

研究简报

截短侧耳素生产菌 *Pleurotus mutilus* 工业发酵
过程代谢组分析

杨 扬¹, 李 霞¹, 韩风华², 胡江林², 元英进¹

(¹ 系统生物工程教育部重点实验室, 天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072;

² 山东胜利股份有限公司, 山东 济南 250101)

关键词: 工业过程; 代谢组学; 主成分分析; 特征代谢物; 截短侧耳素

DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2012.04.027

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157 (2012) 04-1182-07

Metabolome analysis of industrial pleuromutilin fermentation
process of *Pleurotus mutilus*

YANG Yang¹, LI Xia¹, HAN Fenghua², HU Jianglin², YUAN Yingjin¹

(¹ Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Department of Pharmaceutical Engineering,
School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² Shandong Shengli Co., Ltd., Jinan 250101, Shandong, China)

Abstract: Taking the industrial pleuromutilin fermentation with strain *Pleurotus mutilus* as an example, the variations of small molecule metabolomes in different industrial fermentation processes were analyzed. The small molecule metabolomes in different processes were measured by gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. Principal component analysis (PCA) was performed on the metabolome of *P. mutilus*. According to the score plot and loading plot obtained by PCA, the similarities and differences of metabolism of *P. mutilus* in two processes were extracted and classified. The analysis on characteristic metabolites indicated significant effects of different processes on cell viabilities. The higher level of TCA cycle intermediates and amino acids during the seed culture stage in the process two indicated higher carbon and nitrogen metabolism in *P. mutilus* before the inoculation. In addition, the analysis of the variations of metabolites during the two different fermentation processes suggested that nutrition utilization efficiency of *P. mutilus* in process two was higher than that in process one. This study indicates that metabolome analysis could be a new approach to evaluating the industrial bioprocess and is helpful in providing the feasible regulation scheme to improve the fermentation process.

Key words: industrial process; metabolomics; principal components analysis; characteristic metabolites; pleuromutilin

2011-08-26 收到初稿, 2011-12-13 收到修改稿。

联系人: 元英进。第一作者: 杨扬 (1987—), 女, 硕士研究生。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2011CBA00802); 国家自然科学基金项目 (20736006); 重大国际合作项目 (21020102040)。

Received date: 2011-08-26.

Corresponding author: Prof. YUAN Yingjin, yjyuan@tju.edu.cn

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2011CBA00802), the National Natural Science Foundation of China (20736006) and the Major International Joint Research Project (21020102040).

引言

为了提高抗生素生产水平，前人从反应器设计^[1]、发酵条件优化^[2]以及菌株改造^[3]等方面进行了较深入的研究并取得了明显研究成效。然而抗生素发酵是一个受多种因素影响的复杂过程，特别是发酵环境对抗生素发酵单位的影响十分显著^[4]，其中发酵环境涉及物理、化学、生物等多种因素的影响，因此常规的发酵过程调控是一个较为烦琐的多因素优化工作。对这种复杂的生物反应体系，系统生物学可从整体水平对发酵环境与培养菌株之间的相互作用加以研究。其中，利用代谢组学（系统生物学的一个分支）不仅可以揭示菌株本身的代谢特性，更重要的是可以提供菌株的代谢特性与发酵环境变化相互关联的生物工程信息^[5-6]。本文作者曾利用代谢组学手段，对工业乙醇的连续发酵与间歇发酵过程^[7]、环境中复合抑制剂对发酵过程的影响进行了研究^[8]，表明该方法具有较广阔的应用前景。本文以一种常用的兽用抗生素泰妙菌素的前体——截短侧耳素的生产过程为例，对其工业发酵过程中的生产菌株 *Pleurotus mutilus* 进行代谢组学分析，以期对抗生素工业发酵过程的优化提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌种

P. mutilus-SLTJU 菌种由山东胜利股份有限公司保藏。

1.2 培养基

种子培养基和发酵培养基参见文献 [9]。

1.3 发酵条件和方法

本文研究了截短侧耳素生产菌 *P. mutilus* 的两个工业发酵工艺。

工艺 1：菌株在 250 ml 摇瓶、1 m³ 发酵罐、6 m³ 发酵罐中经三级种子放大培养后接种到发酵体积为 50 m³ 的工业发酵罐中进行工业生产发酵。

工艺 2：将 50 m³ 工业发酵罐中生产发酵 48 h 的菌株接种到新的 50 m³ 工业发酵体系进行工业生

产发酵。
工业发酵参数如表 1 所示。

1.4 分析方法

生物量及产物浓度测定方法参照文献 [9-10]。
P. mutilus 胞内初级代谢产物的提取及测定方法参照文献 [7-8] 并作适当调整：取样点细胞经 60% 甲醇淬灭、PBS 缓冲液洗涤、液氮研磨后，再经提取液（甲醇：水=1：1，体积比）冻融提取胞内代谢物。胞内代谢物提取液中加入氘标记琥珀酸作为内标，随后进行冻干及衍生化。每个取样点进行 3 次胞内代谢物提取平行实验。利用气相色谱-飞行时间质谱联用设备（GC-TOF-MS）对胞内代谢物进行检测。每个样品进行两次平行检测。GC-TOF-MS 检测条件及参数设定参照文献 [7]。运用 Masslynx 4.1 软件对代谢图谱进行定性、定量分析，利用 Matlab（R2008a）对数据进行多元统计分析。

2 结果与讨论

2.1 工艺过程对细胞生长及产物浓度的影响

图 1 为两个工艺工业生产发酵阶段细胞生长及产物浓度曲线。如图 1 所示，工艺 2 在工业生产发酵阶段的产物浓度比工艺 1 提高近 20%。根据两个工艺条件下的细胞生长曲线，在细胞生长的延滞期、指数生长期及稳定期分别选择 4、28、48、84 及 124 h 进行代谢组学分析。由于两个工艺的种子培养期培养工艺不同，因此在种子培养期选择 4、28 及 48 h 进行胞内代谢物提取，对不同种子培养期工艺下的细胞进行代谢特征分析。

2.2 *P. mutilus* 胞内代谢物的定性定量分析

运用 Masslynx 4.1 软件及国家标准技术（NIST）质谱库对胞内代谢物进行定性。本实验共检测出 100 余种 *P. mutilus* 胞内代谢物，对包括 TCA 循环中间代谢物、氨基酸、脂肪酸、醇类、糖类以及磷酸化化合物在内的 51 种代谢物成功定性，定性结果如表 2 所示。样品中每个代谢物的峰面积与该样品中氘标记琥珀酸的峰面积的比值视为该代谢物的相对含量。

表 1 两个工艺的工业发酵过程参数

Table 1 Profiles of parameters in two industrial fermentation processes

Fermenter volume/m ³	Aeration rate/m ³ · h ⁻¹	Fermenter pressure/MPa	pH	Work volume/m ³	Rotational speed/r · min ⁻¹	Temperature /℃	Inoculum size/%
50	1600	0.05	6.7	35	150	25.0	10

表 2 *P. mutilis* 胞内代谢物定性结果
Table 2 Identification of intracellular
metabolites of *P. mutilis*

No.	Retention time/min	Metabolites
1	7.1	lactic acid
2	7.57	acetic acid
3	8.24	alanine
4	8.5	hydroxylamine
5	9.29	oxalic acid
6	10.03	ketazolam
7	11.38	valine
8	11.8	ethanolamine
9	12.18	urea
10	12.79	cadaverine
11	12.96	phosphoric acid
12	13.08	glycerol
13	13.57	leucine
14	13.65	proline
15	13.89	glycine
16	14.23	succinic acid
17	14.8	uracil
18	15.26	fumaric acid
19	15.47	serine
20	16.15	threonine
21	16.63	alanine
22	17.91	phosphenodiimidic amide
23	18.36	aspartic acid
24	18.92	malic acid
25	19.4	threitol
26	19.64	pyroglutamic acid
27	19.9	GABA
28	20.12	oxamide
29	20.66	pentanedioic acid
30	22.22	glutamic acid
31	22.33	pentanoic acid
32	24.06	butanediamine
33	24.51	xylitol
34	25.49	glycerol 3-phosphate
35	26.76	citric acid
36	27.47	tetradecanoic acid
37	27.65	inositol
38	28.37	glucose
39	29.04	glucitol
40	29.17	mannitol
41	30.13	mannose
42	31.56	palmitic acid
43	32.25	myo-inositol
44	33.47	heptadecanoic acid
45	34.68	9,12-octadecadienoic acid
46	34.8	oleic acid
47	35.3	stearic acid
48	36.52	CAMP
49	37.75	2-furanacetic acid
50	45.18	amidarone
51	46.02	tricyclo

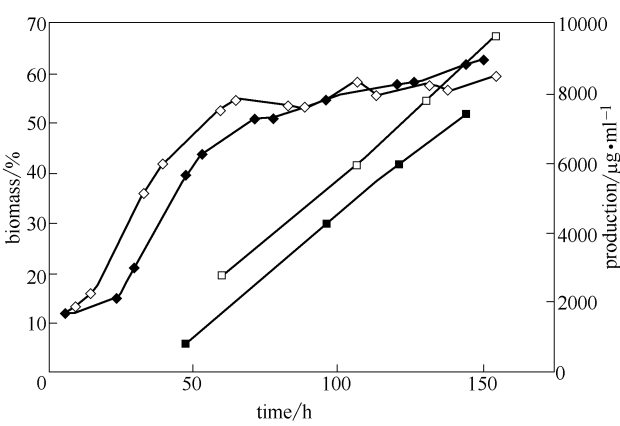


图 1 发酵过程的生物量及产量

Fig. 1 Biomass and production of fermentation processes

◆ biomass of process 1; ◇ biomass of process 2;
■ production of process 1; □ production of process 2

2.3 工艺过程对种子培养期细胞代谢特征的影响

图 2(a) 为两个工艺种子培养期 *P. mutilis* 胞内代谢物的 PCA 得分图，每个数据点代表一个样品的整体代谢特征，数据点的分布表示样品间代谢特征的相似程度。如图 2(a) 所示，两个工艺种子培养期的样品依照代谢特征被分为三组：工艺 1 种子培养期的样品聚为一类；工艺 2 种子培养期 4 h 与 28 h 的样品聚为一类；工艺 2 的 48 h 样品与其他样品距离较远，单独聚为一类。聚类结果表明在工艺 1 的种子培养过程中 *P. mutilis* 代谢特征相似，而在工艺 2 的种子培养后期，*P. mutilis* 代谢特性出现明显变化。图 2(b) 为 PCA 载荷图，每个数据点代表一种胞内代谢物，数据点在载荷图中的分布代表每种代谢物对 PCA 得分图中代谢特征聚类结果的贡献程度。如图 2(b) 所示，丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、脯氨酸 4 种氨基酸以及柠檬酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸 4 种 TCA 循环中间代谢物对两个工艺种子培养期 *P. mutilis* 的代谢特征聚类结果贡献显著，为两个工艺种子培养期的特征代谢物。

对以上几种特征代谢物在种子培养期的相对含量变化趋势进行分析。如图 3 所示，特征代谢物在两个工艺种子培养期中均为显著变化 ($\alpha < 0.05$, *; $\alpha < 0.01$, **)。4 种特征氨基酸在工艺 1 的种子培养期相对含量始终较低；而在工艺 2 的种子培养中后期，特征氨基酸相对含量出现显著提高。两个工艺种子培养期的差别在于工艺 2 种子培养期的培养基中含有玉米浆^[9]，细胞以玉米浆为主要氮

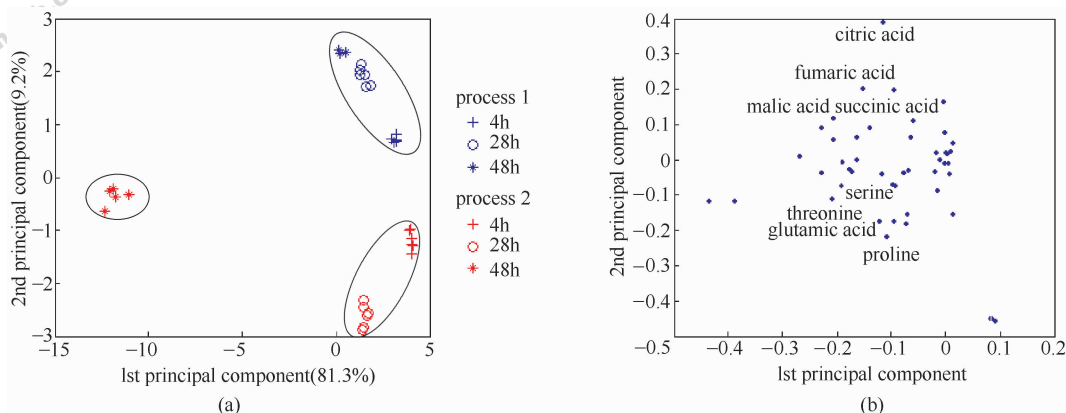


图2 种子培养期细胞的得分图 (a) 与载荷图 (b)

Fig. 2 PCA score plot (a) and loading plot (b) of samples of seed culture processes

源。在抗生素的发酵过程中，细胞对氮源的代谢能力会对抗生素的合成效率产生影响^[11]。工艺2较高的胞内氨基酸含量表明在以玉米浆为氮源的培养基中，种子期的 *P. mutilis* 细胞具有更强的氮源代谢活力。在工艺2的种子培养期，几种 TCA 循环中间代谢物在 48 h 相对含量显著提高，并且高于工艺1中的相对含量（柠檬酸除外）。TCA 循环中间代谢物的相对含量反映中心碳代谢的代谢流活力，当 TCA 循环中间代谢物相对含量较高时表明胞内中心碳代谢活力较高^[12]。以上分析表明，种子培养期玉米浆的添加，增强了 *P. mutilis* 细胞工业发酵接种前的碳源和氮源代谢活力。

2.4 工艺过程对工业发酵过程细胞代谢特征的影响

对工业发酵过程中的 *P. mutilis* 胞内代谢物进行 PCA 分析。如图 4(a) 所示，两个工艺工业发酵过程的 4 h 与 28 h，84 h 与 124 h 的样品具有相似的代谢特征；而在 48 h，两个工艺的细胞表现出较明显的代谢差异。两个工艺工业发酵过程的特征性成分包括柠檬酸、苹果酸、富马酸以及油酸、亚油酸 [图 4(b)]。

截短侧耳素的工业发酵培养基中包括豆油，而豆油中的主要成分——油酸与亚油酸则是两个发酵过程中的特征性成分。在最初的工业发酵研究中，豆油主要被当作一种消泡剂进行添加^[13]。而对一些抗生素发酵而言，豆油可以作为一种很好的迟效碳源^[14]。摇瓶水平的研究表明，豆油在 *P. mutilis* 的发酵过程中可作为迟效碳源被菌株代谢^[9]。但由于高额的成本，有关豆油在实际工业发酵中对 *P. mutilis* 代谢的影响研究较难开展。本文运用代谢组学技术发现，工艺2中油酸与亚油酸在工业发

酵阶段的胞内含量一直处于下降趋势，而这两种特征性成分在工艺1的工业发酵前期均出现了相对含量的上升 [图 5(a)、(b)]。这表明在工业发酵初期工艺1中 *P. mutilis* 并没有对营养物质进行快速利用，进而造成在发酵前 28 h 工艺1的细胞生长速率低于工艺2的细胞生长速率（图 1）。由于两工艺中的 *P. mutilis* 细胞在接种前表现出不同的代谢特征，据此推测，工业发酵过程中细胞对营养物质不同的利用速率可能与两个工艺不同的种子培养过程有关。如图 5(c)~(e) 所示，柠檬酸、富马酸和苹果酸这 3 种 TCA 循环的中间代谢物在前 28 h 胞内含量极低；28 h 后，胞内 TCA 循环中间代谢物含量增加，并且工艺2的胞内含量高于工艺1中的含量。因此工艺2的细胞在工业发酵过程的中心碳代谢活力高于工艺1的细胞。由于截短侧耳素的生物合成前体，如乙酰辅酶 A、丙酮酸等物质主要由中心碳代谢提供^[15]，因此较高的中心碳代谢活力也是工艺2的产量高于工艺1的原因之一。

3 结 论

本文基于代谢组学及多组元数据分析方法提出了一种新的抗生素工业发酵过程研究方法。以截短侧耳素工业发酵过程为例，对两种发酵工艺中的 *P. mutilis* 细胞进行代谢组学分析。分析表明，不同种子期培养工艺对 *P. mutilis* 的胞内初级代谢产物，特别是氨基酸以及 TCA 循环中间代谢物影响明显；同时发现，不同发酵工艺影响 *P. mutilis* 细胞利用豆油等营养成分的能力。相比传统的种子培养工艺，以玉米浆为氮源的种子培养过程使细胞具有更强的碳源、氮源代谢能力，进而在后续的工业

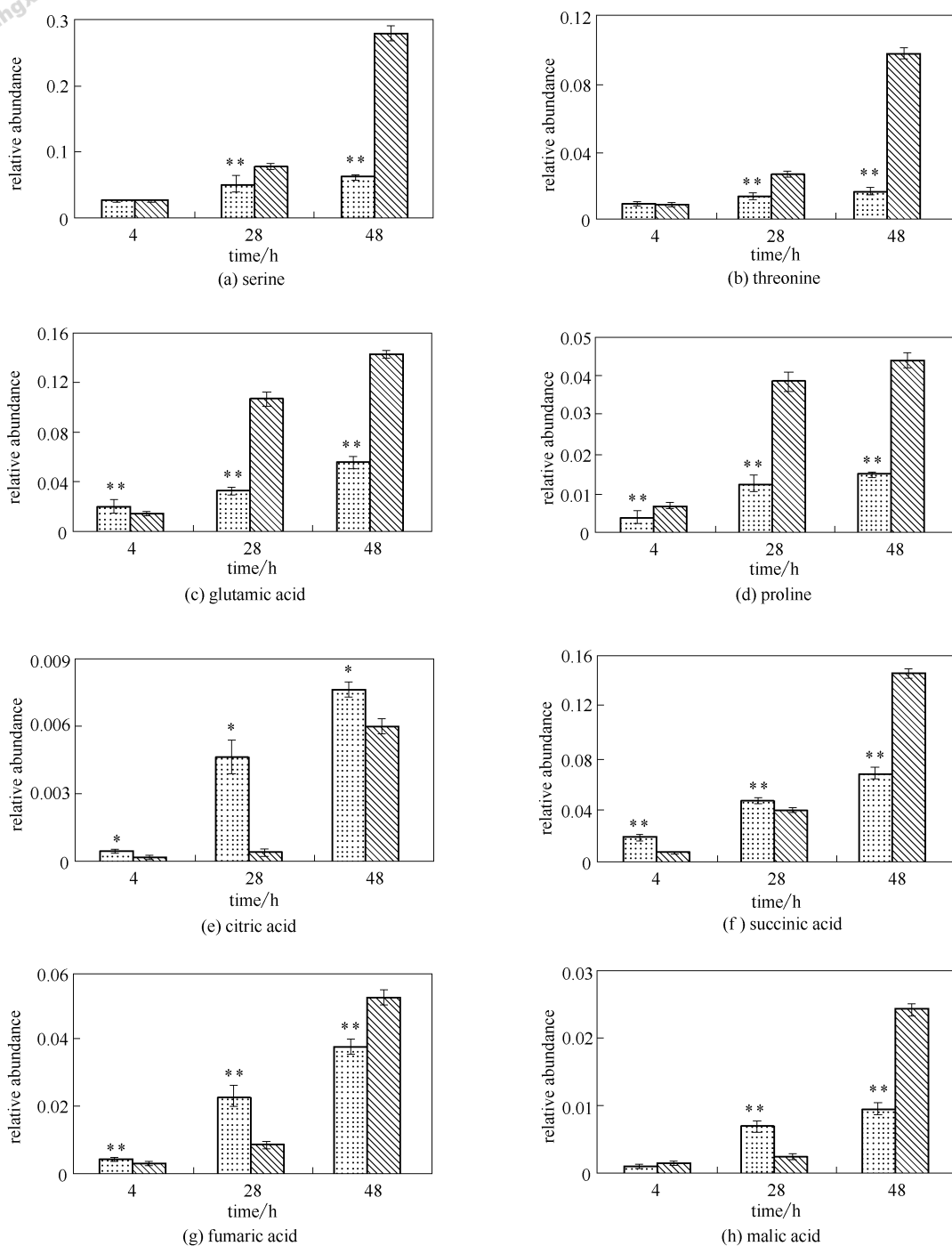


图 3 种子培养期胞内特征代谢物的变化趋势

Fig. 3 Variation of intracellular biomarkers of seed culture processes

□ process 1; ▨ process 2

发酵过程中 *P. mutilis* 可对营养物质更快速地利用, 获得更高产量。在工业大规模发酵过程中利用代谢组学手段可将菌株的代谢特性与发酵过程有效结合, 为进一步的工业大规模发酵研究提供理论依据, 可使发酵过程的优化更加有效地进行。

References

- [1] Zhang Siliang (张嗣良). Study on the fermentation processes at multi-levels in bioreactor and its application for special purposes—optimization and scaling up of the fermentation process based on the parameter correlation

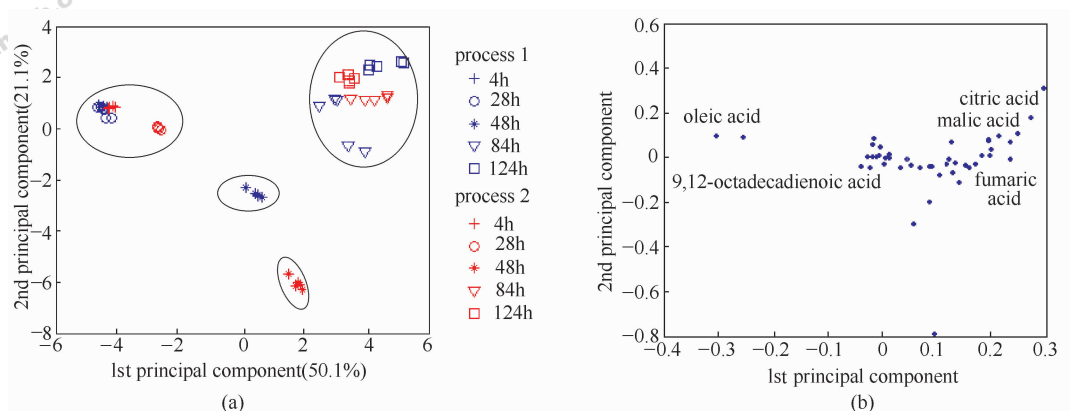


图4 工业发酵过程细胞的得分图 (a) 与载荷图 (b)

Fig. 4 PCA score plot (a) and loading plot (b) of samples of fermentation processes

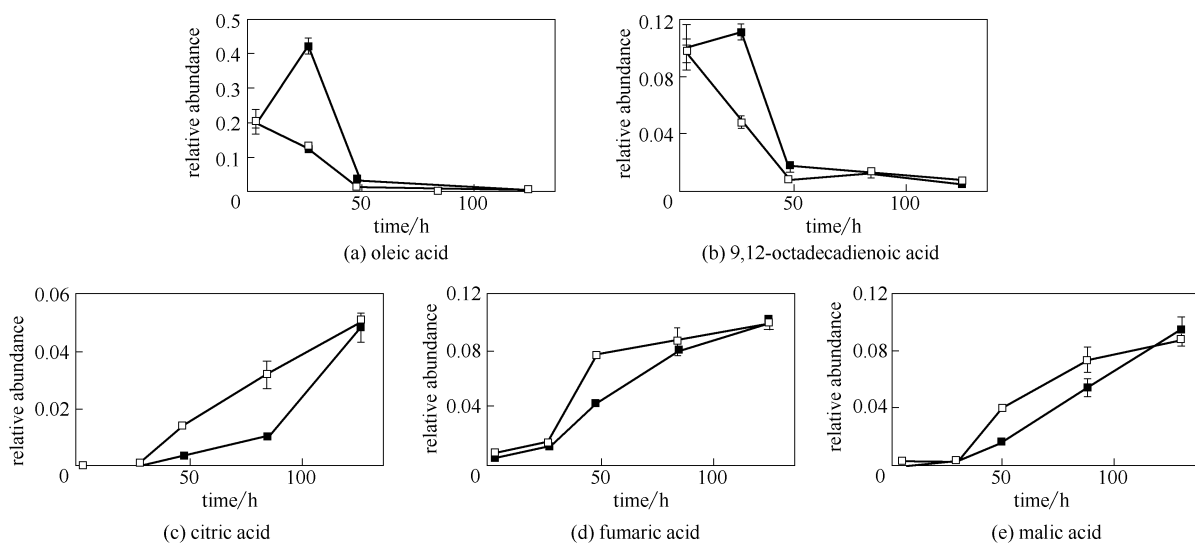


图5 两个工艺工业发酵过程生物标记物的变化趋势

Fig. 5 Variation of intracellular biomarkers of two fermentation processes

■ process 1; □ process 2

- method [J]. *Engineering Science* (中国工程科学), 2001, **3** (8): 37-45
- [2] Yong Soo Park, Isao Momose, Kimiko Tsunoda, Mitsuyasu Okabe. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **40** (6): 773-779
- [3] Arnold L Demain, Jose L Adrio. Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation [J]. *Progress in Drug Research*, 2008, **65**: 251-289
- [4] Stefan Rokem J, Anna Eliasson Lants, Jens Nielsen. Systems biology of antibiotic production by microorganisms [J]. *Natural Product Reports*, 2007, **24** (6): 1262-1287
- [5] Hiroaki Kitano. Systems biology: a brief overview [J]. *Science*, 2002, **295** (5560): 1662-1664
- [6] Jørn Smedsgaard, Jens Nielsen. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, **56** (410): 273-286
- [7] Ding Mingzhu, Cheng Jingsheng, Xiao Wenhai, Qiao Bin, Yuan Yingjin. Comparative metabolomic analysis on industrial continuous and batch ethanol fermentation processes by GC-TOF-MS [J]. *Metabolomics*, 2009, **5** (2): 229-238
- [8] Ding Mingzhu, Wang Xin, Yang Yang, Yuan Yingjin. Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation [J]. *Metabolomics*, DOI 10.1007/s11306-011-0303-6
- [9] Hu Changhua, Zou Yi, Zhao Wenting. Effect of soybean oil on the production of mycelial biomass and pleuromutilin in the shake-flask culture of *Pleurotus mutilus* [J]. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **25** (10): 1705-1711
- [10] Othmane Benkortbi, Salah Hanini, Fatima Bentahar. Batch kinetics and modelling of Pleuromutilin production by *Pleurotus mutilus* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, **36** (1): 14-18

- [11] Yair Aharonowitz. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis [J]. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1980, **34**: 209-233
- [12] Christoph Wittmann, Michael Hans, Wouter A. van Winden, Cor Ras, Joseph J Heijnen. Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **89** (7): 839-847
- [13] Knauseder F, Brandl E. Pleuromutilins: fermentation, structure and biosynthesis [J]. *The Journal of Antibiotics*, 1976, **29** (2): 125-131
- [14] Elander R P. Industrial production of β -lactam antibiotics [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61** (5/6): 385-392
- [15] Wolfgang Eisenreicha, Matthias Schwarzb, Alain Cartayradeb, Duilio Arigonib, Meinhart H Zenke, Adelbert Bacher. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms [J]. *Chemistry & Biology*, 1998, **5** (9): 221-233