

生物技术与方法

异源表达 *afsRS_{cla}* 全局性调控基因提高工业菌株纳他霉素产量

陶正生, 王业民, 郑华亮, 陶美凤

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 200030

陶正生, 王业民, 郑华亮, 等. 异源表达 *afsRS_{cla}* 全局性调控基因提高工业菌株纳他霉素产量. 生物工程学报, 2015, 31(5): 744–751.

Tao ZS, Wang YM, Zheng HL, et al. Improvement of natamycin production in an industrial strain by heterologous expression of the *afsRS_{cla}* global regulatory genes. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 744–751.

摘要: 前期研究表明棒状链霉菌的全局性调控基因 *afsRS_{cla}* 异源表达可以激活变铅青链霉菌中两种抗生素的合成。本研究将包含 *afsRS_{cla}* 基因的质粒 pHL851 整合到纳他霉素工业生产菌株褐黄孢链霉菌 TZ1401 的基因组中, 使纳他霉素产量提高 38%, 达到 3.56 g/L。qRT-PCR 检测 6 个纳他霉素生物合成基因的转录情况, 发现其转录水平提高 1.9–2.7 倍, 表明 *afsRS_{cla}* 通过正调控纳他霉素生物合成基因的转录, 从而提高纳他霉素的产量。本研究结果对 *afsRS_{cla}* 在抗生素工业生产菌株的高产育种应用具有借鉴意义。

关键词: *afsRS_{cla}* 基因, 工业菌株褐黄孢链霉菌 TZ1401, 纳他霉素, 发酵, qRT-PCR

Improvement of natamycin production in an industrial strain by heterologous expression of the *afsRS_{cla}* global regulatory genes

Zhengsheng Tao, Yemin Wang, Hualiang Zheng, and Meifeng Tao

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: The *afsRS_{cla}* global regulatory genes from *Streptomyces clavuligerus* activate the production of two antibiotics

Received: March 22, 2014; **Accepted:** May 5, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31170084), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2010AA10A201).

Corresponding author: Meifeng Tao. Tel: +86-21-62933765-2051; E-mail: tao_meifeng@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31170084), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2010AA10A201) 资助。

in *Streptomyces lividans*. In this study, we gained an increase of 38% in the production of natamycin (3.56 g/L) in an industrial strain *Streptomyces gilvosporeus* TZ1401 through the integration of pHL851 that bears the *afsRS_{cla}* global regulatory genes into its genome. We discovered by quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) that the expression of 6 genes of the natamycin biosynthetic gene cluster were improved from 1.9 to 2.7 times. This suggests that *afsRS_{cla}* improve the production of natamycin through increased transcription. This study provides a good example for applying *afsRS_{cla}* in high yield breeding of industrial antibiotic producers.

Keywords: *afsRS_{cla}* global regulatory genes, industrial strain *Streptomyces gilvosporeus* TZ1401, Natamycin, fermentation, quantitative real-time reverse transcription PCR

纳他霉素 (Natamycin) 又称匹马菌素 (Pimaricin), 是一种二十六元多烯大环内酯类抗生素^[1], 具有很强的抗真菌活性, 能特异性地抑制酵母菌和霉菌的生长^[2]。目前发现的纳他霉素产生菌主要有 3 种: 纳他链霉菌 *Streptomyces natalensis*^[3], 恰塔努加链霉菌 *Streptomyces chattanoogensis*^[4] 及褐黄孢链霉菌 *Streptomyces gilvosporeus*^[5]。

纳他霉素通过与真菌细胞膜上的甾醇化合物发生反应, 改变细胞膜结构, 从而使细胞破裂, 导致细胞死亡^[6]。由于纳他霉素对真菌作用的广谱性, 并具有良好的理化稳定性及对人体无毒害, 已被全球多个国家作为食品防腐剂批准使用。除了作为食品防腐剂广泛应用于食品行业, 纳他霉素还被应用于临床医疗, 如治疗真菌性角膜炎等^[7]。纳他霉素应用领域广泛, 但是较高生产成本是限制其广泛使用的主要因素, 因此提高纳他霉素工业生产菌株的产量, 降低其生产成本, 有利于进一步推广应用。

纳他霉素生物合成基因簇含有 19 个开放阅读框, 其中包括 2 个途径特异性调节基因 (*pimR* 和 *pimM*)、5 个负责纳他霉素聚酮骨架合成的聚酮合酶基因 (*pimS0-pimS4*) 和 12 个负责后修饰和其他功能的基因^[1,8] (图 1)。*pimI* 合成一种 II 型硫脂酶, 可能具有编辑校正功能, 使纳他霉素得以积累^[9]。*pimJ* 为 GDP-甘露糖脱水酶, 参与海藻糖胺糖部分的形成^[10]; *pimK* 为糖基转移酶, 负责 C-15 位上甘露糖的转移^[11]。

链霉菌的次级代谢受到许多因素的影响, 其中转录水平的调控受到多种转录调节蛋白的控制。AfsR 是一种较早在链霉菌中发现的转录正调控蛋白, 含有 993 个氨基酸, 在其 N 端有 SARP 类家族的两个特征结构域, 还含有可以结合 ATP 的保守基元^[12]。AfsR 是一个全局性调控因子, 通过磷酸化介导的信号转导作用将生理和环境信号进行整合, 对多种抗生素合成具有调控作用^[13]。蛋白激酶 AfsK、PkaG 和 AfsL 可以磷酸化 AfsR^[14], AfsR 蛋白的丝氨酸和苏氨酸

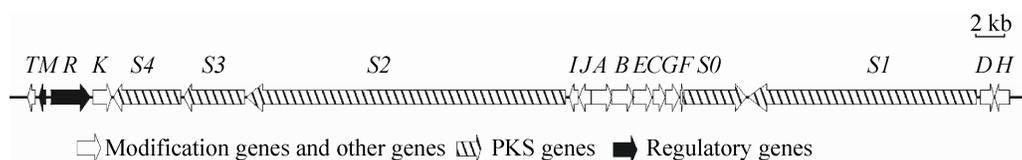


图 1 褐黄孢链霉菌的纳他霉素生物合成基因簇

Fig. 1 The natamycin biosynthetic gene cluster from *S. gilvosporeus*.

残基磷酸化使 AfsR 的 DNA 结合能力增强。被磷酸化后 AfsR 可结合在紧邻 *afsR* 下游的 *afsS* 启动子区,从而启动 *afsS* 转录。天蓝色链霉菌 *afsS* 编码 64 个氨基酸的小蛋白 AfsS, 虽然其功能尚未确定, 但它的存在可以显著增强放线紫红素、钙依赖抗生素和十一烷基灵菌红素的合成^[15]。本课题组陈黎等从棒状链霉菌 *Streptomyces clavuligerus* 克隆得到 *afsRS_{cla}*, 包含 *afsR* 和 *afsS* 两个基因, 发现 *afsRS_{cla}* 不但可以提高棒状链霉菌中克拉维酸的产量并激活沉默的全霉素的合成, 同时还可以激活异源宿主变铅青链霉菌 *Streptomyces lividans* 中沉默的放线紫红素和钙依赖抗生素的产生^[16]。本研究通过把全局性调控基因 *afsRS_{cla}* 导入工业生产菌株褐黄孢链霉菌 TZ1401 中, 考察 *afsRS_{cla}* 对纳他霉素生物合成基因转录的影响, 通过基因工程的方法提高纳他霉素工业生产菌株的产量, 获得高产菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 为大肠杆菌-链霉菌属间接转移供体菌^[17], 本实验室保存。纳他霉素工业生产菌株褐黄孢链霉菌 TZ1401 由工厂提供。质粒 pSET152 含接合转移起始位点 *oriT_{RRK2}*、阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV*、放线菌噬菌体 ΦC31 整合位点 *attP* 以及整合酶基因 *int*^[18]。pHL851 为 pSET152 衍生质粒, 含有棒状链霉菌 *afsRS_{cla}* 基因, 由 Chen 等构建^[16]。

1.1.2 主要试剂

DNA 聚合酶 *rTaq* 及相关试剂购自 TaKaRa 公司; 抗生素购自 Sigma 公司; 其余试剂购自国药集团或 Oxoid 公司。发酵纳他霉素的种子培养基

和发酵培养基粉末由纳他霉素生产厂家提供。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 酵母抽提物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 5, pH 7.0, 用于液体培养大肠杆菌。

2×YT 培养基 (g/L): 酵母抽提物 10, 胰蛋白胨 16, NaCl 5, pH 7.2, 用于接合转移时链霉菌孢子的热激处理。

2CMY 培养基 (g/L): 可溶性淀粉 10, 胰蛋白胨 2, NaCl 1, (NH₄)₂SO₄ 2, CaCO₃ 2, MgSO₄·7H₂O 2, K₂HPO₄ 1, 无机盐溶液 (1 mL), 琼脂 20, pH 7.2, 用于褐黄孢链霉菌的接合转移。其中无机盐溶液 (g/L): FeSO₄·7H₂O 1, MgCl₂·6H₂O 1, ZnSO₄·7H₂O 1。

COM 培养基 (g/L): 玉米淀粉 10, 燕麦粉 5, 麦芽提取物 5, 酵母抽提物 2, 琼脂 15, pH 7.2, 用于褐黄孢链霉菌培养和产孢。

纳他霉素种子培养基 (g/L): 种子培养基粉末 43, pH 7.2。

纳他霉素发酵培养基 (g/L): 发酵培养基粉末 88.5, pH 7.2。

1.1.4 引物

用于 PCR 验证重组菌株以及 qRT-PCR 的引物序列如表 1 所示, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物 *afsRS-F*、*afsRS-R*、*Apr-F* 和 *Apr-R* 根据 pHL851 序列设计, 两对引物的序列分别位于阿泊拉霉素抗性基因 *aac(3)IV* 和 *afsRS_{cla}* 基因^[16], 用于验证 pSET152 和 pHL851 是否存在于重组链霉菌菌株。其他引物用于 qRT-PCR, 本研究中褐黄孢链霉菌纳他霉素基因簇序列已部分测序, 和纳他链霉菌纳他霉素基因簇序列 (基因序列号为 AJ278573) 相同, qRT-PCR 引物序列参考 AJ278573 序列, 引物名称与所扩增的基因名称一一对应。

表 1 本研究的引物及其核苷酸序列

Table 1 Primers used in this study and their nucleotide sequences

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')
afsRS-F	GTCCGTGTACGCCTCCTTGT
afsRS-R	CGACCTCGATGTGATGTCCC
Apr-F	TGGGCAGGTACTTCTCCTCG
Apr-R	GCATCGCATTCTTCGCATC
hrdB-F	GCACATCCCGTACGCTCCCG
hrdB-R	CTCGAAGGCCCGACGCACGT
pimS1-F	GCTACGACTTCCACACCGAG
pimS1-R	CTGGAAGTGGGGACCGTAGT
pimS3-F	GCAGGGCTGATCAAGATGAT
pimS3-R	GCCACTCCTGAGGCTCCGTC
pimM-F	ATGACGGGCGTGACGAATC
pimM-R	CGAGCCTTGATAGAACATTGACC
pimI-F	ACGACCCCAAGACCACGCTG
pimI-R	TTCCCGCAGCAGTGCCAGTA
pimJ-F	GGTCAGGCGAACCCAGGAA
pimJ-R	CTGCTGCCAGGACATCGGTA
pimK-F	CCGCTGTGGGTGGACTGCTA
pimK-R	GAAGGACGGGGTGCCGAGAA

1.2 方法

1.2.1 链霉菌与大肠杆菌属间接转移

链霉菌与大肠杆菌属间接转移参考文献[17]。将酶切验证正确的质粒 pHL851 和空载质粒 pSET152 分别电转到 ET12567/pUZ8002 感受态细胞,获得的转化子 ET12567/pUZ8002/pHL851 和 ET12567/pUZ8002/pSET152,经过质粒提取和酶切验证正确后,作为接合转移供体菌;褐黄孢链霉菌 TZ1401 作为受体菌。大肠杆菌和热激后的链霉菌孢子混合后涂布 2CMY 平板,30 °C 倒置培养 20 h 后用阿泊拉霉素(终浓度 50 μg/mL)和三甲氧苄啶(终浓度 50 μg/mL)覆盖,继续培养直至接合转移子长出。各随机挑取 12 个形态正常的接合转移子,在 COM 平板(含 50 μg/mL 的阿泊拉霉素和 25 μg/mL 萘啶酮酸)划菌块进行

抗性验证。选取抗性验证正确的重组菌株 TZ1401/pSET152 和 TZ1401/pHL851,提取总 DNA,PCR 验证菌株含正确的质粒。

1.2.2 褐黄孢链霉菌的摇瓶发酵

将重组菌 TZ1401/pSET152 和 TZ1401/pHL851 在 COM 培养基上培养至产孢,用 1 mL 蓝色塑料枪头粗口端打菌块(约 1 cm²/块),接种至 30 mL 种子培养基中(250 mL 摇瓶),在 30 °C、220 r/min 振摇(5 cm 振幅)培养 43 h。转接 3 mL 种子培养物至 25 mL 发酵培养基中(250 mL 摇瓶),30 °C、220 r/min 振摇(5 cm 振幅)继续培养 5 d,发酵结束。

1.2.3 褐黄孢链霉菌发酵液的处理方法

纳他霉素的提取:取发酵液 0.5 mL 加入到 2 mL 离心管中,7 000 r/min 离心,弃上清,菌渣中加入 1.5 mL 5%冰乙酸甲醇,充分打散后超声处理 20 min,7 000 r/min 离心,取上清 50 μL 加入到 950 μL 5%冰乙酸甲醇中,充分混匀后过滤,取 150 μL 于内衬管中,进行 HPLC 检测。

菌浓测定:取 3 mL 发酵液,7 000 r/min 离心,收集菌体,称量菌体;菌浓(g/mL)=菌体质量/3。

1.2.4 检测纳他霉素产量的 HPLC 方法

色谱柱(Agilent ZORBAX SB-C18 4.6 mm×250 mm,5 μm);色谱仪:Agilent1260;流动相:甲醇:水:冰乙酸(60:40:5);流速:0.5 mL/min;检测波长:303 nm;上样量:10 μL。纳他霉素标品(含量 89.9%),配制成 0.1 mg/mL 作为标准品对照;纳他霉素发酵效价计算公式:发酵效价(g/L)=样品峰面积/标准品峰面积×稀释倍数×标准品浓度。

1.2.5 qRT-PCR 分析基因表达量的方法

取在发酵培养基生长 96 h 的 TZ1401、

TZ1401/pSET152 和 TZ1401/pHL851 各 3 个平行样品发酵液, 参照 RNA 提取试剂盒 (赛百盛基因公司) 说明书抽取菌体总 RNA, 残余的基因组总 DNA 用 DNase I 进行消化。DNA 消化后用 Nanodrop (Thermo) 定量 RNA 的浓度。参照反转录试剂盒 (Fermentas) 说明书进行 RNA 的反转录。以反转录后的 cDNA 为模板, 选用 6 个具有代表性的纳他霉素基因簇内的基因进行 qRT-PCR, 以 *hrdB* (基因序列号为 X52983) 作为内参基因。扩增程序: 95 °C 预变性 10 min; 随后 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火和延伸 1 min, 共 40 个循环。

qRT-PCR 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对基因表达分析方法^[19], 以 *hrdB* 作为内参基因。设计 7 个基因的 qRT-PCR 引物, 扩增片段大小 200 bp 以内, 引物见表 1。7 个基因的 qRT-PCR 反应完成后的溶解曲线均呈现单一峰, 扩增产物只有一条预期大小的目标条带, 说明 7 对引物均能特异扩增, 没有引物二聚体的形成, 同时反转录合成的 cDNA 也没有受到基因组 DNA 污染。确保 qRT-PCR 数据具有可靠性。

2 结果与分析

2.1 *afsRS_{cla}* 对工业菌株 *S. gilvosporeus* TZ1401 生长的影响

将 pSET152 和 pHL851 分别接合转移到褐黄孢链霉菌 TZ1401, 各随机挑取 12 个接合转移子, 转接培养验证菌株具有阿泊拉霉素抗性; 再分别随机挑取其中抗性正确的菌株提取总 DNA, 进行 PCR 验证。PCR 结果如图 2 所示, TZ1401/pSET152 重组菌 (8 株) 均可扩增出阿泊拉霉素抗性基因 (345 bp), 但不能扩增 *afsRS_{cla}* 基因 (934 bp); TZ1401/pHL851 重组菌 (7 株) 则可以扩增出两个基因。PCR 表明质粒 pSET152 和 pHL851 分别正确导入了 TZ1401。把重组菌株 TZ1401/pSET152 和 TZ1401/pHL851 分别传代培养, 与出发工业菌株 TZ1401 对照观察生长、产孢状况, 发现 3 种菌株单菌落形态基本相似, 但是含有 *afsRS_{cla}* 的菌株 TZ1401/pHL851 产气生菌丝和孢子时间均有约 12 h 延迟, TZ1401/pHL851 在第 4 天产白色气生菌丝, 第 10 天出现灰色孢子丝。

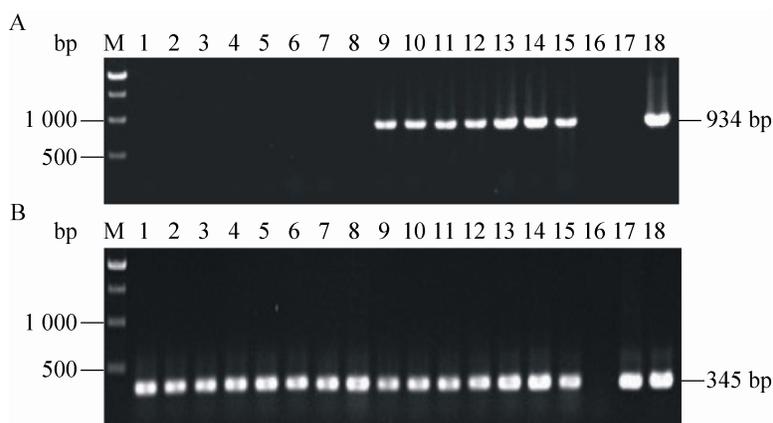


图 2 PCR 检测重组菌株的 *afsRS_{cla}* (A) 和 *aac(3)IV* (B)

Fig. 2 Detection of *afsRS_{cla}* (A) and *aac(3)IV* (B) in the recombinant strains by PCR. M: DNA marker; 1-8: 8 strains TZ1401/pSET152; 9-15: 7 strains TZ1401/pHL851; 16: control TZ1401; 17: control plasmid pSET152; 18: control plasmid pHL851.

2.2 *afsRS_{cla}* 对工业菌株 *S. gilvosporeus* TZ1401 产量的影响

分别挑取 TZ1401/pSET152 和 TZ1401/pHL851 的 3 株平行菌株进行摇瓶发酵, 工厂菌株 TZ1401 作为对照, 每个菌株各重复发酵 4 瓶。在发酵结束后, 测量菌体浓度 (图 3A), TZ1401 的平均菌浓为 0.38 g/mL, TZ1401/pSET152 菌浓略低于 TZ1401, TZ1401/pHL851 平均菌浓与 TZ1401/pSET152 相当, 暗示菌浓改变系由载体引入菌株引起。HPLC 检测纳他霉素发酵产量, 结果见图 3B, 工厂菌株 TZ1401 的纳他霉素平均效价为 2.58 g/L; 导入空载质粒 pSET152 的 3 株菌株纳他霉素产量降低 4%–10%; 而导入含有 *afsRS_{cla}* 的 pHL851 的 3 株重组菌的纳他霉素产量平均效价达到 (3.56±0.04) g/L, 与出发工业菌株 TZ1401 比提高 34%–40% (平均提高 38%), 而与 TZ1401/pSET152 比则提高 50%。

2.3 *afsRS_{cla}* 对工业菌株 *S. gilvosporeus* TZ1401 纳他霉素生物合成基因转录的影响

选取纳他霉素基因簇内 6 个基因进行转录

水平分析, 研究导入全局性调控基因 *afsRS_{cla}* 对工业菌株 TZ1401 纳他霉素生物合成基因转录水平的影响。选取的 6 个基因包括调控基因 *pimM* 和结构基因 *pimS1*、*pimS3*、*pimI*、*pimJ* 和 *pimK*。前期实验表明在 96 h 时, TZ1401 纳他霉素合成基因表达量达到最大值 (未发表)。因此选择在发酵培养 96 h 时进行基因转录水平分析, 考察 6 个基因在 TZ1401、TZ1401/pSET152 和 TZ1401/pHL851 三种菌株的相对转录水平。每个菌株平行发酵 3 瓶作为重复, qRT-PCR 结果如图 4 所示。导入空载质粒 pSET152 对工业菌株 TZ1401 纳他霉素基因簇的 6 个基因表达几乎没有影响, 而导入 pHL851 后纳他霉素基因簇的 6 个基因表达量都有提高, 最低的 *pimJ* 有 1.9 倍的提高, 最高的 *pimS1* 则有 2.7 倍的提高。表明纳他霉素合成基因受到了全局性调控基因 *afsRS_{cla}* 的正调控作用, 这和纳他霉素产量提高的结果是一致的, 但是转录水平比产量提高的更多, 可能因为次级代谢产物的产量受到多种因素影响, 比如前体物供应及翻译效率等。

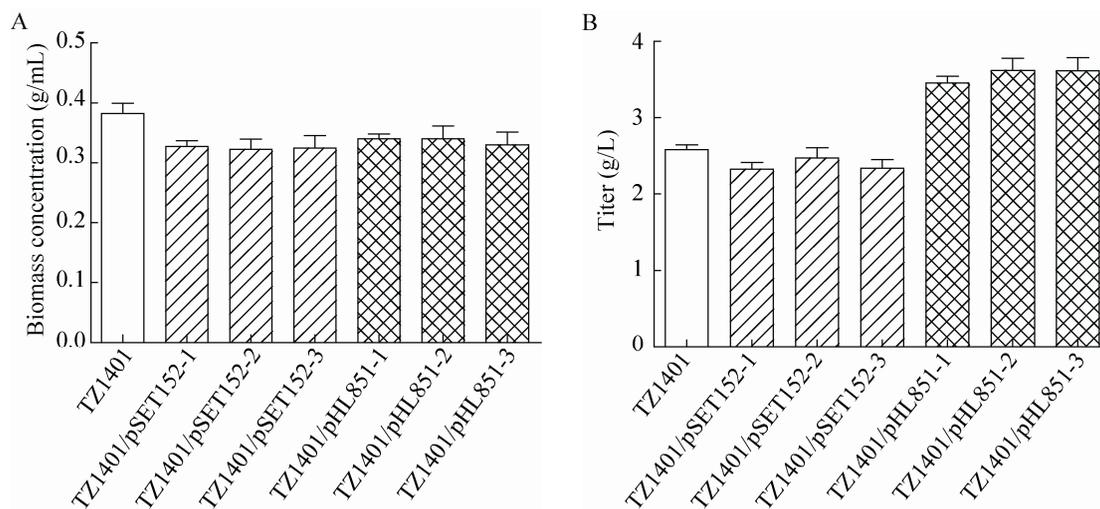


图 3 工业菌株 TZ1401 及含 pSET152 或 pHL851 的重组菌摇瓶发酵液的菌浓 (A) 和发酵效价 (B)

Fig. 3 Biomass concentration (A) and fermentation titers (B) of the industrial strain TZ1401 and recombinants carrying pSET152 or pHL851. Each data bar represents $\bar{x} \pm s$ from four independent samples.

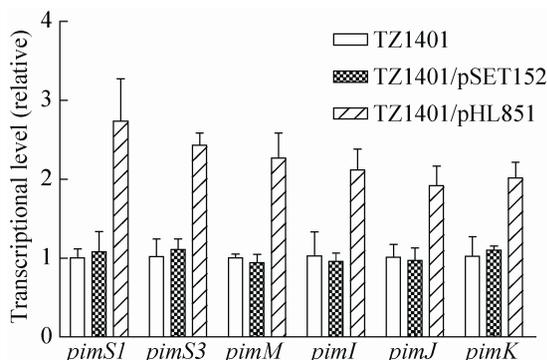


图4 qRT-PCR分析 $afsRS_{cla}$ 对纳他霉素基因簇转录的影响

Fig. 4 Analysis of the effect of $afsRS_{cla}$ on transcription of the natamycin gene cluster by qRT-PCR. TZ1401 was used as calibrator. *hrdB* was used as the internal control. Each data bar represents $\bar{x} \pm s$ from three independent samples.

3 讨论

在链霉菌中, $afsR$ 是研究较清楚的与次级代谢相关的全局性调控基因, 它首先在天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 中被发现, 能够引起 A-因子、放线紫红素和十一烷基菌红素合成基因的高表达^[20-21]。在波赛链霉菌 *Streptomyces peucetius* 中发现了 $afsR$ 的同源基因, 过表达该 $afsR$ 同源基因时, 能够引起波赛链霉菌中阿霉素 (Doxorubicin)、变铅青链霉菌中放线紫红素、棒状链霉菌中克拉维酸和灰色链霉菌 *Streptomyces griseus* 中链霉素 (Streptomycin) 的高表达^[22], 表明 $afsR$ 可能对多种链霉菌中的多种抗生素都有正调节作用。我们早期研究中发现来源于棒状链霉菌的 $afsRS_{cla}$ 能够激活变铅青链霉菌沉默的放线紫红素、钙依赖性抗生素和棒状链霉菌全霉素的生物合成, 并大幅度提高克拉维酸的产量^[16]。这是在野生型链霉菌中的情况。

本研究运用基因工程的方法改造了纳他霉素工业菌株褐黄孢链霉菌 TZ1401, 把棒状链霉菌的全局性调控基因 $afsRS_{cla}$ 导入到 TZ1401 中, 摇瓶

发酵发现 $afsRS_{cla}$ 使纳他霉素产量提高 38%, 表明 $afsRS$ 对工业菌株的抗生素合成也具有促进作用。同时, qRT-PCR 结果表明, 含有 $afsRS_{cla}$ 的 TZ1401/pHL851 菌株纳他霉素基因簇的 6 个代表性基因其转录水平都有 2 倍左右的提高, 说明全局性调控基因 $afsRS_{cla}$ 通过正调控纳他霉素基因簇的表达水平, 从而提高纳他霉素的产量。

在前人研究基础上^[15,23], 推测 $afsRS_{cla}$ 提高纳他霉素合成的机理为: $afsR_{cla}$ 产物 AfsR 被蛋白激酶磷酸化, 磷酸化的 AfsR 的 DNA 结合能力和 ATPase 活性都增强, 磷酸化的 AfsR 结合到下游的 $afsS_{cla}$ 的启动子上形成封闭型的转录复合物, 利用 ATP 水解释放的能量, 将封闭型的转录复合物转变为开放的转录复合物, 从而诱导 $afsS_{cla}$ 的转录, AfsS 能够激活调控基因的转录, 包括途径特异性调控基因 $pimM$ 的转录, 进而促进纳他霉素生物合成基因的转录, 引起纳他霉素的高产。

基因工程育种可以有目的地改造菌株, 进行定向选育。随着对菌株遗传背景和代谢途径的充分了解, 基因工程育种势必成为菌株选育重要手段。据本研究结果, 全局性正调控基因 $afsRS_{cla}$ 可以应用于工业生产菌株, 这对于使用 $afsRS_{cla}$ 来提高其他抗生素工业菌株的产量有重要借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide Pimaricin. *J Biol Chem*, 1999, 274(15): 10133–10139.
- [2] Pedersen JC. Natamycin as a fungicide in agar media. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(3): 1064–1066.
- [3] el-Enshasy HA, Farid MA, el-Sayed el-SA. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J Basic Microbiol*, 2000, 40(5/6): 333–342.

- [4] Du YL, Chen SF, Cheng LY, et al. Identification of a novel *Streptomyces chattanoogensis* L10 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator ScnR11. *J Microbiol*, 2009, 47(4): 506–513.
- [5] Chen GQ, Lu FP, Du LX. Natamycin production by *Streptomyces gilvosporeus* based on statistical optimization. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(13): 5057–5061.
- [6] te Welscher YM, ten Napel HH, Balagué MM, et al. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *J Biol Chem*, 2008, 283(10): 6393–6401.
- [7] O'Day DM, Head WS. Advances in the management of keratomycosis and Acanthamoeba keratitis. *Cornea*, 2000, 19(5): 681–687.
- [8] Vicente CM, Santos-Aberturas J, Guerra SM, et al. PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimarinin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb Cell Fact*, 2009, 8(1): 33.
- [9] Kim BS, Cropp TA, Beck BJ, et al. Biochemical evidence for an editing role of thioesterase II in the biosynthesis of the polyketide pikromycin. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48028–48034.
- [10] Aparicio JF, Caffrey P, Gil JA, et al. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(3): 179–188.
- [11] Martín JF, Aparicio JF. Enzymology of the polyenes pimarinin and candicidin biosynthesis. *Methods Enzymol*, 2009, 459: 215–242.
- [12] Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, et al. AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol*, 2007, 369(2): 322–333.
- [13] Matsumoto A, Hong SK, Ishizuka H, et al. Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene*, 1994, 146(1): 47–56.
- [14] Sawai R, Suzuki A, Takano Y, et al. Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 2004, 334: 53–61.
- [15] Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1413–1430.
- [16] Chen L, Wang Y, Guo H, et al. High-throughput screening for *Streptomyces* antibiotic biosynthesis activators. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(12): 4526–4528.
- [17] Kieser T, Bibb M, Buttner M, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation Press, 2000.
- [18] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, 116(1): 43–49.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [20] Horinouchi S, Hara O, Beppu T. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*, 1983, 155(3): 1238–1248.
- [21] Horinouchi S, Beppu T. Production in large quantities of actinorhodin and undecyl-prodigiosin induced by *afsB* in *Streptomyces lividans*. *Agric Biol Chem*, 1984, 48(8): 2131–2133.
- [22] Parajuli N, Viet HT, Ishida K, et al. Identification and characterization of the *afsR* homologue regulatory gene from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952. *Res Microbiol*, 2005, 156(5): 707–712.
- [23] Horinouchi S. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30(8): 462–467.

(本文责编 陈宏宇)