



# 吸水链霉菌井冈变种的色素合成基因缺失对井冈霉素产量的影响

彭瑶, 芦晨阳, 白林泉\*

上海交通大学, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

**摘要:** 【目的】通过缺失井冈霉素高产菌株TL01中4个典型的色素合成基因簇来考察其对井冈霉素产量、菌体生长和发酵液颜色的影响。【方法】通过同源重组双交换对4个色素合成基因簇进行逐个同框缺失, HPLC检测突变株井冈霉素产量的变化, qRT-PCR检测突变株中井冈霉素合成基因转录变化, 通过称量菌丝体干重来绘制其生长曲线。【结果】和出发菌株TL01相比, 多巴类黑色素基因簇缺失株PY06中井冈霉素的发酵产量由原来的20.6 g/L上升至23.1 g/L, 提高了12%; III型聚酮合酶编码的黑色素基因簇缺失株PY07产量无明显变化; II型聚酮合酶编码的孢子色素基因簇缺失和褐黄素基因簇缺失分别导致井冈霉素产量下降11.7%和17.2%。所有缺失突变株中井冈霉素基因簇转录水平和发酵液颜色均没有明显变化。【结论】不同色素基因的缺失对井冈霉素产量和菌株生物量积累具有不同的影响。多巴类黑色素与井冈霉素的生物合成过程竞争共同前体, 将其中断后使前体流向井冈霉素生物合成, 达到了进一步提高产量的目的。

**关键词:** 井冈霉素, 产量, 黑色素, 酪氨酸, 前体供应

微生物在生长过程中可以产生各种由色素基因编码的天然色素, 它们种类繁多、颜色多样, 具有一定的生物学功能和应用价值<sup>[1]</sup>。根据结构特征, 常见的微生物色素可分为5大类: 以类胡萝卜素、环烯醚萜为代表的异戊二烯衍生物<sup>[2]</sup>, 以红曲色素为代表的聚酮类衍生物<sup>[3]</sup>, 以黑色素为代表的多酚类衍生物<sup>[4]</sup>, 以苯醌、萘醌、蒽醌为代表的醌类衍生物<sup>[5]</sup>, 以及其他色素<sup>[6-7]</sup>。微生

物色素属于次级代谢产物, 是菌体生长和繁殖过程中产生的非必需代谢产物, 菌体失去合成某种色素的能力后仍可以正常生长<sup>[8]</sup>。

微生物色素不仅作为着色剂被广泛运用于食品、化妆品和药品行业<sup>[9]</sup>, 而且具有重要的生物活性, 如抗肿瘤<sup>[10-12]</sup>、抗氧化<sup>[13-14]</sup>、抗菌<sup>[15-17]</sup>、抗炎及免疫调节活性<sup>[18]</sup>等等。此外, 微生物来源的色素作为工业着色剂在纺织、涂料等领域也有广

基金项目: 国家自然科学基金(31070070)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-21-34206722; E-mail: bailq@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-26; 修回日期: 2016-02-26; 网络出版日期: 2016-03-14

泛应用, 它们不仅能提供明亮的颜色, 而且具有显著的抗菌活性<sup>[19]</sup>。

农用抗生素井冈霉素属于C<sub>7</sub>N氨基环醇类化合物, 可高效防治水稻纹枯病。同时, 井冈霉素生物合成的中间产物可用于生产治疗II型糖尿病的药物<sup>[20]</sup>, 具有很高的经济附加价值。2005年, 本实验室成功克隆了井冈霉素生物合成基因簇, 通过重新组装*valABCKLMNG* 8个必需结构基因, 实现了井冈霉素在变铅青链霉菌中的异源合成<sup>[21]</sup>。通过同位素标记、体内缺失和体外酶促等实验, 证明其合成前体是来源于磷酸戊糖途径的7-磷酸景天庚酮糖、UDP-葡萄糖和谷氨酸<sup>[22]</sup>。2012年, 吸水链霉菌井冈变种5008的全基因组被测定, 通过多组学手段对井冈霉素高产机理进行了初步阐述。高产菌株TL01发酵过程中会产生大量未知化学结构的色素, 48 h发酵液呈现深褐色, 这加大了下游分离纯化的难度, 并影响产品的色泽、产率和质量<sup>[23]</sup>。

本研究中, 我们通过生物信息学的分析, 在基因组中寻找找到4组可能参与色素合成的基因, 分别参与以酪氨酸为前体的黑色素<sup>[24]</sup>、III型聚酮合酶(polyketide synthase, 以下简称为PKS)编码的黑色素<sup>[25]</sup>、II型PKS编码的孢子色素<sup>[26]</sup>和来源于尿黑酸的褐黄素<sup>[24]</sup>的合成, 依次命名为Cluster I、Cluster II、Cluster III和Cluster IV。通过对上述基因簇进行逐一缺失, 考察了缺失突变株的井冈霉素产量、生物量积累和发酵液颜色的变化, 得到了产量进一步提高的突变株, 并对其产量提高机理进行了初步分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、质粒及引物:** 本研究所用的菌种、质粒及引物见表1。

**1.1.2 培养基:** 大肠杆菌培养采用LB (Luria-

Bertani)和LA培养基。链霉菌培养采用TSBY液体培养基(g/L): 胰胨豆汤粉30, 蔗糖103, 酵母提取物10, 蒸馏水1 L。黄豆饼粉浸汁琼脂(SFM) (g/L): 黄豆饼粉20, 甘露醇20, 琼脂20, 蒸馏水1 L。YMG培养基(g/L): 酵母提取物4, 麦芽提取物10, 葡萄糖4, 蒸馏水1 L。井冈霉素发酵培养基(g/L): 大米粉95, 花生粉18, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7, NaCl 1.4, CaCO<sub>3</sub> 0.6, 蒸馏水1 L。

**1.1.3 主要试剂:** 实验中所用抗生素购自Sigma公司; 连接酶和KOD高保真DNA聚合酶购自TOYOBO公司; PCR产物回收试剂盒购自Omega公司; 限制性内切酶购自Fermentas公司; RNA快速提取试剂盒购自赛百盛公司。

### 1.2 Cluster I缺失菌株PY06的构建

以TL01基因组DNA为模板, 用引物4198-L-L-SpeI和4198-L-R-EcoRI、4199-R-L-EcoRI和4199-R-R-HindIII扩增得到1.83 kb左侧和1.80 kb右侧片段。左侧片段经*Spe I/EcoR I*酶切, 右侧片段经*EcoR I/Hind III*酶切后, 与*Spe I/Hind III*酶切处理后的载体pJTU1278连接, 得到用于双交换的质粒pLQ655。将pLQ655转入大肠杆菌ET12567 (pUZ8002)中, 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移导入井冈霉素高产菌株TL01中。16 h后用含硫链丝菌素和甲氧苄啶2种抗生素的无菌水覆盖, 待SFM平板吹干后, 倒置培养3-4 d可以观察到接合子。将接合转移子划线接种至含上述2种抗生素的SFM平板上30 °C培养。用验证引物4198-C-F和4198-C-R验证接合转移子是单交换菌株后, 将正确的单交换菌株进行松弛培养, 收集孢子进行梯度稀释, 得到单菌落。随后用PCR扩增方法筛选得到双交换突变株, 即Cluster I缺失突变株, 命名为PY06。

### 1.3 Cluster II缺失菌株PY07的构建

方法与1.2类似, 将构建好的pLQ664通过接合转移导入井冈霉素高产菌株TL01中, 得到Cluster II缺失突变株PY07。

表1. 实验中所用的菌种、质粒及引物  
Table 1. Strains, plasmids and primers used in this study

Strains, plasmids and primers	Related characters and sequences	Sources
Strains		
<i>S. hygroscopicus</i> var. <i>jinggangensis</i>		
TL01	High-yielding validamycin producing strain	Zhejiang Tonglu Huifeng Biosciences Co., Ltd.
PY06	Mutant of TL01 with the deletion of DOPA melanin gene Cluster I (SHJG4188-4188)	This work
PY07	Mutant of TL01 with the deletion of type III PKS melanin gene Cluster II (SHJG2643-2648)	This work
PY08	Mutant of TL01 with the deletion of type II PKS spore pigment gene Cluster III (SHJG3678-3685)	This work
PY08	Mutant of TL01 with the deletion of ochronotic pigment gene Cluster IV (SHJG4405-4406)	This work
<i>E. coli</i>		
DH8B	F'(traΔ36 lacIq proAB lacZΔM15) rpsL (strR) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dcm dam supE44 Δ(lac-proAB)Δ(mcrC-mrr)82::Tn8 (tetR)	GIBCO BRL
ET8567(pUZ8002)	recE dcm- dam- hsdS Cm <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	[27]
Plasmids		
pBluescript II SK(+)	Bla lacZ orif1	Stratagene
pJTU1278	Bla tsr lacZ oriT ori pIJ101 oriColE1	[28]
pLQ655	pJTU1278 with the left 1.83 kb Spe I /EcoR I flanking sequence and the right 1.80 kb EcoR I/Hind III flanking sequence of SHJG4198-4199 for the deletion of Cluster I	This work
pLQ656	pJTU1278 with the left 1.64 kb Spe I /EcoR I flanking sequence and the right 1.58 kb EcoR I/Hind III flanking sequence of SHJG4405-4406 for the deletion of Cluster IV	This work
pLQ664	pJTU1278 with the left 1.60 kb Spe I /EcoR I flanking sequence and the right 1.78 kb EcoR I/Hind III flanking sequence of SHJG2643-2649 for the deletion of Cluster II	This work
pLQ665	pJTU1278 with the left 1.50 kb Spe I /EcoR I flanking sequence and the right 1.60 kb EcoR I/Hind III flanking sequence of SHJG3678-3685 for the deletion of Cluster III	This work
Primers		
	Sequence (5'→3')	
4188-L-L-SpeI	ATATAACTAGTCTACCTCGTCAACACCTC	
4188-L-R-EcoRI	ATATAGAATTCTCCTGGAAGAACCACAAC	
4188-R-L-EcoRI	ATATAGAATTCGGATCAGATTCCGTACCG	
4188-R-R-HindIII	ATATAAAGCTTTGAGTTGCCGAAGAAAGG	
4188-C-F	GGCTCACGTCTCCAAC	
4188-C-R	CGGTGACCAGTGGGCTAC	
2463-L-F-SpeI	ATATAACTAGTGATCGCTCGACCGCTCC	
2463-L-Rin-EcoRI	ATATAGAATTCGATGGGCATGGCTGACCTC	
2463-L-Rout-EcoRI	ATATAGAATTCCTGGGAGCGGGCTTGCT	
2463-R-F-EcoRI	ATATAGAATTCGATCGTCGGGATGATGCA	
2463-R-R-HindIII	ATATAAAGCTTCCAGCAACAGCCTGAGAT	
2463-C-F	CAACGGCAAGATCGTCAC	
2463-C-R	GCTTCTTGCCAGATGCT	
2643-WT-F	ACCTTCACGATGGAGTGG	
2643-WT-R	GAAGTTCCAGGGCATCAC	
3678-L-F-SpeI	ATATAACTAGTGCATCGTCCTGTTCAAGA	

(待续)

(续表1)

3678-L-R-EcoRI	ATATAGAATTCCGAGTTCAAGGAGGTCAG
3678-R-F-EcoRI	ATATAGAATTCCGCTAGGTCAGATCCGTA
3678-R-R-HindIII	ATATAAAGCTTATGCCGCCGATGTAGTAG
3678-C-F	GTGGTGGTGATCGAGAAC
3678-C-R	CTGTTCGTGCTGATGGTT
3678-WT-F	ATCAAGAACATCCTGGAGTG
3678-WT-R	ACCGACAACATCAACAAGA
4405-L-F-SpeI	ATATAACTAGTATCACAGCGTGTCCTCA
4405-L-R-EcoRI	ATATAGAATTCCGGCAAGGGCAACTTCAAG
4405-R-F-EcoRI	ATATAGAATTCATCATCCCCGCTGGTGGAAAC
4405-R-R-HindIII	ATATAAAGCTTAGACCTCTCAGACGCTCGA
4405-C-F	CAGTACACGCGGATGAAG
4405-C-R	CACAACGAGGCACAGATG
4405-WT-F	GCATCAACCCGTACTTCT
4405-WT-R	GCCATCGCCAAGAAGAAG

#### 1.4 Cluster III缺失菌株PY08的构建

方法与1.2类似, 将构建好的pLQ665通过接合转移导入井冈霉素高产菌株TL01中, 得到Cluster III缺失突变株PY08。

#### 1.5 Cluster IV缺失菌株PY09的构建

方法与1.2类似, 将构建好的pLQ656通过接合转移导入井冈霉素高产菌株TL01中, 得到Cluster IV缺失突变株PY09。

#### 1.6 井冈霉素发酵及含量检测

将得到的4株缺失株与出发菌株TL01在种子培养基TSBY中30 °C振荡(220 r/min)培养36–48 h后, 按体积比1 : 10接入发酵培养基, 37 °C振荡(220 r/min)发酵4 d。每隔24 h准确量取1 mL的发酵液, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定, 操作如下: 将发酵液12000 r/min离心15 min取上清, 用0.2 μm一次性水相过滤器过滤, 过滤后的样品稀释10倍, 用HPLC检测井冈霉素产量。所用仪器为安捷伦1200 series高效液相色谱仪, 色谱柱为Agilent公司的ZORBAX SB-C<sub>18</sub>柱(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm), 流动相为98%的0.5 mmol/L磷酸盐缓冲液和2%甲醇, 流速为0.1 mL/min, 柱温为室温, 检测波长为210 nm。每针进样量为5 μL, 检测时

间为15 min。根据标准曲线, 计算出井冈霉素产量。

#### 1.7 菌体干重测定

菌体干重测定采用YMG培养基, 37 °C振荡(220 r/min)发酵4 d, 每隔24 h准确量取1 mL的菌液放于已称重的离心管中, 8000 r/min离心弃上清, 用无菌水清洗1–2遍, 以除去残留的培养基。将离心管放在70 °C烘箱中, 烘至恒重后称量, 计算菌体干重。

#### 1.8 发酵液颜色检测

发酵培养基发酵4 d后, 取1 mL的发酵液12000 r/min离心15 min后取等量上清, 置于1.5 mL Eppendorf管中, 在白色背景下肉眼观察发酵液颜色。

## 2 结果和分析

### 2.1 4组色素编码基因簇转录水平检测

通过全基因组序列分析, 我们发现了4组可能参与色素合成的基因, 其中基因SHJG4198-4199 (Cluster I)参与以酪氨酸为前体的黑色素合成, 基因SHJG2643-2649 (Cluster II)参与III型PKS编码的

黑色素合成, 基因SHJG3678-3685 (Cluster III)参与II型PKS编码的孢子色素合成, 基因SHJG4405-4406 (Cluster IV)参与来源于尿黑酸的褐黄素的合成。通过转录组芯片数据, 我们发现Cluster I的转录量为6.5–7.1, Cluster II的转录量为6.6–8.4, Cluster III的转录量为5.7–9.7, Cluster IV的转录量为7.0–13.4, 内参*hrdB*基因的转录量为9.3, 说明上述4个色素基因簇在高产培养基发酵条件下均具有较高的转录水平。

## 2.2 Cluster I的缺失

### 2.2.1 Cluster I缺失提高井冈霉素产量: 为了探

究以酪氨酸为前体的黑色素与井冈霉素生物合成的关系, 我们缺失了SHJG4198-4199中1079 bp的序列, 得到双交换菌株PY06 (图1-A)。利用验证引物4198-C-F和4198-C-R对双交换菌株的基因型进行PCR扩增验证。以高产菌株TL01的总DNA为模板, 扩增条带为1.70 kb; 以缺失株PY06的总DNA为模板, 扩增条带为0.60 kb (图1-C)。将出发菌株TL01和PY06的3个平行株在相同条件下进行发酵, 每组3个重复。和出发菌株相比, PY06中井冈霉素合成速率加快, 发酵48 h井冈霉素的产量开始明显高于出发菌株, 72 h井冈霉素产量已

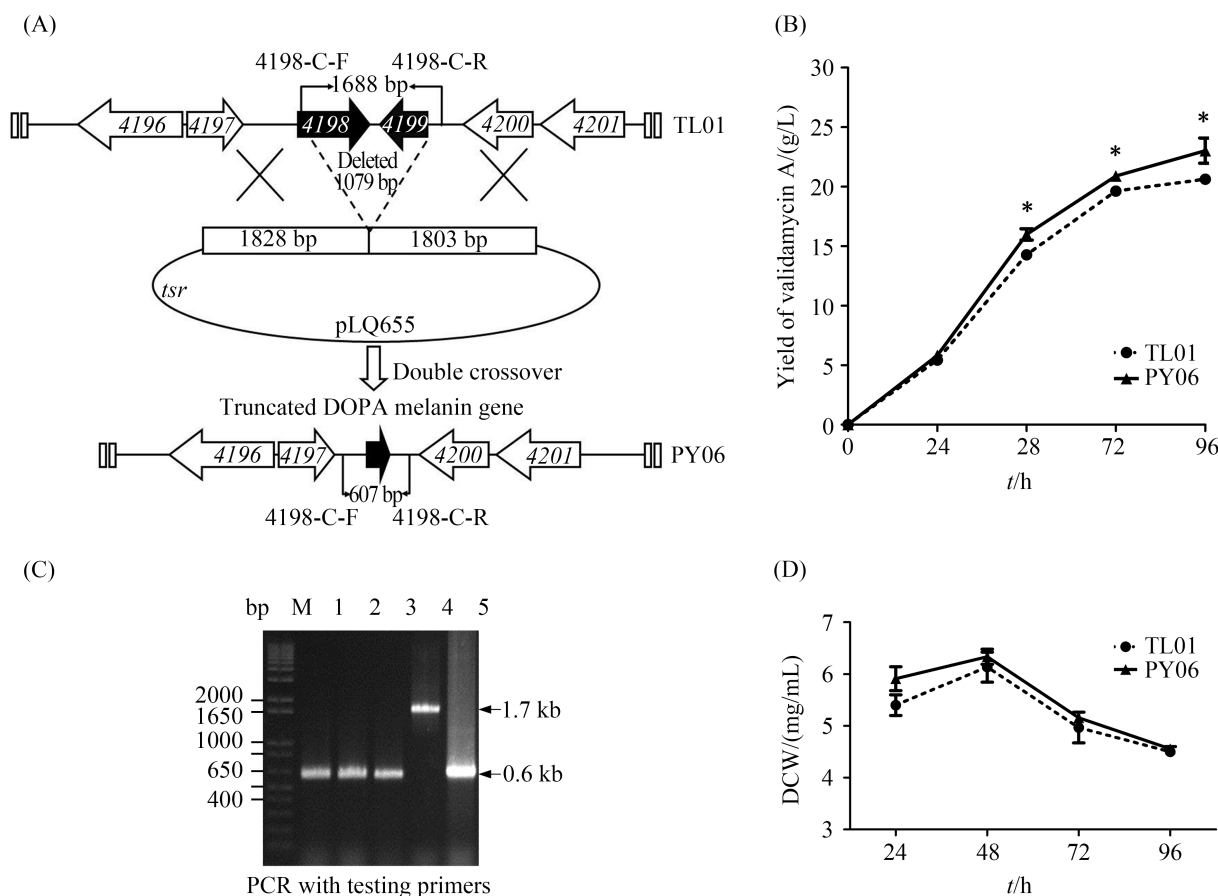


图 1. Cluster I缺失对井冈霉素发酵的影响

Figure 1. Effects of Cluster I deletion on validamycin A production. A: schematic representation of the deletion of SHJG4198-4199; B: validamycin A production of TL01 and PY06; C: confirmation of PY06 by PCR amplification; D: dry cell weight of TL01 and PY06. M: 1 kb ladder DNA marker; 1–3: PCR product with the genomic DNA of mutant PY06 as template; 4: PCR product with the genomic DNA of TL01 as template; 5: PCR product with pLQ655 as template. \*:  $P < 0.05$ .

接近出发菌株96 h的终产量，96 h发酵终产量由20.6 g/L提高到23.1 g/L，相对于出发菌株TL01增加了12% (图1-B)。

**2.2.2 Cluster I缺失能促进菌体生长：**我们同时测定了TL01和PY06的生长曲线并进行比较。结果表明，缺失黑色素基因后，缺失株PY06的生物量在发酵前24 h较出发菌株TL01上升了近10%，并在随后的发酵过程中逐渐趋近于出发菌株的生物量，96 h最终生物量与出发菌株趋同(图1-D)。同时两者的井冈霉素生物合成基因簇的转录水平没有明显的变化(图2)。

### 2.3 Cluster II的缺失

**2.3.1 Cluster II的缺失不影响井冈霉素产量：**为了探究III型PKS编码的黑色素与井冈霉素合成的关系，我们缺失了SHJG2643-2649中6711 bp的序列，得到双交换菌株PY07 (图3-A)。利用验证引物2463-C-F和2463-C-R对双交换菌株的基因型进行PCR验证。以缺失株PY07的总DNA为模板，扩增条带为0.6 kb；以高产菌株TL01的总DNA为模板，由于缺失片段过大，无法得到扩增条带。为了进一步验证，又在缺失区域边缘设计引物2643-WT-F和2643-WT-R，此时以TL01总DNA为模板可以得到0.65 kb扩增条带，而以PY07总DNA为模板无法得到扩增条带(图3-C)。与出发菌株TL01相比，缺失株PY07在发酵24 h井冈霉素产量略有增加，但随着发酵时间的延长，缺失株抗生素产量趋势与出发菌株类似，井冈霉素终产量并没有受到显著的影响(图3-B)。

**2.3.2 Cluster II的缺失提高菌体生长：**我们测定了出发菌株TL01和缺失株PY07的生长曲线并进行比较，缺失株PY07的生物量在发酵前24 h内有大幅度的提升，相比于出发菌株TL01上升了近20%。缺失株的生物量在48 h达到峰值，较出发菌株增加了10%，之后随着发酵时间的延长趋近于出发菌株(图3-D)。同时两者的井冈霉素生物合成基因簇的转录水平没有明显的变化(图2)。

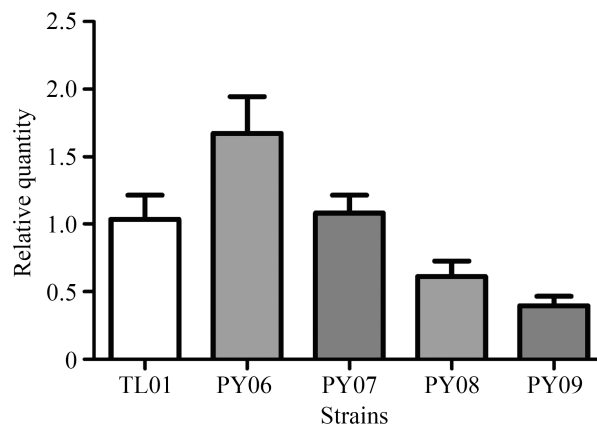


图 2. TL01和4种色素基因缺失株井冈霉素基因簇的转录水平

Figure 2. Transcription of validamycin biosynthetic gene cluster in TL01 and its gene deletion mutants.

### 2.4 Cluster III的缺失

**2.4.1 Cluster III的缺失降低井冈霉素产量：**为了探究II型PKS编码的孢子色素对井冈霉素是否有影响，我们缺失了SHJG3678-3685中6969 bp的序列，得到双交换菌株PY08 (图4-A)。利用验证引物3678-C-F和3678-C-R对双交换菌株的基因型进行PCR验证。以缺失株PY08的总DNA为模板，扩增条带为0.6 kb；以高产菌株TL01的总DNA为模板，由于缺失片段过大，无法得到扩增条带。为了进一步验证，又在缺失区域边缘设计引物3678-WT-F和3678-WT-R，此时以TL01总DNA为模板可以得到0.8 kb扩增条带，而以PY08总DNA为模板无法得到扩增条带(图4-C)。与出发菌株TL01相比，缺失株PY08中井冈霉素的发酵产量在前48 h基本相同，随后缺失株井冈霉素合成速率迅速减缓，发酵72 h产量明显下降，96 h终产量由20.6 g/L下降到18.2 g/L，下降了11.7% (图4-B)。

**2.4.2 Cluster III的缺失不影响菌体生长：**我们测定了出发菌株TL01和缺失株PY08的生长曲线并进行比较，发现缺失株PY08的生长曲线与出发菌株TL01的生长曲线基本保持一致(图4-D)。同时两者的井冈霉素生物合成基因簇的转录水平没有明显的差别(图2)。

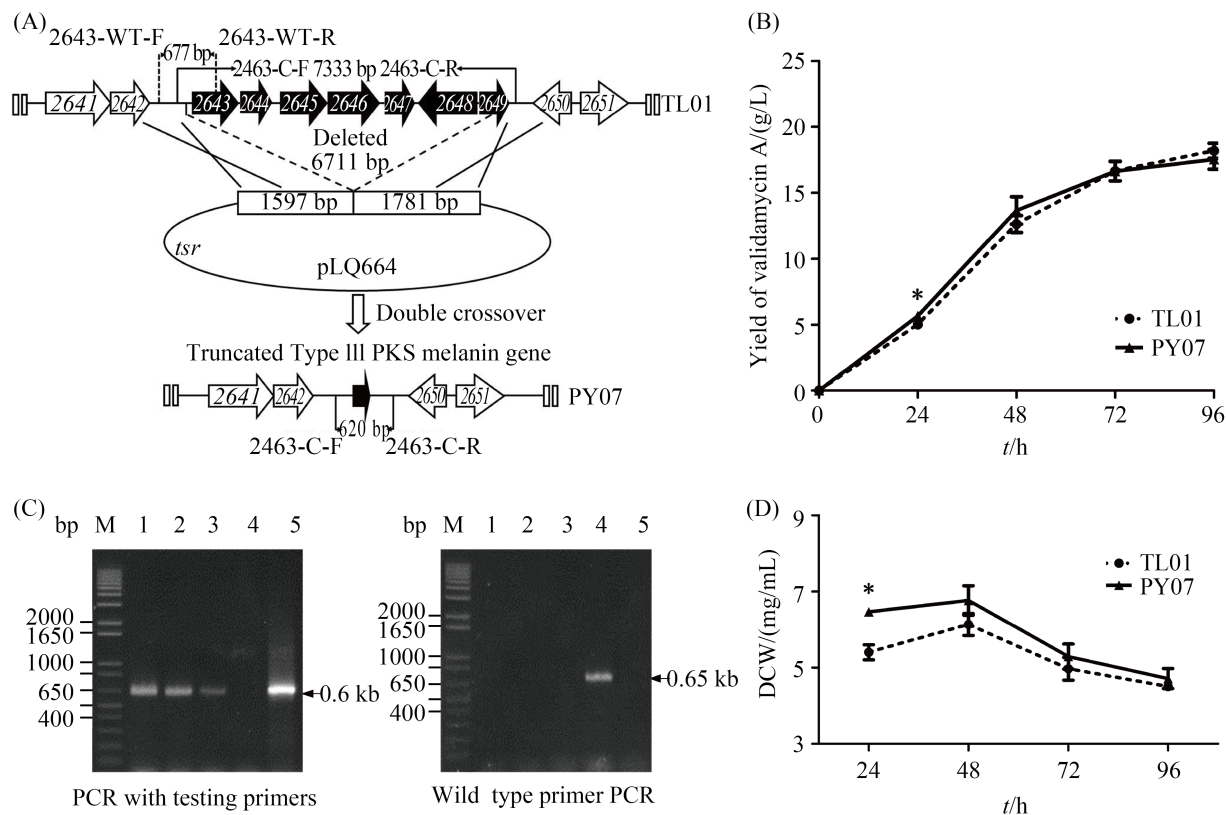


图 3. Cluster II 的缺失对井冈霉素发酵的影响

Figure 3. Effects of Cluster II deletion on validamycin A production. A: schematic representation of the deletion of SHJG2643-2649; B: validamycin A production of TL01 and PY07; C: confirmation of PY07 by PCR amplification; D: dry cell weight of TL01 and PY07. M: 1 kb ladder DNA marker; 1–3: PCR product with the genomic DNA of mutant PY07 as template; 4: PCR product with the genomic DNA of TL01 as template; 5: PCR product with pLQ664 as template. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.5 Cluster IV 的缺失

### 2.5.1 Cluster IV 的缺失降低井冈霉素产量:

为了探究源于尿黑酸的褐黄素与井冈霉素合成的关系, 我们缺失了 SHJG4405-4406 中 1634 bp 的序列, 得到双交换菌株 PY09 (图 5-A)。利用验证引物 4405-C-F 和 4405-C-R 对双交换菌株的基因型进行 PCR 验证。以缺失株 PY09 的总 DNA 为模板, 扩增条带为 1.0 kb; 以高产菌株 TL01 的总 DNA 为模板, 由于缺失片段过大, 无法得到扩增条带。为了进一步验证, 又在缺失区域边缘设计引物 4405-WT-F 和 4405-WT-R, 此时以 TL01 总 DNA 为模板可以得到 0.5 kb 扩增条带, 而以 PY09 总 DNA 为模

板无法得到扩增条带(图 5-C)。与出发菌株相比, 前 24 h 井冈霉素的产量基本一致, 48 h 缺失株的发酵速率减慢, 其产量呈现下降的趋势, 72 h 缺失株井冈霉素产量降低到与出发菌株 48 h 产量持平, 96 h 产量差异进一步扩大, 终产量由 20.6 g/L 降低到 17.05 g/L, 下降了 17.2% (图 5-B)。

### 2.5.2 Cluster IV 的缺失减弱菌体生长:

我们测定了出发菌株 TL01 和缺失株 PY09 的生长曲线并进行比较, 缺失褐黄素基因后, 缺失株 PY09 的生物量在前期较出发菌株 TL01 有下降(图 5-D)。同时两者的井冈霉素生物合成基因簇的转录水平没有明显的变化(图 2)。

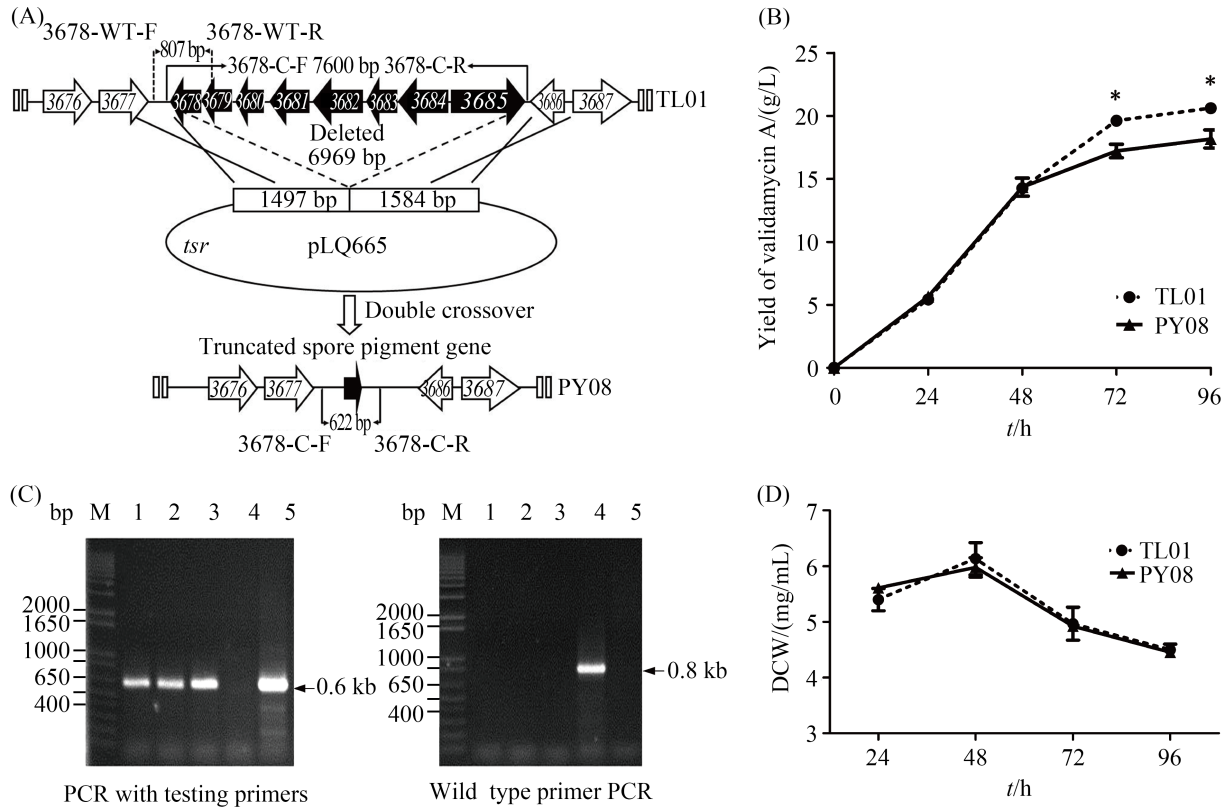


图 4. Cluster III 的缺失对井冈霉素发酵的影响

Figure 4. Effects of Cluster III deletion on validamycin A production. A: schematic representation of the deletion of SHJG3678-3685; B: validamycin A production of TL01 and PY08; C: confirmation of PY08 by PCR amplification; D: dry cell weight of TL01 and PY08. M: 1 kb ladder DNA marker; 1–3: PCR product with the genomic DNA of mutant PY08 as template; 4: PCR product with the genomic DNA of TL01 as template; 5: PCR product with pLQ665 as template. \*:  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

随着全基因组测序的发展, 利用代谢工程手段定向改造工业高产菌株已成为提高抗生素产量的重要手段之一。通过生物信息学分析, 在井冈霉素高产菌株 TL01 的基因组中发现了 4 组参与色素合成的基因簇, 考虑到发酵过程中色素的分泌会增加后续纯化精制的难度, 遂对上述 4 个色素基因分别进行了缺失。结果发现, 缺失株井冈霉素的产量发生不同程度的变化, 但发酵液颜色没有明显变化。

敲除 Cluster I 后, 缺失株产率明显加快, 终产量从 20.6 g/L 提高到 23.1 g/L, 增加近 12%; 生物

量在发酵前 24 h 较出发菌株 TL01 增加近 10%。在微生物代谢中, 酪氨酸合成途径来源于赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸, 而赤藓糖-4-磷酸又是井冈霉素合成前体 7-磷酸景天庚酮糖的转化产物。另外, 酪氨酸代谢分为 2 条途径: (1) 氨基部分经转氨作用生成谷氨酸, 芳香环部分降解成乙酰辅酶 A 和延胡索酸进入 TCA 循环; (2) 在酪氨酸酶催化下生成多巴进而形成黑色素<sup>[29]</sup>。实验中缺失 Cluster I 后, 菌体不再生成以酪氨酸为前体的黑色素, 降低了酪氨酸的消耗与合成, 从而促使更多的芳香环分解产物流向 TCA 循环, 7-磷酸景天庚酮糖和谷氨酸流向井冈霉素生物合成途径, 使得突变株 PY06 表现出产量和生物量均增加的表型。



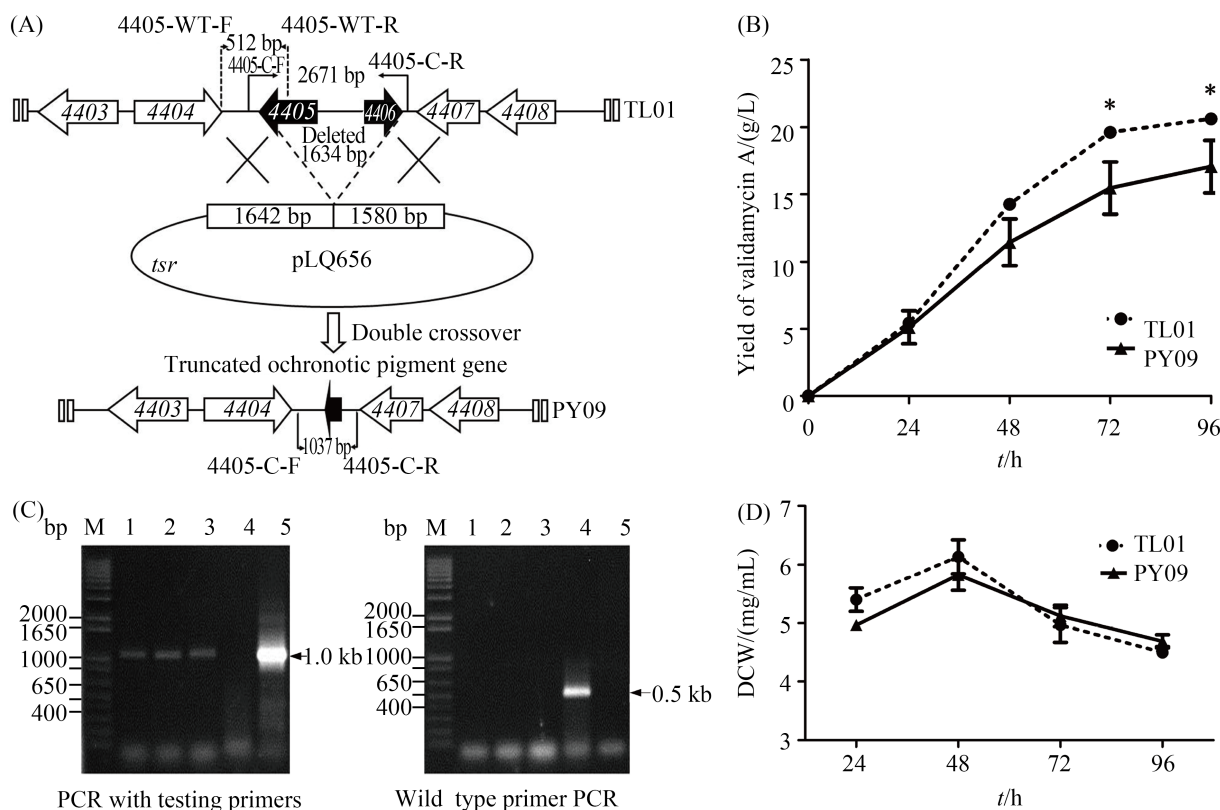


图 5. Cluster IV 的缺失对井冈霉素发酵的影响

Figure 5. Effects of Cluster IV deletion on validamycin A production. A: schematic representation of the deletion of SHJG4405-SHJG4406; B: validamycin A production of TL01 and PY09; C: confirmation of PY09 by PCR amplification; D: dry cell weight of TL01 and PY09. M: 1 kb ladder DNA marker; 1–3: PCR product with the genomic DNA of mutant PY09 as template; 4: PCR product with the genomic DNA of TL01 as template; 5: PCR product with pLQ656 as template. \*:  $P < 0.05$ .

除多巴类黑色素外, 存在另一类III型PKS编码的黑色素。实验中敲除Cluster II后, 菌体量大幅度提升, 但井冈霉素终产量无明显变化。考虑到常见聚酮的前体是辅酶A, 而辅酶A的大量积累会促进初级代谢, 导致生物量增加<sup>[30]</sup>。同时辅酶A不是井冈霉素合成的直接前体, 因此缺失后对井冈霉素的积累没有明显影响。但在缺失编码II型聚酮孢子色素的基因簇 (Cluster III) 后, 突变株产量反而下降 11.7%, 其中的机理目前尚不清楚。除此之外, 缺失褐黄素基因簇(Cluster IV)后发现生物量和产量均下降。这可能是缺失 4-羟苯丙酮酸双加氧酶后, 菌株不再合成尿黑酸, 菌体

不仅不能通过尿黑酸途径代谢酪氨酸用于生长, 反而可能部分强化了以酪氨酸为前体的黑色素生成, 导致井冈霉素合成能力下降。由于褐黄素途径和黑色素途径都来源于酪氨酸前体, 下一步拟在缺失黑色素合成基因的菌株基础上缺失褐黄素合成基因, 进一步提高井冈霉素的产量。

在对高产菌株TL01的4组色素合成基因进行单独缺失后, 发现发酵液仍呈现深褐色, 与出发菌株相比没有明显变化, 推测在基因组中仍存在其他非典型的色素合成基因簇, 负责深褐色色素的分泌, 这需要后续对基因组进行精细分析寻找确认。

## 参考文献

- [1] Zeilinger S, Martín JF, García-Estrada C. Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2. New York: Springer-Verlag, 2015.
- [2] Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40(3): 173–289.
- [3] Martínková L, J'zlová P, Veselý D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *Journal of Applied Microbiology*, 1995, 79(6): 609–616.
- [4] Wei L, Fang JW, Zhou JC, Li YG. Identification of a marine bacterium strain and characterization of a novel functional gene cluster involved in melanin biosynthesis. *Microbiology China*, 2007, 34(6): 1118–1122. (in Chinese)  
魏力, 方加玮, 周俊初, 李友国. 一株海洋细菌的初步鉴定及其产黑色素相关新基因(簇)的分离. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1118–1122.
- [5] Dufossé L. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family. *Food Research International*, 2014, 65: 132–136.
- [6] Choi HS, Kim Jin JK, Cho EH, Kim YC, Kim JI, Kim SW. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 306(4): 930–936.
- [7] Dufossé L. Pigments, microbial//Schaechter M. *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2009: 457–471, doi: 10.1016/B978-012373944-5.00155-3.
- [8] Niu GQ, Tan HR. Biosynthesis and regulation of secondary metabolites in microorganisms. *Science China Life Sciences*, 2013, 56(7): 581–583.
- [9] Yang SC, Li CY, Pan Y. Research progress of microorganisms pigments in the food industry. *Food Research and Development*, 2014, 35(1): 114–117. (in Chinese)  
杨双春, 李春雨, 潘一. 食品工业中微生物色素的研究进展. *食品研究与开发*, 2014, 35(1): 114–117.
- [10] Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 2000, 131(3): 585–593.
- [11] Pandey R, Chander R, Sainis KB. Prodigiosins: a novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2007, 44(5): 295–302.
- [12] Zheng YQ, Xin YW, Shi XN, Guo YH. Anti-cancer effect of rubropunctatin against human gastric carcinoma cells BGC-823. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(5): 1169–1177.
- [13] Lampila LE, Wallen SE, Bullerman LB. A review of factors affecting biosynthesis of carotenoids by the order *Mucorales*. *Mycopathologia*, 1985, 90(2): 65–80.
- [14] Mascio PD, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, 274(2): 532–538.
- [15] Durán M, Ponezi AN, Faljoni-Alario A, Teixeira MFS, Justo GZ, Durán N. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, 21(7): 1524–1532.
- [16] Ibrahim D, Nazari TF, Lim SH, Kassim J. Prodigiosin-an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2014, 4(10): 1–6.
- [17] Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 2009, 5(3): 49–61.
- [18] Antonisamy P, Ignacimuthu S. Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*. *Phytomedicine*, 2010, 17(3/4): 300–304.
- [19] Frandsen RJN, Nielsen NJ, Maolanon N, Sørensen JC, Olsson S, Nielsen J, Giese H. The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(4): 1069–1080.
- [20] Mahmud T, Lee S, Floss HG. The biosynthesis of acarbose and validamycin. *The Chemical Record*, 2001, 1(4): 300–310.
- [21] Bai LQ, Li L, Xu H, Minagawa K, Yu Y, Zhang YR, Zhou XF, Floss HG, Mahmud T, Deng ZX. Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxylamine A. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(4): 387–397.
- [22] Wu H, Qu S, Lu CY, Zheng HJ, Zhou XF, Bai LQ, Deng ZX. Genomic and transcriptomic insights into the thermo-regulated biosynthesis of validamycin in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 337.
- [23] Zhang H. Progress in research of absorbent decolorization.

- Modern Chemical Industry*, 1998, (7): 13–15. (in Chinese)  
张亨. 吸附脱色研究进展. *现代化工*, 1998, (7): 13–15.
- [24] Denoya CD, Skinner DD, Morgenstern MR. A *Streptomyces avermitilis* gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(17): 5312–5319.
- [25] Funa N, Funabashi M, Ohnishi Y, Horinouchi S. Biosynthesis of hexahydroxypentylenequinone melanin *via* oxidative aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(23): 8149–8155.
- [26] Shen YM, Yoon P, Yu TW, Floss HG, Hopwood D, Moore BS. Ectopic expression of the minimal *whiE* polyketide synthase generates a library of aromatic polyketides of diverse sizes and shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(7): 3622–3627.
- [27] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [28] He YL, Wang ZJ, Bai LQ, Liang JD, Zhou XF, Deng ZX. Two pHZ1358viaderivative vectors for efficient gene knockout in streptomyces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(4): 678–682.
- [29] Mason HS. The chemistry of melanin: III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1948, 172(1): 83–99.
- [30] Davis MS, Solbiati J, Cronan Jr JE. Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(37): 28593–28598.

## Effects of pigment gene deletions on validamycin A production in *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis*

Yao Peng, Chenyang Lu, Linqun Bai\*

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** [Objective] We studied the contributions of four pigment biosynthetic genes to validamycin A yield, biomass accumulation, and the color of fermentation broth *via* individual gene deletions. [Methods] The deletion mutants were obtained *via* homologous recombination. The titer of validamycin A was detected by HPLC. The transcription of validamycin biosynthetic genes was quantified by *q*RT-PCR, and the growth was measured with dry cell weight. [Results] Compared with the parent strain, the deletion of DOPA melanin genes increased the validamycin A titer from 20.6 to 23.1 g/L (by 12 %), whereas the deletion of type III polyketide synthase melanin genes showed no effect. The inactivation of type II polyketide synthase spore pigment genes and ochronotic pigment genes decreased validamycin A production by 11.7 % and 17.2 %, respectively. All these mutant strains had no significant change in transcriptional level and the color of supernatant. [Conclusion] Pigment biosynthetic gene deletions showed different effects on validamycin yield and biomass accumulation, and the deletion of DOPA melanin biosynthetic genes redirected the precursor flux and successfully increased the yield of validamycin A.

**Keywords:** validamycin A, production, melanin, tyrosine, precursor supply

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070070)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34206722; E-mail: bailq@sytu.edu.cn

Received: 26 January 2016; Revised: 26 February 2016; Published online: 14 March 2016