

甘油对利福霉素 SV 生物合成的影响*

杜吉泉^{1,2} 王军峰¹ 储 炬¹ 王永红¹ 庄英萍¹ 张嗣良^{1**}

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 国家生化工程技术研究中心 上海 200237)¹

(济南市农业高新技术开发区管委会 济南 250002)²

摘要: 利福霉素 SV 脂肪链桥部分的合成是以乙酸单位 (由丙二酰 CoA 提供) 和丙酸单位 (由甲基丙二酰 CoA 提供) 为延伸单元经过缩合、环化和后修饰而形成的, 一些短链碳前体对二碳或三碳延伸单位的合成具有调节作用。研究发现添加一定量的甘油对利福霉素 SV 的生成具有明显的促进作用, 其最适添加量为 3%, 添加时间以 72h 为宜, 并且分批补加效果更好, 最高提高效价 21% 以上。有机酸分析结果显示, 甘油的加入导致乙酸和琥珀酸在胞外积累的增加, 促进了 EMP 和 TCA 代谢途径, 有利于利福霉素 SV 合成前体的积累。

关键词: 甘油, 利福霉素 SV, 代谢调节, 有机酸

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0034-05

Effect of Glycerol Addition on Rifamycin SV Biosynthesis

DU Ji-Quan^{1,2} WANG Jun-Feng¹ CHU Ju¹ WANG Yong-Hong¹

ZHUANG Ying-Ping¹ ZHANG Si-Liang^{1**}

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, National Engineering Research Center for Biotechnology
East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)¹

(Jinan Agriculture High & New Technology Developing Zone, Jinan 250002)²

Abstract: Biosynthesis of rifamycin involves the assembly of a polyketide through chain extension of an unusual starter unit, 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) by two acetate and eight propionate units on a type I polyketide synthase (PKS). Some short chain precursors have positive effects on the production of rifamycin. In this paper, it was found that the production of rifamycin SV could be improved by adding glycerol in the fermentation broth. The optimal concentration of glycerol was 3% and the suitable adding time was at the 72h during fermentation. Furthermore, it exhibited better effect if the glycerol was added by fed-batch and the maximum improvement of titer was 21% higher than that of control. The results of organic acids analysis demonstrated that adding glycerol led to the accumulation of acetic acid and succinate, thus malonyl-CoA and methylmalonyl-CoA biosynthesis was strengthened; consequently the production of rifamycin SV production was improved.

Key words: Glycerol, Rifamycin SV, Metabolic regulation, Organic acid

利福霉素 (Rifamycin) 是由地中海拟无枝酸菌 (*Amiclatopsis mediterranei*) 产生的一类安莎大环类抗生素, 广泛应用于治疗结核病、麻风病和与艾滋病有关的分枝杆菌感染^[1]。利福霉素包括多种组分, 其中以 SV 和 B 组分最为重要, 二者都是临床药物利福平的直接合成前体。

利福霉素 SV 是由一个萘醌发色团和脂肪链桥组成的。萘醌发色团的主要成分是 3-氨基-5-羟基苯甲酸 (即 AHBA), 它来源于氨基莽草酸途径, 类似于合成芳香族氨基酸

* 上海市科委重点科技攻关项目 (No. 034319220)

** 通讯作者 Tel: 86-21-64253021, E-mail: siliangz@ecust.edu.cn

收稿日期: 2006-01-17, 修回日期: 2006-04-08

的莽草酸途径^[2]；脂肪链桥部分由 8 个丙酸单位（由甲基丙二酰 CoA 提供）和 2 个乙酸单位（由丙二酰 CoA 提供）在 I 型聚酮合成酶（PKS）的作用下连续缩合延伸而成^[3]。一些短链碳前体如乙酸盐、丙酸盐、正丙醇、甘油等可能对二碳或三碳延伸单位的合成具有调节作用，从而影响利福霉素的合成。张蔚文等^[4]曾研究了丙酸盐对利福霉素 SV 生物合成的影响，发现在发酵 48h 加入 10mmol/L 的丙酸盐会提高效价 30%。

本文就甘油在利福霉素 SV 发酵过程的最适添加量、添加时间和添加方式做了初步研究，并从有机酸积累的角度对甘油的作用做了分析。

1 材料与方法

1.1 实验用菌株

地中海拟无枝酸菌（*Amycolatopsis mediterranei*）U-32，由同联集团上海生物技术研究所提供。

1.2 培养方法

1.2.1 种子培养基^[5]：母瓶与子瓶培养基配方相同。

1.2.2 发酵培养基：葡萄糖 8.0g，鱼粉 0.3g，黄豆饼粉 1.0g，生物氮素 1.0g，硝酸钾 0.6g，碳酸钙 0.3g，磷酸二氢钾 0.02g，定容至 100mL。

1.2.3 培养方法：甘油管接母瓶，摇床培养 48h 后转接子瓶，子瓶培养 48h 后按 8% 接种量转接发酵瓶（50mL/500mL），发酵瓶在摇床上培养 120h 后放瓶。以上培养条件皆为 28℃、220r/min。

1.3 有机酸测定

色谱柱 Symmetry shield RP18 (5μm, 3.915mm)，流速 1.0mL/min，进样量 20μL，柱温 35℃，检测波长 210nm，样品进样之前需用 0.22μm 微孔滤膜过滤。

1.4 其它参数测定方法

菌浓为 PMV 法；还原糖为斐林氏法^[6]；化学效价为分光光度法^[7]。

1.5 主要仪器设备

SPY50 双层培养摇床（上海离心机械研究所），818 型酸度计（美国奥立龙公司），HP1100 型高效液相色谱仪（美国安捷伦有限公司）。

2 结果与讨论

2.1 甘油的不同添加时间对利福霉素发酵的影响

分别在发酵的 0、24、48、72、96h 添加甘油，添加量皆为 2%（v/v，下同），培养 120h 后测定放瓶效价及其它参数，结果如表 1 所示。

表 1 不同时间添加甘油对利福霉素发酵的影响

前体	添加时间 (h)	pH	菌浓 (%)	还原糖 (g/100mL)	化学效价 (r/mL)	相对效价 (%)
对照		7.99	42	0.68	3614.7	100
甘油	0	5.20	36	1.80	0	0
	24	7.82	40	1.65	1587.9	43.9
	48	7.92	45	1.35	3817.4	105.6
	72	7.95	44	1.12	4020.1	111.2
	96	7.93	45	0.68	3962.1	109.6

由表 1 看出, 当甘油在 24h 以前添加时均会不同程度地影响产素, 而且添加时间越早抑制产素的作用越明显; 而当甘油在 48h 以后添加时则对利福霉素发酵则有不同程度的促进作用, 最高使发酵单位提高了 11.2% (72h 添加)。

分析原因: 在发酵前期菌体处于生长期时添加甘油, 会对菌的生长产生抑制作用, 使菌浓偏低, 从而导致菌体利用糖的速率减慢, 残糖浓度升高, 最终产素能力下降; 而当菌体进入产素期后 (48h 以后) 添加甘油, 菌体生长基本不受影响, 残糖浓度较低, 最终效价得到了不同程度的提高。而且, 在初级代谢转向次级代谢初期菌体利用前体的能力并不强, 培养基中原有的前体物质基本能够满足菌体的需要, 加入的甘油没有被充分作用; 随着次级代谢作用的增强, 培养基中游离的前体逐渐被利用而减少, 此时加入的外源的前体会很快的被利用转入抗生素合成途径, 因此 72h 要比 48h 添加效果好。

2.2 甘油最适添加量的确定

为了确定甘油的最适添加量, 在发酵进行到 72h 时分别加入不同量的甘油, 加量分别为 1%、2%、3%、4% 和 5% (v/v), 培养 120h 后测定放瓶效价及还原糖浓度。

实验结果表明在低浓度时随着甘油加量的增大利福霉素的产量不断提高, 在 3% 甘油浓度时达到最高点, 此时效价增幅达到 11%; 而当甘油加量超过 3% 时, 利福霉素的产量基本没有增加或增加甚微, 可能是高浓度的甘油产生了底物抑制而影响了对甘油的转化和利用。故甘油的最适添加浓度应选择 3%。

2.3 甘油补加方式的优化

将甘油以分批补料的方式加入发酵液中, 从发酵 48h 开始每隔 24h 补 1 次甘油, 具体补料方式与实验结果见表 2 和图 1。

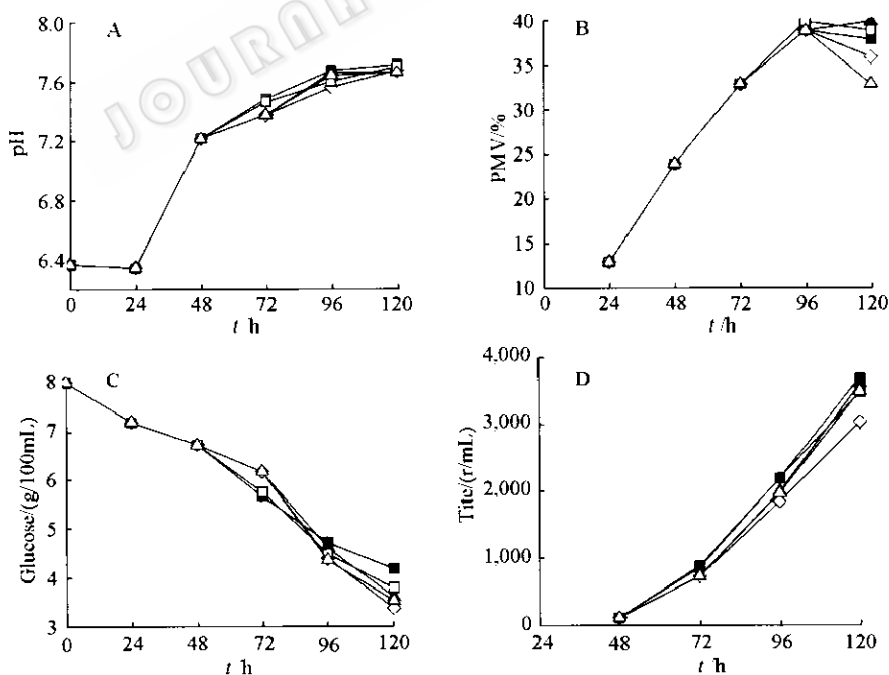


图 1 补加甘油时 pH (A)、菌浓 (B)、还原糖 (C) 和发酵单位 (D) 的变化

—○— 0, —■— 1, —▲— 2, —□— 3, —△— 4

表 2 甘油不同补加方式对利福霉素 SV 发酵的影响

编号	每次补加量 (%)	总补加量 (%)	补加时间 (h)	发酵单位 (U/mL)	相对效价 (%)
0				3642. 9	100
1	1	3	48、72、96	4429. 8	121. 6
2	2	6	48、72、96	4171. 1	114. 5
3	1	2	72、96	4320. 5	118. 6
4	2	4	72、96	4189. 3	115. 0

由图 1 发现，此次甘油补料实验的结果与前面的甘油添加的效果一致，甘油加入后的发酵单位比对照高，这说明甘油的确能促进产素。比较各个甘油补料操作发现，甘油补料的时间与浓度对发酵单位有较大的影响。甘油总补入量控制在 3% 时效果最好，再增加甘油的添加浓度会对产素产生抑制作用；从甘油的补加时间来看，一般在菌体开始产素或处于产素高峰期时加入有利于提高发酵单位，因此，从产素期开始少量并连续地补加甘油有利于发酵单位的提高。同时，补加甘油会适量减缓菌体对糖的消耗，这可能是由于甘油的利用途径与葡萄糖的相似，它比较容易进入 EMP 途径，从而会适当减缓菌体对糖的利用速率。

2.4 添加甘油后发酵液中的有机酸分析

为了进一步研究甘油添加后对发酵的影响，我们跟踪测定了在发酵各时间段发酵液中有有机酸积累的情况，以期通过对有机酸积累情况的分析更好地解释甘油的作用，我们比较了 0、1、2 三种补料方式下（表 2）胞外有机酸的积累情况，结果见图 2。

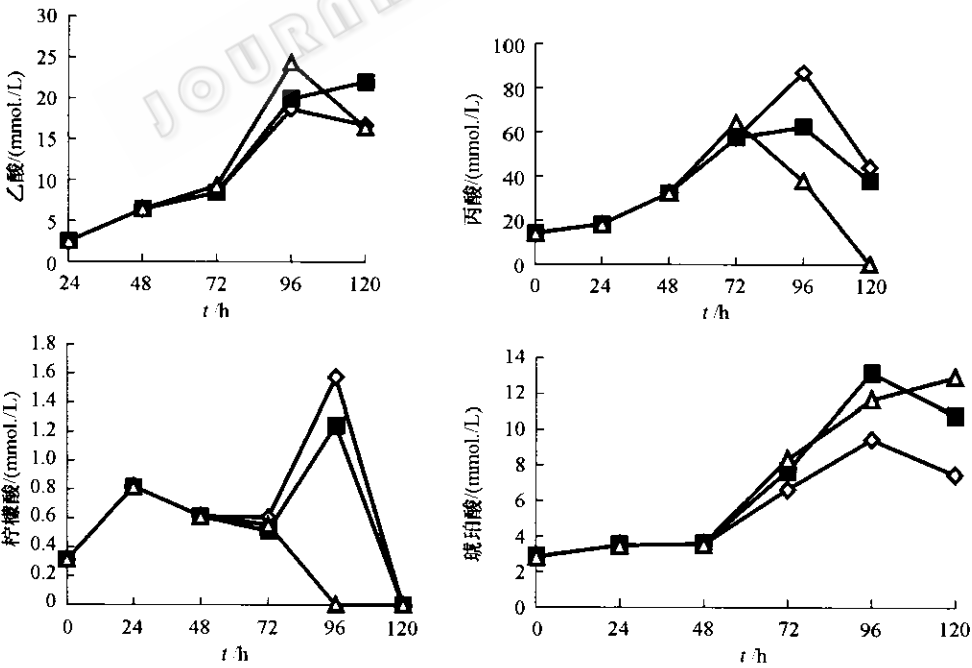


图 2 发酵过程中乙酸 (A)、丙酸 (B)、柠檬酸 (C) 和琥珀酸 (D) 的变化情况
—◇— 0, —■— 1, —△— 2

在利福霉素 SV 发酵液中的众多有机酸中,可以测出的有乙酸、丙酸、柠檬酸和琥珀酸,以上列出的就是这 4 种有机酸在胞外的积累情况。由图 2 可看到甘油补加后引起的有机酸的规律性变化。胞外有机酸的积累是胞内有机酸多少的反映,胞外较高的有机酸积累表明胞内积累得较多而溢出,胞外较少的有机酸积累表明该有机酸在胞内被迅速转化。

比较以上各图发现,加入甘油后,乙酸和琥珀酸在胞外的积累增加,而丙酸和柠檬酸在胞外的积累减少。加入甘油后造成发酵后期丙酸的积累减少,表明丙酸被大部分转化,丙酸在菌体内可以转化为丙酰 CoA、甲基丙二酰 CoA 参与抗生素的合成,因此甘油的加入可能促进了丙酸在菌体内的转化,因而它的积累就相对较少。加入甘油后,发酵液中乙酸的积累有所增加,在菌体内一般是由丙酮酸转变成乙酰 CoA,进而转变为乙酸,甘油是通过 EMP 途径被转化的,它的加入能促进 EMP 途径的通量,促进 EMP 途径终点产物丙酮酸的合成,因此会有多余的丙酮酸转化成乙酸。甘油加入后,柠檬酸在胞外的积累减少,而琥珀酸的积累增加,这表明甘油的加入促使柠檬酸的转化加快,柠檬酸通过 TCA 循环转变成琥珀酸,由于琥珀酰 CoA 可以进一步转变为利福霉素 SV 合成的关键前体甲基丙二酰 CoA,琥珀酸的积累有利于更多的琥珀酸转化成琥珀酰 CoA,从而有利于利福霉素 SV 的合成。综上所述,甘油的加入有利于促进 EMP 和 TCA 代谢途径,有利于利福霉素 SV 合成前体的积累,从而促进利福霉素 SV 的合成。

3 结论

甘油作为利福霉素 SV 合成途径中的前体物质,对产物的生成有一定的促进作用。其最适添加量为 3%,菌体进入次级代谢(即 48h 后)添加为宜并且以 72h 添加效果最佳,补加方式以分批补加较好,最高可提高效率 21% 以上。有机酸分析显示,甘油的加入促进了 EMP 和 TCA 代谢途径,有利于利福霉素 SV 合成前体的积累,从而促进利福霉素 SV 的合成。

参考文献

- [1] Queener S W, Sebek O K, Vezina C. *Annu Rev Microbiol*, 1978, **32**: 593 ~ 636.
- [2] Floss H G, Yu T W. *Chemical Reviews*, 2005, **105** (2): 621 ~ 632.
- [3] Floss H G, Yu T W. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, **3** (5): 592 ~ 597.
- [4] 张蔚文,焦瑞身. *中国抗生素杂志*, 1995, **20** (4): 268 ~ 272.
- [5] 焦瑞身,陈聿美,吴梦淦,等. *植物生理学报*, 1979, **5** (4): 395 ~ 402.
- [6] Chen J M, Xu L D. *Antibiotic Industry Analysis*, Beijing: Chinese Medical Technology Publishing House, 1991.
- [7] Sensi P, Thiemann J E. *Prog Ind Microbiol*, 1967, **6**: 21 ~ 29.