

综述近年来放线菌工业生产抗生素方面的研究进展, 包括工业菌种选育、发酵过程优化及放大方面的新理论和技术。系统比较分析和讨论这些新理论和技术在放线菌工业化生产应用方面的优缺点, 以及今后可能的发展方向。

郭美锦

放线菌工业菌种选育、过程优化 与放大研究进展

于岚^{1,2} 郭美锦^{1*} 储炬¹ 庄英萍¹ 张嗣良¹

(1. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

(2. 湖州师范学院 生命科学学院 浙江 湖州 313000)

摘要: 放线菌属由于能够产生一系列结构复杂的生物活性物质而受到广泛关注, 这些活性代谢产物的大规模发酵生产在医药、农业等领域的应用中起着重要的作用。本文综述近年来放线菌次级代谢产物产业化研究的一些新进展, 包括菌株的改造、生物过程优化和控制以及发酵放大技术, 并对这些方法和技术进行讨论。

关键词: 放线菌, 菌种改造, 生物过程优化, 发酵放大技术

Industrial antibiotic-producing actinobacteria: from strain improvement to bioprocess optimization and scale-up

YU Lan^{1,2} GUO Mei-Jin^{1*} CHU Ju¹ ZHUANG Ying-Ping¹ ZHANG Si-Liang¹

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

(2. School of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

Abstract: Actinobacteria are well known as they can produce a series of secondary metabo-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021201); 湖州市南太湖特聘专家计划项目

*通讯作者: Tel: 86-21-64251131; 信箱: guo_mj@ecust.edu.cn

收稿日期: 2013-02-22; 接受日期: 2013-05-20

lites with complex structures and various bioactivities. The industrial production of these secondary metabolites plays a vital role in medical and agricultural fields. Recent advances in strain improvement, bioprocess optimization and control, and fermentation scale-up were reviewed here. The holistic viewpoints and approaches applied in industrialized production of secondary metabolites by actinobacteria were discussed as well as the perspectives.

Keywords: Actinobacteria, Strain improvement, Bioprocess optimization, Fermentation scale-up

放线菌(Actinobacteria)是一类主要来源于土壤和水栖沉淀物的微生物,通过产生大量的胞外酶,如壳多糖酶、脂肪酶、淀粉酶、蛋白酶和纤维素酶等在有机物贫瘠的环境中生存,并通过产生一系列具有抑制其他微生物生长的次级代谢产物而达到自我保护的目的。这些具有生物活性的次级代谢产物在医药和农业应用上具有重要的作用,如抗细菌素、抗癌物质、免疫抑制剂、驱虫药以及抗真菌物质等^[1-2]。

放线菌产生的活性次级代谢产物具有较复杂的化学结构,在野生菌株中产量极低。为了满足在医药与工农业应用中的需求,通常需要大规模发酵来生产。因此,菌种改造、发酵过程优化及放大是至关重要的应用工程技术。为此,本文综述了目前在工业生产的放线菌发酵过程中的菌种改造、过程优化和放大的方法与技术,并通过一些实例来阐明这些技术的优点以及今后可能的发展方向。

1 放线菌的工业菌种改造

理想的工业用生产菌种需具备稳定的生产能力以及碳、氮源代谢转化率。从自然环境中筛选得到的野生型菌种通常需要经过改造或引入一个新的细胞特性来满足工业化生产的要求^[3],如传统的菌种改造主要依赖于随机诱变(包括物理诱变和化学诱变)和理性设计高通量筛选的方法来获得。由于次级代谢产物过量积累是由多个基因表达产物来调控,这些基因之间具

有相互作用,调控作用的机理复杂^[4-5],目前还未全面甚至是尚未了解,因此对放线菌工业生产菌的改造也常常受到一些局限或阻碍。尽管如此,随着近年组学(Omics)技术的发展许多策略成功应用于工业生产菌株的选育中,如基于基因组信息的改造、基于转录组学和蛋白组学分析的改造、基于代谢理论的代谢途径改造以及整合了多理论的改造新策略等。

1.1 基于基因组信息的菌种改造

尽管很多次级代谢产物如抗生素的生物合成途径已阐明,优化代谢途径中某一关键基因能够有效提高抗生素的水平,但在工业应用水平需要更多全局调控技术才能实现。因此近年来很多学者利用全局方法来改造放线菌工业生产菌获得所需要的高性能菌株^[6-7]。

“分子进化工程(Molecular evolution engineering)”是基于基因组信息构建工业微生物突变株的重要方法,与传统的方法相比具有显著高效的特点,已在放线菌育种方面取得了显著成效。这些技术在基因水平上利用易错 PCR、DNA 重组、DNA 改组(DNA shuffling)、增长截短技术、合成改组等获得随机突变的基因,并通过选择压力和传代筛选获得稳定的正突变株。例如 Stutzman-Engwall 等通过 DNA shuffling 技术对阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)中一个 *aveC* 基因进行突变筛选获得 1 株突变株,其多拉菌素(Doramectin)的产量提高了 23 倍多,该突变株已经用于工业化生产^[8]。在 DNA

shuffling 技术的基础上发展起来的基因组改组 (Genomic shuffling) 技术是针对整个基因组进行的 DNA shuffling, 它被认为是重组技术在菌种表型改造方面应用的一个重要里程碑^[9]。自 2002 年开始已经有多篇报道关于利用基因组 Shuffling 技术进行放线菌改造的文献。例如, Hida 等利用 3 轮基因组 Shuffling 使得链霉菌 (*Streptomyces* sp.) U121 的羟基柠檬酸 (Hydroxycitric acid) 的产量与野生菌株相比提高了 5 倍^[10]; Xu 等利用始旋链霉菌 (*Streptomyces pristinaespiralis*) 的基因组进行改组, 通过筛选获得普那霉素 (Pristinamycin) 高产菌株, 与出发菌株相比产量提高了约 89.4%^[11]; Zhang 等在生产泰乐菌素 (Tylosin) 的弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 高产菌株选育中, 产量提高了约 6 倍^[12]; 基因组改组技术目前已被认为是一种全新的全细胞进化工程的快速高效技术^[12]。由于基因组 Shuffling 可以在不了解基因背景的情况下展开工作, 适合应用于遗传背景复杂的工业放线菌育种, 并且更合适获得复杂的表型。随着高通量筛选 (High through-put screening) 技术的发展, 基因组改组将会成为工业放线菌育种的重要策略之一。

1.2 基于转录组学和蛋白组学分析的菌种改造

在由多基因调控的放线菌次级代谢产物合成的研究方面, 潜在改造基因靶点的寻找极其重要。DNA 微阵列 (DNA microarray) 技术的发展可以比较两个高、低产菌株或者不同样品之间或者一个样品在不同时间点或环境下的转录组学特性的差异, 为寻找合成途径中调控回路和潜在的改造靶点提供了基础, 从而通过分子遗传改造获得高产突变株^[13]。例如利用红霉素强启动子 (*ermEp*) 替换天然启动子序列, 从而有效提高目标基因的表达水平^[14-15]; 采用启动子文库策

略通过优化一些关键基因的表达水平使得目标代谢途径的通量和菌体生长通量之间的平衡最优化, 也是一种非常有效的策略; 另外, 新强启动子的发现可能会为工业菌株的改造提供新的方向, 通过更换目标基因上游的启动子来提高下游基因的表达量是一种高效、可行的策略。

除改造基因上游启动子的强度来提高目的基因的表达外, 近年来发现的各种调控因子的改造也是一种有效的方法, 因为调控因子的调控范围更广泛, 可以同时调控多个基因的表达。例如, Zhou 等通过对阿维链霉菌工业菌种的 *hrdB* 基因进行易错 PCR 并替换原有基因, 通过高通量筛选得到的突变株中, 受突变的 σ^{hrdB} 调控的 *aveR* 基因转录水平显著提高, 使得阿维菌素 (Avermectin) B1a 组分的产量提高了约 50%^[16]。Yin 等通过在棒状链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*) NP1 中阻断一个精氨酸合成途径相关的调控因子 *argR*, 使初级代谢途径中与乙酰辅酶 A 合成相关的蛋白表达发生变化, 使得乙酰辅酶 A 合成量增加, 从而导致全霉素 (Holomycin) 的产量显著提高^[17]。理论上, 在转录组学分析的基础上构建的调控因子网络模型可以更加理性调控目标代谢途径基因的转录, 但是目前对调控因子了解还不够全面, 甚至尚未了解, 因而应用调控因子网络改造的调控策略在工业上仍受到很大限制。

由于大部分细胞代谢活动都是直接或间接由蛋白参与的, 蛋白组学分析使得对细胞代谢状态的了解更深入一步, 但是目前为止不是所有蛋白节点的功能都已经了解清楚, 因而与转录组学相比蛋白组学的信息还较少。然而, 蛋白组学能够分析两个以上的不同环境条件下蛋白节点的变化强度, 这为菌种改造设计提供了重要信息。例如, Song 等利用蛋白组学分析了一株波赛链霉菌 (*Streptomyces peucetius*) 突变株

中与多柔比星(Doxorubicin)合成相关的蛋白并使得突变株中多柔比星的产量提高了1倍多^[18]。随着实验技术的发展,蛋白功能以及蛋白相互作用机制的研究,基于蛋白组学分析改造技术在工业菌种改造中应用将会越来越广泛。

1.3 基于代谢工程理论的菌种改造

在过去的20年中,放线菌工业生产菌株的改造策略主要还是集中于代谢工程(Metabolic engineering)。随着组学、代谢流分析以及计算建模技术的飞速发展,代谢工程的改造策略得到了广泛的应用^[7]。通过代谢工程改造生产菌株的策略是通过提高整个代谢途径中关键节点基因或者与代谢途径相关的调控基因表达水平来提高次级代谢产物的产量。例如,Yanai等通过在卡那链霉菌(*Streptomyces kanamyceticus*)工业菌株中过量表达卡那霉素(Kanamycin)基因簇使得工业突变株中卡那霉素的产量显著提高^[19];本课题组通过过量表达一株工业生产菌株红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)中红霉素(Erythromycin)合成途径中两个修饰酶基因*eryK*和*eryG*的表达量,有效提高了有效组分Er-A的产量而降低了Er-B和Er-C杂质的合成^[20];另外,通过提高龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)工业生产菌株SR16中土霉素合成途径的起始合成酶基因*oxyABC*有效提高了工业突变株中土霉素的产量^[15]。由于通常次级代谢产物合成途径中的酶基因在基因组中的位置是相邻成簇的,也可以直接增加次级代谢产物合成基因簇的拷贝数以提高合成途径中所有基因的表达量,本课题组通过在红色糖多孢菌中过量表达红霉素合成基因簇中部分和所有基因,从而筛选得到了可以工业化生产的工业突变株^[21]。此外,对初级代谢途径改造对次级代谢产物的合成也是有效方法,例如,本课题组通过阻断龟裂链霉菌工业生产菌株SRI中编码磷

酸戊糖途径(HMP)中关键酶—6-P-葡萄糖脱氢酶的*zwf1*基因获得了土霉素产量提高36.2%的突变株^[22];而通过在红色糖多孢菌E2的染色体中整合一个来自壮观链霉菌(*Streptomyces spectabilis*)的S-腺苷甲硫氨酸合成酶,使得突变株中有效成分Er-A提高了1.3倍^[23]。

代谢工程的重要基础是代谢网络的构建和代谢物流的动态定量分析。采用核磁共振(Nuclear magnetic resonance, NMR)、气相色谱质谱联用(Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)、气相色谱-时间飞行质谱联用(Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, GC-TOF)以及液相色谱质谱联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分析技术的发展对高通量分析基因和环境扰动条件下细胞的各代谢组分差异提供了重要测定技术,定量的代谢产物数据可用于代谢流组学分析,从而深入了解细胞的生理状态^[7]。由于胞内通量是难以测量的,通过同位素标记¹³C-葡萄糖在细胞中的代谢,同位素的分布信息可以反应胞内代谢速率变化,通过对多个培养条件及基因扰动条件下代谢通量的差异来筛选可改造的位点,从而获得高产突变株,是一种常用的方法。例如,Borodina等根据天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)的基因组信息构建了全基因组代谢模型,预测并敲除了一个磷酸果糖激酶同工酶的编码基因——*pfkA2*,有效提高了抗生素的产量,采用¹³C标记实验检测突变株中的代谢流变化,目标代谢途径的碳源代谢通量(Metabolic flux)有效提高了^[24]。本课题组重构了基因组规模的龟裂链霉菌代谢网络模型,预测得到降低磷酸戊糖途径的碳源代谢通量能够有效提高前体乙酰辅酶A(Acetyl-coA)的合成,理论上也可以有效提高龟裂链霉菌中土霉素(Oxytetracycline)的产量。磷酸戊糖途径

的第一个酶是 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH), 它有两个同工酶分别由 *zwf1* 和 *zwf2* 基因编码, 由于考虑到菌体生长的需要, 不能完全阻断磷酸戊糖途径, 因而采用分别阻断 *zwf1* 和 *zwf2* 基因的策略, 考察对模式菌 M4018 中菌体的生长及土霉素的合成的影响^[25], 选择一个最优的策略用于工业菌株 SR16 的改造, 结果表明在工业菌株 SR16 中敲除 *zwf1* 基因菌株能够有效提高土霉素的产量(图 1), G6PDH 酶活力约为出发菌株 SR16 的 70%左右, 糖酵解途径(EMP)中的磷酸葡萄糖异构酶(Phosphoglucose isomerase, PGI)的活力约为出发菌株的 125%。因此可以看出, 敲除 *zwf1* 基因能够有效降低 HMP 途径中的碳源代谢通量, 有效提高 EMP 途径中的碳源代谢通量从而导致菌株的土霉素高产。

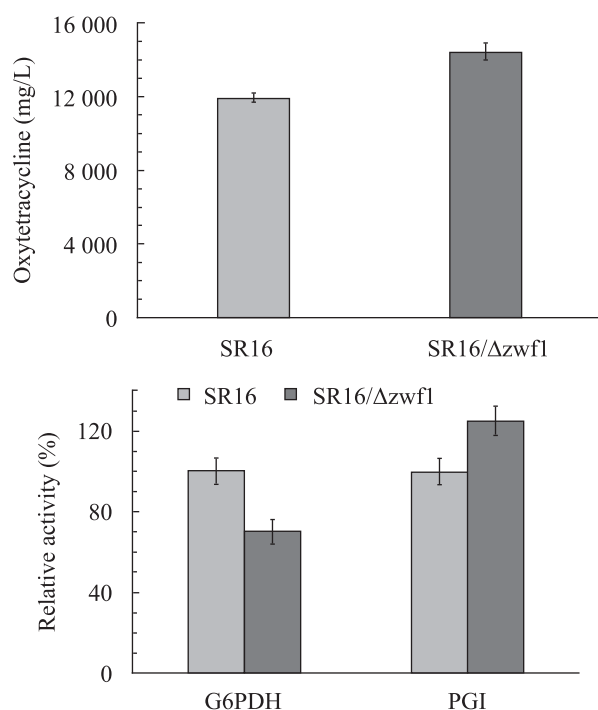


图 1 *zwf1* 基因的敲除对土霉素和中心代谢途径关键酶活力的影响

Fig. 1 Effect of *zwf1* deletion on oxytetracycline production and the activities of key enzymes in central metabolic pathways

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

代谢工程能够针对性改造更容易获得高产菌株、有效减低生产成本, 在工业放线菌育种中占有重要的地位, 分析技术的发展和精确代谢途径网络模型的构建将快速推动代谢工程在工业菌种改造中的应用。

1.4 基于系统生物学获得新的改造策略

由于生物系统的复杂性, 要实现将各个组学分析理论完全融合并用于工业菌种的改造是很困难的, 但是利用不同的方法交叉是放线菌改造的新策略。例如, Lv 等利用基因组改组和核糖体工程两种方法结合获得的工业突变株卑霉素(Avilamycin)的产量提高了 4.85 倍^[26]。另外, 常用的交叉方法还有利用计算机建模和模拟与代谢组学、代谢流分析或转录组学等定量分析方法结合^[27], 采用多个组学高通量分析的数据和计算机建模, 由计算机模拟的结果来设计实验进行验证, 实验的内容不仅包括基因和代谢工程, 还包括高通量的组学实验来获得更多的全局数据; 实验的结果再返回到计算机模型中进行修正, 然后重新用实验验证, 这样的循环模式来获得高产突变株^[28-29]。

如上所述的这些用于菌株改造的策略都有各自的优点, 这些基于不同基础的基因(组)扰动汇总到一个单独的菌株中时可能会产生意想不到的协同效应, 从而可能获得一个“超级工程菌”。

2 放线菌工业化生产过程优化和控制

工业化生产的目的是需要实现其经济价值, 发酵过程是建立在控制细胞内和细胞外环境相互作用的基础上, 需要了解在微观条件下细胞内的基因转录、蛋白表达、代谢产物浓度及其对微生物生长和代谢的影响, 也需要了解在发酵罐大规模环境条件下, 如流场、剪切力等对细胞内环境的影响等。因此, 微生物发酵

表型是由它的基因型以及环境对其刺激引起的应答共同决定的^[30]。对丝状放线菌发酵过程优化而言,发酵罐中放线菌细胞生理状态的描述和模拟是理性设计优化策略的重要内容。目前为止,一些相对简单的动力学模型已经成功应用于设计、控制和优化生物过程,但是简单考虑生物系统的输入-输出而将细胞内代谢当作一个“黑箱”处理所构建的模型与过程优化是值得质疑的^[6,31]。近年来,许多学者提出了基于组学与过程参数相结合的优化方法,同时关联与细胞活动相关的胞内代谢理性设计生物过程优化来提高目的代谢产物的产量^[32]。

2.1 基于动力学模型的过程优化与控制

微生物发酵过程是一个底物碳源、氮源代谢形成菌体和产物的生物化学过程,因此数学模型在过程优化中起重要作用。经典发酵动力学至今在发酵过程的局部仍然适用,但是往往是最佳 pH、温度、底物浓度等的静态过程优化方法无法实现发酵全过程的最优化,其原因是目标产物的比形成速率(q_p)与比生长速率(μ)、底物浓度(S)等在整个发酵过程中不可能是恒定的,因此需要进行动态优化。动态优化方法之一是根据底物代谢速率、产物形成速率、底物传递速率和负责催化代谢途径中生化反应关键酶特性(酶活力或者酶的量)等动力学模型进行动态优化^[33]。另外,利用动力学调控的策略通过感知胞内环境的变化来调节代谢途径中酶的表达,也是获得最优的工业化生产工艺有效的策略。例如, Singh 等通过 ^{13}C 同位素标记测定代谢通量,在优化培养基过程中发现 4 种培养基成分(豆饼粉、葡萄糖、 CaCO_3 和 MgSO_4)对吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) MTCC 4003 中的抗生素次级代谢产物的合成具有显著的促进作用,优化后培养基中菌株的产量是原来的 11 倍左右^[34]。

由于生物过程是一个开放的非线性系统,因此对发酵过程优化必须是动态优化。动态优化策略能使生物过程中随时间变化的参数如补料速率实现其设定的值,从而使发酵过程性能参数如产率、目的产物浓度、发酵指数等最大化。针对不同微生物开发的特有优化控制程序则能够应用到相关的发酵过程中,如自适应控制、现代预测控制、神经网络等,但这些方法均需要与生物过程特征相结合才能获得满意结果。

2.2 基于组学和代谢流分析的过程优化和控制

在过去的几十年中很多研究者致力于研究目的代谢途径相关基因的功能,以获得影响代谢途径通量的关键酶基因,通过了解该蛋白的合成机理,通过控制营养物质来提高菌体生长速率,并设计生物过程来提高目标产物的产量。过量表达代谢途径中关键节点的酶基因是最常见的一种策略,利用多拷贝质粒直接增加关键节点酶基因的表达量或者通过过量表达该基因的正调控因子来实现。

例如,本课题组通过过量表达龟裂链霉菌中土霉素合成途径的起始酶的基因表达量以及一个与产物运输相关的转运蛋白基因 *otrC* 的表达量,有效提高了土霉素工业生产菌 SR16 中土霉素合成途径的通量,从而获得工业高产菌株^[14-15]。另外,可以通过代谢组学和代谢通量分析来验证目标途径的通量改变,并适当调节培养基中营养物质的供给来建立稳定的菌体生长和产物生产速率的关系^[35]。本课题组在前期的工作中对两株分别提高了 *eryK* 和 *eryG* 表达水平的红色糖多孢菌突变株 ZL1004 和 ZL1007 进行了培养,通过改变培养基成分(添加玉米浆)并分析胞内外代谢产物的变化以及在碳源中心代谢途径中的关键酶活力,使 ZL1004 中

Er-A 的产量显著提高了 23.9% 而副产物 Er-B 基本不产生, Er-C 的产量也降低了 83.9%^[36-37]。在 30 L 发酵罐规模发酵生产红霉素的过程中, 通过限制性流加葡萄糖有效提高了红霉素合成前体的供应, 限制了旁路代谢途径的通量, 从而提高了红霉素的产量。通过代谢流分析表明, 在限制葡萄糖流加的情况下, 可以促进前体丙醇的代谢速率, 而丙酸代谢途径通量减少, 从而提高了丙酰辅酶 A、丙甲基辅酶 A 和 NADPH 的积累, 最终导致红霉素的高产^[38]。

因此, 通过调节代谢途径中酶量(活力)的表达动力学调控策略, 可以有效控制目标代谢途径的通量和产率, 是一种有效的生物过程优化和控制的手段。但是, 放线菌中次级代谢途径多而复杂, 目前为止没有一个完整的放线菌的次级代谢网络模型。除此以外, 基于动力学和物料平衡的代谢通量模拟计算也是建立在各种假设条件的基础上(如拟稳态), 与实时代谢通量不一定完全吻合, 这大大限制了代谢组学和代谢流分析的应用。

2.3 基于基因组学和蛋白组学的过程优化和控制

通过比较高、低产菌株的基因组和蛋白组, 了解在不同条件下的细胞代谢和生理状态, 并以此来寻找与目标途径相关的突变位点, 是实现生物过程优化的另一重要方法^[32]。

Rodríguez-García 等利用转录组学和蛋白组学分析天蓝色链霉菌 M145 及其缺失 *phoP* 基因的突变株在两种磷酸盐含量不同的培养基上的全基因组范围内的转录和蛋白表达水平, 以分析初级代谢途径中与磷酸盐和硝酸盐摄取相关的基因之间的相互作用, 从而了解在磷酸盐限制情况下细胞的生理特征^[39]。本实验室对一株经过传统诱变获得工业阿维链霉菌突变株和一株实验室模式菌株进行全基因组测序并进行

序列比对, 并比较了两种培养基中培养条件下胞内蛋白的表达差异^[40], 结果表明一些氨基酸代谢途径中的酶(*glnA*, *leuC*)蛋白的表达显著提高, 在另外一些压力应答因子蛋白(*eshA*, *clpC*, *dnaK*, *grpE*)表达量低的情况下阿维菌素的产量也低, 因而这些蛋白的编码基因可以作为菌种改造的基因靶点来提高前体物质的供应以及对外界压力的敏感性从而提高阿维菌素代谢途径的通量。

另外, 通过对不同的扰动范围多时间尺度和不同形式定量分析细胞内基因表达的瞬时动力学信息, 从而进行生物过程优化。如全局转录工程(Global transcriptional machinery engineering, gTME)就是这样的方法, 可提高目标产物的产量^[41]。全局调控因子的发现为放线菌中调控网络的构建提供了有用的信息, 并用于优化目标产物的产量^[42-43]。

2.4 放线菌发酵过程多尺度过程优化与控制

随着系统生物学发展, 对放线菌细胞内生命代谢的分子机制逐步阐明, 发酵过程控制也由细胞外环境因素优化进入到细胞内的生理特性调控。但是发酵过程是一个生命过程的高度复杂系统, 宏观动力学研究的环境操作参数与某些生理参数的检测与数据处理, 不能真正代表细胞内复杂代谢反应过程的本体特性。基于单一生理调控机制出发的研究往往只揭示了生理调控的局部和某一时段的特点, 仅靠高度分支化和具体分散的研究是难以对整个生物过程全局优化起决定性作用。因此, 本课题组近年来提出了发酵过程多尺度优化方法与技术^[44], 即放线菌在发酵罐内分为三个尺度, 一是细胞内基因尺度的遗传特性调控; 二是细胞尺度的细胞代谢特性调控; 三是发酵罐(反应器)尺度的流场特性调控。三者之间相互进行物质流、信息流和能量流的变化作用, 进而从众多因素

的海量数据中挖掘出影响发酵过程全局优化的敏感生理参数,实现发酵过程的全局优化,从而可克服只从组学水平或工程的流场水平研究的不足。该技术在多个放线菌发酵产品上取得了很好的优化效果,如红霉素发酵过程中控制早期葡萄糖浓度,通过 ppGpp 形成促进红霉素的合成,而在发酵中晚期则通过参数控制葡萄糖代谢速率与前体正丙醇代谢速率稳定实现红霉素的高产^[45];另外,在土霉素发酵以控制 C:N 流加技术^[46]、阿维菌素发酵控制菌体形态^[47]等关键敏感参数实现了发酵过程优化。

3 放线菌工业化生产中的过程放大技术

为了提高目标产物的产量,维持稳定的生产率,工业发酵需要采用一个简单但是精确的方法来确定产物产率和质量相关的过程参数,并以这些参数为依据实现发酵过程放大。长期以来,发酵过程优化主要采用生物化学工程的宏观动力学、化学计量学及热力学为基础的经典工程学方法;而在发酵过程放大时,通常采用量纲分析法,如相似论和因次分析等。这些方法用于发酵过程优化与放大时往往实际效果差并难以重复,在实践中主要还是靠人工经验的反复摸索。为此,本研究组在放线菌实际研究中提出了基于生理特性和流场特性的放大技术与方法。

3.1 基于细胞系统生理参数的放大方法

工业规模发酵生产是以细胞生长和产物合成为目的的,细胞系统的生理状态是胞外和胞内环境相互作用的结果。适合用于作为发酵放大的参数一般是过程参数或者对生理状态具有重要影响的参数。如在好氧发酵过程中,氧气的传递是一个重要的参数,由于氧气在水中的溶解度低,而氧气的供应又是微生物生长及代

谢的重要基质,因此,在以往的发酵过程控制和放大中摄氧速率(Oxygen uptake rate, OUR)已经作为一个重要的参数,用于生物反应器的选择、设计和放大。以 OUR 为依据进行发酵规模的放大已经有很多成功的例子,本课题组在利用阿维链霉菌工业菌生产阿维菌素 B1a 时,以 OUR 为主要参数进行放大(2 m³),通过控制在菌体生长时期的 OUR 值使得罐上阿维菌素 B1a 的产率提高了约 21.8%^[48]。在红霉素发酵过程中,利用 OUR 作为主要参数,从实验室发酵规模 50 L 成功放大到生产规模 132 m³ 和 372 m³^[49]。

3.2 基于计算流体力学(Computational fluid dynamics, CFD)的发酵放大方法

近年来发展起来的 CFD 模拟方法,用于描述基质浓度在发酵罐中的浓度梯度和混合传递特性的方法成功应用于发酵放大。CFD 模型是基于实验中流体和循环的测定,从而利用测定的参数建立的流体动力学模型。在实验过程中粒子(荧光染料、磁力或辐射颗粒)的轨迹和速度通过光学或者流体追踪技术等来测定^[50]。为了对流动的液体进行描述和建立数学模型,整个生物反应器网格化,在给定的基因组和流变数据的基础上,根据质量、动能和能量守恒按 Navier-Stokes 方程对这些细胞的生理状态进行数值化,从而获得任何一个时间点细胞的生理状态和流场特性,如混合时间、混合速率、流体动力学、剪切应力等^[51-52],这些可用于反应器和搅拌桨的设计或改进^[52]。如果将 CFD 模拟值与其他的参数结合(如底物浓度和梯度、停留时间、菌体生长动力学和代谢流分析等)则可构建整合流体动力学模型(Integrated fluid dynamics, IFD),更精确模拟发酵放大过程中流体和细胞生理特性参数的变化。

由于放线菌发酵是丝状菌好氧发酵,一般

较粘稠和菌形控制很重要,因此氧传递速率是放线菌发酵放大过程中关键因素之一。目前,通过模拟不同规模生物反应器中的气-液混合特性、氧传递效率应用于过程放大已经有不少成功例子, Mehmood 等在利用始旋链霉菌(*S. pristinaespiralis*)生产 Pristinamycins 从摇瓶到小罐的放大过程中,利用 CFD 模拟氧气传质速率并用于预测单位体积的功耗,获得较好的结果^[53]。本课题组在红霉素发酵过程中,利用 CFD 模拟了实验室发酵规模 50 L 和工厂发酵规模 132 m³ 生物反应器中的氧传质效果,发现在 132 m³ 生物反应器中的 OUR 率显著低于 50 L 生物反应器,这是限制工业化生产红霉素产量的主要因素,需要通过改进搅拌系统和控制 OUR 成功实现放大^[54]。尽管 CFD 模拟氧传递速率在多个放线菌以及其他微生物的发酵放大过程中已经成功应用,事实上,对气-液两相和发酵液中气-液-固多相复杂系统混合过程中氧气的传递条件、底物分布对产物合成的影响等还未充分了解。目前很多学者致力于对流体动力学特性进行深入研究^[55],以详细了解气-液混合的过程,以便进一步了解生物反应器中基质的分布以及浓度梯度。

4 展望

实现放线菌工业化生产经济价值的关键在于获得高性能的工业菌株、最优化的生物过程和放大发酵规模。为了获得理想的工业生产菌,需要对菌株的特性进行设计和改造,例如冗余设计、功能性模块的插入和表达、各层次(基因、蛋白、代谢途径)的组织等等。而要实现这些改造,需要对放线菌细胞生理代谢的系统生物学表型进行研究,也需要对刺激作出响应的基因调控瞬时动力学以及相关的分子机理深入了解^[56]。目前,虽然获得了很多放线菌的全基因组

信息,但是还有很多基因的功能还尚未了解^[57],这是改造并获得理想工业菌株的关键,这些信息还有待进一步研究。

发酵过程优化控制是依据在发酵过程中所测定的关键参数来控制细胞内外环境的平衡以获得最佳的发酵条件,发酵放大技术是以发酵过程一个或几个关键生理过程参数来进行。为了确定关键的过程参数并了解在不同规模发酵条件下对微生物生理状态的影响,必须对不同的物理、化学和生理参数对发酵过程的影响及其交互作用进行详细的分析。目前,在利用系统生物学的工具了解放线菌细胞内基因、蛋白功能方面取得了很大的进展,但还没有一个能够涵盖微生物细胞中基因组、转录、蛋白、代谢的全局模型。目前在已知的信息基础上选择合适的系统范围进行分析和生物过程调控的策略虽有初步成功的例子^[58-59],但都未能完整阐明整个放线菌细胞复杂的发酵过程系统。本课题组提出了微生物过程多尺度优化的方法和技术,采用参数相关方法来挖掘发酵过程关键的敏感参数,实现过程优化。

在发酵过程放大方面,需要对放线菌不同阶段生理状态、发酵条件、反应器性能以及放大效应应有较全面的理解。完整的放大策略包括对生物过程特性的详细了解,以便确定影响产物产率和质量的关键参数和胁迫因素,还需要合适的生物过程控制以及过程设计以保证过程最优化。这需要发酵过程的关键数据(如代谢速率、比生长速率、菌丝形态、剪切力分布等)和过程信息处理计算机软硬件作为支撑^[60]。

总之,对放线菌工业化生产过程的优化与放大,应从组学水平(如基因组、蛋白组、代谢组等)、细胞水平(如代谢途径调控水平、代谢网络、细胞系统等)、生物反应器水平(如混合、传递特性等)多尺度地采集过程信息并进行相关

性分析, 从而建立过程优化与放大的工艺。随着组学技术的发展, 将各组学和系统生物学理论整合应用并模型化, 将是获得放线菌菌株改造、过程优化控制和放大新策略的重要途径, 对放线菌工业化生产具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Baltz RH. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8(5): 557–563.
- [2] Olano C, Mendez C, Salas JA. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis[J]. *Natural Product Reports*, 2009, 26(5): 628–660.
- [3] Jarboe LR, Zhang X, Wang X, et al. Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 761042: 1–18.
- [4] Park JH, Lee SY, Kim TY, et al. Application of systems biology for bioprocess development[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(8): 404–412.
- [5] Mainguet SE, Liao JC. Bioengineering of microorganisms for C3 to C5 alcohols production[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(12): 1297–1308.
- [6] Blazeck J, Alper H. Systems metabolic engineering: genome-scale models and beyond[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(7): 647–659.
- [7] Zhang SL, Ye BC, Chu J, et al. From multi-scale methodology to systems biology: to integrate strain improvement and fermentation optimization[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81: 734–745.
- [8] Stutzman-Engwall K, Conlon S, Fedechko R, et al. Semi-synthetic DNA shuffling of *aveC* leads to improved industrial scale production of doramectin by *Streptomyces avermitilis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(1): 27–37.
- [9] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 666–668.
- [10] Hiroyuki H, Takashi Y, Yasuhiro Y. Genome shuffling of *Streptomyces* sp. U121 for improved production of hydroxycitric acid[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(6): 1387–1393.
- [11] Xu B, Jin ZH, Wang HZ, et al. Evolution of *Streptomyces pristinaespiralis* for resistance and production of pristinamycin by genome shuffling[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(2): 261–267.
- [12] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. *Nature*, 2002, 415(6872): 644–646.
- [13] Wang Y, Chu J, Zhuang YP, et al. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 989–995.
- [14] Yu L, Yan XY, Wang L, et al. Molecular cloning and functional characterization of an ATP-binding cassette transporter OtrC from *Streptomyces rimosus*[J]. *BMC Biotechnology*, 2012, 12: 52.
- [15] Yu L, Cao N, Wang L, et al. Oxytetracycline biosynthesis improvement in *Streptomyces rimosus* following duplication of minimal PKS genes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50(6/7): 318–324.
- [16] Zhuo Y, Zhang WQ, Chen DF, et al. Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(25): 11250–11254.
- [17] Yin H, Xiang S, Zheng J, et al. Induction of holomycin production and complex metabolic changes by the *argR* mutation in *Streptomyces clavuligerus* NP1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3431–3441.
- [18] Song E, Malla S, Yang YH, et al. Proteomic approach to enhance doxorubicin production in panK-integrated *Streptomyces peuceetius* ATCC 27952[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(9): 1245–1253.
- [19] Yanai K, Murakami T, Bibb M. Amplification of the entire kanamycin biosynthetic gene cluster during empirical strain improvement of *Streptomyces kanamyceticus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(25): 9661–9666.
- [20] Wu J, Zhang Q, Deng W, et al. Toward improve-

- ment of erythromycin A production in an industrial *Saccharopolyspora erythraea* strain via facilitation of genetic manipulation with an artificial *attB* site for specific recombination[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(21): 7508–7516.
- [21] 吴杰群. 以红霉素工业生产菌种为对象的代谢工程改造探索[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2011.
- [22] 郑子静, 于岚, 唐振宇, 等. 龟裂链霉菌工业菌 *zwf1* 基因的阻断对土霉素生物合成影响[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 1(5): 35–38.
- [23] Wang Y, Wang YG, Chu J, et al. Improved production of erythromycin A by expression of a heterologous gene encoding S-adenosylmethionine synthetase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(4): 837–842.
- [24] Borodina I, Siebring J, Zhang J, et al. Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2) mediated by phosphofructokinase deletion[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(37): 25186–25199.
- [25] Tang ZY, Xiao CY, Chu J, et al. Improved oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* M4018 by metabolic engineering of the G6PDH gene in the pentose phosphate pathway[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 49(1): 17–24.
- [26] Lv XA, Jin YY, Li YD, et al. Genome shuffling of *Streptomyces viridochromogenes* for improved production of avilamycin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(2): 641–648.
- [27] Lecca P, Nguyen TP, Priami C, et al. Network inference from time-dependent Omics data[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 719: 435–455.
- [28] Charaniya S, Mehra S, Lian W, et al. Transcriptome dynamics-based operon prediction and verification in *Streptomyces coelicolor*[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(21): 7222–7236.
- [29] Kim SH, Lee HN, Kim HJ, et al. Transcriptome analysis of an antibiotic downregulator mutant and synergistic actinorhodin stimulation via disruption of a precursor flux regulator in *Streptomyces coelicolor*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1872–1877.
- [30] Deckwer WD, Jahn D, Hempel D, et al. Systems biology approaches to bioprocess development[J]. Engineering in Life Sciences, 2006, 6(5): 455–469.
- [31] Katagiri F. Attacking complex problems with the power of systems biology[J]. Plant Physiology, 2003, 132(2): 417–419.
- [32] Kuhn D, Blank LM, Schmid A, et al. Systems biotechnology-rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design[J]. Engineering in Life Sciences, 2010, 10(5): 384–397.
- [33] Keasling JD. Manufacturing molecules through metabolic engineering[J]. Science, 2010, 330(6009): 1355–1358.
- [34] Singh N, Rai V. Improved antimicrobial compound production by a new isolate *Streptomyces hygroscopicus* MTCC 4003 using Plackett-Burman design and response surface methodology[J]. Bioinformation, 2012, 8(21): 1021–1025.
- [35] Alam MT, Merlo ME, Hodgson DA, et al. Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 202.
- [36] Zou X, Chen CF, Huang HF, et al. Response surface methodology for optimization of the erythromycin production by fed-batch fermentation using an Inexpensive biological nitrogen source[J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2010, 24(1): 95–100.
- [37] Zou X, Hang HF, Chu J, et al. Enhancement of erythromycin A production with feeding available nitrogen sources in erythromycin biosynthesis phase[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(13): 3358–3365.
- [38] Chen Y, Huang MZ, Wang ZJ, et al. Controlling the feed rate of glucose and propanol for the enhancement of erythromycin production and exploration of propanol metabolism fate by quantitative metabolic flux analysis[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, DOI: 10.1007/s00449-013-0883-9.
- [39] Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, et al. Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a Δ *phoP* mutant[J]. Proteomics, 2007, 7(14): 2410–2429.
- [40] Yin P, Li YY, Zhou J, et al. Direct proteomic mapping of *Streptomyces avermitilis* wild and industrial

- strain and insights into avermectin production[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 79C: 1–12.
- [41] Warner JR, Patnaik R, Gill RT. Genomics enabled approaches in strain engineering[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(3): 223–230.
- [42] Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, et al. Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 56.
- [43] Pullan ST, Chandra G, Bibb MJ, et al. Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 175.
- [44] 张嗣良. 工业生物过程优化与放大研究中的科学问题[J]. *中国基础科学*, 2009, 11(5): 7–13.
- [45] 尚永崇. 重组红霉素工业菌发酵优化与工业规模放大规律研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2010.
- [46] 廖瑜玲. 土霉素发酵代谢特性及参数相关分析[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2008.
- [47] 梁剑光. 基于多尺度参数相关分析的阿维菌素发酵过程优化及工业规模放大研究[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2011.
- [48] Liang JG, Chu XH, Xiong ZQ, et al. Oxygen uptake rate regulation during cell growth phase for improving avermectin B-1a batch fermentation on a pilot scale (2 m³)[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27 (11): 2639–2644.
- [49] Zou X, Hang HF, Chu J, et al. Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m³ scale[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1406–1412.
- [50] Bezzo F, Macchietto S, Pantelides CC. General hybrid multizonal/CFD approach for bioreactor modeling[J]. *AIChE Journal*, 2003, 49(8): 2133–2148.
- [51] Kelly WJ, Humphrey AE. Computational fluid dynamics model for predicting flow of viscous fluids in large fermentor with axial flow impellers and internal cooling coils[J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(2): 248–258.
- [52] Fang ZW. Applying computational fluid dynamics technology in bioprocesses-part 2[J]. *BioPharm International*, 2010, 23(5): 42–52.
- [53] Mehmood N, Olmos E, Marchal P, et al. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, kLa[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(11): 1779–1786.
- [54] Zou X, Xia JY, Chu J, et al. Real-time fluid dynamics investigation and physiological response for erythromycin fermentation scale-up from 50 L to 132 m³ fermenter[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(5): 789–800.
- [55] Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 85(2): 175–185.
- [56] Yosef N, Regev A. Impulse control: temporal dynamics in gene transcription[J]. *Cell*, 2011, 144(6): 886–896.
- [57] Otero JM, Nielsen J. *Industrial systems biology*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(3): 439–460.
- [58] Hermann T. Using functional genomics to improve productivity in the manufacture of industrial biochemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(5): 444–448.
- [59] Bro C, Nielsen J. Impact of ‘ome’ analyses on inverse metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2004, 6(3): 204–211.
- [60] Berkholtz R, Guthke R. Model based sequential experimental design for bioprocess optimization—an overview[J]. *Focus Biotechnology*, 2002, 4: 129–141.