医药生物技术

棘白菌素 B 高产菌株的构建及发酵调控

牛坤,蔡红炜,叶一鑫,徐瑾月,柳志强*,郑裕国

浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

牛坤, 蔡红炜, 叶一鑫, 徐瑾月, 柳志强, 郑裕国. 棘白菌素 B 高产菌株的构建及发酵调控[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1455-1466. NIU Kun, CAI Hongwei, YE Yixin, XU Jinyue, LIU Zhiqiang, ZHENG Yuguo. Construction and fermentation regulation of strains with high yields of echinocandin B[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1455-1466.

摘 要: 棘白菌素 B (echinocandin B, ECB)是第三代棘白菌素类抗真菌药物阿尼芬净的关键前体, 是由构巢曲霉菌株发酵得到的次级代谢产物,其发酵效价受 ECB 合成通路及细胞形态的显著影 响。本研究旨在通过对 ECB 生物合成过程中与转录激活、羟基化、细胞形态等相关的关键基因进 行改造,以提高 ECB 的发酵效价,同时改变构巢曲霉细胞形态以降低发酵液黏稠度。结果表明过 表达ecdB和ecdK基因使ECB发酵产量分别比野生菌株提高了25.8%和23.7%,达到(2030.5±99.2) mg/L 和(1996.4±151.4) mg/L。但与细胞壁合成相关的fksA基因的缺失导致其细胞壁受损,影响了菌株生 长和产物合成。对过表达 ecdB 的工程菌株进行 50 L 罐分批补料发酵调控,ECB 发酵效价达到 2234.5 mg/L。本研究为后续菌株的代谢工程改造奠定了基础。

关键词:棘白菌素 B; 构巢曲霉; ecdB 过表达; 50 L 罐发酵调控

Construction and fermentation regulation of strains with high yields of echinocandin B

NIU Kun, CAI Hongwei, YE Yixin, XU Jinyue, LIU Zhiqiang*, ZHENG Yuguo

College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: Echinocandin B (ECB) is a key precursor of the antifungal drug anidulafungin. It is a secondary metabolite of *Aspergillus nidulans*, and its titer in fermentation is significantly affected by the ECB synthesis pathway and cell morphology. In this study, the key genes related to the transcription activation, hydroxylation, and cell morphology during ECB biosynthesis

*Corresponding author. E-mail: microliu@zjut.edu.cn

资助项目:国家重点研发计划(2022YFC2105400);浙江省基础公益研究计划(LGF22B060006)

This work was supported by the National Key Research and Development Project of China (2022YFC2105400) and the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LGF22B060006).

Received: 2024-08-03; Accepted: 2024-12-04; Published online: 2024-12-06

were investigated to increase the fermentation titer of ECB and to change the cell morphology of Aspergillus *nidulans* to reduce the viscosity of the fermentation broth. The results indicated that after overexpression of *ecdB* and *ecdK*, the ECB titer increased by 25.8% and 23.7%, respectively, compared with that of the wild-type strain, reaching (2 030.5±99.2) mg/L and (1 996.4±151.4) mg/L. However, the deletion of *fksA* associated with cell wall synthesis resulted in damage to the cell wall, affecting strain growth and product synthesis. The engineered strain overexpressing *ecdB* was fermented in a 50-L bioreactor, in which the ECB titer reached 2 234.5 mg/L. The findings laid a research foundation for the subsequent metabolic engineering of this strain.

Keywords: echinocandin B; *Aspergillus nidulans*; *ecdB* overexpression; regulation of fermentation in a 50-L bioreactor

随着人类免疫缺陷疾病患者数量增加,以 及人体器官移植、骨髓移植、微创介入性诊断 治疗和抗肿瘤化疗药物使用的增多,系统性真 菌感染相关风险正逐年上升。统计数据表明侵 袭性真菌感染的年发病率为 650 万,死亡人数 达 380 万^[1]。常见的临床抗真菌药物有多烯类、 三唑类、氮唑类、棘白菌素类等^[2-4],其中棘白 菌素类药物是一类新型抗真菌药物,对念珠菌、 曲霉菌和卡氏肺孢子虫等病原性真菌有抑制作 用,目前已上市的棘白菌素类药物主要有卡泊 芬净(Caspofungin)、米卡芬净(Micafungin)、阿 尼芬净(Anidulafungin)、雷扎芬净(Rezafungin) 等^[5-7],其中卡泊芬净和米卡芬净已先后在国内 上市。

阿尼芬净是第三代棘白菌素类抗真菌药物,具有全新的作用机理,能抑制真菌细胞壁的1,3-β-D-葡聚糖合成酶,其抗真菌谱较广且无交叉耐药性,能用于治疗多种全身性真菌感染疾病。注射用阿尼芬净为美国辉瑞制药公司开发,2006年12月在美国上市,之后华北制药、海正药业、浙江康恩贝制药等企业先后在国内获得了阿尼芬净原料药及注射用阿尼芬净的药物临床试验批件,但由于其前体棘白菌素 B (echinocandin B, ECB)的发酵效价较低,目前在国内尚未上市。棘白菌素 B 由 4*R*,5*R*-二羟基-L-鸟氨酸、2 个 L-苏氨酸、4*R*-羟基-L-脯氨酸、

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

3S,4S-二羟基-L-高酪氨酸和 3S-羟基-4S-甲基-L-脯氨酸等氨基酸组成的环肽加 1 条亚油酸侧链 组成(图 1),是构巢曲霉(Aspergillus nidulans) 发酵合成的次级代谢产物,其生物合成过程如 图 1 所示。

棘白菌素 B 的生物合成是一个复杂的次级 代谢过程。首先双烯亚油酸侧链连接到 ecdA 编 码的非核糖体肽合酶(Non-ribosomal peptide synthase, NRPS)硫酯化结构域 T₀,然后在 NRPS 的作用下,依次连接 L-鸟氨酸、L-苏氨酸、L-脯氨酸、L-高酪氨酸、L-苏氨酸和 L-甲基脯氨 酸这 6 种氨基酸,最后线性六肽在末端缩合结 构域 C_T催化下发生环化,形成六肽环状母核^[8]。 如图 1 所示,其合成主要分为 4 个过程:脂质 体的启动、链状六脂肽的生成、链状六脂肽的 环化以及环状六肽母核羟基化氧化,最终形成 棘白菌素 B。Cacho 等研究发现在构巢曲霉中, ECB 的生成主要由 ecd 和 hty 这 2 个生物合成 基因簇控制^[9]。其中 ecdA 基因编码非核糖体肽 合成酶 NRPS; ecdB 基因编码真菌转录因子; ecdC、ecdD 基因编码转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS); ecdE 基因编码糖 基水解酶; ecdF 基因编码糖苷酶; htyE、ecdG、 ecdK 基因编码非血红素铁/a-酮戊二酸依赖型 双加氧酶; htyF、ecdH 基因编码细胞色素 P450 血红素铁依赖型加氧酶; ecdl 基因编码脂肪酰



图 1 棘白菌素 B 的生物合成机制

Figure 1 Biosynthetic mechanism of Echinocandin B.

基-AMP 连接酶; ecdJ 基因编码未知蛋白; ecdL 基因编码 ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC); 而 htyA、htyB、htyC、 htyD 基因编码生成关键前体 L-高酪氨酸的酶^[9]。

棘白菌素 B 结构复杂,目前唯一的合成方 式是由构巢曲霉发酵获得^[10-13],但在其发酵过 程中会出现发酵液黏稠、溶氧传质水平低等问 题,导致 ECB 产量较低。为解决上述问题, 研究人员采用菌种诱变、培养基优化、无机微 粒添加、培养条件调控及气升式发酵罐培养等 方法,取得了一些进展^[14-17]。近年来,许多研 究人员通过分子操作来提升丝状真菌次级代 谢产物的产量,如 Chen 等通过破坏合成氨基 酸的关键基因,将产纽莫康定 B₀菌株中的副产 物纽莫康定 A₀消除^[18]。Wei 等采用 *htyE* 基因替 换洛佐亚棘白菌(*Glarea lozoyensi*) SIPI1208 的 脯氨酸羟化酶基因 gloF, 消除了纽莫康定 C₀, 增加了纽莫康定 B₀ 的产量^[19]。Min 等通过阻 断杂色曲霉素的生物合成途径,增加了德氏曲 霉(Aspergillus delacroxii) SIPIW15 中 ECB 的效 价^[20]。FR901379 是另一个重要的棘白菌素类 抗真菌药物米卡芬净的关键前体,Men 等通过 过表达与细胞色素 P450 酶相关的基因 mcfH、 mcfF 及过表达转录激活因子 mcfJ,在5L发酵 罐分批补料条件下,使 FR901379 发酵效价达 到了4g/L^[21]。

本研究针对构巢曲霉中与 ECB 合成过程所 涉及的转录激活、羟基化氧化、细胞形态等相 关的关键基因进行改造,考察其对 ECB 生物合 成的影响,构建高产菌株,并通过 50 L 发酵罐 调控优化,最终提高 ECB 的发酵效价,以期为 后续菌株的代谢工程改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

构巢曲霉(Aspergillus nidulans) UA-68 由本 实验室保藏。

1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 土豆 200, 蔗糖 20, 琼 脂 20, 115 ℃灭菌 30 min。

种子培养基(g/L):黄豆饼粉 25,葡萄糖 10, 甘油 10, pH 6.8-7.0, 115 ℃灭菌 30 min。

发酵培养基(g/L):花生油 20,甘油 10,蛋 白胨 8.6,L-苏氨酸 3.1,L-鸟氨酸盐酸盐 6.1, 油酸甲酯 70,黄豆饼粉 40,K₂HPO₄·3H₂O 8, MgSO₄·7H₂O 0.5,MnSO₄·H₂O 0.2,FeSO₄·7H₂O 0.05,CaCl₂ 0.3,CuSO₄·5H₂O 0.6,121 ℃灭菌 20 min,pH 6.0–6.8。

1.3 主要仪器与设备

恒温调速摇床(太仓市华利达实验设备有限公司);高效液相色谱(Agilent公司);高压蒸汽灭菌锅(SANYO公司);电子分析天平(上海精密仪器仪表有限公司);高速离心机(Eppendorf公司)。

1.4 培养方法

1.4.1 孢子培养

用灭菌后的接种环从构巢曲霉菌株保藏管 中蘸取少量孢子接到无菌 PDA 平板培养基 中,28 ℃避光静置培养 6-7 d,菌体由白色变 成墨绿色后进行接种。

1.4.2 种子培养

用接种铲挖取培养皿上培养的菌落,一般 取深褐色菌核附近 1 cm² 的菌块接种到含种子 培养基的锥形瓶中(50 mL/250 mL),置于 25 ℃、240 r/min 摇床条件下培养 3 d,待种子 液呈黏稠的橘黄色液体后可用于转接。

1.4.3 发酵培养

摇瓶发酵培养:将上述种子液以 10%的接种量均匀且分散地接种于含发酵培养基的锥形瓶中(50 mL/250 mL),置于 25 ℃、240 r/min摇床条件下培养 10 d,待发酵液从灰白色变为橘黄色,再变为深棕褐色发酵结束,取样测定结果,每批实验设置 3 个平行样品,结果取平均值。

50 L 罐发酵培养:在 1.2 所述的发酵培养 基中加入 0.01%消泡剂作为 50 L 发酵罐中初始 培养基,补料培养基为 35 g/L 油酸甲酯,121 ℃ 灭菌 20 min 备用。将上述种子液以 10%的接种 量转接到装液量为 200 mL/1 000 mL 的二级种 子液中,置于 25 ℃、240 r/min 的摇床条件下培 养 3 d。将培养好的二级种子液以 6%的接种量 转接到 50 L 的发酵罐中(装液量为 30 L)。在 25 ℃培养温度下,优化转速进行 50 L 发酵罐 补料培养,并定时取样测定生物量和 ECB 发酵 效价。

1.5 分析方法

生物量(g/L)的测定:本研究发酵培养基中 含有黄豆饼粉等不溶于水的物质,因此发酵过 程生物量的测定采用干重法^[22]。用分析天平称 取 2 mL EP 管重量并进行编号,取 2 mL 发酵液 于 EP 管中,12 000 r/min 离心 10 min,弃上 清,用超纯水洗涤 3 次后,将下层沉淀置于 80 ℃的鼓风式电热恒温烘干箱中烘干,待其 质量维持恒定值时,用分析天平称取整个 EP 管质量,通过干燥后 EP 管总质量减去空 EP 管 重量计算得出生物量。

棘白菌素 B 的检测:将发酵液摇匀后取 1 mL 于 EP 管中,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清;将沉淀菌体中加入甲醇,并定容至 5 mL, 在超声清洗仪中隔水超声萃取 5 min 后常温静 置萃取 24 h;4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 后 取上清,用 0.22 μm 滤膜过滤后进行液相检测。

液相色谱检测方法:检测仪器为安捷伦高 效液相色谱仪;色谱柱为 C18 柱(大连依利特 4.6 mm×250 mm×5 µm);流动相为甲醇:乙 腈:水=7:1:2;流速 1 mL/min;紫外检测器检 测波长 222 nm;进样量 20 µL;柱温 40 ℃。

1.6 ECB 合成簇基因过表达菌株的 构建

以构巢曲霉基因组(CCTCC 数据库登录 号: M2012300)为模板,利用引物 gpdA-F/ gpdA-R 进行扩增,获得强启动子 gpdA 的基因 片段,进一步将 gpdA 基因片段和线性化载体 pDht 连接,并转化至克隆载体大肠杆菌 (Escherichia coli) DH5a 中。将验证后的克隆阳 性单菌落接种于含有卡那霉素(kanamycin, Kan) 的 LB 液体培养基试管中, 37 ℃、180 r/min 条 件下培养12h,之后离心收集菌体并提取质粒 pDht-gpdA,保存备用。利用限制性核酸内切 酶 Xba I 对质粒 pDht-gpdA 进行单酶切获得线性 化 pDht-gpdA 质粒。以构巢曲霉 UA-68 基因组 为模板,利用相应引物扩增获得6个ECB合成 基因簇中的关键基因 ecdB、ecdC、ecdD、 ecdK、ecdL和htyE。通过Exnase II 同源重组, 将上述 6 个基因分别连接到线性化 pDht-gpdA 质粒上,由此获得6个由gpdA强启动子启动的 表达载体。

根癌曲霉能有效地将其 T-DNA 转移至丝 状真菌中,使原核生物和丝状真菌之间的 DNA 转移效率大大提高^[23]。本研究中进一步采用文 献所述根癌农杆菌介导转化技术,将表达载体 转入构巢曲霉 UA-68 中表达^[24]。具体操作如 下:将构巢曲霉与根癌农杆菌在 PDA 筛选培养 基上进行共培养,转化子与根癌农杆菌同时生 长,由于转化子数量较多,故挑选菌落颜色为 墨绿色的转化子,并进一步将共培养后的构巢 曲霉转化子转接至潮霉素抗性的 PDA 平板培养基中,培养 5-7 d,后筛选表面颜色为墨绿色,底部颜色为深褐色的转化子。转化子以 YZ-F/YZ-R 为引物进行 PCR 验证,成功编辑的转化子可以分别扩增出 1 919 bp (*ecdB*)、2 029 bp (*ecdC*)、1 834 bp (*ecdD*)、1 119 bp (*ecdK*)、5 218 bp (*ecdL*)、1 104 bp (*htyE*)长度大小的条带,最后通过 DNA 测序验证无误后得到突变株。

1.7 pDht- $\Delta fksA$ 质粒的构建

本研究采用同源重组的方式对 fksA 基因 进行敲除。以潮霉素抗性基因 HygR 作为筛选 标记。以构巢曲霉 UA-68 基因组为模板,利 用引物对 fksA-L-1000-F/fksA-L-1000-R 和 fksA-R-1000-F/fksA-R-1000-R 分别扩增获得 fksA 基因的上下游片段,并进行琼脂糖凝胶电 泳验证,然后采用 Dpn I 消化 2 h,并使用试剂 盒纯化。同时以带有 HygR 基因的质粒为模板, 利用引物 HygR-F/HygR-R 扩增获得 HygR 基因 片段。进一步将 fksA 基因上下游片段与 HygR 片段和 pDht 线性化载体连接,构建获得整合 质粒 pDht-AfksA, 质粒图谱如图 2 所示。进一 步将质粒 pDht-*ΔfksA* 转化至 E. coli DH5α 感受 态中,并涂布至含有卡那霉素抗性的 SOB 平板 中, 37 ℃倒置培养 16-20 h, 后挑取适量单菌 落进行菌落 PCR。将 PCR 产物进行条带大小 验证,挑取合适条带大小样品进行测序比 对。将测序正确的菌落培养后提取质粒即为 pDht-ΔfksA 质粒。将该质粒利用根癌农杆菌转 化的方法导入构巢曲霉中。重组片段在构巢曲 霉中与染色体中的 fksA 发生同源重组,以达 到基因敲除的目的。最终通过提取转化子的基 因组,利用 PCR 验证敲除是否成功;同时将 转化子进行发酵培养,并通过电镜观察其形态 变化。



图 2 pDht-Δ*fksA* 质粒示意图 Figure 2 Schematic diagram of pDht-Δ*fksA* plasmid.

2 结果与分析

2.1 过表达转录因子基因对 ECB 合成 的影响

转录因子是一类调控基因转录效率的 DNA 结合蛋白,主要通过影响转录初始复合 物的形成,干预靶基因的转录与表达,在生物 体内基因表达的调控发挥着重要的作用^[25]。ecdB 是构巢曲霉真菌通路特异性转录因子的调控基 因,介导的调控具有高度选择性,影响ECB的 生物合成基因簇转录。将构建的 ecdB 过表达 质粒通过根癌农杆菌介导的转化,导入构巢曲 霉 UA-68 中。大量筛选发酵结果表明菌落表面 颜色为白色、底部颜色为黄色的转化子,其ECB 发酵产量较低。因此选取菌落表面颜色为墨绿 色、底部颜色为褐色的转化组进行后续发酵实 验。以原始菌株 UA-68 作为对照,与筛选获得 的 ecdB 重组菌株在相同条件下培养发酵 10 d 后,测定 ECB 含量,结果如图 3 所示。其中, 重组菌株 EB4 的发酵效价较对照菌株 [(1 613.5±25.0) mg/L]提高了 25.8%,达到 (2 030.5±99.2) mg/L,生物量与对照菌株相 近。据此推测,过表达 ECB 通路特异性转录 因子基因 ecdB 能加强 ECB 合成基因簇基因的 转录与表达,进而能在一定程度上提升 ECB 的发酵效价。

2.2 过表达氧化和羟基化基因对 ECB 合成的影响

在 ECB 的合成过程中,会发生多次羟基 化反应,这些羟基化反应的发生依赖于各种 氧化酶。ecdK 和 htyE 编码非血红素铁/a-酮戊 二酸依赖型双加氧酶,htyE 参与将 L-脯氨酸 羟基化成 4R-羟基-L-脯氨酸的反应,ecdK 参 与亮氨酸氧化成甲基脯氨酸的过程,为母核 的形成提供前体物质。将构建的 ecdK、htyE 过表达质粒通过根癌农杆菌介导的转化,导 入到构巢曲霉 UA-68 中。以原始菌株 UA-68 作为对照与 ecdK、htyE 重组菌株在相同条件 下培养发酵 10 d 后,测定 ECB 含量,发酵结 果如图 4 所示。



图 3 基因过表达对 ECB 合成的影响 *表示具 有显著性差异。

Figure 3 Effects of *ecdB* overexpression on ECB biosynthesis. *: Significant difference.



图 4 过表达氧化和羟基化基因对 ECB 合成的 影响 *表示具有显著性差异。

Figure 4 Effects of *ecdK* (EK4) and *htyE* (HE8) gene overexpression on ECB biosynthesis. *: Significant difference.

其中, 过表达 ecdK 基因的菌株 EK4 较对照 菌株提高了 23.7%,发酵效价达到了(1 996.4± 151.4) mg/L, 且生物量稍有提高。过表达 htyE 基因后,其发酵效价和生物量较对照菌株出现 显著下降。造成这一现象的原因可能是 ECB 的 环状六肽母核合成需要多种前体氨基酸,包括 羟脯氨酸和甲基脯氨酸,在 ECB 的合成过程 中, ecdK 是编码参与亮氨酸氧化成甲基脯氨酸 氧化酶的基因,过表达 ecdK 基因,加强了亮 氨酸氧化成甲基脯氨酸的能力,使得环状六肽 母核前体氨基酸之一的甲基脯氨酸生成增多, 利于更多的环状六肽母核形成,从而提高了 ECB的产量。而 htyE 基因的过表达,加强了脯 氨酸向 4R-羟基-L-脯氨酸转变的羟基化反应, 使得脯氨酸供应不足,从而影响了环状六肽母 核的形成,导致 ECB 产量出现下降,因此后续 还应对多个相关基因进行调控改造。

2.3 过表达转运蛋白基因对 ECB 合成的影响

ECB 是一种胞内次级代谢产物,有研究表明构巢曲霉几丁质重复结构上的羟基基团会减

少 ECB 与葡聚糖合酶的结合,因此,构巢曲霉 有耐受较高浓度 ECB 的潜力。ATP 结合盒转运 蛋白 ABC 能利用 ATP 能量跨生物膜转运抗真 菌化合物等。ecdL 编码转运蛋白 ABC,调控多 种药物的转运。转运蛋白超家族 MFS 是已知 最大的次级主动转运蛋白超家族,负责运输广 谱底物,ecdC、ecdD 基因则编码转运蛋白 MFS。为了增加 ECB 的外排,削弱产物对产物 合成的负反馈抑制,提高 ECB 的产量,本研究 在 UA-68 中过表达关键基因 ecdC、ecdD、 ecdL。以原始菌株 UA-68 作为对照与 ecdC、 ecdD、ecdL 重组菌株在相同条件下培养发酵 10 d后,测定 ECB 含量,发酵结果如图5 所示。

由图 5 可以看出,强化转运蛋白相关基因 后,对菌体生物量基本无影响,但对 ECB 的合 成则产生了不同程度抑制,使其均呈现下降趋 势。分析其原因可能是 ECB 为次级代谢产物, 其合成需要大量前体物质,而强化转运蛋白后 可能将部分所需的前体物质转运到了膜外,导 致 ECB 的合成受到影响。





Figure 5 Effects of transporter genes overexpression on ECB biosynthesis. **: Highly significant difference; *: Significant differences.

2.4 敲除 fksA 基因对 ECB 合成的影响

构巢曲霉属于丝状真菌多核微生物,具有 比酵母或细菌等单细胞微生物更复杂的形态。 其在发酵过程中会呈现丝状或球状形态,导致 发酵液黏稠,影响发酵过程中的溶氧和营养的 传质,从而影响 ECB 的合成。β-1,3-葡聚糖的 合成在真菌生长和发育过程中的形态调控中起 着重要的作用,*fksA* 为构巢曲霉菌体形态的调 控基因,是 β-1,3-葡聚糖合酶的编码基因。因 此,本研究拟通过敲除该基因调控菌体形态, *fksA* 基因敲除后的菌株扫描电镜分析结果如图 6 所示,菌株发酵结果如图 7 所示。

图 6 显示在敲除 fksA 基因后,菌株的细胞 结构发生了显著变化,图 6C 中可以看出发酵液 中细长菌丝数量增加,且细胞壁表面产生了一 定的损伤(图 6D)。这可能是敲除该基因后 β-1,3-葡聚糖合酶受到抑制,导致菌株细胞壁 的合成受到了阻碍,并且在培养过程中发现菌 株在敲除该基因后与初始菌相比生长变慢,种 子液在培养 3 d 后仍未呈现橘黄色,上述现象 均不利于 ECB 的合成。图 7 发酵结果表明重组 菌株FK2 的生物量和ECB 发酵效价较出发菌株



图 6 出发菌株 UA-68 (A、B)和 *fksA* 敲除菌株(C、 D)的扫描电子显微镜分析

Figure 6 Scanning electron microscope analysis of the strain UA-68 (A, B) and the strain $\Delta fksA$ (C, D).



图 7 敲除 *fksA* 菌株对 ECB 发酵的影响 Figure 7 Effect of knockout *fksA* gene on ECB fermentation.

均显著下降。这可能是敲除 fksA 基因后,导致 β-1,3-葡聚糖合酶的活性受到抑制,使得 β-1,3-葡聚糖量减少,细胞壁结构缺失,菌株生长受 到阻碍生长缓慢。ECB 属于次级产物且具有一 定抗真菌活性,对曲霉菌属有一定的抑制作 用,而构巢曲霉凭借着几丁质上的羟基和长链 结构,对 ECB 有较高的耐受能力,敲除 fksA 基因后破坏了细胞壁结构,进一步破坏或者影 响了上述结构,使得构巢曲霉对ECB的耐受能 力降低,导致其产量下降。

2.5 棘白菌素 B 高产菌株在 50 L 发酵罐 中的发酵调控

构巢曲霉为丝状真菌,在其发酵过程中会 以不同的菌丝体形态存在,而不同的形态都会 造成发酵液黏稠;同时,培养基中含有黄豆饼 粉等难以溶解的物质,这些物质容易使菌体附 着在其表面,进一步造成传质和溶氧受限,因 此发酵罐中的发酵调控尤为重要。对丝状真菌 发酵过程而言,适当提高转速能在一定程度上 提高发酵液中的溶解氧,但高转速引起的强剪 切力也会对菌丝体造成损伤,不利于产物合成。 因此,本研究首先考察了发酵过程中的搅拌转 速, 探究了其对 ECB 发酵效价的影响, 实验结 果如图 8 所示。

由图 8 可知,当利用 3 种不同的转速进行 发酵时,pH 的总体趋势是大致相同,而且在 168 h 达到了最高值,然而后期呈现下降趋 势。当转速由 100 r/min 提高至 400 r/min 时, 棘白菌素 B 的发酵效价由 425.36 mg/L 提高至 688.69 mg/L,这可能是因为高转速有助于菌体 更有效地吸收营养,从而促进菌体的增长速 率。图 8C 也表明随着转速的增加,生物量也 呈现上升趋势,当速度为 400 r/min 时,生物量 在 168 h 内达到最大生物量 75 g/L,且不同转速 下生物量基本都在 24 h 达到最大值。同时,图 8D 中溶氧数据表明高转速可以在一定程度上 提高溶氧水平,且采用 3 种不同的转速时,发 酵过程溶氧变化规律基本一致,发酵前 120 h 溶氧均逐渐降低,后期逐渐回升。对比 ECB 在 120 h 后的合成过程可以发现,该时期菌丝进入 次级代谢阶段, ECB 合成速率加快,此时应提 供足够的氧气,以提高其代谢合成效率,因此 后期如果采用分段控制转速提高溶解氧水平, 对产量提升可能有积极效果。





Figure 8 Effect of different stirring speeds on ECB synthesis. A: pH. B: ECB titer. C: Dry cell weight. D: Dissolved oxygen.

窗: 010-64807509

进一步在上述结果的基础上采用分段控制 转速调控发酵过程、考虑菌体的不同生长阶段 对溶氧的需求以及对剪切力的耐受能力,本研 究确定了如下分阶段调控策略:在0-48 h,不 同转速对溶氧影响较小,采用 200 r/min 搅拌转 速; 48-96 h, 逐渐提升至 300 r/min; 96-168 h, 微生物进入次级代谢阶段,该阶段为 ECB 关键 合成期,需要充足的氧气,在此阶段逐渐提升 至 400 r/min: 发酵后期进一步提高溶氧以强化 次级代谢产物的合成,此时搅拌转速提高至 500 r/min,在上述条件下发酵曲线如图 9 所示。 可以看出溶氧随着分阶段提高转速会相应提高, 生物量在前24h同样快速提高,在120h时达到 最大值 75.82 g/L; 在 120 h 时, ECB 合成速率最 大,发酵结束时 ECB 的效价可达 864.30 mg/L, 较 400 r/min 恒定搅拌转速时提高了 25%。说明 根据菌体的生长调控转速可以为发酵过程提供 充足的氧气,积累中间代谢物,对棘白菌素 B 次级代谢产物的生成产生积极作用,所以在后 续的发酵罐放大中采用分段控制转速。

除搅拌转速外, 前期研究发现底物油酸甲

酯对 ECB 的合成也具有显著影响。因此本研究 进一步优化了油酸甲酯的分批补料方式, 根据 其生长和产物代谢情况优化了油酸甲酯的分批 补料浓度,结果如图 10 所示,在发酵 72 h 时, 开始匀速加入 100 mL 的 35 g/L 的油酸甲酯, 此时溶氧开始下降,油酸甲酯作为碳源继续消 耗, pH 继续下降, 生物量比前 48 h 的生物量 提升。当发酵到 120 h 时, 溶氧下降到临界氧 浓度,通过提高转速和通气量来使溶氧提高到 正常水平,而当发酵 144 h 时,开始加入 200 mL 的 35 g/L 的油酸甲酯,此时菌丝开始进入次级 代谢, ECB 的合成速率开始加快, 所以之后每 隔 24 h 补充 100 mL 的 35 g/L 油酸甲酯,同时 控制 pH 和溶氧,使其达到合适的范围。发酵 144 h 时, 生物量、pH 达到最大值, 之后便开 始下降。当发酵 192 h 时,通过控制转速来提 高溶氧。在发酵后期转速的提高能够改善溶氧, 高转速能够加速菌丝对营养的吸收,使棘白菌 素 B 产量逐步增加。当发酵到 264 h 时, ECB 的产量达到最大值 2 234.5 mg/L,比分批补料前 提高了110.0%。





Figure 9 Effects of segmented stirring speed on ECB biosynthesis.

http://journals.im.ac.cn/cjbcn



图 10 50 L 发酵罐中分阶段分批补料发酵过程曲线 Figure 10 Fed-batch fermentation process in 50-L fermenter with high yield strain EB4.

3 讨论与结论

目前研究人员已针对构巢曲霉发酵代谢合 成次级代谢产物 ECB 开展了大量研究,但主要 集中在菌种传统诱变选育、发酵培养基优化、 发酵工艺优化等方面,而对菌株在代谢过程中 所涉及的关键基因的分子改造较少。目前报道 的可以合成 ECB 的发酵菌株主要是构巢曲霉, 该菌株为丝状真菌,存在菌株性能不稳定、细 胞形态导致的发酵液黏稠、分子改造效率低等系 列问题,虽然 ECB 在摇瓶中的发酵单位已超过 3 000 mg/L,但在放大培养时仍存在发酵调控 困难等问题,从而导致其发酵放大培养效价不 高^[26]。因此,本研究对构巢曲霉进行了分子改 造,并通过发酵罐中的发酵调控以提高 ECB 的 合成效率。

本研究初步考察了ECB生物合成基因簇中 影响其生物合成的关键节点,考察了其对ECB 代谢合成过程的影响,寻找影响ECB发酵效价 的主要限制因素。通过过表达影响羟基化的 ecdK和htyE基因和控制转录因子的ecdB基因, 过表达转运蛋白基因ecdC、ecdD、ecdL,探究 其对 ECB 产量的影响。研究表明过表达 ecdB、 ecdK 基因可以增加 ECB 的发酵效价, 重组菌 株 EB4 发酵效价为(2 030.5±99.2) mg/L,较对照 菌株提高了 25.8%。重组菌株 EK4 发酵效价为 (1996.4±151.4) mg/L, 较对照菌株提高了 23.7%。 利用同源重组的方式敲除与细胞壁合成相关的 基因 fksA 得到重组菌株,但 SEM 结果表明细 胞壁有一定损伤,摇瓶发酵未表现出较好效果。 最后,在50L发酵罐中优化了棘白菌素B的发 酵工艺,首先探究了转速对 ECB 发酵效价的影 响,并对分子高产菌株 EB4 进行了 50 L 罐分批 补料工艺的优化,经优化后其在 50L 发酵罐中 的发酵效价达到 2 234.5 mg/L,是目前放大培养 的最高水平。本研究为后续代谢工程改造合成 ECB 及工业化生产奠定了研究基础,后续应进 一步在菌体形态调控、代谢通路改造等方面开 展深入的研究工作,加速阿尼芬净的国产化工 业进程。

REFERENCES

[1] DENNING DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease[J]. The Lancet Infectious

Diseases, 2024, 24(7): e428-e438.

- [2] BAUER A, BRÖNSTRUP M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(1): 35-60.
- [3] ZOU SP, ZHONG W, XIA CJ, GU YN, NIU K, ZHENG YG, SHEN YC. Mutagenesis breeding of high echinocandin B producing strain and further titer improvement with culture medium optimization[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(10): 1845-1854.
- [4] 陈前利. 抗真菌药在皮肤浅部真菌病治疗中的合理应用[J]. 中国医药指南, 2012, 10(11): 87-88.
 CHEN QL. Rational application of antifungal drugs in the treatment of superficial dermatomycosis[J]. Guide of China Medicine, 2012, 10(11): 87-88 (in Chinese).
- [5] CHEN SCA, SLAVIN MA, SORRELL TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison[J]. Drugs, 2011, 71(1): 11-41.
- [6] PERLIN DS. Current perspectives on echinocandin class drugs[J]. Future Microbiology, 2011, 6(4): 441-457.
- [7] CHANDRASEKAR PH, SOBEL JD. Micafungin: a new echinocandin[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 42(8): 1171-1178.
- [8] 张峰. Aspergillus pachycristatus 棘白菌素 B 合成中脯 氨酸羟化酶的功能分析及 CRISPR/Cas9 基因编辑体 系的构建[D]. 济南:山东大学, 2019. ZHANG F. Functional analysis of proline hydroxylase in the synthesis of echinocandin B from Aspergillus pachycristatus and construction of CRISPR/Cas9 gene editing system[D]. Jinan: Shandong University, 2019 (in Chinese).
- [9] CACHO RA, JIANG W, CHOOI YH, WALSH CT, TANG Y. Identification and characterization of the echinocandin B biosynthetic gene cluster from *Emericella rugulosa* NRRL 11440[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(40): 16781-16790.
- [10] COCKSHOTT AR, SULLIVAN GR. Improving the fermentation medium for Echinocandin B production. Part I: sequential statistical experimental design[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(7): 647-660.
- [11] COCKSHOTT AR, HARTMAN BE. Improving the fermentation medium for Echinocandin B production part II: Particle swarm optimization[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(7): 661-669.
- [12] TÓTH V, NAGY CT, PÓCSI I, EMRI T. The echinocandin B producer fungus Aspergillus nidulans var. roseus ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(1): 113-122.
- [13] TÓTH V, NAGY CT, MISKEI M, PÓCSI I, EMRI T. Polyphasic characterization of "Aspergillus nidulans var. roseus" ATCC 58397[J]. Folia Microbiologica, 2011, 56(5): 381-388.
- [14] VEENSTRA JA. Identification of cells expressing Calcitonins A and B, PDF and ACP in *Locusta migratoria* using cross-reacting antisera and *in situ* hybridization[J]. Peptides, 2021, 146: 170667.
- [15] GIBBS PA, SEVIOUR RJ, SCHMID F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and

http://journals.im.ac.cn/cjbcn

possible solutions[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2000, 20(1): 17-48.

- [16] XIA JY, WANG YH, ZHANG SL, CHEN N, YIN P, ZHUANG YP, CHU J. Fluid dynamics investigation of variant impeller combinations by simulation and fermentation experiment[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43(3): 252-260.
- [17] KRULL R, WUCHERPFENNIG T, ESFANDABADI ME, WALISKO R, MELZER G, HEMPEL DC, KAMPEN I, KWADE A, WITTMANN C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163(2): 112-123.
- [18] CHEN L, YUE Q, LI Y, NIU XM, XIANG MC, WANG WZ, BILLS GF, LIU XZ, AN ZQ. Engineering of *Glarea lozoyensis* for exclusive production of the pneumocandin B0 precursor of the antifungal drug caspofungin acetate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(5): 1550-1558.
- [19] WEI TY, ZHENG Y, WAN MY, YANG SB, TANG JW, WU YJ, LI JY, CHEN SX. Analysis of FR901379 biosynthetic genes in *Coleophoma empetri* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-based genomic manipulation[J]. ACS Chemical Biology, 2022, 17(8): 2130-2141.
- [20] MIN TL, XIONG L, LIANG Y, XU R, FA CC, YANG S, HU HF. Disruption of stcA blocks sterigmatocystin biosynthesis and improves echinocandin B production in *Aspergillus delacroxii*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(7): 109.
- [21] MEN P, ZHOU Y, XIE L, ZHANG X, ZHANG W, HUANG XN, LU XF. Improving the production of the micafungin precursor FR901379 in an industrial production strain[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 44.
- [22] BOTELLA C, HERNANDEZ JE, WEBB C. Dry weight model, capacitance and metabolic data as indicators of fungal biomass growth in solid state fermentation[J]. Food and Bioproducts Processing, 2019, 114: 144-153.
- [23] DE GROOT M, BUNDOCK P, HOOYKAAS P, BEIJERSBERGEN A. Agrobacterium tumefaciensmediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 839-842.
- [24] 逄爱萍. 里氏木霉十种 β-葡萄糖苷酶的机理研究与应用[D]. 南京: 东南大学, 2021.
 PANG AP. mechanism study of 10 β-glucosidases in trichoderma reesei and its application[D]. Nanjing: Southeast University, 2021 (in Chinese).
- [25] 白晓轩,张极峰,李婧,李奥,刘士平. 丝状真菌转录因子调控非核糖体肽合成酶介导的次级代谢产物合成研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 445-453. BAI XX, ZHANG JF, LI J, LI A, LIU SP. advance on transcription factors regulating the synthesis of secondary metabolites mediated by nrps in filamentous fungi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 445-453 (in Chinese).
- [26] NIU K, WU XP, HU XL, ZOU SP, HU ZC, LIU ZQ, ZHENG YG. Effects of methyl oleate and microparticle-enhanced cultivation on echinocandin B fermentation titer[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(11): 2009-2015.