戊二酸和焦谷氨酸在突变菌株中上调外，其余均下调；尤其是油酸和 D-葡萄糖醛酸，突变菌株较出发菌株下调最为显著。

2.4 两菌株发酵过程中差异代谢物筛选

为进一步找出阿维拉霉素合成过程的差异代谢物,进行了 OPLS-DA 分析。它是一种有监督的多元统计分析方法,它综合了 PLS-DA 和正交信号过滤(orthogonal signal correction, OCS)技术,能够把预先设定的和分类无关的信息最大程度从原始矩阵分离,主要用于两个样本的差异比较。在本次模型建立中,将两菌株作为差异自变量,各含有 9 个样本(图 4)。A 组代表 *S. viridoehrongenes* gs77-54 菌株, B 组代表 *S. viridoehrongenes* gs77 菌株,图中横坐标表示 OCS 过程中主成分的得分值,可解释组间差异;纵坐标表示的是 OCS 过程中正交成分的得分值,可解释组内差异。图 4 中两组被完全分开,差异明显;且该模型 $R^2X=0.721$, $R^2Y=0.944$, $Q^2=0.911$, $P<0.05$,说明该模型是可靠的。OPLS-DA 能在 OCS 过程中对重要变

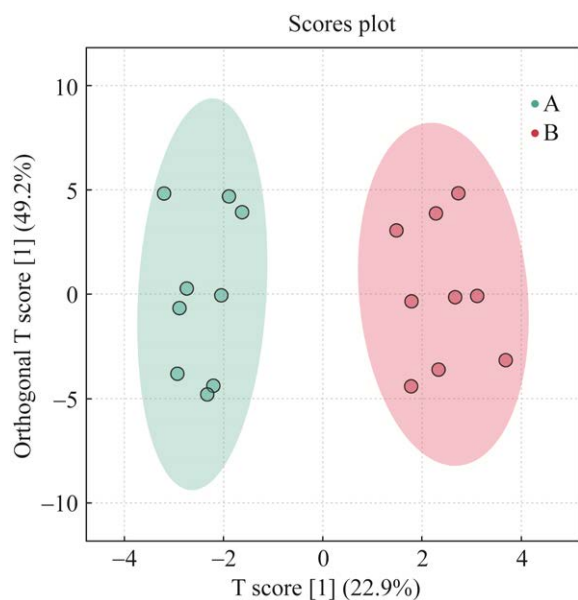


图 4 绿色产色链霉菌 gs77-54 菌株(A)和绿色产色链霉菌 gs77 菌株(B) OPLS-DA 得分图

Figure 4 OPLS-DA scores of *Streptomyces viridoehrongenes* gs77-54 strain (A) and *Streptomyces viridoehrongenes* gs77 strain (B).

量进行筛选。以 $VIP \geq 1$ 为标准筛选出阿维拉霉素合成过程中的特征代谢物共 11 种(图 5),按 VIP 值由大到小分别是 D-柠檬酸、D-半乳糖、L-丙氨酸、L-含氧脯氨酸、L-缬氨酸、油酸、 β -龙胆糖、D-葡萄糖、3- α -甘露二糖、D-纤维二糖和 L-丝氨酸。

2.5 发酵过程中两菌株差异代谢物相对含量变化

为了解这 11 种小分子代谢物在突变菌株中高产阿维拉霉素的机制,结合 OPLS-DA 分析结果,对两菌株发酵过程中的差异代谢物绘制时序性变化图(图 6, 图 7)。分析共有氨基酸类代谢物,在两菌株分批发酵过程中,除 L-含氧脯氨酸外, L-丙氨酸、L-缬氨酸和 L-丝氨酸相对含量随着发酵时间的延长而降低。发酵过程中突变菌株中 4 种氨基酸的含量始终高于出发菌株。其中 L-丙氨酸、L-缬氨酸和 L-丝氨酸差异最明显,分别为 25%、38%、43%。就共有糖类代谢物而言,在突变菌株中,除 β -龙胆糖和 D-半乳糖外,所有糖类代谢物相对含量在发酵过程中逐渐降低。且 3 个取样时间点出发菌株中糖类代谢物含量均高于出发菌株,发酵 4 d 时除 β -龙胆糖外,突变菌株中其他单糖及二糖相对含量均比出发菌株高出 35%以上,其中 3- α -甘露二糖高出 78.8%, D-纤维二糖为 51%。发酵 6 d 时,突变菌株中 3- α -甘露二糖比出发菌株仅高出 37%,证明突变菌株的耗糖速率明显快于出发菌株。与氨基酸和糖类代谢物相反,油酸和 D-柠檬酸在整个发酵过程中表现为出发菌株高于突变菌株,且差异在发酵 4 d 时就极为显著,分别为 56%和 90%。

2.6 结合阿维拉霉素合成分析突变菌株代谢途径

任健等^[13]认为乙酰辅酶 A 在一系列羧化酶的作用下形成阿维拉霉素分子七糖链结构中的

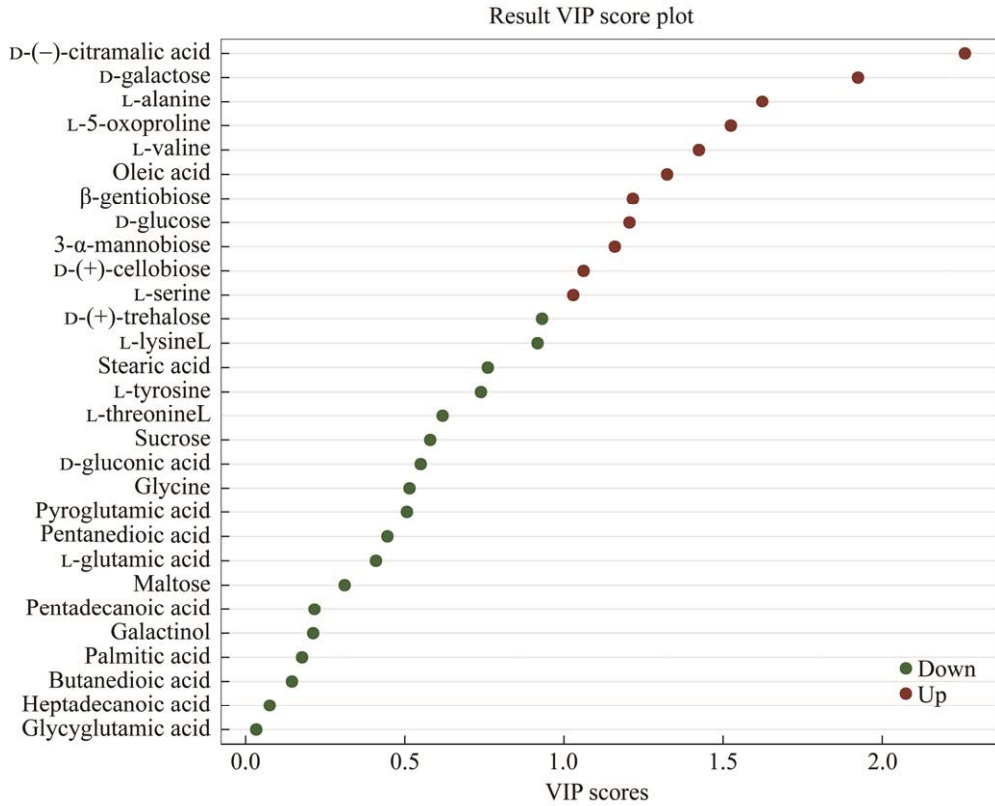


图 5 胞内代谢物第一主成分 VIP 得分图

Figure 5 VIP score of the first principal component of intracellular metabolites.

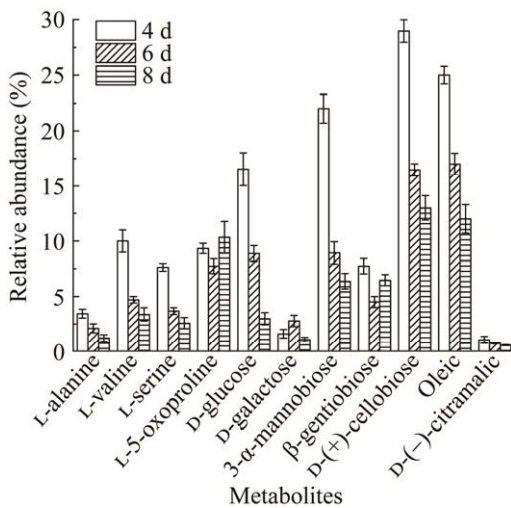


图 6 绿色产色链霉菌 *gs77-54* 菌株胞内差异代谢物发酵时序变化图

Figure 6 Sequence changes of intracellular differential metabolite fermentation in *Streptomyces viridoehrongenes* *gs77-54*.

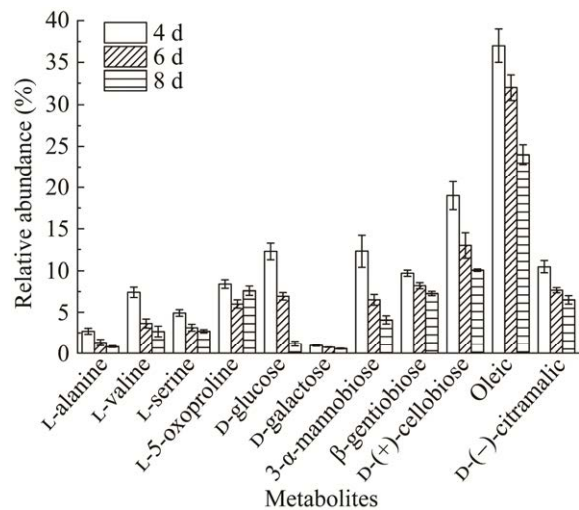


图 7 绿色产色链霉菌 *gs77* 菌株胞内差异代谢物发酵时序变化图

Figure 7 Sequence changes of intracellular differential metabolite fermentation in *Streptomyces viridoehrongenes* *gs77* strain.

残基 A, 残基 B、C、D 的直接底物是 1-磷酸-葡萄糖, 残基 E、F、H 则以 GDP-D-甘露糖为起始底物, 而 UDP-葡萄糖是合成残基 G 的直接起始物质。刘芳等^[14]指出阿维拉霉素的合成起始于 L-来苏糖。Zhu 等^[15]通过在阿维拉霉素发酵过程中添加不同浓度的葡萄糖、铵离子和磷酸盐调控阿维霉素合成, 证明了磷酸戊糖途径和三羧酸循环是影响阿维拉霉素合成的重要途径。本研究通过上述分析得到的差异代谢物, 结合阿维拉霉素合成过程推测^[16], 绘制了阿维拉霉素合成代谢网络图(图 8)。

从图 8 可知, D-葡萄糖经磷酸化反应形成 6-磷酸葡萄糖。6-磷酸葡萄糖可经葡萄糖磷酸变位酶催化形成 1-磷酸葡萄糖, 再经催化后形成 UDP-葡萄糖和 dTDP-葡萄糖。UDP-葡萄糖转化

为 UDP-葡萄糖醛酸后, 经过 1 次脱羧和 2 次差向异构化反应生成 L-来苏糖^[17]。dTDP-葡萄糖经一系列的脱羧、脱水和还原作用后形成残基 B、C、D 的上游物质 dTDP-4-酮基-D-橄榄糖^[18]。同时, 6-磷酸葡萄糖也可以进入磷酸戊糖途径形成 3-磷酸甘油酸, 再经一系列脱氢、转氨、水解作用后产生丝氨酸, 进入三羧酸循环途径。此外, D-葡萄糖经差向异构化、焦糖磷酸化后形成 GDP-D-甘露糖, 其经一系列氢还原和甲基化作用后直接形成参加 E 和 H^[19-20], 经过两步甲基化反应后形成残基 F^[21]。在突变菌株胞内代谢物中, 较高含量的 D-葡萄糖为整个糖代谢途径提供了充足的底物, L-丝氨酸和 3- α -甘露二糖可对 D-葡萄糖产生正反馈, 促进糖代谢过程。

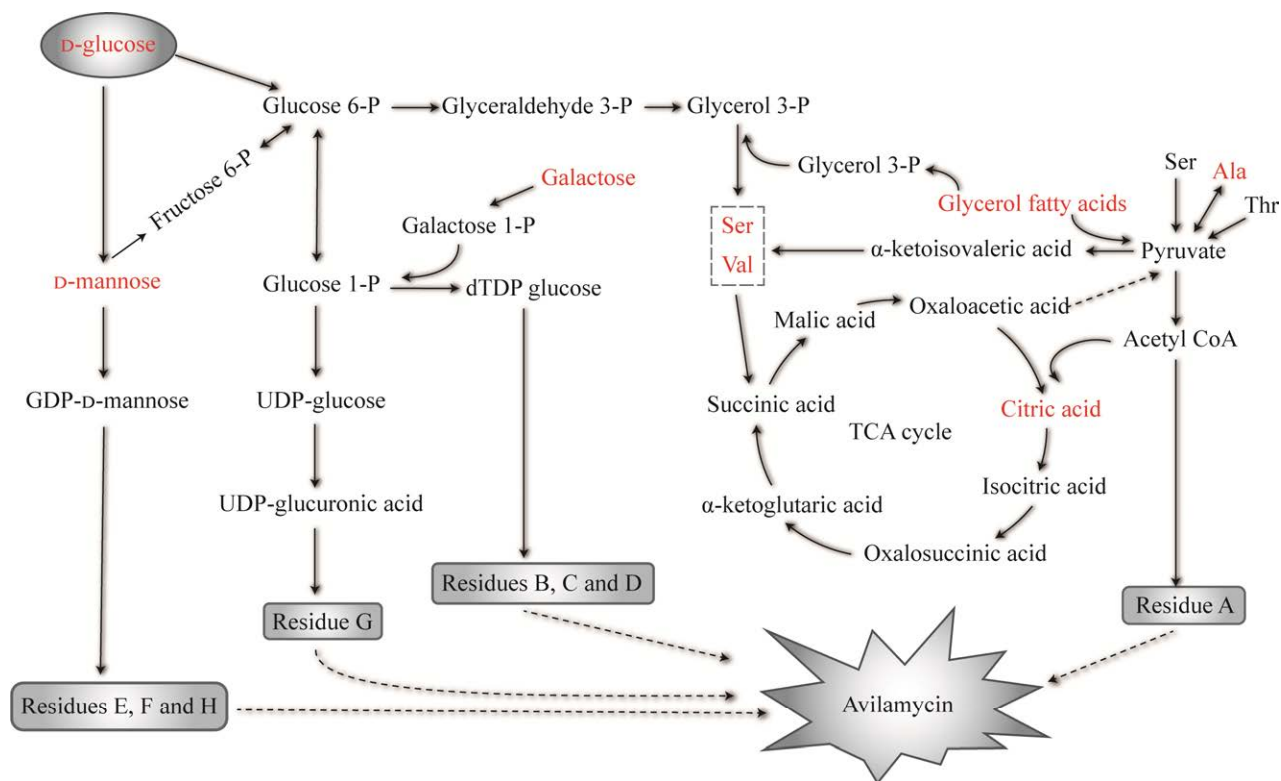


图 8 阿维拉霉素合成代谢网络图
Figure 8 Anabolic network of avilamycin.

油酸作为一种不饱和脂肪酸，一方面经脂肪酸代谢形成 3-磷酸甘油酸，促进了丝氨酸的形成；另一方面通过 β -氧化及糖酵解后形成丙酮酸，将糖代谢与三羧酸循环途径连接起来。同时，丙酮酸贯穿氨基酸代谢、糖代谢与三羧酸循环途径，在阿维拉霉素的合成中起着不可或缺的作用。丙酮酸可通过形成乙酰辅酶 A 合成残基 A；另外，它可经脱羧形成乙酰 TPP，再经还原、变位、脱水形成 α -酮异戊酸后直接转氨生成缬氨酸；除此之外，它也可由丙氨酸转氨酶直接催化形成丙氨酸，此反应可逆。同时，乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环促进 D-柠檬酸的生成，使得经三羧酸循环生成的草酰乙酸作为丙酮酸的回补途径，对油酸的利用进行正反馈，同时促进氨基酸代谢。相较于出发菌株，突变菌株中较低的油酸和 D-柠檬酸促进了三大代谢途径的循环，从而促进了培养基中相应碳

水化合物的利用，促进了阿维拉霉素的合成。

此外，为明确 11 种差异代谢物所参与的代谢途径，借助 MetaboAnalyst 网站对其进行通路富集，结果如图 9 所示。11 种代谢物共涉及代谢通路 16 条，以 $P < 0.05$ 为筛选标准，得到 5 条显著影响的代谢物途径，其中氨酰-tRNA 生物合成途径、淀粉和蔗糖代谢途径、半乳糖代谢途径差异极为显著 ($P < 0.01$)。同时，使用 KEGG 数据库对这 3 种代谢途径进行分析，进一步筛选得到关键差异代谢物 6 种：L-缬氨酸、L-丝氨酸、L-丙氨酸、D-半乳糖、D-纤维二糖和 D-葡萄糖。由此可见，阿维拉霉素的合成过程主要受到碳水化合物代谢和氨基酸代谢的影响。综上，我们推测经过链霉素抗性筛选的突变菌株，其核糖体结构发生改变，增加了其糖代谢和氨基酸代谢能力，从而增加了阿维拉霉素合成速率。

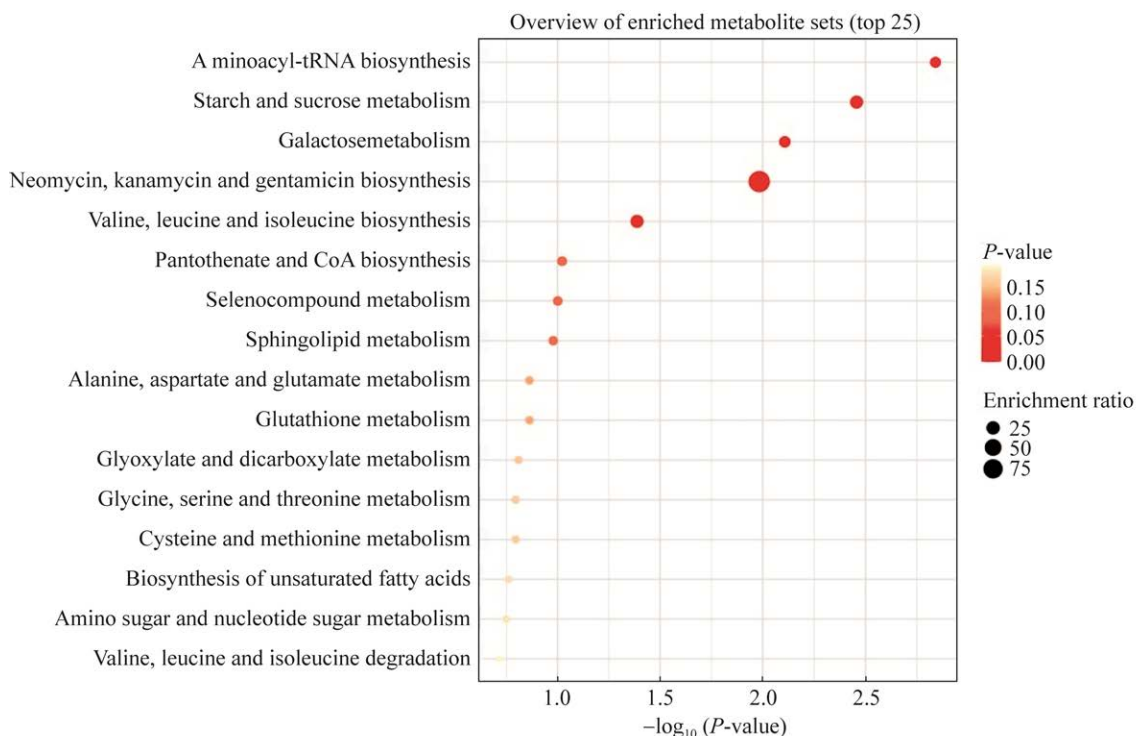


图 9 差异代谢物所涉及 16 种代谢通路气泡图

Figure 9 Bubble map of the top 16 metabolic pathways involved in differential metabolites.

3 讨论

目前国内对阿维拉霉素发酵工艺优化依然以培养基和发酵参数优化为主。章梅^[22]对阿维拉霉素发酵工艺中的培养基成分、接种量和温度等因素进行优化,使阿维拉霉素产量提高了29.87%。李红梅等^[23]采用响应面法优化了发酵过程中氧载体油酸的添加量、添加时间及培养基 pH,阿维拉霉素产量提高了109.97%。以上研究表明培养基和发酵参数优化可以提高阿维拉霉素产量,但是盲目地对培养基成分进行筛选摸排存在工作量大、耗费时间等缺点。随着代谢组学技术被广泛应用于抗生素发酵过程中细胞代谢物组的差异分析和机制研究,它对微生物发酵过程工艺优化和菌种选育具有重要指导意义。GC-MS 联用技术继核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)后在代谢组学分析中应用广泛。通过衍生化后的样品经气相色谱能很好地被分离,同时质谱技术能较准确地定性,具备灵敏度高和重现性好等优点^[24]。Xia 等^[25]在驻波链霉菌的发酵中,利用基于 GC-MS 的代谢组学的方法比较高产素培养基和低产素培养基条件下代谢差异,根据关键代谢产物的变化情况,得到一种培养基优化策略,使得目标产物 FK506 的产量提高了61.4%。

本研究采用 GC-MS 代谢组学技术分析了突变菌株与出发菌株胞内代谢产物差异,通过多元数据统计进行了差异代谢物分析。结果表明,在突变菌株中,较高含量的 L-缬氨酸为阿维拉霉素的合成提供了充足的前体物质;同时, L-丙氨酸和 L-丝氨酸分别通过合成丙酮酸和丁二酸进入糖酵解途径和三羧酸循环途径,促进阿维拉霉素的合成。作为寡糖类七糖链物质,葡萄糖、半乳糖等小分子单糖是阿维拉霉素的

直接合成底物。结合整个发酵过程中总糖的消耗速率、菌浓生长情况和发酵液中 pH 变化,链霉素引入的抗性突变改变了菌株的糖代谢能力,使得培养基中复杂的碳源物质被充分利用,成为其高产的主要原因之一。大豆油是培养基中主要脂肪酸类物质来源,其降解产物油酸通过转化成丙酮酸进而转化为阿维拉霉素结构中残基 A 的直接前体物质乙酰辅酶 A。同时油酸可经一系列途径转化为丝氨酸和缬氨酸,进一步促进氨基酸代谢。D-柠檬酸是三羧酸循环途径的关键物质,其直接连接了氨基酸代谢和糖代谢。GC-MS 检测结果表明其在出发菌株和突变菌株中含量差异达90%,突变菌株对其利用率远远高于出发菌株,这是其高产阿维拉霉素的另一重要原因。

4 结论

本研究通过对突变菌株 *S. viridoehrongenes* gs77-54 和出发菌株 *S. viridoehrongenes* gs77 发酵过程中胞内代谢组学的研究,比较两菌株中的差异代谢物,确定了11种阿维拉霉素发酵过程中的差异代谢物,KEGG 数据库锁定6种与氨基酸及糖代谢有关的关键差异代谢物。分析突变菌株高产的原因是由于链霉素抗性引入造成的突变菌株发酵过程中三羧酸循环途径、氨基酸代谢、脂肪酸代谢途径以及糖代谢途径的增强,促进阿维拉霉素合成的相关底物及过程中间产物被大量合成,使得 *S. viridoehrongenes* gs77-54 发酵至第8天时阿维拉霉素产量达到1962 mg/L,较出发菌株提高了76.85%。此外,本研究获得的6种关键差异代谢物均为阿维拉霉素生物合成残基,可作为前体物质进一步研究,这将为后续阿维拉霉素发酵工艺的优化及工业化生产奠定基础。

REFERENCES

- [1] 进口兽药注册目录(中华人民共和国农业部公告第 192 号). [2002]外兽药准字 43 号. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/200212/t20021219_36976.htm.
- [2] MENOTTA S, FEDRIZZI G, MACRI S, SCANDURRA S, SAGGIORATO M. Results of avilamycin residues monitoring plans for the experimental use in Italy[J]. Meat Quality and Safety, 2008, 7: 1939-1398.
- [3] GAISSER S, TREFZER A, STOCKERT S, KIRSCHNING A, BECHTHOLD A. Cloning of an avilamycin biosynthetic genecluster from *Streptomyces viridochromo* Tü57[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(20): 6271-6278.
- [4] WEITNAUER G, GAISSER S, TREFZER A, STOCKERT S, WESTRICH L, QUIROS LM, MENDEZ C, SALAS JA, BECHTHOLD A. An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromo* Tü57[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(3): 690-695.
- [5] GAO P, XU GW. Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: recent developments and applications[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(3): 669-680.
- [6] 曹鹏, 胡栋, 张君, 张变强, 高强. 基于比较代谢组学的理性优化方法提高阿维菌素产量[J]. 微生物学报, 2017, 57(2): 281-292.
- CAO P, HU D, ZHANG J, ZHEANG BQ, GAO Q. Improving abamectin production by rational optimization method based on comparative metabolomics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(2): 281-292 (in Chinese).
- [7] 刘桂君, 乔宇琛, 周思静, 王平, 宋梅芳, 杨素玲, 顾海科, 侯莉. 基于代谢组学的蛹虫草菌株虫草素合成途径研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(7): 16-25.
- LIU GJ, QIAO YC, ZHOU SJ, WANG P, SONG MF, YANG SL, GU HK, HOU L. Biosynthesis pathway of cordycepin in *Cordyceps militaris* based on metabolomics[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(7): 16-25 (in Chinese).
- [8] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [9] 王亚萍, 陈敏, 李红梅. 硅胶对阿维拉霉素吸附特性的研究[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(16): 1388-1394.
- WANG YP, CHEN M, LI HM. Adsorption property of avilamycin on silica gel-based absorbent[J]. China Industrial Economics, 2018, 53(16): 1388-1394 (in Chinese).
- [10] 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[J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 61-67.
- GUO G, TANG D, TIAN PP, SHI XF, CAO P, GAO Q. Optimized sample preparation for metabolome studies on *Streptomyces avermitilis* by GC-MS[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(5): 61-67 (in Chinese).
- [11] 刘华华, 陈宇航, 陈敏. 核糖体工程技术选育阿维拉霉素高产菌株[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(7): 1322-1330.
- LIU HH, CHEN YH, CHEN M. Breeding of high avilamycin-producing strains by ribosome engineering[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(7): 1322-1330 (in Chinese).
- [12] 潜媛媛, 陈敏, 王宏. 分段调控优化阿维拉霉素生产菌罐上发酵参数[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 27-30, 56.
- QIAN YY, CHEN M, WANG H. Optimization of fermentation parameters in fermenter for avilamycin by grading control[J]. Food & Machinery, 2013, 29(1): 27-30, 56 (in Chinese).
- [13] 任健, 童应凯, 吴兆亮. 卑霉素的合成途径及分子生物学进展[J]. 天津农学院学报, 2008, 15(3): 47-51.
- REN J, TONG YK, WU ZL. Biosynthesis pathway and molecular biology progress of avilamycin[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2008, 15(3): 47-51 (in Chinese).
- [14] 刘芳, 李晓荣, 邹祥. 阿维拉霉素生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(12): 25-30.
- LIU F, LI XR, ZOU X. Advances on biosynthesis approach and metabolic regulation of avilamycin[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(12): 25-30 (in Chinese).
- [15] ZHU CH, LU FP, HE YN, HAN ZL, DU LX. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochr* effects of glucose, ammonium ion, and inorganic phosphate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5): 1031-1038.
- [16] 宇光海, 彭海芬, 王翔宇. 阿维拉霉素生物合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(1): 94-102.
- YU GH, PENG HF, WANG AY. Research progress of avilamycin biosynthesis[J]. China Biotechnology, 2021, 41(1): 94-102 (in Chinese).
- [17] HOFMANN C, BOLL R, HEITMANN B, HAUSER G, DÜRR C, FRERICH A, WEITNAUER G, GLASER SJ, BECHTHOLD A. Genes encoding enzymes

- responsible for biosynthesis of L-lyxose and attachment of eurenate during avilamycin biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(10): 1137-1143.
- [18] HYUN C, KIM SS, SOHNG JK, HAHN J, KIM J, SUH J. An efficient approach for cloning the dNDP-glucose synthase gene from actinomycetes and its application in *Streptomyces spectabilis*, a spectinomycin producer[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 183(1): 183-189.
- [19] YAMAUCHI N, KAKINUMA K. Enzymic carbocycle formation in microbial secondary metabolism. The mechanism of the 2-deoxy-scyllo-inosose synthase reaction as a crucial step in the 2-deoxystreptamine biosynthesis in *Streptomyces fradiae*[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1995, 60(17): 5614-5619.
- [20] TREEDE I, HAUSER G, MÜHLENWEG A, HOFMANN C, SCHMIDT M, WEITNAUER G, GLASER S, BECHTHOLD A. Genes involved in formation and attachment of a two-carbon chain as a component of eurenate, a branched-chain sugar moiety of avilamycin A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 400-406.
- [21] SCHMIDT MS, WITTMANN V. Stereoselective synthesis of 1,1'-linked α -L-lyxopyranosyl β -D-glucopyranoside, the proposed biosynthetic precursor of the FG ring system of avilamycins[J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(10/11): 1612-1623.
- [22] 章梅. 绿色产色链霉菌产阿维拉霉素的发酵工艺研究[D]. 淄博: 山东理工大学硕士学位论文, 2018.
- ZHANG M. Study on fermentation technology of avermectin produced by *Streptomyces viridans*[D]. Zibo: Master's Thesis of Shandong University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [23] 李红梅, 陈敏. 响应面优化绿色产色链霉菌发酵产阿维拉霉素[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(9): 108-115.
- LI HM, CHEN M. Fermentation optimization of avilamycin using *Streptomyces viridochromogenes* by response surface methodology[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(9): 108-115 (in Chinese).
- [24] JIYE A, TRYGG J, GULLBERG J, JOHANSSON AI, JONSSON P, ANTTI H, MARKLUND SL, MORITZ T. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(24): 8086-8094.
- [25] XIA ML, HUANG D, LI SS, WEN JP, JIA XQ, CHEN YL. Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(10): 2717-2730.

(本文责编 陈宏宇)