

研究报告

发酵条件优化及基因簇加倍对厦门霉素生物合成的影响

胡晓艳¹ 徐岷涓² 步绪亮¹ 徐俊^{1,3*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 上海交通大学系统生物医学研究院 上海 200240)

(3. 上海交通大学海洋研究院 上海 200240)

摘要:【目的】优化发酵培养条件及加倍 *xim* 基因簇, 提高厦门霉素的产量。【方法】采用单因素添加: C 源(鼠李糖、葡萄糖酸)、无机 N 源(KNO₃)、稀有金属元素(ScCl₃)及 A-Factor (γ-丁内酯), 优化适宜厦门链霉菌 318 菌株产生厦门霉素的培养条件; 通过位点特异性整合将厦门霉素生物合成基因簇进行加倍, 构建高产的基因工程菌株厦门链霉菌 318Pls1, 并对其培养基进行了正交实验优化。【结果】与初产量(15 mg/L)相比, 在 GYM 培养基中进行单因素添加可使 318 菌株的厦门霉素产量达到 20 mg/L; 而基因簇加倍菌株 318Pls1 在 GYM 培养基上的厦门霉素产量可达 35 mg/L, 在正交实验优化后的 9#培养基中厦门霉素产量可达 76.15 mg/L。【结论】对厦门霉素的发酵培养条件进行了优化, 并通过基因簇过表达获得了生物合成能力提高的菌株, 为进一步提高其产量奠定了基础。

关键词: 厦门霉素, 生物合成, 培养条件优化, 基因簇加倍

Medium optimization and biosynthetic gene cluster doubling enhance xiamenmycin yield

HU Xiao-Yan¹ XU Min-Juan² BU Xu-Liang¹ XU Jun^{1,3*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(3. Institute of Oceanology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Objective] To improve xiamenmycin yield from *Streptomyces xiamenensis* 318 we optimized fermentation medium and doubled biosynthetic gene cluster. [Methods] Glucose-yeast extract-maltose medium (GYM) was optimized by a series of single-factor experiments with variation of carbon source (rhamnose and gluconic acid), nitrogen source (KNO₃), trace element (ScCl₃) and A-Factor analogous (γ-butyrolactone). Subsequently, the biosynthetic gene cluster *xim* was doubled by site-specific integration to obtain a genetic engineering strain *S. xiamenensis* 318Pls1 and orthogonal

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81473105)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-34207208; E-mail: xujunn@sjtu.edu.cn

Received: March 11, 2016; **Accepted:** May 23, 2016; **Published online** (www.cnki.net): July 19, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81473105)

***通讯作者:** Tel: 86-21-34207208; E-mail: xujunn@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-03-11; **接受日期:** 2016-05-23; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-07-19

experiment was applied to optimize the medium. **[Results]** The single-factor experiments improved xiamenmycin yield in wild-type strain 318 from 15 mg/L to 20 mg/L. The yield in biosynthetic gene doubling strain 318Pls1 attained to 35 mg/L in GYM and was increased to 76.15 mg/L in the optimized medium 9# by orthogonal experiment. **[Conclusion]** This study shows that the medium optimization combined with biosynthetic gene cluster doubling enhanced xiamenmycin yield and provides an opportunity for further improvement of high productivity strain.

Keywords: Xiamenmycin, Biosynthesis, Mediums optimization, Gene cluster doubling

厦门霉素(Xiamenmycin)是从分离自福建漳州红树林沉积物的厦门链霉菌(*Streptomyces xiamenensis* 318)中提取出的一种苯并吡喃类化合物,前期研究表明其具有抑制肺纤维化和瘢痕增生的生物活性,是新的抗纤维化药物候选物^[1-3]。采用常用的 GYM (Glucose yeast-extract maltose)培养基发酵培养,野生型厦门链霉菌中厦门霉素的产量仅为 15 mg/L。为满足进一步的药理活性研究和药物开发的需求,厦门霉素的产量亟待提高。

培养基成分和培养条件是影响菌体生长和发酵产率效率的重要因素,对相关因素进行优化是提高化合物产量的传统方法。此外,将目标化合物生物合成基因簇加倍,提高生物合成基因的表达效率,是提高产量的更为直接有效的途径。如 Chen 等将与 FK506 生物合成相关的两个延伸基团(甲氧基丙二酰-ACP和烯丙基丙二酰-CoA)的编码基因加倍,使 FK506 在 *S. tsukubaensis* 中的产量提高到原来的 1.5 倍^[4]。

厦门霉素的生物合成途径已被完全解析,克隆

到的生物合成基因簇包括 *ximA-E* 这 5 个基因,分别负责催化由分支酸裂解形成 4-羟基苯甲酸,经过异戊烯基转移、环化形成厦门霉素 B,以及加载 L-苏氨酸形成终产物厦门霉素的过程^[5]。厦门霉素生物合成途径相对简单,合成所需的前体均来自于微生物普遍存在的主代谢途径(TCA、PPP、MEP 等)。基于厦门霉素生物合成途径对出发菌株进行定向分子育种,有望快速构建高产菌株。

本文对厦门链霉菌的摇瓶发酵条件进行了研究。通过培养条件优化、单因素添加和正交实验,确定了厦门霉素发酵的优化培养基。同时,将 318 野生株中的 *xim* 基因簇加倍构建了基因工程菌株 318Pls1,在优化的发酵培养基中进一步提升了厦门霉素的产量。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、引物

厦门链霉菌(*S. xiamenensis* 318)由本实验室筛选并保藏。所用其他菌株、质粒见表 1,引物见表 2。

表 1 本研究所用菌株、质粒列表 Table 1 Strains and plasmids used in this study		
菌株和质粒 Strains and plasmids	特征/用途 Characterization/Applications	来源/参考文献 Source/Reference
<i>S. xiamenensis</i> 318	Xiamenmycin producing strain	[6]
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	Apr, Cm, Kana, Donor strain for conjugation	[7]
318Pls1	<i>xim</i> gene doubling mutant of strain 318	This work
318::pSET152	pSET152 inserting mutant of strain 318	This work
pSET152	Apr, Cloning vector	[7]
pLMO09404	Apr, Plasmid for <i>xim</i> gene heterologous expression	[5]

注: Apr: 阿泊拉霉素抗性; Cm: 氯霉素抗性; Kana: 卡那霉素抗性。

Note: Apr: Apramycin resistance; Cm: Chloramphenicol resistance; Kana: Kanamycin resistance.

表 2 本研究所用引物列表
Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 Primer sequence (5'→3')
Apr-F	ATGTCATCAGCGGTGGAGT
Apr-R	CGGCATCGCATTCTTCGCA
Pls-att-F	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAG
Pls-att-R	ATTTGCCGTTGCCGTTGCGG
Pls-M13A-F	GTAAAACGACGGCCAGTGCCAA
Pls-M13A-R	GCCTGACGGACGTTACCCAGTA
Pls-M13E-F	CAGGAAACAGCTATGACATGAT
Pls-M13E-R	AAGCCGTCAAGGGCGAAAT

1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自美国 OMEGA 生物技术有限公司；A-Factor 类似物(4-羟基丁酸内酯)购自北京百灵威科技有限公司；*Pfu* 酶、pMD18-T 载体及各培养基组分购自生工生物(上海)有限公司；阿泊拉霉素(Apr)、氯霉素(Cm)、卡那霉素(Kana)购自国药集团化学试剂有限公司。其它试剂均为国产分析纯。组合式摇床，上海智诚仪器设备有限公司；旋转蒸发仪，日本 EYELA 东京理化器械株式会社；高效液相色谱仪，日本岛津制作所；普通光学显微镜，厦门麦克奥迪实业有限公司。

1.3 培养基和培养条件优化

产孢培养基 SFM、种子活化培养基 TSB 和发酵培养基 GYM 的配方见《链霉菌遗传操作手册》^[7]。

对 318 菌株的摇瓶发酵过程中以下单因素进行了考察，包括是否加弹簧、消泡剂，培养温度(30、37 °C)、摇床转速(180、220、300 r/min)、种子活化时间(24、36、48 h)、接种量(2%、5%、10%)等。观察记录菌丝形态等生长情况，测定发酵培养 7 d 后厦门霉素的终产量(3 个平行实验组)，确定 318 菌株的种子活化条件和发酵培养条件。

鼠李糖、葡萄糖酸、KNO₃、ScCl₃ 以不同浓度直接添加于发酵培养基中，1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。A-Factor 类似物配制不同浓度后，0.22 μm 滤膜过滤除菌，选择两种添加方法：(1) 培养 12 h 时向发

酵液中分别添加 1、10、20 mmol/L；(2) 分别于培养 4、8、12、24 h 时向发酵液中添加 10 mmol/L A-Factor 类似物。

通过正交实验设计调整 GYM 培养基中 4 种原料的配比，使用 L₉(3⁴)表进行 4 因素 3 水平的正交实验(表 3)，采用优化后的培养方法对 318Pls1 菌株进行了发酵培养基的优化筛选，以厦门霉素终产量为研究指标。每个实验组重复 3 次，实验数据采用 Excel 2007 和 SPSS 17.0 软件，结合极差和方差分析法评价发酵条件优化组合和显著性水平。

1.4 基因簇加倍菌株 318Pls1 及空载对照菌株 318::pSET152 的构建

分别将 pSET152 质粒和带有 *xim* 基因簇的重组质粒 pLMO09404 转入 *E. coli* ET12567 (pUZ8002)，获得转化子之后再分别与厦门链霉菌 318 菌株进行接合转移。具体操作参见《链霉菌遗传操作手册》^[7]。选出抗性重组子分别使用表 2 中引物 Pls-att-F/R 和 Pls-M13A-F/R、Pls-M13E-F/R 进行 PCR 检测，筛选质粒成功整合的空载对照菌株 318::pSET152 和基因簇加倍菌株 318Pls1。

1.5 厦门霉素提取检测方法

将 100 mL 发酵液用等体积乙酸乙酯浸泡过夜，重复萃取 3 次，上层有机相合并蒸干，浸膏溶于 6 mL 甲醇。将上述甲醇溶解浸膏稀释 3 倍后，按照进样量 10 μL 进行高效液相色谱(HPLC)分析，检测条件为：C₁₈ 反相柱(Agilent Extend-C₁₈，4.6 mm×150 mm，5 μm)；流动相为甲醇-水(20%–80%梯度洗脱)，流速 1 mL/min，柱温为 40 °C；紫外检测波长 254 nm。

表 3 318Pls1 液体发酵正交实验因素水平
Table 3 Different levels of factors on the liquid-state fermentation of 318Pls1

水平 Level	葡萄糖 Glucose (g/L)	酵母浸膏 Yeast extract (g/L)	麦芽浸膏 Malt extract (g/L)	硝酸钾 KNO ₃ (g/L)
1	4	2	10	1
2	10	4	15	2
3	20	10	20	3

2 结果与分析

2.1 培养条件的优化

通过观察不同培养条件下菌体的生长情况、摇瓶状态及检测厦门霉素产量, 得出最适培养条件。种子活化为: 在固体培养基平板上挑取产孢良好的单菌落, 接种于 500 mL 三角瓶内的 100 mL 种子活化培养基中, 30 °C、220 r/min 培养 48 h。发酵培养条件为: 按 5% 接种量(体积比), 转接种子液于 500 mL 三角瓶, 装液量 100 mL, 30 °C、220 r/min 旋转式摇床振荡培养 7 d, 摇瓶中需加弹簧, 不加消泡剂。培养过程中 318 菌丝体的生长状态如图 1 所示。

2.2 添加 C 源鼠李糖、葡萄糖酸及无机 N 源 KNO_3 对产素的影响

在 GYM 发酵培养基中添加额外 C 源: 0.1%–0.4% 的鼠李糖及葡萄糖酸, 发酵培养 3 d 后, 观察到添加鼠李糖组菌液颜色无明显区别, 添加葡萄糖酸组, 菌液随添加浓度的增加颜色明显加深, 直至完全变为黑色。待发酵 7 d 后提取厦门霉素, 结果如图 2A、2B 所示, 额外添加鼠李糖和葡萄糖酸这两种 C 源可以提高厦门霉素产量, 在培养基中添加 0.2% 鼠李糖或 0.4% 葡萄糖酸时厦门霉素产量分别提高到原来的 1.35、1.29 倍。

向 GYM 发酵培养基中直接添加 0.2%–1.5% 的 KNO_3 作为补充 N 源, 发酵培养 3 d 后, 观察发现发酵液随添加 KNO_3 浓度增加颜色逐渐加深, 至添加浓度为 1.5%, 发酵液颜色从浅棕色变为深褐色。产物提取结果如图 2C 所示, 添加低浓度 KNO_3 可促进厦门霉素产生, 当添加的 KNO_3 浓度为 0.2% 时, 其产量提高至原来的 1.26 倍, 高浓度 KNO_3 对厦门霉素产生有抑制作用。

2.3 添加稀有金属元素 ScCl_3 及 A-Factor 类似物(γ -丁内酯)对产素的影响

添加稀有金属元素 $\text{Sc}^{[8-9]}$ 和 A-Factor 类似物(γ -丁内酯)^[10-11] 对链霉菌的次级代谢有刺激作用, 因此本研究中通过添加不同浓度的 ScCl_3 及 A-Factor 类似物, 考察其对厦门霉素生物合成的影响。结果表明 GYM 培养基中添加不同浓度 ScCl_3 可以使厦门霉素产量提高 1.15–1.26 倍, 不同浓度 ScCl_3 对产素作用区别不明显(图 3A)。添加 A-Factor 类似物后, 厦门霉素产量均有所提高(图 3B)。比较同一时间(12 h)添加不同浓度 A-Factor 类似物(1、10、20 mmol/L)和不同时间(4、8、12、24 h)添加 10 mmol/L A-Factor 类似物的效果, 发现 12 h 时添加 10 mmol/L 产量提高最多, 为 19 mg/L, 提高到初始产量的 1.3 倍。

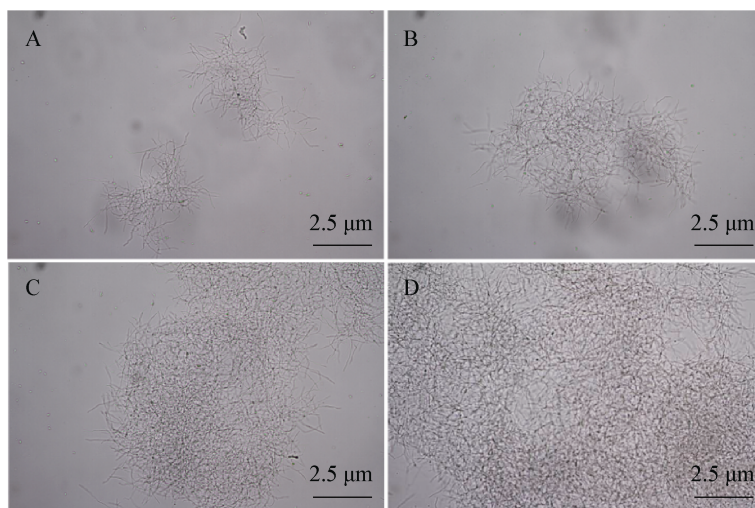


图 1 318 种子活化过程中菌丝体生长状态

Figure 1 The growth state of the mycelium in 318 seed culture

注: A–D: 12–48 h 菌丝体生长状态; 显微镜放大倍数: 40×10.

Note: A–D: The growth state of the mycelium in 12–48 h seed cultivation; Microscope magnification: 40×10.

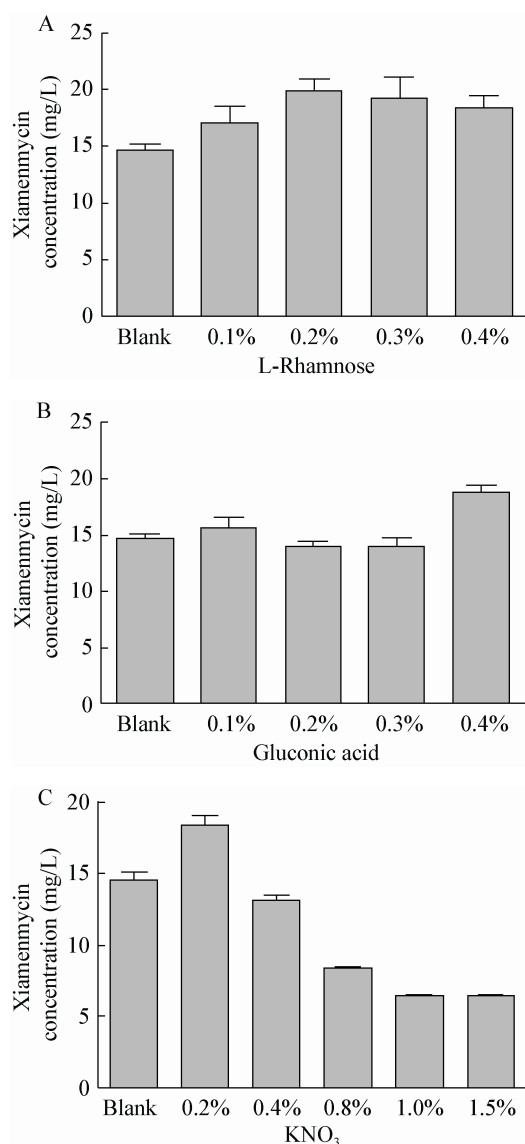


图2 添加C源(鼠李糖和葡萄糖酸)和N源(KNO₃)对厦门霉素产量的影响

Figure 2 The effect of xiamenmycin yield after adding C source (L-rhamnose and gluconic acid) and N source (KNO₃) to the fermentation medium

总结上述5种单因子添加实验对厦门霉素产量的影响,可知GYM发酵培养基中添加0.2%鼠李糖、0.4%葡萄糖酸、0.2% KNO₃、10–100 μmol/L ScCl₃及发酵12 h添加10 mmol/L A-Factor类似物时,厦门霉素产量提高幅度在1.15–1.35倍之间。

2.4 基因簇加倍菌株318Pls1的构建

将携带有厦门霉素生物合成基因簇 *xim* 的质粒

pLMO09404 转入到 ET12567 后,与 *S. xiamenensis* 318 菌株进行接合转移。质粒整合过程示意图见图4,并依据此设计PCR引物扩增染色体上相应的区域以确认 *xim* 基因簇实现了整合加倍。

对阿泊拉霉素抗性的整合子纯化后进行如下PCR验证:首先用引物 Pls-att-F/R 扩增整合位点 *attL* 的序列,PCR扩增产物大小与目标条带1 kb相符,证实 pSET152 质粒整合进318染色体中(图5A)。其次,分别用引物 Pls-M13A-F/R 和 Pls-M13E-F/R 扩增重组质粒 pLMO09404 中 *xim* 基因簇前后端的重组序列,PCR扩增产物大小与预期的目标条带2.2 kb和2.3 kb相符,证实质粒携带的第二个 *xim* 基因簇整合进318染色体中(图5B、C)。

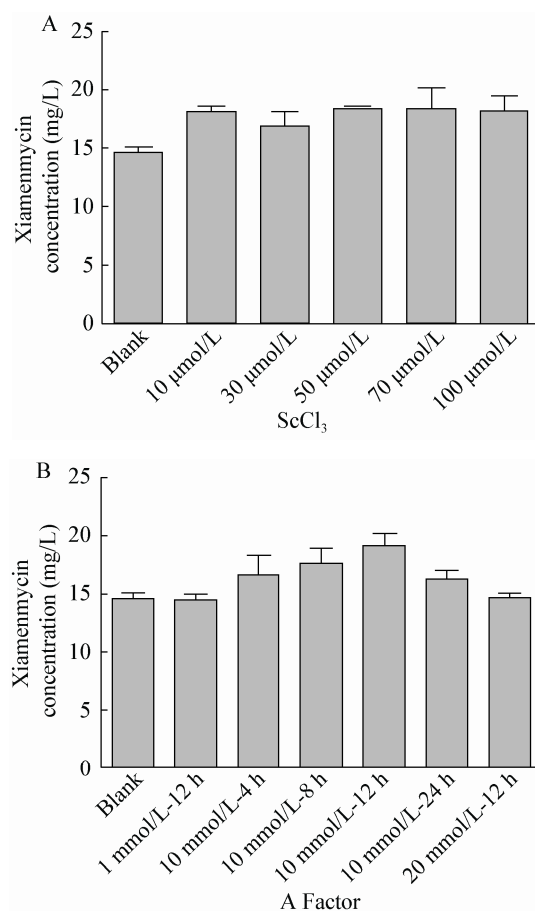


图3 添加ScCl₃和A-Factor对厦门霉素产量的影响

Figure 3 The effect of xiamenmycin yield after adding ScCl₃ and A-Factor to the fermentation medium

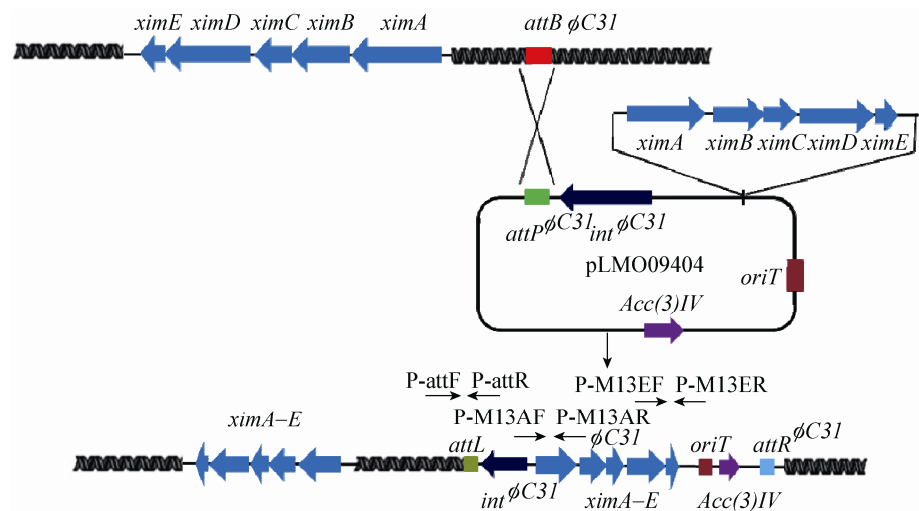


图 4 *xim* 基因簇加倍菌株 318Pls1 的构建流程

Figure 4 Construction of *xim* gene cluster doubling mutant 318Pls1

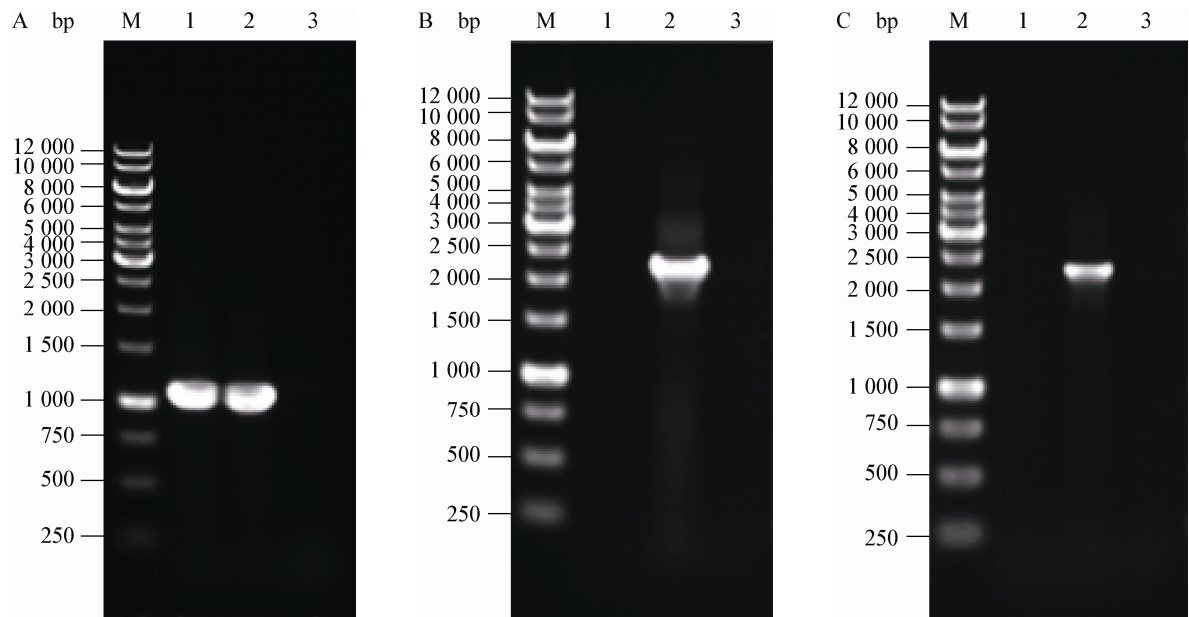


图 5 *xim* 基因簇加倍菌株 318Pls1 的 PCR 验证

Figure 5 PCR confirmation analysis of *xim* gene doubling strain 318Pls1

注：A：整合位点 *attL* 的 PCR 鉴定；B：pLMO09404 上 *xim* 基因上游重组序列的 PCR 鉴定；C：pLMO09404 上 *xim* 基因下游重组序列的 PCR 鉴定。M：1 kb DNA marker；1：318::pSET152 的 PCR 产物；2：318Pls1 的 PCR 产物；3：318 WT 阴性对照。

Note: A: PCR confirmation analysis of integration site *attL*; B and C: PCR confirmation analysis of the *xim* gene cluster introduced by pLMO09404 integration. M: 1 kb DNA marker; 1: The PCR product of mutant 318::pSET152; 2: The PCR product of mutant 318Pls1; 3: Negative control of 318 WT.

2.5 基因簇加倍菌株 318Pls1 的厦门霉素的产量
将构建的 *xim* 基因簇加倍菌株 318Pls1 和整合入空载体的菌株 318::pSET152 分别在 GYM 培养基中进行发酵培养，培养 7 d 后提取厦门霉素。从图 6 可以看出，在 GYM 培养基中培养，基因

簇加倍菌株 318Pls1 厦门霉素产量可达 35 mg/L，是 318 野生株的 2.4 倍。

依据 $L_9(3^4)$ 正交实验表对发酵培养基 GYM 成分进行了优化，结合极差和方差分析(表 4，表 5)可知：影响 318Pls1 菌株产生厦门霉素的因素主次

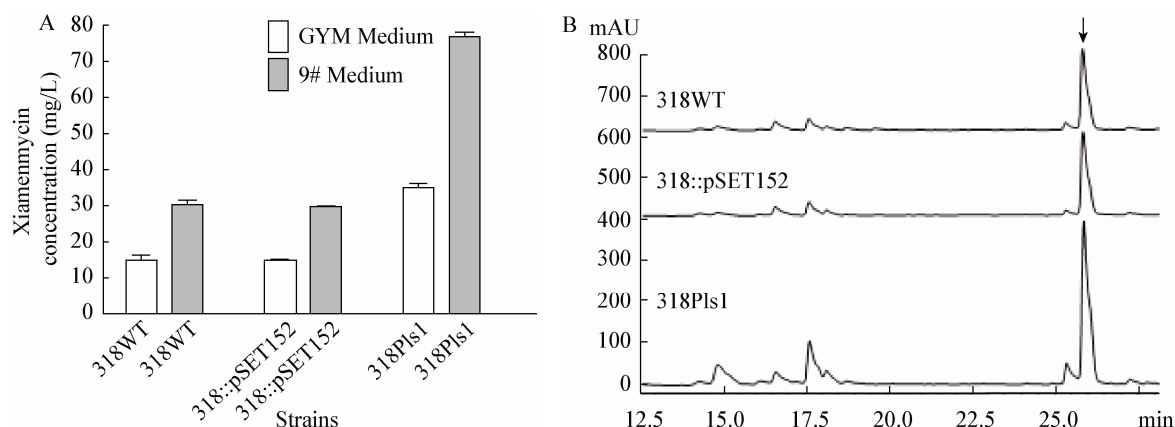


图6 *xim* 基因簇加倍菌株 318Pls1 的厦门霉素产量

Figure 6 Xiamenmycin yield in *xim* gene doubling strain 318Pls1

注: A: 318Pls1 在 GYM 培养基及优化后的 9 号培养基中厦门霉素的产量; B: 318Pls1 在 GYM 培养基中发酵产物的 HPLC 图谱(箭头指示厦门霉素).

Note: A: Xiamenmycin yield of 318Pls1 in GYM medium and 9# medium; B: HPLC profiling of 318Pls1 in GYM medium (The arrow marked xiamenmycin).

表 4 $L_9(3^4)$ 正交实验数据极差分析
Table 4 Range analysis for orthogonal array design $L_9(3^4)$

试验号 No.	A 葡萄糖 Glucose	B 酵母浸膏 Yeast extract	C 麦芽浸膏 Malt extract	D 硝酸钾 KNO ₃	厦门霉素产量 Xiamenmycin concentration (mg/L)
1	1	1	1	3	10.15
2	1	2	2	2	19.35
3	1	3	3	1	18.95
4	2	1	2	3	23.45
5	2	2	1	1	40.48
6	2	3	3	2	35.02
7	3	1	3	2	42.13
8	3	2	1	3	38.90
9	3	3	2	1	76.15
K_1	48.452	75.723	84.074	135.583	
K_2	98.951	98.740	118.949	96.506	
K_3	157.184	130.123	101.563	72.497	
k_1	16.151	25.241	28.025	45.194	
k_2	32.984	32.913	39.650	32.169	
k_3	52.395	43.374	33.854	24.166	
R	36.244	18.133	11.625	21.029	
Primary and secondary factors: A>D>B>C					
Optimization levels: A ₃ D ₁ B ₃ C ₂					

注: K_1 : 水平 1 所对应的试验指标之和; K_2 : 水平 2 所对应的试验指标之和; K_3 : 水平 3 所对应的试验指标之和; R : 极差, 可以判断各因素对试验指标的影响主次.

Note: K_1 : The sum of test index which is corresponding to the level one; K_2 : The sum of test index which is corresponding to the level two; K_3 : The sum of test index which is corresponding to the level three; R : Rang, it can be used to judge the primary and secondary influence of various factors on the test index.

表 5 $L_9(3^4)$ 正交实验数据方差分析
Table 5 Variance analysis for orthogonal array design $L_9(3^4)$

变量 Source of variation	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 Prob>F
Model	9 093.481	8	1 136.685	86.925	<0.000 1**
Glucose (g/L)	5 921.807	2	2 960.904	226.427	<0.000 1**
Yeast extract (g/L)	145.379	2	72.689	5.559	0.013 0*
Malt extract (g/L)	995.223	2	497.611	38.054	<0.000 1**
KNO ₃ (g/L)	1 072.251	2	536.126	40.999	<0.000 1**
Error	235.379	18	13.077		
Corrected total	9 328.861	26			

注：*：统计上的显著水平方差($P<0.05$)；**：统计上的非常显著水平方差($P<0.01$)。
Note: *: Statistically significant level variance ($P<0.05$); **: Statistically extremely significant level variance ($P<0.01$).

顺序为：葡萄糖(A)>KNO₃ (D)>酵母浸膏(B)>麦芽浸膏(C)；在选定的条件下，优化生长培养基组合为 A₃D₁B₃C₂，即 9 号培养基(g/L，葡萄糖 20、KNO₃ 1、酵母浸膏 10、麦芽浸膏 15)。在该优选的培养基中，野生型、空载对照和基因簇加倍菌株的产量均有提高(图 6)。基因簇加倍菌株 318Pls1 的产量最高可达到 76.15 mg/L，较野生型菌株初始产量(15 mg/L)提高 5.2 倍。

3 讨论

厦门链霉菌 318 菌株是分离自红树林沉积物的链霉菌^[6]，前期的研究已证实该菌株具有天然最简化的基因组(5.96 Mb)，厦门霉素生物合成基因簇 *xim* 位于一个 61.39 kb 的基因组岛上，暗示该基因簇可能通过水平基因转移获得^[12]。通过位点特异性整合，将另一个 *xim* 基因簇导入到 318 菌株基因组，基因拷贝数目的增加获得了较为明显的增产效果。但是，从菌株活化、发酵过程中生长状态及菌株生长、产素周期等方面观察比较发现，在野生株中整合空载质粒 pSET152 对菌株生长、产素无明显影响，但将厦门霉素基因簇加倍后发现其菌丝体与 318 野生株和 318::pSET152 菌株相比更加细密，种子活化时间变长且菌株早衰，生长周期缩短近一半。以上结果暗示该基因簇在厦门链霉菌中表达对代谢的全局性影响较大。厦门霉素生物合成的直接

前体与分支酸、异戊烯基单元和氨基酸等主代谢有密切关系。厦门霉素生物合成基因簇在变铅青链霉菌中可以异源表达^[5]。通过代谢网络动力学模型分析，评估了添加甘油对厦门霉素在变铅青链霉菌中代谢流分布的影响^[13]。基于厦门链霉菌 318 菌株的全基因序列信息，构建 318 基因组的代谢网络模型，通过网络建模分析找出限制厦门霉素生物合成的代谢流分布的关键节点，将为通过系统的代谢工程改造提供指导。

链霉菌生长代谢一般可分为初级代谢和次级代谢两个阶段，前一阶段菌株主要完成自身生长繁殖和合成一些生长代谢所必需的氨基酸、小分子、核苷酸等物质，为第二阶段提供合成前体和效应因子，待菌体生物量积累到一定程度，代谢开关打开进入次级代谢阶段^[14]。培养基中的营养成分是影响菌体生长速率的重要因素，菌体的生长速率可以影响到次级代谢动力学过程，进而影响次级代谢产物的生物合成^[15]。向 GYM 发酵培养基中，共同添加适宜浓度的鼠李糖、葡萄糖酸、KNO₃、ScCl₃ 和 A-Factor 对于 318 野生株、318::pSET152 及 318Pls1 菌株产素有一定刺激作用但效果均不明显。通过 318Pls1 菌株的 GYM 培养基各成分分配比的正交实验优化，从而筛选出最适组合及因素配比，得到了较高水平的厦门霉素产量。

4 结论

本文从培养条件优化及单因素添加实验方面,对厦门链霉菌 318 菌株中厦门霉素产量提高进行了初步探索。构建了厦门霉素生物合成基因簇加倍的菌株 318Pls1,发现该菌株在 GYM 培养基中厦门霉素产量可达 35 mg/L,同时通过培养基多因素正交实验筛选出适宜 318Pls1 产素的最优组合,使厦门霉素产量提高至 76 mg/L,提高到野生株的 5.2 倍。为进一步提高厦门霉素产量提供了新的基因工程菌株。

参考文献

- [1] Xu MJ, Liu XJ, Zhao YL, et al. Identification and characterization of an anti-fibrotic benzopyran compound isolated from mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis*[J]. *Marine Drugs*, 2012, 10(3): 639-654
- [2] You ZY, Wang YH, Zhang ZG, et al. Identification of two novel anti-fibrotic benzopyran compounds produced by engineered strains derived from *Streptomyces xiamenensis* M1-94P that originated from deep-sea sediments[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(10): 4035-4049
- [3] Liu XJ, Xu MJ, Fan ST, et al. Xiamenmycin attenuates hypertrophic scars by suppressing local inflammation and the effects of mechanical stress[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, 133(5): 1351-1360
- [4] Chen DD, Zhang Q, Zhang QL, et al. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(15): 5093-5103
- [5] Yang Y, Fu L, Zhang JL, et al. Characterization of the xiamenmycin biosynthesis gene cluster in *Streptomyces xiamenensis* 318[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99537
- [6] Xu J, Wang Y, Xie SJ, et al. *Streptomyces xiamenensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(3): 472-476
- [7] Hopwood DA, Bibb MJ, Lydiate DJ, et al. Genetic manipulation of streptomycetes: a laboratory manual[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 56(3): 388-399
- [8] Kawai K, Wang GJ, Okamoto S, et al. The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp.[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 274(2): 311-315
- [9] Ochi K, Tanaka Y, Tojo S. Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(2): 403-414
- [10] Tan GY, Bai LQ, Zhong JJ. Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates A-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2013, 110(11): 2984-2993
- [11] Yoon V, Nodwell JR. Activating secondary metabolism with stress and chemicals[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(2): 415-424
- [12] Xu MJ, Wang JH, Bu XL, et al. Deciphering the streamlined genome of *Streptomyces xiamenensis* 318 as the producer of the anti-fibrotic drug candidate xiamenmycin[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18977
- [13] Xu MJ, Chen YC, Xu J, et al. Kinetic model of metabolic network for xiamenmycin biosynthetic optimisation[J]. *IET Systems Biology*, 2016, 10(1): 17-22
- [14] Hwang KS, Kim HU, Charusanti P, et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 255-268
- [15] Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, et al. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7132-7139