

## 研究报告

## 恩拉霉素生产菌株的遗传改造

牟慧艳<sup>1</sup> 刘扬<sup>1</sup> 王应东<sup>1</sup> 刘宝爱<sup>2</sup> 魏建军<sup>2</sup> 张会图<sup>1\*</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院应用微生物与酶工程实验室 天津 300457)

(2. 天津市新星兽药厂 天津 300402)

**摘要:**【目的】提高杀真菌素链霉菌发酵生产恩拉霉素的产量。【方法】利用定点突变技术,对恩拉霉素生产菌株杀真菌素链霉菌 F1 中影响细胞次级代谢及抗生素合成的核糖体 S12 蛋白的编码基因 *rpsL* 进行改造,将第 43 位的赖氨酸(Lys)分别替换为天冬酰胺(Asn)和精氨酸(Arg),并对改造菌株 L-M1(Asn43)和 L-M2(Arg43)的生长特性、抗生素合成以及摇瓶发酵性能进行研究。【结果】与野生型菌株相比,改造菌株的生长特性及生理生化特性均发生了明显的改变:产孢周期明显缩短,野生型菌株在 MS 培养基中,28 °C 下需要培养 5–7 d 后才能产生孢子,而在相同条件下,改造菌株 3 d 后就能产生大量的孢子;恩拉霉素产量相对提高,摇瓶发酵条件下,改造菌株 L-M1(Asn43)和 L-M2(Arg43)的恩拉霉素产量分别可达到 1 334 U/mL 和 1 456 U/mL,与野生型菌株 F1 相比分别提高了 11.9%和 22.1%。【结论】通过遗传改造,恩拉霉素的产量得到了提高,为其他位点的遗传改造提供了可行性。

**关键词:** 恩拉霉素, 抗生素, 抗真菌素链霉菌, 遗传改造, 核糖体 S12 蛋白, 定点突变

## Genetic modification of an enramycin producing strain

MOU Hui-Yan<sup>1</sup> LIU Yang<sup>1</sup> WANG Ying-Dong<sup>1</sup> LIU Bao-Ai<sup>2</sup>  
WEI Jian-Jun<sup>2</sup> ZHANG Hui-Tu<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory of Enzyme and Applied Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science &amp; Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Xinxing Veterinary Pharmaceutical Factory, Tianjin 300402, China)

**Abstract:** [Objective] To enhance the production of enramycin by *Streptomyces fungicidicus*. [Methods] In this study, the ribosomal S12 protein encoding gene *rpsL* which affects the secondary metabolism and biosynthesis of antibiotics in enramycin producing strain of *S. fungicidicus* F1 was changed through the method of site-directed mutation, during which the Lys43 was substituted for Asn and Arg, respectively. And then the growth characteristics, synthesis of antibiotic and flask fermentation performance of the modified strains were studied. [Results] The results showed that the growth characteristics and physiological and biochemical characteristics of the modified strains were significantly changed compared with the wild type strain. Sporulation cycle was shorten, spore was

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81373309)

\*Corresponding author: Tel/Fax: 86-22-60601958; E-mail: hzhang@tust.edu.cn

Received: January 19, 2016; Accepted: May 06, 2016; Published online (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81373309)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-22-60601958; E-mail: hzhang@tust.edu.cn

收稿日期: 2016-01-19; 接受日期: 2016-05-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-24

produced from wild type strain using MS medium under the condition of 28 °C for 5–7 days, but the modified strains can produced large amounts of spore only after 3 days in the same conditions. Enramycin yield was relatively increased. Under the flask formation condition, the enramycin production of the modified strains of L-M1(Asn43) and L-M2(Arg43) can reach a maximum of 1 334 U/mL and 1 456 U/mL, respectively. Compared with the wild-type strain, it was improved by 11.9% and 22.1% separately. **[Conclusion]** Through the genetic modification, the yield of enramycin was improved, which might provide a feasibility for the modification of other sites.

**Keywords:** Enramycin, Antibiotics, *Streptomyces fungicidicus*, Genetic modification, Ribosomal protein S12, Site-directed mutation

恩拉霉素(Enramycin)又名恩来霉素、恩霉素、安来霉素、持久霉素,是由日本研究人员在土壤中分离得到的一株杀真菌素链霉菌经过发酵获得的次级代谢产物<sup>[1-2]</sup>。它是一类含有 17 个氨基酸的脂肽类抗生素,对革兰氏阳性菌,特别是禽畜肠道内有害梭状芽孢杆菌具有较强的抑制作用<sup>[3]</sup>;饲料中添加适量的恩拉霉素不仅可以预防常见的动物消化道疾病,改善动物肠道内的群落平衡,还可以提高饲料的利用率,促进动物增重。同时,恩拉霉素具有较高的稳定性、低毒性、低药物残留、长期使用后不易产生耐药性等特点,因此被许多国家作为抗生素生长剂使用<sup>[4]</sup>。目前,工业上常用杀真菌素链霉菌 *S. fungicidicus* 作为恩拉霉素生产菌株,但由于该菌株发酵周期长、产素水平低等原因<sup>[5]</sup>,严重阻碍了企业的大规模生产。因此,采用现代技术选育高产的恩拉霉素生产菌株,对于降低恩拉霉素的生产成本具有重要的意义。

常规的选育方法如物理、化学等诱变剂进行随机诱变,无需了解其遗传背景,至今依然被广泛使用,但存在耗时长、效率低等缺点;而基因工程、代谢工程等新一代育种方法虽然效率高,目标明确,但需掌握复杂的遗传信息、代谢调控机制,因而限制了其广泛使用。因此寻找简单、高效、稳定的微生物遗传改造的方法尤为重要。2004 年,日本国家食品研究所 Ochi 等首次提出了核糖体工程概念,指出对微生物的核糖体或 RNA 聚合酶进行修饰改造,能够直接或间接地激活与微生物次级代谢产物合成有关基因的表达,从而提高次级代谢产物的产量甚至获得新的活性物质<sup>[6]</sup>。该技术操作简单、

可行性高,可以广泛地应用到抗生素高产菌株的选育中。大量研究发现,位于 30S 小亚基上的核糖体 S12 蛋白(*rpsL* 基因编码)影响着微生物次级代谢产物的合成,若核糖体 S12 蛋白的结构发生改变,将导致次级代谢产物相关基因被激活或过量表达。1997 年, Hesketh 和 Ochi 等将 *rpsL* 基因的 K88E 突变引入野生型天蓝色链霉菌 A3(2)中,使该菌株放线紫红素产量得到了显著提高<sup>[7]</sup>;2000 年, Okamoto-Hosoya 等筛选到 *rpsL* 基因的突变体 P91S,其放线紫红素产量是野生型天蓝色链霉菌 A3(2)的 7–10 倍<sup>[8]</sup>。目前,对 S12 蛋白编码基因(*rpsL*)的突变主要集中在 S12 的循环结构中的两个保守区:区域 I (TPKKPNS, 氨基酸残基)和区域 II (RVKDLPGVR, 氨基酸残基)。对区域 II 中第 88 位赖氨酸周围的位点进行突变,获得了抗生素高产突变菌株;而对区域 I 中,第 43、44 位的赖氨酸突变的研究则相对较少。

本文利用定点突变技术,将杀真菌素链霉菌中核糖体 S12 蛋白(*rpsL* 基因编码)的氨基酸序列上第 43 位的赖氨酸(Lys)分别替换了天冬酰胺(Asn)和精氨酸(Arg),获得了恩拉霉素产量明显提高、产孢周期明显缩短的突变菌株。该研究旨在为工业化发酵生产恩拉霉素提供优良的高产菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株、质粒和引物:** 本实验所用的菌株与质粒如表 1 所示。PCR 引物如表 2 所示,其中加粗并标下划线的部分为酶切位点及突变位点。

表 1 菌株与质粒  
Table 1 Strains and plasmids

菌株及质粒 Strains and plasmids	特征 Characterizations	来源 Sources
<i>Escherichia coli</i> JM109	Host strain	Laboratory stock
<i>E. coli</i> ET12567	pUZ8002, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	Laboratory stock
<i>S. fungicidicus</i> F1	Wild type	Laboratory stock
<i>S. fungicidicus</i> L-M1	Lys(43) of gene <i>rpsL</i> to Asn	This study
<i>S. fungicidicus</i> L-M2	Lys(43) of gene <i>rpsL</i> to Arg	This study
pUCm-T	Cloning vector, Amp <sup>r</sup>	Sangon Biotech
pKC1139	Shuttle plasmid of <i>Streptomyces</i> and <i>E. coli</i> , Apra <sup>r</sup> , repts	Laboratory stock

表 2 PCR 反应引物  
Table 2 PCR primers

引物 Primers	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增片段的大小 Size (bp)
rpsLF1	GTGCCTACGATCCAGCAGCT	370
rpsLR1	TTACTTCTCCTTCTTGGCGC	370
rpsLF2	GCCGAGTTCGGCTTCTTCG	1 400
rpsLR2	ACAACCTGCAGGAGCACTCC	1 400
S12F1	CCGAATTCGAACGGCAAGGCGGTCGC	1 450
S12R1	GCAAGCTTGCAGGTCAAGTGAAGTGGTA	1 450
MrpsLF1	ACCACCCCGAACAAGCCGAA	778
MrpsLR1	TTCGGCTTGTTTCGGGGTGGT	671
MrpsLF2	ACCACCCCGCGGAAGCCGAA	778
MrpsLR2	TTCGGCTTCCGCGGGGTGGT	671
Apra-F1	AGGTAGCTGTATGGGGTGTTC	820
Apra-R1	CATGTGCGCCGATATAAACAT	820

**1.1.2 培养基:** 培养大肠杆菌(*E. coli*)采用 LB 培养基<sup>[5]</sup>。培养链霉菌(*S. fungicidicus*)采用 MS 培养基(g/L): 甘露醇 20.0, 黄豆粉 20.0, 琼脂 20.0 和 2XYT 培养基<sup>[5]</sup>。种子培养基(g/L): 玉米粉 35.00, 玉米浆 3.20, 玉米蛋白粉 5.00, 硫酸铵 2.50, 硫酸亚铁 0.36, 磷酸二氢钾 41.30, 轻质碳酸钙 15.00, 橄榄油 0.50 mL/L, pH 6.2–7.0。发酵培养基(g/L): 玉米粉 140.00, 玉米浆 1.00, 玉米蛋白粉 35.00, 尿素 2.50, 硫酸铵 5.00, 硫酸亚铁 0.065, 磷酸二氢钾 0.17, 氯化锌 0.10, 轻质碳酸钙 20.00, 耐高温  $\alpha$ -淀粉 0.070 mL/L, 豆油 5.00 mL/L, 橄榄油 0.50 mL/L, pH 7.0–7.2。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、DNA 聚合酶及连接酶等均购自宝生物(大连)工程有限公司; DNA 提取及纯化回收试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 实验所用抗生素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 扩增仪与移液器均购自 Eppendorf (中国); P230II 高效液相色谱仪购自大连依利特分析仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 从杀真菌素链霉菌 F1 中克隆 *rpsL* 基因:** 利用 NCBI 数据库查找链霉菌 *rpsL* 基因同源序列, 在同源序列保守区, 利用 Vector NTI 设计一对扩增杀真菌素链霉菌 *rpsL* 基因序列的引物 rpsLF1/R1 (表

2) 通过 PCR 扩增 *rpsL* 基因。PCR 体系 2×GC buffer 25 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, 模板 2 μL, LA Taq DNA polymerase (5 U/μL) 1 μL, 补加超纯水至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后并将其连接到 pUCm-T 上, 转化 *E. coli* JM109, 提取质粒, 酶切验证正确后, 送出测序。根据测序获得的 *rpsL* 基因的核苷酸序列, 设计引物 rpsLF2/R2 (表 2), 通过反向 PCR 技术, 扩增 *rpsL* 基因的上下游基因, PCR 反应体系及条件同上, 产物纯化后同样连接到 pUCm-T 上, 转化 *E. coli* JM109, 提取质粒酶切验证正确后, 送出测序。根据测序获得的序列, 再次设计引物 S12F1/R1 (表 2), 扩增获得含有上下游同源臂的 *rpsL* 基因, 记作 *K-rpsL*。PCR 反应体系同上; PCR 条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

**1.2.2 DNA 片段的回收、酶切、克隆、转化、质粒的提取及序列的测定:** 质粒的提取及 DNA 的回收参见公司试剂盒说明书; 酶切、克隆及转化参见文献[9]。酶切验证正确的阳性克隆子均送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

**1.2.3 重叠 PCR:** 根据 *rpsL* 基因序列, 利用 Vector NTI 设计定点突变引物: MrpsLF1/R1 和 MrpsLF2/R2 (表 2)。第一次 PCR: 以扩增得到的 *K-rpsL* 基因为模板, 分别以 S12F1 和 MrpsLR1、S12R1 和 MrpsLF1 为引物, 进行常规 PCR, 获得产物 P1 和 P2。PCR 体系: 2×GC buffer 10 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 1 μL, LA Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, 补加超纯水至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。第二次 PCR: 以 P1 和 P2 的混合物为模板, 先不添加引物, 反应 3–5 个循环之后, 添加引物 S12F1/R1, 进行常规 PCR。扩增出完整的含有突变碱基的 *K-rpsL* 基因记作 M1。同样方法得到 M2。PCR 体系及条件同 1.2.1。将突变基因 M1 和 M2 连

接到质粒 pKC1139 上, 获得重组质粒 pKC1139-L-M1 和 pKC1139-L-M2, 送出测序并转化大肠杆菌 ET12567。

**1.2.4 接合转移:** 大肠杆菌感受态的制备采用 CaCl<sub>2</sub> 法, 重组质粒需在 pUZ8002 的协助下, 通过接合转移从大肠杆菌 ET12567 导入杀真菌素链霉菌中。利用安普霉素抗性筛选和孢子 PCR 筛选阳性接合子。具体过程见参考文献[10-11]。

**1.2.5 链霉菌发酵培养:** 取适当的孢子悬液, 均匀涂布于 MS 培养基中, 28 °C 培养 7 d 后, 用接种铲挖取 1 cm×1 cm 大小的带菌的琼脂块于种子培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 48 h 后转接于发酵培养基中。装液量 50 mL/500 mL 三角瓶, 接种量 20%, 每株菌 3 个平行样, 30 °C、200 r/min 培养 10 d。

**1.2.6 HPLC 法测定恩拉霉素的产量:** 恩拉霉素标准曲线的制备: 称取一定量的恩拉霉素标准品(4% 预混剂)于丙酮浸提液中浸提 30 min 后超声 1 h, 制成效价浓度为 2 000 mg/L 的母液, 分别稀释为 1 400、1 200、1 000、800、600、400、200 mg/L 的标准溶液, 样品脱气过膜, 用于制定标准曲线。样品制备: 取 10 mL 发酵液 8 000 r/min 离心 5 min, 去掉上清液, 加入 10 mL 预先配制好的丙酮浸提液浸提 30 min 后超声 1 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液脱气过膜, 4 °C 保存备用。HPLC 检测条件: 色谱柱 C<sub>18</sub> 反向色谱柱 (4.6 mm×150 mm, Φ=5 μm); 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 紫外检测波长 267 nm。流动相乙腈:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mmol/L)=3:7; 磷酸调节 pH 4.5; 流速: 1.0 mL/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变基因序列与原序列对比

通过重叠 PCR, 获得了突变的 *rpsL* 基因 M1 和 M2, 测序得到了突变基因的完整序列, 利用 vector NTI 将核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 与原序列进行比对, 结果见图 1。

由图 1 可知, 与对照组相比, 突变基因 M1 和 M2 编码的氨基酸序列的第 43 位点的赖氨酸分别被

<i>rpsL</i>	VPTIQQLVRKGRQDKVEKNKTPALEGSPQRRGVCTRVFTTTT	KPNSALRKVARVRLTSG	60
M1	VPTIQQLVRKGRQDKVEKNKTPALEGSPQRRGVCTRVFTTTT	KPNSALRKVARVRLTSG	60
M2	VPTIQQLVRKGRQDKVEKNKTPALEGSPQRRGVCTRVFTTTT	KPNSALRKVARVRLTSG	60
<i>rpsL</i>	IEVTAYIPGEGHINLQEHISIVLVRGGRVKDLPGVRYKIIRGSLDTQGVKNRKQARSRYGAK		120
M1	IEVTAYIPGEGHINLQEHISIVLVRGGRVKDLPGVRYKIIRGSLDTQGVKNRKQARSRYGAK		120
M2	IEVTAYIPGEGHINLQEHISIVLVRGGRVKDLPGVRYKIIRGSLDTQGVKNRKQARSRYGAK		120
<i>rpsL</i>	KEK		123
M1	KEK		123
M2	KEK		123

图 1 原 *rpsL* 基因与突变基因 M1 和 M2 氨基酸序列比对Figure 1 Amino acid sequence alignment of *rpsL* and M1 and M2

替换为天冬酰胺和精氨酸,符合预期设计。

## 2.2 突变菌株的构建与筛选

通过接合转移,成功将突变质粒导入了杀真菌素链霉菌孢子中,以 Apra-F1/Apra-R1 (表 2)为引物,进行孢子 PCR,对筛选到的突变菌株进行验证,结果如图 2 所示。第一次同源重组:由于 pKC1139 属于温度敏感型质粒,当培养温度升高至 40 °C 后,处于游离状态的质粒会自然丢失。利用这一特点,将阳性接合子转接到含有安普霉素抗性的 MS 培养基中,40 °C 培养,传代 2-3 次,使游离质粒彻底丢失,筛选在含有安普霉素抗性平板中仍能正常生长的接合子,即游离质粒成功整合到染色体 DNA 上的接合子;第二次同源重组:将上述接合子转接到无抗的 MS 培养基中,28 °C 培养,在没有选择压力的情况下,连续传代 3-4 次后,影印到不含安普霉素抗性和含有安普霉素抗性的平板中,28 °C 培养,挑取在不含抗性的平板中生长而在含有安普霉素的平板中不能生长的接合子(图 3),此时得到的接合子中有一部分可能已经成功发生第二次同源重组。

提取接合子的基因组,利用 PCR 技术,以 *rpsL*F1/R1 为引物,扩增核糖体 S12 的 *rpsL* 基因,送出测序,对测序结果进行比对分析,比对结果如图 1 所示,说明突变体构建成功。最终,M1 型突变共获得 3 株接合子;M2 型突变共获得 4 株接合子。

## 2.3 突变菌株产孢能力的考察

将野生型菌株 F1、M1 及 M2 型突变菌株转

接到同一个 MS 固体平板上,在同样的培养条件下,野生型菌株需要 5-7 d 才能产生孢子,而突变菌株在 3 d 后就可以产生大量的孢子。从图 4 中可以看出突变菌株的产孢周期明显早于野生型菌株。

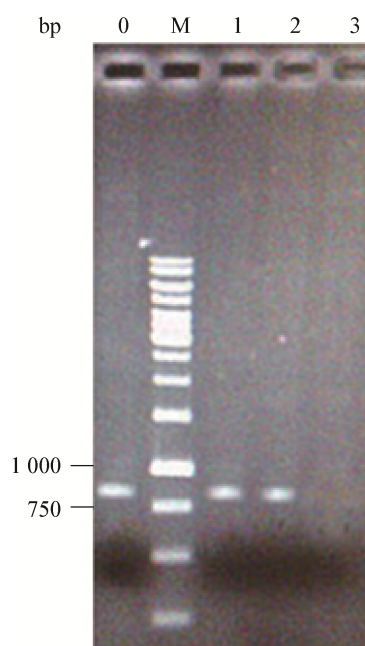


图 2 安普霉素抗性基因孢子 PCR 产物电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of spore PCR production of *Apra<sup>r</sup>*

注: M: 10 kb marker; 0: pKC1139 对照; 1: M1 型阳性接合子; 2: M2 型阳性接合子; 3: 野生型杀真菌素链霉菌对照。

Note: M: 10 kb marker; 0: pKC1139 control; 1: Type M1 positive trans-conjugant; 2: Type M2 positive trans-conjugant; 3: *S. fungicidicus* F1 control.

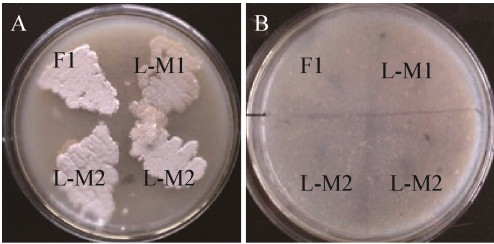


图3 接合转化子转接划线平板  
Figure 3 The switching streak plate of conjugation transformant  
注：A：不含安普霉素的 MS 培养基；B：含有安普霉素的 MS 培养基。  
Note: A: MS medium without apramycin; B: MS medium with apramycin.

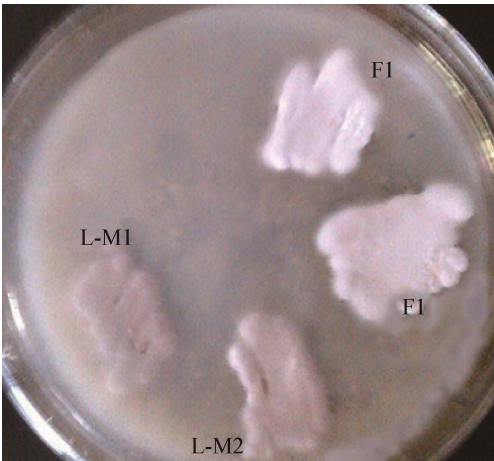


图4 突变菌株与野生菌株产孢能力的考察  
Figure 4 The sporulation ability of modification strain and wild strain

2.4 突变菌株的发酵验证及 HPLC 分析

对上述实验获得的 3 株 M1 型突变接合子和 4 株 M2 型突变接合子进行多批次的摇瓶发酵实验，同时以野生型杀真菌素链霉菌为对照。摇瓶发酵后，经 HPLC 分析显示：M1 型突变菌株的恩拉霉素产量最高可达到 1 334 U/mL，与野生型菌株相比，提高了 11.9% (表 3)；而 M2 型突变菌株的恩拉霉素产量最高可达到 1 456 U/mL，与野生型菌株相比，提高了 22.1% (表 3)。同一突变型的不同接合子的恩拉霉素产量存在差异，在误差允许的范围 内，可以忽略不计。实验结果表明，将核糖体 S12 蛋白的编码基因 *rpsL* 的第 43 位赖氨酸进行突变，可以达到提高恩拉霉素的产量目的，尤其是将 43 位的赖氨酸突变成精氨酸时，产量提高幅度更大，可达到 20%以上。

2.5 高产突变菌株遗传稳定性分析

对突变菌株 L-M1-2 及 L-M2-1 连续的传代培养，以 4 °C 保存的生长良好的第一代菌株为对照，结果表明，突变菌株 L-M1-2 第 1-5 代的相对发酵单位分别为 100%、99.3%、98.2%、100.3%、99.1%；突变菌株 L-M2-1 第 1-5 代的相对发酵单位分别是 100%、97.4%、99.5%、99.3%、101.2%。表明这两株高产突变菌株传 4 代以内，对恩拉霉素的发酵水平没有较为明显的影响，说明这两株突变菌株具有良好的遗传稳定性。

表 3 恩拉霉素产量对比一览表			
Table 3 Enramycin yield comparison table			
菌株编号	发酵时间	恩拉霉素产量	提高率
Strain number	Fermentation time (d)	Enramycin yield (U/mL)	Increase rate (%)
F1	10	1192±23	0
L-M1-1	10	1318±26	10.6
L-M1-2	10	1334±29	11.9
L-M1-3	10	1329±21	11.5
L-M2-1	10	1456±34	22.1
L-M2-2	10	1442±25	20.9
L-M2-3	10	1435±28	20.4
L-M2-4	10	1423±26	19.4

### 3 结论

利用核糖体工程技术,对核糖体蛋白的结构进行修饰、改造,造成核糖体功能改变,可间接调控次级代谢产物的合成,从而获得突变的高产菌株。大量研究案例表明,利用该技术所进行的实验研究具有一定的可行性和实用性,在工业微生物育种中具有良好的应用前景。本文利用核糖体工程技术,对恩拉霉素产生菌 *S. fungicidicus* F1 中编码核糖体 S12 蛋白的基因 *rpsL* 进行定点改造,将该蛋白中的第 43 位的赖氨酸(Lys)替换为天冬酰胺(Asn)和精氨酸(Arg),以安普霉素作为抗性遗传筛选标记,得到突变菌株 L-M1 和 L-M2,与野生菌株 F1 相比较,突变菌株恩拉霉素产量分别可提高 11.9%和 22.1%,并且遗传稳定性较好;突变后的菌株生长特性也发生了改变,能在较短时间内产生大量的孢子,大大缩短链霉菌的培养周期及恩拉霉素的生产周期,更适用于工厂大规模生产。同时,本实验结果也为核糖体蛋白其他位点的突变提供了可行性。

### 参 考 文 献

- [1] Higashide E, Hatano K, Shibata M, et al. Enduracidin, a new antibiotic. I. *Streptomyces fungicidicus* No. B5477, an enduracidin producing organism[J]. The Journal of Antibiotics, 1968, 21(2): 126-137
- [2] McCafferty DG, Cudic P, Frankel BA, et al. Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics[J]. Biopolymers, 2002, 66(4): 261-284
- [3] Yin XH, Zabriskie TM. The enduracidin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fungicidicus*[J]. Microbiology, 2006, 152(Pt10): 2969-2983
- [4] Pedrosa AA, Menten JF, Lambais MR, et al. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics[J]. Poultry Science, 2006, 85(4): 747-752
- [5] Wang JL, Xu MY, Shi TG, et al. UV mutagenesis for high-yield enramycin producing strains[J]. Industrial Microbiology, 2015, 45(5): 23-28 (in Chinese)  
王建玲, 许铭玉, 石天歌, 等. 紫外诱变选育恩拉霉素高产菌株[J]. 工业微生物, 2015, 45(5): 23-28
- [6] Ochi K, Okamoto S, Tozawa Y, et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production[J]. Advances in Applied Microbiology, 2004, 56: 155-184
- [7] Hesketh A, Ochi K. A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin[J]. The Journal of Antibiotics, 1997, 50(6): 532-535
- [8] Okamoto-Hosoya Y, Sato TA, Ochi K. Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. The Journal of Antibiotics, 2000, 53(12): 1424-1427
- [9] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002
- [10] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. Practical Streptomyces Genetics[M]. Norwich: The John Innes Foundation, 2000
- [11] Fang ZK, Hong WR, Yan LB, et al. Construction of the conjugal transfer system of *Streptomyces aureofaciens*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2011, 40(5): 521-524 (in Chinese)  
方志锴, 洪文荣, 严凌斌, 等. 金色链霉菌接合转移体系的构建[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(5): 521-524