

运用高通量筛选技术优化红霉素A发酵的合成培养基

廖建国 洪铭 储炬*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: **目的** 设计并优化出一种适用于红霉素发酵的合成培养基。**方法** 利用单因素缺失实验设计来减少培养基组分, 然后利用Plackett-Burman实验设计来优化组分浓度。上述实验都是采用高通量方法进行的。**结果** 最初选取了38种与生长和次级代谢相关的物质; 然后通过2次单因素缺失实验将培养基组分减少到了19种; 最后通过Plackett-Burman实验对19种组分的浓度进行了进一步优化, 确定各物质的浓度。5L罐发酵结果表明本研究获得的优化后合成培养基生成的红霉素A产量是采用现有文献报道合成培养基得到红霉素A产量的13.6倍。**结论** 高通量筛选技术是一种快速有效的筛选方法, 该方法适合于优化培养基的组分。采用本论文中得到合成培养基可以对红色糖多孢菌的胞内代谢特征和红霉素A合成的关键代谢因素进行深入分析, 利用这些代谢特点和影响代谢的关键因素, 本文可以更加理性地对红霉素A的发酵过程进行调控, 进而提高工业红霉素A产量并降低生产成本。

关键词: 高通量筛选; 单因素缺失实验; 红霉素A; 红色糖多孢菌; 合成培养基

中图分类号: R945 **文献标志码:** A

Optimization of synthetic medium for erythromycin A production by high-throughput screening technology

Liao Jian-guo, Hong Ming and Chu Ju

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

Abstract Objective To design and optimize a synthetic medium for the production of erythromycin A. **Methods** Single factor deletion experiments were employed to reduce the components of the medium, then Plackett-Burman experiment was carried out to optimize the concentration of each component. All experiments were carried out by a high throughput method. **Results** The initial medium consists of 38 component related to cell growth and secondary metabolism. Two sequential single factor deletion experiments were conducted, and the number of component was reduced to 19. At last the Plackett-Burman experiment was carried out to optimize the final concentration of these components. The titer was 13.6 times higher using this optimized recipe than that of using original medium formula. **Conclusion** High through-put method is very efficient for synthetic medium optimization. In this study, we have a deeper understanding of the metabolism of the cell and the process of erythromycin production, thus it will help us promote the erythromycin A production and lower the costs.

Key words High-throughput screening method; Single factor deletion experiment; Erythromycin A; *Saccharopolyspora erythraea*; Chemically defined synthetic medium

收稿日期: 2017-03-01

作者简介: 廖建国, 男, 生于1987年, 在读硕士研究生, 研究方向: 微生物代谢调控, E-mail: 472974345@qq.com

*通讯作者, E-mail: juchu@ecust.edu.cn

红霉素A主要是由红色糖多孢菌合成的,是一种广谱大环内酯类抗生素,它主要被用于治疗革兰阳性菌引起的疾病。红霉素A的抗菌谱与青霉素非常类似,因而红霉素A可以作为青霉素过敏患者的备用药。同时,红霉素的许多衍生物也被证明具有抗寄生虫、免疫抑制和抗发炎等功效^[1-2]。

在过去的几十年中,研究人员对红霉素A的合成和发酵调控进行了大量研究,红霉素A的产量也得到了不断提高^[3-5]。为了进一步提高红霉素A的产量需要对红霉素A合成过程中的胞内代谢和胞外环境变化进行更深入的分析,急需寻找影响红霉素A合成的确切因素。然而,以前的红霉素A发酵调控的研究大部分是在复合培养基条件下进行^[6-8]。由于复合培养基的成分复杂,整个发酵过程中菌体所存在的环境因素变化较大,特别菌浓难以准确测定,很难找到红霉素A合成与环境条件之间的确切定量关系^[9]。而一些采用合成培养基的实验中,红霉素A的产量又非常低^[10-14],难以满足红霉素合成定量研究的需求。采用合成培养基进行红霉素A发酵,则能够通过菌体所处环境的精确测定来找到红霉素A合成与环境条件(主要是胞外物浓度)之间的确切关系。同时,采用合成培养基有利于进行胞内和胞外代谢物组分析,从而进一步得到环境条件变化对胞内代谢的影响,进而对红霉素A合成的规律有更深入的理解,为进一步提高红霉素A的产量奠定科学基础。

本研究的主要内容是通过单因素缺失实验和Plackett-Burman^[15-17]实验从38个物质中筛选出一种成分数量少且有利于红霉素A合成的合成培养基。为了提高效率,本文采用了一种高通量的筛选和测定方法,得到了一种有利于红霉素A合成的合成培养基。本研究为后续红霉素A发酵过程中的代谢物组研究以及红霉素A合成过程中的代谢调控规律的研究打下了坚实基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

Saccharopolyspora erythraea E3菌株,用于红霉素A发酵。沙土管保存/甘油管保藏。菌种保存在本实验室中。短小芽孢杆菌*Bacillus pumilus* CMCC(B) 63202购于广东环凯微生物科技有限公司。用于高通量测定红霉素浓度的实验菌。

1.2 培养基

1.2.1 平板培养基

淀粉10g/L,玉米浆13g/L,氯化钠3g/L,硫酸铵3g/L,琼脂20g/L,碳酸钙3g/L, pH=7.0。

1.2.2 种子培养基

淀粉40g/L,蛋白胨20g/L,氯化钠4g/L,糊精20g/L,磷酸二氢钾0.2g/L,硫酸镁0.25g/L,碳酸钙3g/L, pH=7.0。

1.2.3 普通合成培养基^[18]

葡萄糖10g/L,硫酸铵5g/L,磷酸氢二钾3g/L,磷酸二氢钾2g/L,硫酸镁0.4g/L,脯氨酸7g/L,硫酸锰0.0024g/L,氯化钴0.003g/L,硫酸锌0.0024g/L,硫酸亚铁0.00036g/L,钼酸钠0.00024g/L,氯化钙0.0012g/L,硫酸铜0.00012g/L。

1.2.4 检测菌固体培养基

蛋白胨0.5%,牛肉膏0.3%,磷酸氢二钾0.3%,葡萄糖1%,氯化钠0.5%,琼脂2%, pH=7.0。

1.2.5 检测培养基

蛋白胨0.5%,牛肉膏0.3%,磷酸氢二钾0.3%,葡萄糖1%,氯化钠0.5%, pH=7.0。

1.3 培养方法

1.3.1 平板培养

将还未凝固的平板培养基倒入平板中,取出甘油管保存的孢子液50 μ L,均匀涂布在平板上。接着在34 $^{\circ}$ C条件下培养4-6d。

1.3.2 摇瓶种子培养

从已经生长好的茄子瓶中挖出一块大小为1cm²的方块接种到装有50mL种子培养基的500mL摇瓶中,在34 $^{\circ}$ C, 220r/min条件下培养48h。

1.3.3 48孔板发酵培养

为了提高合成培养基的筛选效率,本研究采用48孔板进行培养基的筛选,其中单孔深4cm,最大装液量为5mL。首先将培养好的摇瓶种子转入5mL离心管中,在4000r/min条件下离心5min,并除去上清液。接着用30mL 0.9%NaCl溶液清洗菌体3次。清洗完毕,用50mL去离子水重悬菌体。取出的合成培养基0.9mL加入到48孔板中,再用排枪吸取0.1mL种子悬液到多孔板中。然后在34 $^{\circ}$ C, 220r/min条件下培养120h。

1.3.4 5L罐发酵培养

用0.9%的无菌氯化钠溶液把种子培养基洗涤,按照9%接种量接种。在发酵过程中通过调节转速使发酵过程中溶氧在40%以上,同时用葡萄糖和氢氧化钠来调节发酵液pH在7.0左右,发酵温度34 $^{\circ}$ C。

1.4 高通量测定红霉素A浓度

为了提高实验效率,本实验中采用一种高通量方法来检测红霉素A的浓度。基本原理是利用红霉素A对检测菌生长的抑制来测定红霉素A的浓度^[19]。高通量测定红霉素A浓度的方法如图1所示。

(1)取出甘油管保存的检测菌(短小芽孢杆菌),用竹签接种到装有检测菌固体培养基的茄子瓶中,在37℃条件下培养5~6d。

(2)菌悬液准备:用0.9%氯化钠溶液将短小芽孢杆菌从茄子瓶里洗下。适当稀释,使菌悬液在580nm波长下的吸光值在1.0左右。按照5%接种量将检测菌

的菌悬液接入到检测培养基里。然后将接种后的检测培养基分装到48孔板中,装液量225μL。

(3)样品分析:取25μL按一定比例稀释的样品,添加到含检测菌的检测培养基里,在37℃,150r/min条件下进行培养。当空白样品吸光值达到0.6左右(5.5~6.5h),取出48孔板用酶标仪检测各个样品的 A_{580} 值。

(4)计算红霉素A浓度:以 A_{580} 值为纵坐标,以 $\log(\text{红霉素A浓度})$ 为横坐标做出标准曲线。根据样品的 A_{580} 值和标准曲线计算出红霉素A的浓度,标准曲线为 $Y=-0.5694X+0.3666$, $R^2=0.9934$ (其中Y代表 A_{580} 的数值,X代表以10为底数红霉素浓度的对数值)。

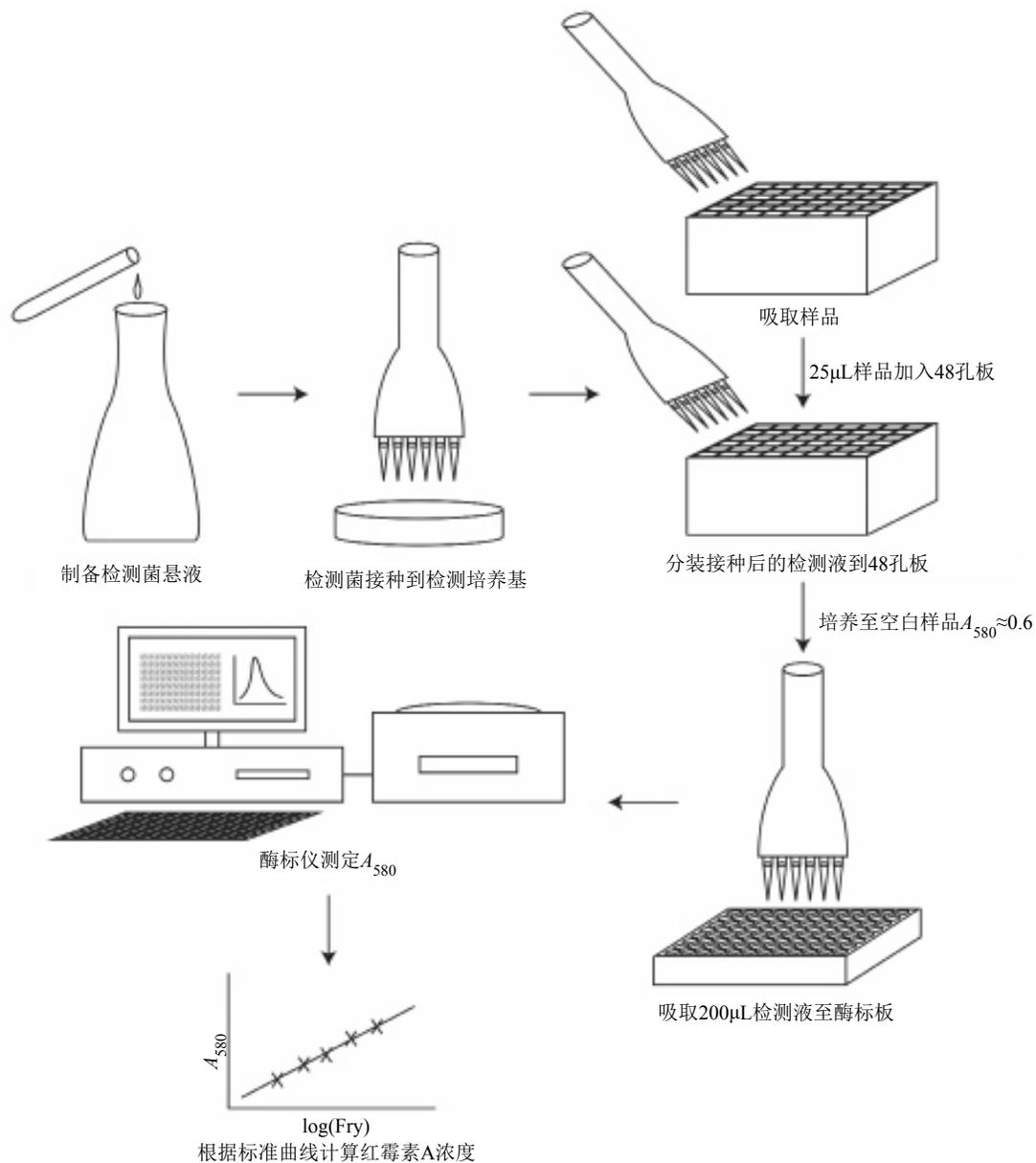


图1 高通量测定红霉素A浓度示意图

Fig. 1 The high through-put determiantion method for erythromycin A

1.5 单因素缺失实验

为了减少培养基的组分，降低分析的难度，本文首先进行单因素缺失实验，初步筛选出对红霉素A合成有利的物质。根据菌体生长和抗生素合成所需的成分，本文挑选了38种物质作为初始培养基组分。在后续培养基中，每个培养基都是在初始培养基的基础上减去38种物质中的1种。发酵120h，通过比较某种合成培养基的红霉素A的产量与初始培养基的关系来确定该物质是否有利于红霉素A合成。 C_x 指单因素实验设计的合成培养基中红霉素A的产量， C_1 指初始培养基中的红霉素A产量。如果 $C_x/C_1 > 1$ ，则表明该物质不利于红霉素A合成，应该从初始培养基中除去；反之，若 $C_x/C_1 < 1$ ，则表明该物质有利于红霉素A的合成，应该保留。

为了尽可能减少培养基的组分，本文一共进行了2次单因素实验。第2次单因素实验的初始培养基组分为第1次单因素实验的基础上除去了那些对红霉素A合成不利的组分。

1.6 Plackett-Burman(PB)实验设计

根据2次单因素缺失实验，最终确定了培养基包含19个营养物质，分别对19个物质进行PB实验设计，设定高水平是低水平的1.25倍，每组实验重复3

次，每个样品测定3次。自变量、编码和水平因素见表1。Plackett-Burman实验的设计如表2所示，其中

表1 Plackett-Burman设计因子水平及编码

Tab. 1 Levels of each component in Plackett-Burman design

| 变量 | 因素 | 高水平/(g/L) | 低水平/(g/L) |
|-----|-------|-----------|-----------|
| F1 | 葡萄糖 | 21.875 | 17.5 |
| F2 | 磷酸氢二钾 | 8.75 | 7 |
| F3 | 磷酸二氢钾 | 3.75 | 3 |
| F4 | 七水硫酸镁 | 1.9219 | 1.5375 |
| F5 | 丙氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F6 | 精氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F7 | 天冬氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F8 | 半胱氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F9 | 亮氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F10 | 异亮氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F11 | 丝氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F12 | 苏氨酸 | 0.5 | 0.4 |
| F13 | 柠檬酸三钠 | 1.25 | 1 |
| F14 | 氯化钴 | 0.0094 | 0.0075 |
| F15 | 四硼酸钠 | 0.0004 | 0.0003 |
| F16 | 三氯化铁 | 0.0075 | 0.006 |
| F17 | 氯化铜 | 0.000375 | 0.0003 |
| F18 | 钼酸铵 | 0.000375 | 0.0003 |
| F19 | 碳酸钙 | 11.3636 | 9.0909 |

表2 Plackett-Burman实验设计表

Tab. 2 Plackett-Burman design

| Run | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | F7 | F8 | F9 | F10 | F11 | F12 | F13 | F14 | F15 | F16 | F17 | F18 | F19 |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 2 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 3 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 5 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 6 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 10 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 11 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 12 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 13 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 14 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 15 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 17 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 18 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 19 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 20 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 |

Run代表培养基序号。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

单因素实验的实验组比较多，为了提高实验效率本文采用了高通量的方法进行发酵和红霉素A的检测。第1次单因素缺失实验结果见表3，有12个物质的 $C_x/C_1 > 1$ ，说明这些物质的添加不利于红霉素A的合成。第1次单因素实验后，还剩26种物质。为了进一步减少培养基中的组分数量，本文又进行了第2次单因素缺失实验，其初始培养基组成为第1次单因素缺失筛选后剩下的组分。第2次单因素缺失实验的结果如表4所示。第2次单因素实验中共有7个组分 $C_x/C_1 > 1$ ，这表明这些组分也不利于红霉素A的合成，因此这些组分也被从培养基中除去。经过两次单因素缺失实验后，最终培养基中的组分还剩19种(表4中 $C_x/C_1 < 1$ 的组分)。

2.2 Plackett-Burman实验结果

Plackett-Burman实验结果如图2所示。通过Design expert软件进行数据分析，其结果如表5所示，其中standardized effects数值的绝对值大小代表该成分对产量影响的大小，值越大影响越大(正数表示该物质浓度应该提高，负数代表该成分浓度应该下调)，对红霉素影响最大的有磷酸氢二钾，天冬氨酸，磷酸二氢钾，亮氨酸和氯化钴，对各组分的浓度进行再次调整。浓度增加的组分有葡萄糖，精氨酸，天冬氨酸，半胱氨酸，亮氨酸，柠檬酸三钠，氯化钴，四硼酸钠，氯化铁和碳酸钙；浓度降低的有磷酸氢二钾，磷酸二氢钾，七水硫酸镁，丙氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，苏氨酸，氯化铜和钼酸铵。最终培养基成分和浓度为：葡萄糖22g/L，丙氨酸0.2g/L，精氨酸0.8g/L，天冬氨酸0.8g/L，半胱氨酸0.6g/L，亮氨酸0.8g/L，异亮氨酸0.2g/L，丝氨酸0.2g/L，苏氨酸0.2g/L，磷酸氢二钾4g/L，磷酸二氢钾2g/L，七水硫酸镁1g/L，柠檬酸三钠1.4g/L，六水氯化钴0.009g/L，四硼酸钠0.0006g/L，三氯化铁0.0068g/L，氯化铜0.00027g/L，钼酸铵0.00027g/L，pH=7.0。

2.3 普通合成培养基与优化后的合成培养基对比

在相同的菌株E3和相同的工艺条件下，本文在5L罐中对普通合成培养基(过去本课题组研究红色糖多孢菌代谢所采用合成培养基^[18])与优化的合成培养基的红霉素A产量进行了对比(图3)。本论文中优化合成培养基在120h红霉素产量达到1113mg/L，而普通培养基的产量只有81.9mg/L。本论文优化的合成

培养基产量比普通合成培养基产量提高13.6倍。

另外，在5L发酵罐发酵过程中，采用优化后的培养基可以得到更高的菌浓(图4)。同时，优化培养基在发酵过程中的残磷浓度一直较高，高残磷浓度或许与高菌浓以及高红霉素产量有关。发酵过程中

表3 单因素缺失实验一

Tab. 3 The first round of single factor deletion experiments

| 缺失组分 | 浓度/(g/L) | 培养基 | C_x/C_1 |
|-------|----------|-----|------------|
| | | 1 | 1.00±0.01 |
| 蔗糖 | 20 | 2 | 1.076±0.02 |
| 葡萄糖 | 17.5 | 3 | 0.97±0.03 |
| 硫酸铵 | 16.262 | 4 | 1.18±0.02 |
| 磷酸氢二钾 | 7 | 5 | 0.17±0.04 |
| 磷酸二氢钾 | 3 | 6 | 0.17±0.02 |
| 七水硫酸镁 | 1.5375 | 7 | 0.17±0.01 |
| 硫酸钾 | 0.25 | 8 | 1.08±0.02 |
| 氯化钠 | 2 | 9 | 1.01±0.03 |
| 丙氨酸 | 0.4 | 10 | 0.16±0.04 |
| 精氨酸 | 0.4 | 11 | 0.86±0.02 |
| 天冬氨酸 | 0.4 | 12 | 0.99±0.04 |
| 半胱氨酸 | 0.4 | 13 | 0.96±0.02 |
| 谷氨酸 | 0.4 | 14 | 0.74±0.03 |
| 甘氨酸 | 0.4 | 15 | 0.49±0.02 |
| 组氨酸 | 0.4 | 16 | 1.01±0.04 |
| 亮氨酸 | 0.4 | 17 | 0.86±0.03 |
| 异亮氨酸 | 0.4 | 18 | 0.84±0.02 |
| 赖氨酸 | 0.4 | 19 | 0.80±0.03 |
| 甲硫氨酸 | 0.4 | 20 | 1.08±0.04 |
| 苯丙氨酸 | 0.4 | 21 | 0.19±0.02 |
| 脯氨酸 | 0.4 | 22 | 0.79±0.04 |
| 丝氨酸 | 0.4 | 23 | 0.98±0.02 |
| 苏氨酸 | 0.4 | 24 | 0.96±0.03 |
| 酪氨酸 | 0.4 | 25 | 1.05±0.02 |
| 缬氨酸 | 0.4 | 26 | 0.85±0.04 |
| 柠檬酸钠 | 1 | 27 | 0.84±0.02 |
| 丙酸钠 | 4 | 28 | 0.99±0.03 |
| 琥珀酸 | 1 | 29 | 1.01±0.04 |
| EDTA | 1.2 | 30 | 1.04±0.02 |
| 氯化钴 | 0.0075 | 31 | 0.14±0.05 |
| 氯化锌 | 0.0012 | 32 | 1.03±0.02 |
| 四硼酸钠 | 0.0003 | 33 | 0.38±0.04 |
| 三氯化铁 | 0.006 | 34 | 0.70±0.03 |
| 氯化铜 | 0.0003 | 35 | 0.80±0.02 |
| 钼酸铵 | 0.0003 | 36 | 0.99±0.03 |
| 氯化锰 | 0.0003 | 37 | 1.01±0.04 |
| 氯化钙 | 0.003 | 38 | 1.01±0.03 |
| 碳酸钙 | 9.0909 | 39 | 0.96±0.02 |

的另外一个现象是残糖浓度的差异。在整个培养过程中，本文都采用葡萄糖来反馈控制pH，在优化出的培养基中葡萄糖浓度一直在下降，然而在普通培养基中葡萄糖浓度一直在上升，这说明优化后的培养基中菌体的活性更高葡萄糖消耗更快，而普通培养基中葡萄糖消耗速率会越来越慢，这或许与普通培养基中底物的缺乏有关。

采用本论文中得到合成培养基可以对红色糖多孢菌的胞内代谢特征和红霉素A合成的关键代谢因素进行深入分析，利用这些代谢特点和影响代谢的关键因素，本文可以更加理性地对红霉素A的发酵过程进行调控，进而提高红霉素A产量并降低生产成本。

Flores^[10]等在合成培养基条件下研究红霉素A合成过程中聚酮合酶的多酶系统DEBS1、DEBS2和DEBS3的特征，然而其红霉素产量只有10μg/mL，难以确定研究结果对工业化的影响。Caffrey等^[11]在合

表4 单因素缺失实验二

Tab. 4 The second round of single factor deletion experiments

| 缺失组分 | 浓度/(g/L) | 培养基 | C_2/C_1 |
|-------|----------|-----|-----------|
| | | 1 | 1.00±0.02 |
| 葡萄糖 | 17.5 | 2 | 0.26±0.03 |
| 磷酸氢二钾 | 7 | 3 | 0.97±0.02 |
| 磷酸二氢钾 | 3 | 4 | 0.91±0.04 |
| 七水硫酸镁 | 1.5375 | 5 | 0.37±0.02 |
| 丙氨酸 | 0.4 | 6 | 0.93±0.04 |
| 精氨酸 | 0.4 | 7 | 0.66±0.03 |
| 天冬氨酸 | 0.4 | 8 | 0.99±0.04 |
| 半胱氨酸 | 0.4 | 9 | 0.94±0.02 |
| 谷氨酸 | 0.4 | 10 | 1.04±0.03 |
| 甘氨酸 | 0.4 | 11 | 1.01±0.03 |
| 亮氨酸 | 0.4 | 12 | 0.92±0.02 |
| 异亮氨酸 | 0.4 | 13 | 0.77±0.04 |
| 赖氨酸 | 0.4 | 14 | 1.02±0.02 |
| 苯丙氨酸 | 0.4 | 15 | 1.06±0.04 |
| 脯氨酸 | 0.4 | 16 | 1.02±0.02 |
| 丝氨酸 | 0.4 | 17 | 0.97±0.03 |
| 苏氨酸 | 0.4 | 18 | 0.92±0.02 |
| 缬氨酸 | 0.4 | 19 | 1.01±0.03 |
| 柠檬酸钠 | 0.4 | 20 | 0.87±0.04 |
| 丙酸钠 | 4 | 21 | 1.15±0.02 |
| 氯化钴 | 0.0075 | 22 | 0.79±0.03 |
| 四硼酸钠 | 0.0003 | 23 | 0.78±0.02 |
| 三氯化铁 | 0.006 | 24 | 0.48±0.03 |
| 氯化铜 | 0.0003 | 25 | 0.99±0.04 |
| 钼酸铵 | 0.0003 | 26 | 0.94±0.02 |
| 碳酸钙 | 9.0909 | 27 | 0.92±0.03 |

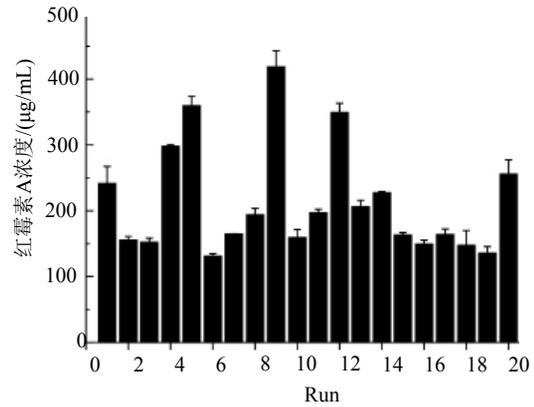


图2 Plackett-Burman实验结果

Fig. 2 Results of Plackett-Burman design

表5 Plackett-Burman实验结果分析

Tab. 5 Statistics analysis of Plackett-Burman results

| 组分 | Standardized effects | P-value |
|-------|----------------------|---------|
| 葡萄糖 | 21.3102 | 0.0179 |
| 磷酸氢二钾 | -83.1703 | 0.0012 |
| 磷酸二氢钾 | -63.9793 | 0.002 |
| 七水硫酸镁 | -26.3424 | 0.0118 |
| 精氨酸 | 33.4905 | 0.0074 |
| 天冬氨酸 | 69.4452 | 0.0017 |
| 亮氨酸 | 43.8033 | 0.0043 |
| 异亮氨酸 | -12.1685 | 0.0521 |
| 丝氨酸 | -23.1386 | 0.0153 |
| 苏氨酸 | -7.0929 | 0.1336 |
| 柠檬酸三钠 | 22.8232 | 0.0157 |
| 氯化钴 | 37.2465 | 0.006 |
| 四硼酸钠 | 17.4922 | 0.0262 |
| 三氯化铁 | 20.1044 | 0.0201 |
| 氯化铜 | -19.678 | 0.0209 |
| 钼酸铵 | -40.8629 | 0.005 |
| 碳酸钙 | 28.1158 | 0.0104 |

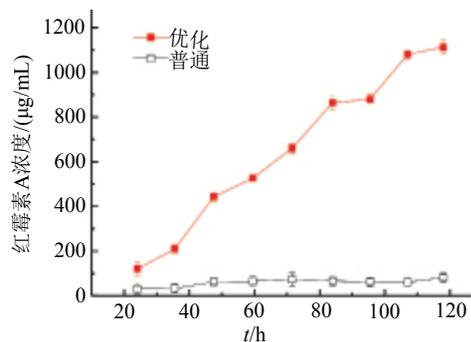
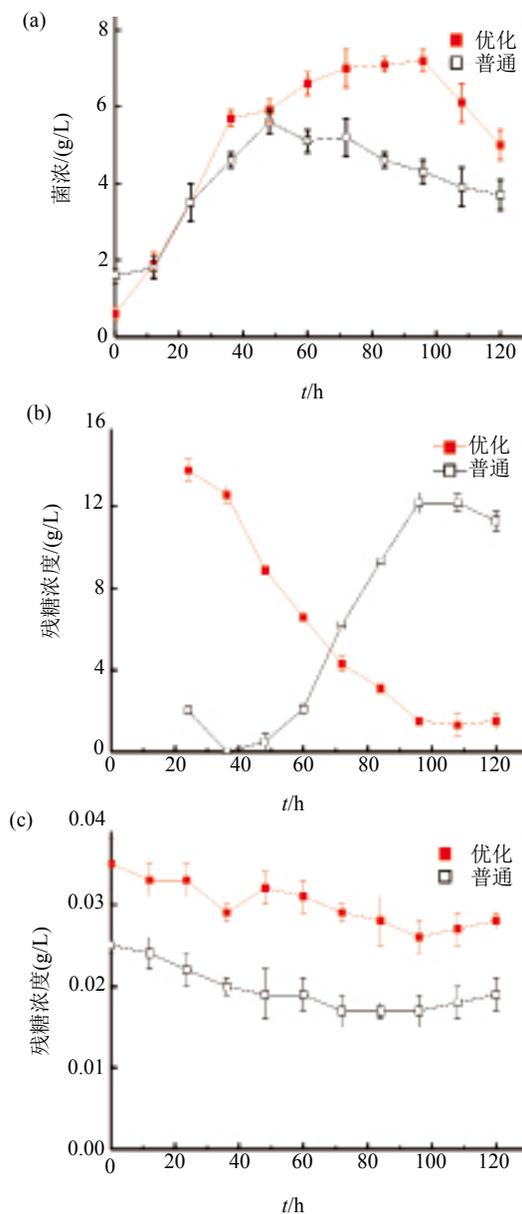


图3 普通合成培养基与优化的合成培养基的红霉素A产量对比

Fig. 3 Comparison of normal synthetic medium and optimized synthetic medium



注：a代表菌浓；b代表残糖浓度；c代表残磷浓度

图4 5L罐发酵过程参数

Fig. 4 Fermentation parameters in 5L fermentor

成培养基条件下研究氮源对*S. erythreus* NRRL B-2338菌生产红霉素的调控，发现提高铵离子浓度会极大降低红霉素合成，然而其红霉素最高产量仅仅只有10 μ g/mL，与工业条件差距非常大，也难以有工业价值。Maria等^[20]利用合成培养基批发酵，用交换树脂的方法来分离红霉素，然而红霉素产量也仅只有120 μ g/mL。而本论文优化的合成培养基中红霉素产量高达1113mg/L，因而利用本研究得到的培养基更有工业应用价值。

3 总结

本论文采用高通量的发酵和红霉素A检测的方法，并通过单因素缺失实验和Plackett-Burman实验，设计并优化了一种用于生产红霉素A的合成培养基。此培养基在发酵罐中的产量为本课题组前期研究红色糖多孢菌代谢过程中所采用的合成培养基的红霉素A产量的13.6倍。采用本论文中得到合成培养基可以对红色糖多孢菌的胞内代谢特征和红霉素A合成的关键代谢因素进行深入分析，利用这些代谢特点和影响代谢的关键因素，本文可以更加理性地对红霉素A的发酵过程进行调控，进而提高红霉素A产量并降低生产成本。

参考文献

- [1] Li Y Y, Chang X, Yu W B, *et al.* Systems perspectives on erythromycin biosynthesis by comparative genomic and transcriptomic analyses of *S. erythraea* E3 and NRRL23338 strains[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 1-13.
- [2] Mironov V A, Sergienko O V, Nastasyak I N, *et al.* Biogenesis and regulation of biosynthesis of erythromycins in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2004, 40(6): 531-541.
- [3] Reeve L M, Baumberg S. Physiological controls of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* are exerted at least in part at the level of transcription[J]. *Biotechnol Lett*, 1998, 20(6): 585-589.
- [4] Wu J Q, Zhang Q L, Deng W, *et al.* Toward improvement of erythromycin A production in an industrial *Saccharopolyspora erythraea* strain via facilitation of genetic manipulation with an artificial attB site for specific recombination[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(21): 7508-7516.
- [5] Wang Y, Wang Y G, Chu J, *et al.* Improved production of erythromycin A by expression of a heterologous gene encoding S-adenosylmethionine synthetase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(4): 837-842.
- [6] Yao L L, Liao C H, Huang G, *et al.* GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in the actinomycete *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(18):7935-7948.
- [7] Wu P P, Pan H, Zhang C M, *et al.* SACE_3986, a TetR family transcriptional regulator, negatively controls erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(7): 1159-1167.
- [8] Kamarei F, Attar H, Nikjah S, *et al.* Determination of erythromycins in fermentation broth using liquid phase extraction with back extraction combined with high

- performance liquid chromatography[J]. *Arab J Chem*, 2014, 7(3): 292-296.
- [9] Mashego M R, Rumbold K, Mey D M, *et al.* Microbial metabolomics: past, present and future methodologies[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(1): 1-16.
- [10] Flores M E, Sánchez S. Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, 26(2-1): 191-194.
- [11] Caffrey P, Bevitt D J, Staunton J, *et al.* Identification of DEBS 1, DEBS 2 and DEBS 3, the multienzyme polypeptides of the erythromycin-producing polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *FEBS Lett*, 1992, 304(2-3): 225-228.
- [12] Hsieh Y J, Kolattukudy P E. Inhibition of erythromycin synthesis by disruption of malonyl-coenzyme A decarboxylase gene *eryM* in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(3): 714-724.
- [13] Bermúdez O, Padilla P, Huitrón C, *et al.* Influence of carbon and nitrogen source on synthesis of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, methylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 164(1): 77-82.
- [14] Oliveira P H, Batagov A, Ward J, *et al.* Identification of erythrobactin, a hydroxamate-type siderophore produced by *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42(4): 375-380.
- [15] Analytical Methods Committee. Experimental design and optimisation (4): Plackett-Burman designs[J]. *Analyt Methods*, 2013, 5(8): 1901-1903.
- [16] Mandal S, Bhunia B, Kumar A, *et al.* A statistical approach for optimization of media components for phenol degradation by *Alcaligenes faecalis* using Plackett Burman and response surface methodology[J]. *Desalinat Water Treat*, 2013. 51(31-33): 6058-6069.
- [17] Amro A A, Mounir M, Salem-Bekhit, *et al.* Plackett-Burman randomization method for Bacterial Ghosts preparation form *E-coli* JM109[J]. *Saud Pharm J*, 2014, 22(3): 273-279.
- [18] Hong M, Huang M Z, Chu J, *et al.* Impacts of proline on the central metabolism of an industrial erythromycin-producing strain *Saccharopolyspora erythraea* via C labeling experiments[J]. *J Biotechnol*, 2016, 231: 1-8.
- [19] Tan J, Chu J, Hao Y Y, *et al.* A high-throughput screening strategy for accurate quantification of erythromycin[J]. *J Inst Chem Engin*, 2013, 44(4): 538-544.
- [20] Maria H L, Isabel A C. Recovery of erythromycin from fermentation broth by adsorption onto neutral and ion-exchange resins[J]. *Separat Purificat Technol*, 2005, 45(3): 232-239.