

· 工业生物技术 ·

# 基于前体供给途径遗传改造提高褐黄孢链霉菌纳他霉素的产量

孔德真, 李浩, 李晓杰, 谢周杰, 刘浩

天津科技大学 生物工程学院 天津市工业微生物重点实验室 工业发酵微生物教育部重点实验室 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津 300457

孔德真, 李浩, 李晓杰, 谢周杰, 刘浩. 基于前体供给途径遗传改造提高褐黄孢链霉菌纳他霉素的产量. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4630-4643.

KONG DZ, LI H, LI XJ, XIE ZJ, LIU H. Engineering the precursor supply pathway in *Streptomyces gilvosporeus* for overproduction of natamycin. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4630-4643.

**摘 要:** 纳他霉素 (natamycin) 是一种高效、广谱、安全的抗真菌剂, 广泛应用于食品防腐与医药领域。纳他霉素可由多种链霉菌发酵产生。它是以乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 及甲基丙二酰辅酶 A 为前体经 I 型聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 催化合成的多烯大环内酯类化合物。本研究以纳他霉素产生菌——褐黄孢链霉菌为研究材料, 分别对不同前体分子供给途径中的关键酶进行过表达, 并确定影响纳他霉素产量的关键前体供给途径。研究结果发现: 通过过表达乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA synthase, ACS) 加强乙酰辅酶 A 合成途径, 以及通过过表达甲基丙二酰辅酶 A 变位酶 (methylmalonyl-CoA mutase, MCM) 加强甲基丙二酰辅酶 A 合成途径, 重组菌株纳他霉素产量分别比野生型菌株提高了 44.19% 和 20.51%。共过表达 ACS 和 MCM, 重组菌株纳他霉素产量获得进一步提升 (达 1 123.34 mg/L), 比野生型菌株提高了 66.29%。上述发现为通过前体代谢工程的策略构建纳他霉素工业高产菌株提供了参考, 也为其他聚酮类天然产物高产工程菌株的构建提供了借鉴。

**关键词:** 褐黄孢链霉菌; 纳他霉素; 前体供给; 乙酰辅酶 A 合成酶; 甲基丙二酰辅酶 A 变位酶

Received: May 3, 2022; Accepted: July 18, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100700); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-006)

Corresponding authors: XIE Zhoujie. E-mail: zhoujiexie@tust.edu.cn  
LIU Hao. E-mail: liuhao@tust.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2100700); 天津市合成生物技术创新能力提升行动 (TSBICIP-KJGG-006)

# Engineering the precursor supply pathway in *Streptomyces gilvosporeus* for overproduction of natamycin

KONG Dezhen, LI Hao, LI Xiaojie, XIE Zhoujie, LIU Hao

National and Local United Engineering Laboratory of Metabolic Control Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** Natamycin is a safe and efficient antimycotics which is widely used in food and medicine industry. The polyene macrolide compound, produced by several bacterial species of the genus *Streptomyces*, is synthesized by type I polyketide synthases using acetyl-CoA, malonyl-CoA, and methylmalonyl-CoA as substrates. In this study, four pathways potentially responsible for the supply of the three precursors were evaluated to identify the effective precursor supply pathway which can support the overproduction of natamycin in *Streptomyces gilvosporeus*, a natamycin-producing wild-type strain. The results showed that over-expressing acetyl-CoA synthetase and methylmalonyl-CoA mutase increased the yield of natamycin by 44.19% and 20.51%, respectively, compared with the wild type strain under shake flask fermentation. Moreover, the yield of natamycin was increased by 66.29% compared with the wild-type strain by co-overexpression of acetyl-CoA synthetase and methylmalonyl-CoA mutase. The above findings will facilitate natamycin strain improvement as well as development of strains for producing other polyketide compounds.

**Keywords:** *Streptomyces gilvosporeus*; natamycin; precursor supply; acetyl-CoA synthase; methylmalonyl-CoA mutase

纳他霉素 (natamycin), 又称匹马霉素, 是一种含有海藻糖胺糖基修饰的多烯大环内酯类化合物。作为高效的抗真菌剂, 纳他霉素可以有效控制霉菌感染和酵母繁殖, 但对哺乳动物细胞几乎没有毒性<sup>[1]</sup>。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO)、欧洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 以及食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 在彻底评估后将其列为公认的安全 (generally recognized as safe, GRAS) 状态, 并被欧盟视为天然防腐剂。目前, 纳他霉素被广泛应用于食品防腐剂以增加商品货架期。除了食品应用外, 纳他霉素还可应用于许多真菌性

疾病的治疗, 如支气管肺曲霉菌病<sup>[2]</sup>和霉菌性角膜炎<sup>[3]</sup>。纳他霉素由放线菌, 如褐黄孢链霉菌 (*Streptomyces gilvosporeus*)、纳塔尔链霉菌 (*Streptomyces natalensis*)、恰塔努加链霉菌 (*Streptomyces chatanoogensm*) 和利迪链霉菌 (*Streptomyces lydicus*) 发酵产生<sup>[4]</sup>。随着应用范围和市场需求的不断扩大, 对纳他霉素高效低成本生产也提出了更高的要求, 其中高产菌株的选育是关键因素之一。

纳他霉素生物合成基因簇已经从不同纳他霉素产生菌中克隆, 不同产生菌来源的纳他霉素基因簇具有相似的基因组成和相近的排布方式<sup>[5]</sup>。生物合成基因簇的克隆与生物合成机制

的阐明揭示了纳他霉素是由典型的I型聚酮合酶 (polyketide synthase, PKS) 催化合成。纳他霉素生物合成基因簇编码的I型 PKS 包含有 12 个功能模块 (modules), 以乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 为底物催化合成大环内酯骨架结构, 后者经过进一步的后修饰过程生成成熟的纳他霉素分子 (图 1)。

聚酮类天然产物属于次级代谢产物。与初级代谢不同, 次级代谢对菌体生长发育不是必需的, 一般在菌体生长的稳定期开始启动, 代谢产物产生过程受到严格的调控。次级代谢产

物合成的直接前体主要来源于初级代谢过程, 通过代谢工程手段操纵前体物质的合成, 以保证次级代谢过程前体的充足供给, 是提高次级代谢产物生产能力的有效方式。最近一项研究表明, 链霉菌初级代谢积累的三酰甘油 (triacylglycerols, TAGs) 是聚酮类次级代谢产物合成所需前体 (乙酰辅酶 A) 的主要来源。通过对三酰甘油分解代谢控制节点关键酶脂酰辅酶 A 合成酶 (acyl-CoA synthetase, ACYS) 的可控诱导表达可以实现前体乙酰辅酶 A 的充足供给, 取得了放线菌素、四环素和阿维菌素 B<sub>1a</sub>

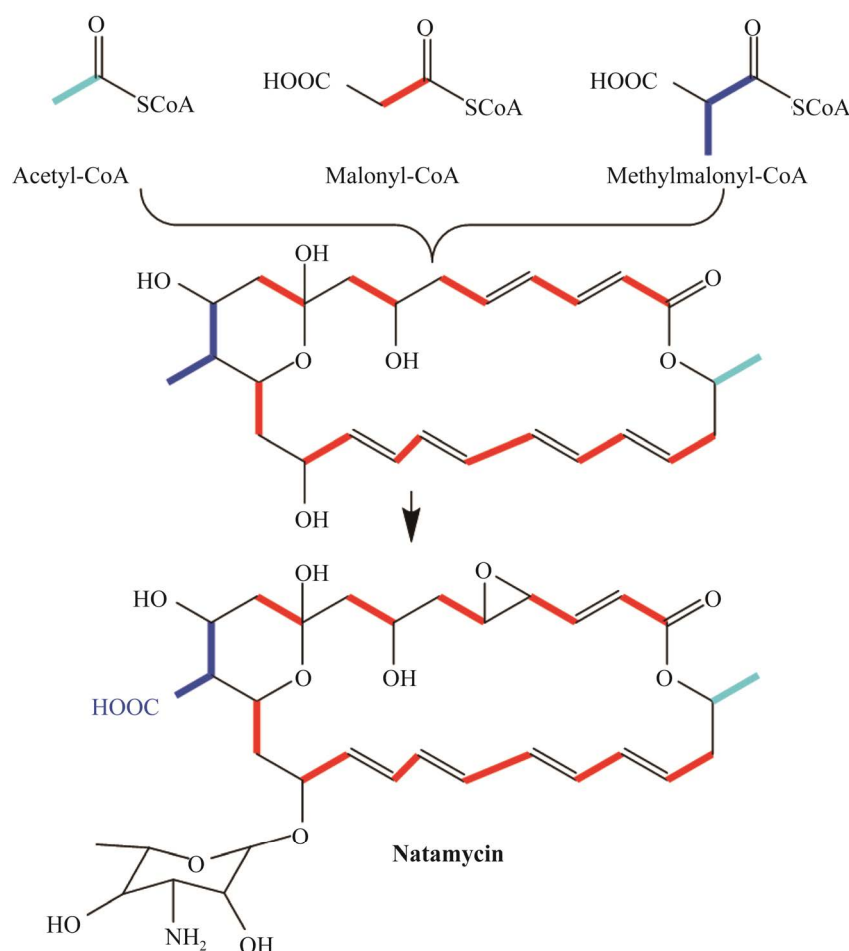


图 1 纳他霉素、内酯环骨架以及前体分子的分子结构

Figure 1 Structures of natamycin, macrolactone ring and its precursors.



### 1.1.2 培养基

LB 培养基 (g/L): 酵母浸出物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 固体培养基加入 2%琼脂粉, pH 7.0, 用于培养大肠杆菌。2×YT 培养基 (g/L): 酵母抽提物 10.0, 胰蛋白胨 16.0, NaCl 5.0, pH 7.2, 用于接合转移时链霉菌孢子的热激处理。MS 培养基 (g/L): 甘露醇 20.0, 黄豆粉 20.0, 琼脂 18.0, 用于链霉菌与大肠杆菌结合转移及链霉菌培养产孢。种子培养基 (g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 6.0, 酵母浸出物 6.0, NaCl 10.0, pH 调至 7.0, 用于链霉菌种子液培养。发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 40.0, 大豆蛋白胨 15.0, 酵母浸出物 5.0, 牛肉浸粉 5.0, pH 调至 7.5, 用于链霉菌摇瓶发酵。

### 1.1.3 抗生素、酶及试剂

潮霉素 B (100 mg/mL), 安普霉素 (100 mg/mL H<sub>2</sub>O), 氯霉素 (25 mg/mL 100%乙醇), 萘啶酮酸 (100 mg/mL, 0.1 mol/L NaOH) 作为储备液于 -20 °C 保存。在 LB 培养基中, 潮霉素 B、安普霉素的使用浓度均为 100 µg/mL, 氯霉素为 25 µg/mL, 萘啶酮酸在 MS 中的使用浓度是 25 µg/mL, 潮霉素 B 和安普霉素在 MS 培养基中的使用浓度均为 10 µg/mL。抗生素试剂均购自北京索莱宝科技有限公司。

质粒构建所用到的限制性内切酶如 *EcoR* I、*Hind* III 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。高保真聚合酶 PrimeSTAR<sup>®</sup>HS DNA Polymerase with GC Buffer 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。快速克隆试剂盒 ClonExpress<sup>®</sup>II One Step Cloning Kit, 快速 PCR 聚合酶 2×Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。Bacterial RNA Kit 购自 Omega 生物公司。RT-qPCR 所用试剂 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II、PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。本实验所用琼脂糖凝胶 DNA 回收试

剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 过表达质粒的构建

链霉菌基因组 DNA 的提取、大肠杆菌感受态的制备及分子克隆操作参阅文献[13-14]。DNA 测序由华大基因有限公司完成。本研究所用引物见表 2。

乙酰辅酶 A 合成酶过表达质粒 pACS 的构建: 以天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 的基因组 DNA 为模板, 使用引物对 SCO3563-L/R 扩增乙酰辅酶 A 合成酶基因 (*acs*)<sup>[15]</sup>, 利用一步克隆试剂盒 ClonExpress<sup>®</sup>II 将 *acs* 片段克隆入载体 pIMEP 的 *EcoR* I 位点获得质粒 pACS。脂酰辅酶 A 合成酶过表达质粒 pACYS 的构建: 以天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) 的基因组 DNA 为模板, 使用引物对 SCO6196-L/R 扩增脂酰辅酶 A 合成酶基因 (*fadD*)<sup>[16]</sup>, 利用一步克隆试剂盒将 *fadD* 克隆至 pIMEP 的 *EcoR* I 位点获得质粒 pACYS。

乙酰辅酶 A 羧化酶过表达质粒 pACC 的构建: 丙二酰辅酶 A 羧化酶包含  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  这 3 个亚基, 分别由 *accA2*、*accB* 和 *accE* 这 3 个基因编码<sup>[7]</sup>。以天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) 基因组为模板, 用引物对 SCO4921-L/R 扩增基因 *accA2*, 用引物对 SCO5535-L/R 扩增包含 *accB* 和 *accE* 的 DNA 片段, 利用一步克隆试剂盒 ClonExpress<sup>®</sup>II 将 *accA2* 片段克隆入载体 pIMEP 的 *EcoR* I 位点获得中间质粒 pIMEP::*accA2*, 同样的方法将 *accB* 和 *accE* 亚基片段克隆至 pIMEP::*accA2* 的 *EcoR* I 位点获得重组质粒 pACC。

甲基丙二酰辅酶 A 变位酶过表达质粒 pMCM 的构建: 我们采用 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 内源甲基丙二酰辅酶 A 变位酶基因构建了 pMCM。首先委托华大基因公司合成 DNA

片段 *kasOp*\*<sup>[17]</sup>, 利用一步克隆试剂盒 ClonExpress®II 将该片段克隆入载体 pIJ10500 的 *Hind* III 位点获得质粒 pIJ10500::*kasOp*\*。因为 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 基因组序列尚未测定, 我们参照序列已知的 *S. gilvosporeus* F607 基因组 (GenBank 登录号: CP020569.1), 设计引物对 MCM-L/R, PCR 扩增 *S. gilvosporeus*

ATCC 13326 内源甲基丙二酰辅酶 A 变位酶基因 (*mutAB*)。PCR 产物经测序表明, *S. gilvosporeus* ATCC 13326 来源的 *mutAB* 与 *S. gilvosporeus* F607 来源的 *mutAB* 基因序列完全相同。使用一步克隆试剂盒 ClonExpress®II 将 *mutAB* 片段克隆入载体 pIJ10500::*kasOp*\* 的 *Hind* III 位点获得质粒 pMCM。

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Purpose
SCO6196-L	ATCTAGCGGAACGGATCTAGAGATATGAGCGGTGAGCAGGAGCTGT	pACYS construction
SCO6196-R	TTCCATCGCCGCTTCATGATGAATTC AACGAAACAAGCCAGCCGGG	pACYS construction
SCO3563-L	TAGCGGAACGGATCTAGAGATGTGAGCAACGAATCCTTG GCC	pACS construction
SCO3563-R	GAATTCGGTACCGGATCCGATTCGGTGGGCAGCACGGAACA	pACS construction
SCO4921-L	CGGAACGGATCTAGAGATGTGCGCAAGGTGCTCATC	pACC construction
SCO4921-R	TTCGGTACCGGATCCGATCAGTCCTTGATCTCGCAGAT	pACC construction
SCO5535-L	CTGATCGGATCCGGTACCCGACGGCTCGCAATCCTTG	pACC construction
SCO5536-R	TCATGATGAATTCGGTACCGGGCCTCTCTTGTCGTTC	pACC construction
MCM-L	GCCGAAGGTCTCCTATCGACCATAGCGGGCAGGGAG	pMCM construction
MCM-R	CCGAGAACCTAGGATCCAAGCTGTAGGGCAGCAGTTTCACCAGC	pMCM construction
YZ-ACYS-L	GCGAACGGGCGAACCTTGT	<i>S. gilvosporeus</i> ACYSOE verification
YZ-ACS-L	CGAGCACCCGCTGTTCATC	<i>S. gilvosporeus</i> ACSOE verification
YZ-ACS-R	TGAGCGAGGAAGCGGAAGA	<i>S. gilvosporeus</i> ACSOE verification
YZ-ACC-L	CGTTATGTTGATCGGCACTTTG	<i>S. gilvosporeus</i> ACCOE verification
YZ-MCM-L	ATCTGGTACCGAAGATGAACACGATCAGGCA	<i>S. gilvosporeus</i> MCMOE verification
YZ-MCM-R	ACGCCACCTCCGTGACATCC	<i>S. gilvosporeus</i> MCMOE verification
qPCR-ACYS-L	GTCGAGGAGTTCCTGTACGC	<i>fadD</i> qPCR
qPCR-ACYS-R	TGAGTCCGAAACAGTCGGTG	<i>fadD</i> qPCR
qPCR-ACS-L	GTGGATCTGGTACCGCAAGA	<i>acs</i> qPCR
qPCR-ACS-R	TAGGTGTCGATGAACCGCTG	<i>acs</i> qPCR
qPCR-ACC-L	AAGGTGCTCATCGCCAATCG	<i>accA2</i> qPCR
qPCR-ACC-R	TTCTCCGAGAGGAACCCGTA	<i>accA2</i> qPCR
qPCR-MCM-L	CATGTACGTCAACCAGCCCT	<i>mutA</i> qPCR
qPCR-MCM-R	TCATCGTCATCGACACCGTC	<i>mutA</i> qPCR
qPCR-HrdB-R	CGAATTCGTAATCATAGCCCCGTACCCCCATGC	<i>hrdB</i> qPCR
qPCR-HrdB-R	ATGCGTCGCACTAGTGTGCTGGCCGACACGAACAA	<i>hrdB</i> qPCR

### 1.2.2 重组菌株的构建

本研究采用结合转移的方法将重组质粒转入褐黄孢链霉菌<sup>[18]</sup>,进而构建褐黄孢链霉菌工程菌株。过程简要描述如下:将用于接合转移的质粒 pACS 转化至大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态中,用含此质粒的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 与褐黄孢链霉菌 (*S. gilvosporeus* ATCC 13326) 进行两亲本接合转移,30℃、18 h 后用安普霉素和萘啶酮酸进行覆盖,5 d 后即可挑取接合转移子提取基因组 DNA,使用引物对 YZ-ACS-L/R 进行 PCR 验证,获得重组菌株 *S. gilvosporeus* ACSOE。将质粒 pACYS 转入到褐黄孢链霉菌野生型中,使用引物 YZ-ACYS-L 和 SCO6196-R 进行 PCR 验证,获得重组菌株 *S. gilvosporeus* ACYSOE。同样的方法,将质粒 pACC 转入到褐黄孢链霉菌野生型中,使用引物 YZ-ACC-L 和 SCO4921-R 进行 PCR 验证,获得重组菌株 *S. gilvosporeus* ACCOE。将质粒 pMCM 转入到褐黄孢链霉菌野生型中,使用引物对 YZ-MCM-L/R 进行 PCR 验证,获得重组菌株 *S. gilvosporeus* MCMOE。将质粒 pACS 转入到 *S. gilvosporeus* MCMOE 中,使用引物对 YZ-ACS-L/R 进行 PCR 验证,获得重组菌株 *S. gilvosporeus* ACS-MCMOE。本文验证所用的引物见表 2。

### 1.2.3 链霉菌菌株的摇瓶发酵

将链霉菌划线于 MS 平板上,28℃培养 7~10 d。用无菌水洗取新鲜孢子,制备新鲜孢子悬浮液。将孢子悬液按 2%~4% 的接种量接种到装有 20 mL 种子培养基的 100 mL 的三角瓶中,28℃、200 r/min 培养 2 d,然后将种子培养基按 5% 的接种量转接到含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、200 r/min 发酵 144 h。

### 1.2.4 基因表达水平的检测

参照方法 1.2.2 对链霉菌进行摇瓶发酵,培

养至对数期,收集 2 mL 对数期菌体使用 Bacterial RNA Kit 提取总 RNA。总 RNA 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 要求进行反转录,取 100 ng 反转录产物,按照 TB Green® Premix Ex Taq™ II 的要求配制混合液进行 RT-qPCR,程序设定为:95℃ 30 s;95℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 15 s,共 40 个循环;72℃ 采集荧光信号。以 *hrdB* 为内参,设置 3 个生物学重复及各 3 个技术重复,按目标基因相对于内参基因的扩增量为  $2^{-\Delta C_t}$  处理数据,其中  $-\Delta C_t = -(C_{t,q} - C_{t,cb})$ ,  $C_{t,q}$  为目标基因循环数,  $C_{t,cb}$  为内参基因循环数。

### 1.2.5 链霉菌生物量的测定

用电子天平准确称重滤纸的重量,将滤纸片浸湿置于抽滤容器中,吸取 10 mL 发酵液并加在滤纸片表面,启动抽滤泵抽滤菌体,将含有菌体的滤纸片置于烘箱烘干至恒重。用电子天平称重此时滤纸片的重量并记录,菌体干重等于总重减去滤纸的重量,以时间为横坐标系,以细胞干重为纵坐标系描绘细胞的生长曲线。

### 1.2.6 纳他霉素产量的检测

样品处理:取 1 mL 发酵液,加入 9 mL 的甲醇,充分振荡后,超声 20 min,之后 8 000 r/min 离心 15 min。将上清液用甲醇稀释合适倍数后用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得到待测液。

检测条件:Cosmosil 5C18-MS-II 柱 (4.6 mm ID×150 mm);流动相:甲醇:水=7:3 (V/V);流速:0.700 mL/min;检测波长:303 nm;进样量:10 μL;柱温:30℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙酰辅酶 A 合成途径遗传改造对纳他霉素产生的影响

不同链霉菌中的代谢研究表明:在发酵过程的中后期细胞内伴随着三酰基甘油 (TAGs) 的积累<sup>[19]</sup>,培养基中伴随着乙酸 (acetate) 的积

累<sup>[20]</sup>。三酰基甘油和乙酸都是乙酰辅酶 A 合成的重要前体物质 (图 2A)。前者主要通过脂肪酸  $\beta$  氧化途径生成乙酰辅酶 A, 脂酰辅酶 A 合成酶 (acyl-CoA synthetase, ACYS) 催化的反应是该途径的限速步骤<sup>[6]</sup>。乙酸在乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACS) 的催化作用下可以直接合成乙酰辅酶 A<sup>[15]</sup>。为了研究

乙酰辅酶 A 的供给途径遗传改造对纳他霉素产生的影响, 我们在 *S. gilvosporeus* 中分别对上述两个乙酰辅酶 A 合成途径的关键基因分别进行了过表达。

将天蓝色链霉菌来源的脂酰辅酶 A 合成酶基因 (*fadD*) 置于链霉菌组成型强启动子 *ermEp\** 之下, 并克隆入链霉菌整合型载体 pSET152 中,

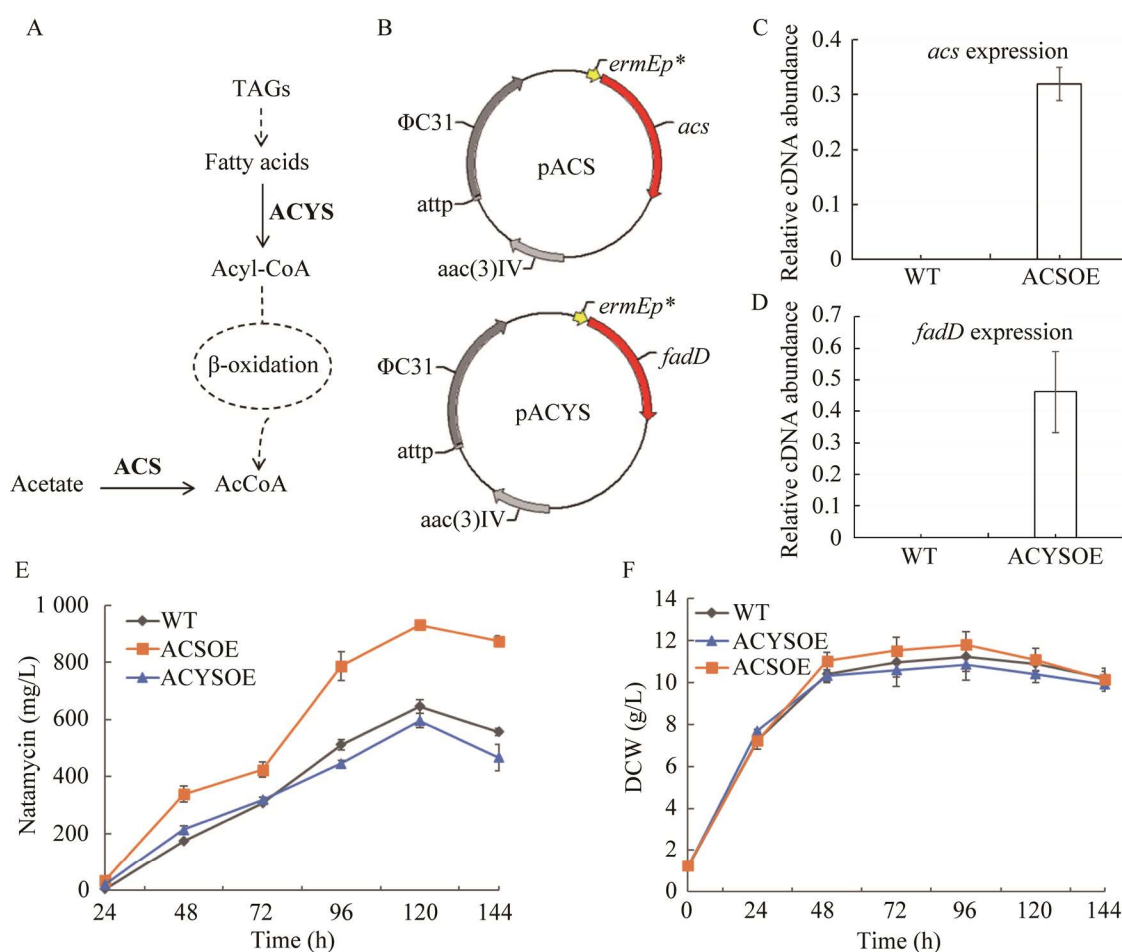


图 2 乙酰辅酶 A 供给途径代谢遗传改造对纳他霉素产生的影响

Figure 2 Effect of engineering the supply of acetyl-CoA on natamycin production. (A) The acetyl-CoA pathway engineered in this study. ACS: acetyl-CoA synthase. ACYS: acyl-CoA synthetase. (B) The plasmids map for the acetyl-CoA-providing pathway. pACYS: plasmid used for overexpressing *fadD* (the gene encoding ACYS in *S. coelicolor*). pACS: plasmid for overexpressing *acs* (the gene encoding ACS in *S. coelicolor*). (C) Expression of *acs* in wild-type strain (WT) and ACS overexpression strain (ACSOE). The transcript abundance of *acs* was determined by RT-qPCR and is presented relative to *hrdB* in the corresponding strain, which was arbitrarily assigned as 1 and is not shown in the graph. (D) Expression of *fadD* in wild-type strain (WT) and ACYS overexpression strain (ACYSOE). (E) Natamycin production in ACYS overexpression strain (ACYSOE), ACS overexpression strain (ACSOE), and wild type strain (WT). (F) Growth curves of recombinant strains and wild-type strain.



构建成脂酰辅酶 A 合成酶过表达质粒 pACYC (图 2B)。将重组质粒 pACYC 转化入 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 野生型菌株, 获得脂酰辅酶 A 合成酶过表达菌株 (*S. gilvosporeus* ACYSOE)。类似地, 将天蓝色链霉菌来源的乙酰辅酶 A 合成酶基因 (*acs*) 置于链霉菌组成型强启动子 *ermEp\** 之下, 并克隆入链霉菌整合型载体 pSET152 中, 构建成重组质粒 pACS (图 2B)。将重组质粒 pACS 转化入 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 野生型菌株, 获得乙酰辅酶 A 合成酶过表达菌株 (*S. gilvosporeus* ACSOE)。RT-qPCR 实验表明天蓝色链霉菌来源的基因在对应的两个重组菌株中均得到了有效表达, 由于扩增引物的特异性, 相关基因在野生型菌株中检测不到表达 (图 2C-D)。

将野生型菌株 (WT)、脂酰辅酶 A 合成酶过表达菌株 (ACYSOE) 和乙酰辅酶 A 合成酶过表达菌株 (ACSOE) 进行摇瓶发酵。发酵结果表明, 所有 3 个菌株在 120 h 时纳他霉素产量达到最大值。其中, 乙酰辅酶 A 合成酶过表达菌株 (ACSOE) 产量最高, 其产量相比于野生型提升了 44.19%。脂酰辅酶 A 合成酶过表达菌株 (ACYSOE) 与野生型菌株相比, 纳他霉素产量没有显著差异 (图 2E)。两种重组菌株与野生型菌株在生长上没有明显差异 (图 2F)。

## 2.2 丙二酰辅酶 A 合成途径遗传改造对纳他霉素产生的影响

聚酮类天然产物合成过程中普遍采用的延伸单元——丙二酰辅酶 A 在细菌体内主要来源之一是乙酰辅酶 A 的羧化反应<sup>[7,21]</sup>。乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 的催化下可以直接合成丙二酰辅酶 A (图 3A)。为了研究丙二酰辅酶 A 供给途径遗传改造对纳他霉素产生的影响, 我们在 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 中对乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 的编码基因进行了过

表达。将天蓝色链霉菌来源的编码乙酰辅酶 A 羧化酶亚基基因, *accA2*、*accB* 和 *accE* 置于链霉菌组成型启动子 *ermEp\** 之下, 并克隆入链霉菌整合型载体 pSET152 中, 构建成乙酰辅酶 A 羧化酶过表达质粒 pACC (图 3B)。将重组质粒 pACC 转化入 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 野生型菌株, 获得乙酰辅酶 A 羧化酶过表达菌株 (*S. gilvosporeus* ACCOE)。RT-qPCR 实验表明丙二酰辅酶 A 羧化酶  $\alpha$  亚基编码基因 (*accA2*) 在重组菌株 (*S. gilvosporeus* ACCOE) 中得到了有效表达, 由于扩增引物的特异性, 在野生型菌株中检测不到 *accA2* 的表达 (图 3C)。

将野生型菌株 (WT) 和乙酰辅酶 A 羧化酶过表达菌株 (ACCOE) 进行摇瓶发酵。发酵结果表明, 重组菌株和野生型菌株在 120 h 时纳他霉素产量达到最大值。乙酰辅酶 A 羧化酶过表达菌株 (ACCOE) 与野生型菌株相比, 纳他霉素产量没有显著差异 (图 3D)。重组菌株与野生型菌株在生长上没有明显差异 (图 3E)。

## 2.3 甲基丙二酰辅酶 A 合成途径遗传改造对纳他霉素产生的影响

琥珀酰辅酶 A 途径是甲基丙二酰辅酶 A 的主要来源之一。来自于三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 的琥珀酰辅酶 A 在甲基丙二酰辅酶 A 变位酶 (methylmalonyl-CoA mutase, MCM) 的催化下的可逆异构化是部分细菌中生成甲基丙二酰辅酶 A 的主要途径之一<sup>[22]</sup> (图 4A)。为了研究甲基丙二酰辅酶 A 供给途径遗传改造对纳他霉素产生的影响, 我们首先采用 PCR 的方法克隆了 *S. gilvosporeus* ATCC 13326 内源甲基丙二酰辅酶 A 变位酶编码基因 (*mutAB*)。编码蛋白 (MutA 和 MutB) 与功能已知的糖多孢红霉菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 来源的丙二酰辅酶 A 变位酶两个亚基同源性分别为 61.89% 和

79.64%。推测二者在 *S. gilvosporeus* 中构成了功能性的甲基丙二酰辅酶 A 变位酶。进一步地, 将 *mutAB* 置于链霉菌组成型启动子 *kasOp\** 之下, 并克隆入链霉菌整合型载体 pIJ10500 中, 构建成甲基丙二酰辅酶 A 变位酶过表达质粒 pMCM (图 4B)。将重组质粒 pMCM 转化入 *S. gilvosporeus* 野生型菌株, 获得甲基丙二酰辅酶 A 变位酶过表达菌株 (*S. gilvosporeus* MCMOE)。RT-qPCR 实验表明: 与野生型菌株中的表达量相比, 甲基丙二酰辅酶 A 变位酶  $\alpha$

亚基编码基因 (*mutA*) 在重组菌株中的表达量获得显著提升 (图 4C)。

将野生型菌株 (WT) 和甲基丙二酰辅酶 A 变位酶过表达菌株 (MCMOE) 进行摇瓶发酵。发酵结果表明, 重组菌株和野生型菌株在 120 h 时纳他霉素产量达到最大值。甲基丙二酰辅酶 A 变位酶过表达菌株 (MCMOE) 与野生型菌株相比, 纳他霉素产量提升了 20.51% (图 4D)。重组菌株与野生型菌株在生长上没有明显差异 (图 4E)。

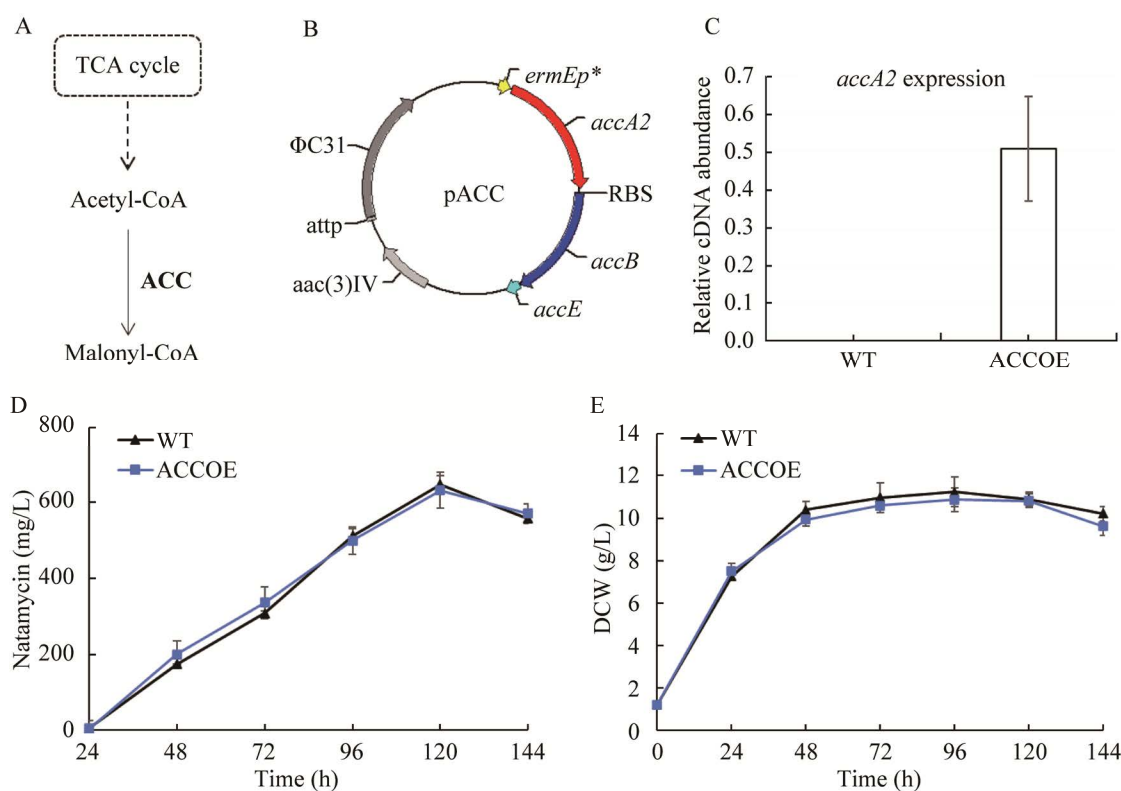


图 3 丙二酰辅酶 A 供给途径代谢遗传改造对纳他霉素产生的影响

Figure 3 Effect of engineering the supply of malonyl-CoA on natamycin production. (A) The malonyl-CoA pathway engineered in this study. ACC: acetyl-CoA carboxylase. (B) The map of recombinant plasmid pACC used for the overexpression of acetyl-CoA carboxylase. *accA2*, *accB* and *accE* are three genes from *S. coelicolor*, which encode the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunit of acetyl CoA carboxylase respectively. (C) Expression of *accA2* in wild-type strain (WT) and ACC overexpression strain (ACCOE). The transcript abundance of *accA2* was determined by RT-qPCR and is presented relative to *hrdB* in the corresponding strain, which was arbitrarily assigned as 1 and is not shown in the graph. (D) Natamycin production in ACC overexpression strain (ACCOE) and wild-type strain (WT). (E) Growth curves of recombinant strain (ACCOE) and wild-type strain (WT).

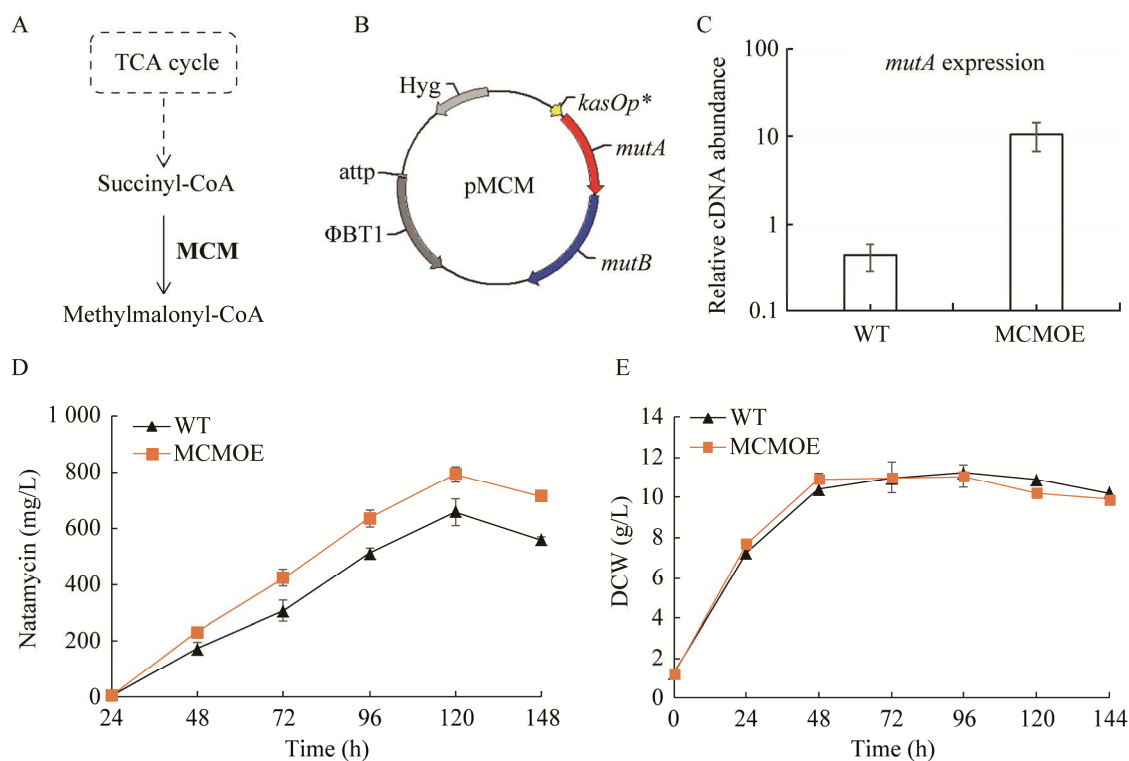


图4 甲基丙二酰辅酶A供给途径代谢遗传改造对纳他霉素产生的影响

Figure 4 Effect of engineering the supply of methylmalonyl-CoA on natamycin production. (A) The methylmalonyl-CoA pathway engineered in this study. MCM: methylmalonyl-CoA mutase. (B) The map of recombinant plasmid pMCM used for the overexpression of *mutAB*. *mutA* and *mutB* are two genes from *S. gilvosporeus* ATCC 13326, which encode the  $\alpha$ -subunit and  $\beta$ -subunit of MCM, respectively. (C) Expression of *mutA* in wild-type strain (WT) and ACC overexpression strain (ACCOE). The transcript abundance of *mutA* was determined by RT-qPCR and is presented relative to *hrdB* in the corresponding strain, which was arbitrarily assigned as 1 and is not shown in the graph. (D) Natamycin production in MCM overexpression strain (MCMOE) and wild-type strain (WT). (E) Growth curves of recombinant strain (MCMOE) and wild-type strain (WT).

## 2.4 前体合成途径的组合改造进一步提高纳他霉素的产量

在上述前体物质合成路径的遗传改造中, 通过过表达乙酰辅酶A合成酶基因(*acs*)提高乙酸合成乙酰辅酶A的效率, 或者过表达甲基丙二酰辅酶A变位酶编码基因(*mutAB*)加强琥珀酰辅酶A到甲基丙二酰辅酶A的合成过程, 都能获得纳他霉素产量的显著增加。为了确定2个前体合成途径的组合改造能否协同提升纳他霉素的产量, 我们将乙酰辅酶A合成酶过表达质粒pACS转化到甲基丙二酰辅酶A合

成酶过表达菌株(MCMOE)中, 获得乙酰辅酶A合成酶和甲基丙二酰辅酶A合成酶共过表达菌株(ACS-MCMOE)。采用RT-qPCR实验分别对基因*acs*和*mutA*在重组菌株中的表达情况进行了分析。结果与预期一致, 异源基因*acs*在褐黄孢链霉菌野生型中检测不到表达, 而在重组菌株中(ACS-MCMOE)有显著表达(图5A); 另外, *mutA*基因在重组菌株中的表达量比野生型中的表达量也有显著提升(图5B)。将野生型菌株(WT)与共过表达菌株(ACS-MCMOE)进行摇瓶发酵。结果表明, 在

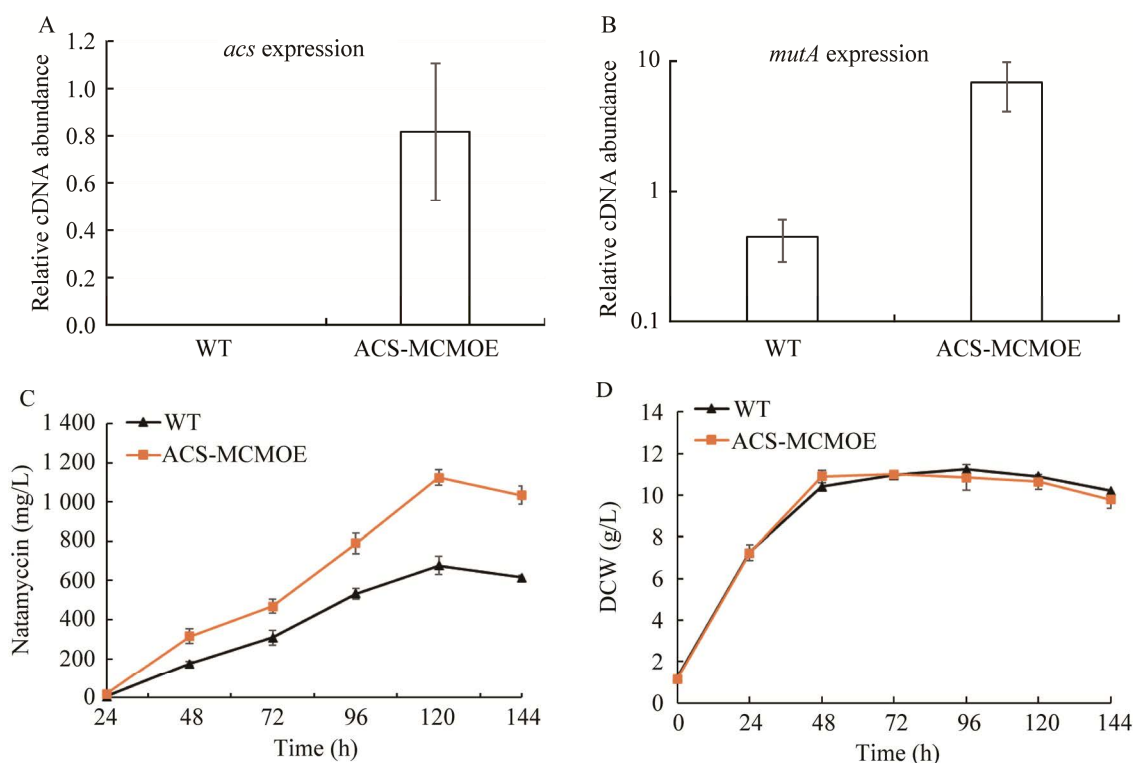


图5 前体物质供给途径的联合加强

Figure 5 Effect of engineering the supply of acetyl-CoA and methylmalonyl-CoA in combination on the production of natamycin. (A) Expression of *acs* in wild-type strain (WT) and the recombinant strain (ACS-MCMOE). The transcript abundance of *acs* was determined by RT-qPCR and is presented relative to that of *hrdB* in the corresponding strain, which was arbitrarily assigned as 1 and is not shown in the graph. (B) Expression of *mutA* in wild-type strain (WT) and the recombinant strain (ACS-MCMOE). (C) Natamycin production in recombinant strain with the overexpression of ACS and MCM in combination strain (ACS-MCMOE), and wild-type strain (WT). (D) Growth curves of recombinant strain (ACS-MCMOE) and wild-type strain (WT).

菌株生长没有显著差异的情况下(图 5D), 共过表达菌株 (ACS-MCMOE) 在 120 h 时产量达到最大值 1 123.34 mg/L, 与野生型菌株相比产量增加了 66.29%(图 5C)。同时结果也表明: 相比单一途径遗传改造, 前体合成途径的组合改造进一步提高了纳他霉素的产量。

### 3 讨论

乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和甲基丙二酰辅酶 A 是纳他霉素内酯环合成的直接前体。本研究发现通过乙酰辅酶 A 合成酶 (ACS) 的过

表达, 强化乙酸回流生成乙酰辅酶 A 的途径, 可以显著提高纳他霉素的发酵产量。有研究报道乙酸是链霉菌发酵中后期常见的代谢积累产物。乙酸的积累往往导致培养基中气泡的增加和次级代谢产物产量的降低<sup>[23]</sup>。我们推测通过过表达 ACS, 强化乙酸回流生成乙酰辅酶 A 的过程, 不仅减缓了乙酸积累对发酵体系的不利影响, 而且有效增加了聚酮化合物合成的前体供给, 从而提高了纳他霉素的产量。操纵稳定期积累的代谢产物, 将其导向次级代谢产物合成过程, 进而有效提升次级代谢产物的产量。

推测该策略对聚酮类天然产物的高效生产可能具有普遍意义。本研究还发现在 *S. gilvosporeus* 中过表达甲基丙二酰辅酶 A 合成途径的关键酶——甲基丙二酰辅酶 A 变位酶, 重组菌中纳他霉素产量获得显著提升。该结果表明在 *S. gilvosporeus* 中, 甲基丙二酰辅酶 A 的胞内供给是纳他霉素合成的限制因素。KEGG 代谢途径数据库显示, 链霉菌中除了甲基丙二酰辅酶 A 变位酶参与的合成途径, 还有至少 3 条途径参与甲基丙二酰辅酶 A 合成<sup>[9]</sup>。推测这些合成途径的加强也有望提高纳他霉素的产量。强化甲基丙二酰辅酶 A 供给途径能够增加纳他霉素的产量。

三酰基甘油 (TAGs) 是另一种在稳定期积累的代谢产物。已有研究报道在菌体生长稳定期诱导表达脂酰辅酶 A 合成酶 (TAGs 降解产生乙酰辅酶 A 代谢途径中的限速酶), 能够有效提升聚酮类天然产物的产量<sup>[6]</sup>。本研究通过组成型过表达脂酰辅酶 A 合成酶, 没有获得预期的纳他霉素产量提升的结果。已有研究表明脂酰辅酶 A 合成酶的时序表达模式对稳定期乙酰辅酶 A 供给有重要影响。未来我们将采用内源时序表达启动子或诱导型启动子来探究三酰基甘油降解途径对纳他霉素合成前体有效供给的影响。另外, 本研究通过直接在 *S. gilvosporeus* 中组成型过表达乙酰辅酶 A 羧化酶 (丙二酰辅酶 A 合成中的关键酶), 发现重组菌株并没有获得纳他霉素产量的显著提升。因为该途径依赖于胞内乙酰辅酶 A 的有效供给, 推测在没有同时加强乙酰辅酶 A 合成途径的情况下, 单独过表达乙酰辅酶 A 羧化酶可能无法进一步提升胞内丙二酰辅酶 A 的浓度。未来我们将采用共过表达并结合内源时序启动子来进一步研究丙二酰辅酶 A 前体供给途径的加强对于纳他霉素产量的影响。

总之, 本研究首次在纳他霉素产生菌中探究了前体供给途径的遗传改造对纳他霉素合成的影响。研究发现无论通过过表达乙酰辅酶 A 合成酶 (ACS) 加强乙酰辅酶 A 前体供给途径, 还是通过过表达甲基丙二酰辅酶 A 变位酶 (MCM) 加强甲基丙二酰辅酶 A 前体供给途径, 都能够显著提升纳他霉素的发酵产量 (分别比野生株提高了 44.19% 和 20.51%)。两个途径的协同加强能够进一步提升纳他霉素产量 (比野生株提高了 66.29%, 达 1 123.34 mg/L)。尽管与诱变育种获得的工业高产菌株 (产量达 14.1 g/L) 相比仍有一定差距<sup>[24]</sup>, 但是该发现为在传统诱变基础之上通过代谢工程的手段进一步提高纳他霉素产量提供了可能, 同时对于其他聚酮化合物高产菌株的构建具有理论指导意义。

## REFERENCES

- [1] Levinskas GJ, Ribelin WE, Shaffer CB. Acute and chronic toxicity of pimarcin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1966, 8(1): 97-109.
- [2] Patterson K, Streck ME. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2010, 7(3): 237-244.
- [3] Malecha MA. Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treated successfully with natamycin. *Cornea*, 2004, 23(2): 201-203.
- [4] 刘宁, 金志华, 骆健美, 岑沛霖. 前体对纳他霉素生物合成的影响. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(6): 328-331. Liu N, Jin ZH, Luo JM, et al. Effect of precursor on natamycin biosynthesis. *Chin J Antibiot*, 2005, 30(6): 328-331 (in Chinese).
- [5] Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, et al. Biotechnological production and application of the antibiotic pimarcin: biosynthesis and its regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(1): 61-78.
- [6] Wang WS, Li SS, Li ZL, et al. Harnessing the intracellular triacylglycerols for titer improvement of polyketides in *Streptomyces*. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(1): 76-83.
- [7] Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, et al. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*.

- Appl Environ Microbiol, 2006, 72(11): 7132-7139.
- [8] Reeves AR, Brikun IA, Cernota WH, et al. Effects of methylmalonyl-CoA mutase gene knockouts on erythromycin production in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33(7): 600-609.
- [9] Mo S, Ban YH, Park JW, et al. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36(12): 1473-1482.
- [10] Flett F, Mersinias V, Smith CP. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. FEMS Microbiol Lett, 1997, 155(2): 223-229.
- [11] Wang SL, Fan KQ, Yang X, et al. CabC, an EF-hand calcium-binding protein, is involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated regulation of spore germination and aerial hypha formation in *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, 2008, 190(11): 4061-4068.
- [12] 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. BMC Genomics, 2011, 12: 175.
- [13] 徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组DNA. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.  
Xu P, Li WJ, Xu LH, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. Microbiol China, 2003, 30(4): 82-84 (in Chinese).
- [14] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics: a laboratory manual. John Innes Centre Foundation, Norwich, England, 2000.
- [15] Jiao JY, Fu L, Hua ZS, et al. Insight into the function and evolution of the Wood-Ljungdahl pathway in actinobacteria. ISME J, 2021, 15(10): 3005-3018.
- [16] Banchio C, Gramajo H. A stationary-phase acyl-coenzyme A synthetase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is necessary for the normal onset of antibiotic production. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(9): 4240-4246.
- [17] Wang WS, Li X, Wang J, et al. An engineered strong promoter for streptomycetes. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(14): 4484-4492.
- [18] Wang XK, Jin JL. Crucial factor for increasing the conjugation frequency in *Streptomyces netropsis* SD-07 and other strains. FEMS Microbiol Lett, 2014, 357(1): 99-103.
- [19] Olukoshi ER, Packter NM. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. Microbiology (Reading), 1994, 140 (Pt 4): 931-943.
- [20] Ramirez-Malule H, Junne S, Nicolás Cruz-Bournazou M, et al. *Streptomyces clavuligerus* shows a strong association between TCA cycle intermediate accumulation and clavulanic acid biosynthesis. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(9): 4009-4023.
- [21] Maharjan S, Park JW, Yoon YJ, et al. Metabolic engineering of *Streptomyces venezuelae* for malonyl-CoA biosynthesis to enhance heterologous production of polyketides. Biotechnol Lett, 2010, 32(2): 277-282.
- [22] Reeves AR, Brikun IA, Cernota WH, et al. Engineering of the methylmalonyl-CoA metabolite node of *Saccharopolyspora erythraea* for increased erythromycin production. Metab Eng, 2007, 9(3): 293-303.
- [23] Xin X, Qi HS, Wen JP, et al. Reduction of foaming and enhancement of ascomycin production in rational *Streptomyces hygroscopicus* fermentation. Chin J Chem Eng, 2015, 23(7): 1178-1182.
- [24] Wang YM, Tao ZS, Zheng HL, et al. Iteratively improving natamycin production in *Streptomyces gilvosporeus* by a large operon-reporter based strategy. Metab Eng, 2016, 38: 418-426.

(本文责编 陈宏宇)