

综述

微生物发酵法生产灵菌红素研究进展

尤忠毓, 王玉洁, 孙诗清, 刘晓侠

嘉兴学院 生物与化学工程学院, 浙江 嘉兴 314001

尤忠毓, 王玉洁, 孙诗清, 等. 微生物发酵法生产灵菌红素研究进展. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1332–1347.

You ZY, Wang YJ, Sun SQ, et al. Progress in microbial production of prodigiosin. Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1332–1347.

摘要: 灵菌红素是一种微生物次级代谢产生的重要天然红色素, 在医药开发、环境治理和染料制备等领域具有巨大的潜在应用价值。文中从3个方面归纳了国内外关于灵菌红素的研究进展: 产灵菌红素微生物的发现与改造; 灵菌红素发酵与提取过程的控制与优化; 灵菌红素生物合成途径及其转录调控机制的解析。最后, 讨论了微生物发酵法生产灵菌红素今后的研究方向。

关键词: 灵菌红素, 发酵生产, 菌株选育, 优化控制, 合成途径, 转录调控

Progress in microbial production of prodigiosin

Zhongyu You, Yujie Wang, Shiqing Sun, and Xiaoxia Liu

College of Biological, Chemical Sciences and Engineering, Jiaying University, Jiaying 314001, Zhejiang, China

Abstract: Prodigiosin is an important natural red pigment that is produced as a secondary metabolite by microorganisms, and has great potential applications in the field of pharmaceutical development, environmental management and dye preparation. This paper reviews recent research progress in the production of prodigiosin by microbial fermentation, including discovery and modification of the prodigiosin-producing microorganisms, regulation and optimization of prodigiosin fermentation and extraction process, and resolution of biosynthetic pathway of prodigiosin and related transcriptional regulation. Finally, we discussed the future research directions in microbial production of prodigiosin.

Keywords: prodigiosin, fermentation, strain breeding, optimization and regulation, synthesis pathway, transcriptional regulation

Received: January 19, 2016; **Accepted:** April 18, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31100053), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LQ14C050002), Public Welfare Technology Applied Research Projects of Zhejiang Province (No. 2014C31046), Open Project of Key Laboratory of Yarn Material Molding and Composite Processing Technology of Zhejiang Province (No. MTC2014-007), Project of Jiaying Science and Technology (No. 2014BY15001).

Corresponding author: Xiaoxia Liu. Tel: +86-573-83646246; E-mail: sunliuwx@163.com

国家自然科学基金 (No. 31100053), 浙江省自然科学基金 (No. LQ14C050002), 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (No. 2014C31046), 浙江省纱线材料成型与复合加工技术研究重点实验室开放项目 (No. MTC2014-007), 嘉兴市科技项目 (No. 2014BY15001) 资助。

灵菌红素类色素 (Prodigiosins, PGs) 是一类具有 3 个吡咯环的甲氧基吡咯骨架结构的天然红色素, 它们是某些沙雷氏菌、放线菌及海洋细菌的次级代谢产物^[1]。因其烷基侧链的不同分为多种结构类似物, 包括灵菌红素 (Prodigiosin, PG)、十一烷基灵菌红素 (Undecylprodigiosin, UP)、环烷基灵菌红素 (Cycloprodigiosin)、间环丙菌素 (Metacycloprodigiosin)、链玉红菌素 B (Streptorubin B) 等^[1-2]。其中灵菌红素是该类色素的典型代表之一, 其外观为暗红色粉末, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮等极性较大的有机溶剂, 几乎不溶于水, 在不同 pH 条件下可以呈现出不同的颜色^[3-4]。研究发现, 灵菌红素具有抗细菌、抗真菌、抗疟疾、抗原生动物、抗癌、免疫抑制等重要生物活性^[1-2], 可用于特效的免疫抑制剂和抗菌、抗癌等药物的开发; 而且灵菌红素对藻类的生长有明显的抑制作用, 在治理由各种藻类造成的海洋赤潮和淡水水华等方面表现出极佳的效果, 且无二次污染^[5-6]; 此外, 灵菌红素作为微生物来源的天然色素, 用作生态染料, 具有良好的色牢度和上染率, 有望推动传统染料工业乃至纺织工业的技术变革^[7-8]。近来研究还发现由于灵菌红素对光敏感, 可作为防晒霜等化妆品的添加剂, 减小紫外线对皮肤的损伤^[9]。因此灵菌红素在医药、环境治理、纺织染料乃至化妆品等领域具有广阔的应用前景和市场价值。

目前, 灵菌红素可以通过化学合成法和微生物发酵法制备^[2,10]。由于化学合成法相对困难, 反应步骤多, 产率低, 因此难以实现大规模的生产; 而微生物发酵法生产灵菌红素具有环境友好、条件温和、成本低和易于工业化等优点, 因此, 近年来采用微生物发酵法生产灵

菌红素已成为国内外研究的热点。本实验室也从自然界筛选到了 1 株产灵菌红素的菌株^[3,11], 并开展了菌种的诱变育种^[12]、发酵及提取工艺优化^[13]、灵菌红素的抗菌及染色性能研究^[14-15]、灵菌红素合成关键酶的克隆表达^[16]等研究工作, 取得了一定的研究成果。本文在实验室前期研究的基础上, 结合前人对灵菌红素生物合成的研究, 就产灵菌红素菌株的选育、发酵及提取工艺的优化、灵菌红素生物合成途径及相关基因的表达调控等方面进行综述, 以促进微生物发酵法生产灵菌红素的研究进程。

1 产灵菌红素微生物的发现与改造

1.1 产灵菌红素的天然微生物

自然界中能合成天然色素的微生物很多, 但是产灵菌红素的微生物种类并不多, 主要包括沙雷氏菌属 *Serratia*^[17]、河氏菌属 *Hahella*^[18]、假单胞菌属 *Pseudomonas*^[19]、弧菌属 *Vibrio*^[20] 等。其中研究最广泛的是粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*, 该菌又名灵杆菌, 是一种常见的革兰氏阴性杆菌, 灵菌红素最早于 1902 年从该菌中发现^[21]。笔者实验室从土壤中筛选到 1 株 *S. marcescens* jx1, 经培养条件优化后其灵菌红素产量可达 5.1 g/L^[22]。表 1 中列举了其他多种 *S. marcescens* 及其产灵菌红素的水平。除 *S. marcescens* 外, 还有多种海洋微生物也具有产灵菌红素的能力, 例如, Kim 等从海洋中筛选到 1 株河氏菌 *Hahella chejuensis* KCTC 2396, 该菌经培养可得到 0.028 g/L 的灵菌红素^[18]。从表 1 中可以看出, 海洋微生物的灵菌红素产量普遍低于 *S. marcescens*, 因此, *S. marcescens* 将是发酵法生产灵菌红素的首选微生物。

表 1 灵菌红素产生菌

Table 1 Strains for prodigiosin production

Sources	Strains	Prodigiosin yield (g/L)	References
Salt marsh	<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	NR	[17]
Mandarin fish intestine	<i>Serratia marcescens</i> HFUT 1301	3.22	[23]
Soil	<i>Serratia marcescens</i>	0.535	[24]
Pangola grass compost	<i>Serratia marcescens</i> CFFSUR-B2	0.06	[25]
Spoiled coconut	<i>Serratia rubidaea</i>	<0.01	[26]
Sea	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	0.028	[18]
Sea	<i>Pseudomonas</i> sp.	≈0.07	[19]
Sea	<i>Vibrio ruber</i> sp.	NR	[20]
Sea	<i>Zooshikella rubidus</i> S1-1	0.048	[27]

NR: not reported.

1.2 高产菌株的选育

野生型菌株的灵菌红素产量较低,不具备大规模生产的能力,从而很难走出实验室,若要真正利用灵菌红素,必须在高产菌株的选育上有所突破,表 2 列举了部分灵菌红素产生菌的诱变育种效果。紫外诱变是一种传统而经典的物理诱变方法,该方法操作简便,成本低,常用于微生物菌种的改良。Tao 等将 *S. marcescens* 的细胞悬液在紫外下照射 20 s,经培养、筛选得到 1 株灵菌红素产量提高 2.8 倍的突变株^[28]。相对于紫外诱

变而言,微波诱变是一种较新的且具有显著成效的物理诱变技术,笔者实验室利用微波诱变技术对 *S. marcescens* jx1 进行了诱变处理,使该菌的灵菌红素产量从 3.1 g/L 提高至 6.5 g/L^[12]。

烷化剂是一类高效的化学诱变剂,它可引起 DNA 分子的部分烷化,使 DNA 在复制过程中发生错配而产生突变,常见的烷化剂有甲基磺酸乙酯 (EMS)、亚硝基胍 (NTG) 和硫酸二乙酯 (DES) 等。Kim 等以 EMS 为诱变剂,对灵菌红素产生菌 *H. chejuensis* KCTC 2396 进行

表 2 灵菌红素产生菌的诱变育种

Table 2 Mutation breeding of prodigiosin production strains

Strains	Mutagenic agents	Change of prodigiosin yield	References
<i>S. marcescens</i>	UV	Increased to 2.8-fold	[28]
<i>S. marcescens</i> RZ21	UV	Increased to 1.25-fold	[32]
<i>S. marcescens</i>	UV	Increased to 3.15-fold	[33]
<i>S. marcescens</i> jx1	Microwaves	Increased to 2.1-fold	[12]
<i>S. marcescens</i>	EMS	Increased to 7.44-fold	[33]
<i>H. chejuensis</i> KCTC 2396	EMS	Increased to 2.5-fold	[29]
<i>V. gazogenes</i>	Methyl nitrosoguanidine	Increased to 1.81-fold	[30]
<i>Serratia</i> sp.W0206	UV-LiCl	Increased to 3-fold	[31]

了处理,经平板筛选、液体培养发现其灵菌红素产量从 0.658 g/L 提高至 1.628 g/L^[29]。Alihosseini 等利用 1-甲基-3-硝基-1-亚硝基胍对 *Vibrio gazogenes* 进行诱变育种,使其灵菌红素产量提高了 81%^[30]。

此外,多种诱变剂的复合使用也是提高突变率的有效方法,陶金莉等通过 UV-LiCl 复合处理 *S. marcescens* 并利用高浓度的葡萄糖定向筛选抗葡萄糖分解代谢物阻遏的高产株,最终获得 1 株产量提高了 3 倍的突变株^[31]。综上所述,从自然界筛选新菌种、菌种诱变育种是提高灵菌红素产量的重要方法,结合新兴的微生物育种技术(如基因工程育种等)进一步选育出高产菌株是今后育种的重要方向。

2 灵菌红素的发酵及提取工艺

众所周知,微生物发酵产品的生产除了良好的菌种外,优良的发酵工艺也是必不可少的。为了进一步提高灵菌红素的产量,有必要对发酵过程进行优化和控制研究,包括培养基组分、培养过程参数和培养模式等。同时,发酵过程结束后,灵菌红素的分离纯化过程是影响其质量的关键因素,也是决定其生产成本的最主要因素。因此,国内外研究者在灵菌红素发酵和提取工艺方面做了大量研究工作。

2.1 培养基组分的优化

培养基为微生物的生长和代谢产物的合成提供足够的营养和能量。对于灵菌红素的发酵生产,不同菌种对培养基组分的需求也不尽相同,研究人员常采用基于统计分析的方法设计理想的培养基配方,以获得最大的灵菌红素产量。例如:Su 等利用响应面法对 *S. marcescens* 的培养基组分进行了优化,结果表明,该菌的

最优培养基组分为:0.5%蔗糖、0.454%蛋白胍、0.5%甘氨酸和 1 626.3 ppm KH_2PO_4 ,在最佳培养条件下,该菌的灵菌红素产量达 2.423 g/L,比其初始产量提高了 8.42 倍^[34]。Kim 等利用 Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken 设计优化了 *H. chejuensis* KCTC 2396 的培养基,最终使其灵菌红素产量提高了 3 倍^[35]。

在培养基组分优化过程中,研究人员发现某些特殊物质的添加可以增加灵菌红素的产量。如:含脂肪酸类的物质在灵菌红素发酵生产中发挥着重要的作用,其中作用最为明显的是花生粉。Giri 等以花生粉培养基代替营养肉汤培养基时,*S. marcescens* 产灵菌红素的水平从 0.52 g/L 迅速上升至 38.75 g/L,该产量提升的关键因素是花生粉中含有大量的饱和脂肪酸,而饱和脂肪酸有助于 *S. marcescens* 合成灵菌红素^[36]。有研究表明,脯氨酸、色氨酸和组氨酸等含有吡咯结构的氨基酸可以作为前体物质加入培养基中,有利于促进灵菌红素的合成。Siva 等的研究显示,脯氨酸单独或与甲硫氨酸组合使用,可以让 *S. rubidaea* 的灵菌红素产量提高数倍^[26]。此外,笔者实验室在优化 *S. marcescens* 发酵过程时发现当发酵培养基中添加 0.1 g/L 的二甲基亚砜时,灵菌红素的产量可以提高近 1 倍,分析其原因可能是二甲基亚砜增加了细胞膜的通透性,使其从细胞内分泌至细胞外,减少了灵菌红素在细胞内积累,从而解除了反馈调节,提高了灵菌红素的产量^[37]。

为了进一步降低生产成本,有效利用各类资源,研究人员还不断致力于寻找更廉价高效的培养基。de Araujo 等考察了木薯废水和玉米浸出液对 *S. marcescens* UCP 1549 产灵菌红素的影响,结果发现利用 6%木薯废水和 2%甘露醇为

培养基时,该菌的灵菌红素产量可达 49.5 g/L,这是目前文献报道中灵菌红素的最高产量^[38]。Sumathi 等从以制革厂产生的废肉为食的鱼类肠道中筛选到 1 株 *S. marcescens*,该菌可以在制革废肉培养基中生长并合成灵菌红素,在最佳培养条件下,其灵菌红素的产量可达约 48 g/L^[39]。笔者实验室也探索了利用硫酸软骨素生产过程中产生的废蛋白代替蛋白胨来培养 *S. marcescens*,在适当浓度下有利于灵菌红素产量的提高(结果待发表)。由此可以看出,利用工农业废弃物作为培养基原料发酵生产灵菌红素是有效降低成本、合理利用资源的理想途径。

2.2 发酵参数与发酵模式的优化

发酵参数(如温度、pH 等)对微生物合成灵菌红素有着重要的影响,其中温度对沙雷氏菌属产灵菌红素的影响最为显著。该菌属产灵菌红素的过程属于温度敏感型,当温度低于 30 °C 时,其产灵菌红素的能力较强,温度高于 37 °C,其基本不产色素。多数研究表明,*S. marcescens* 产灵菌红素的最佳温度为 28 °C^[26,36,38]。为了探究温度对灵菌红素合成的影响机理,徐虹等分析了 *S. marcescens* JNB5-1 在不同温度下的蛋白表达差异,结果发现在高温(37 °C)培养下,参与灵菌红素合成的相关蛋白(酶)表达量显著下降,从而降低了灵菌红素的产量^[40]。还有研究指出,*S. marcescens* TKU011 PG 的最适生长温度和最适产色素温度有一定差别,作者将菌体生长温度设为 30 °C,灵菌红素合成温度设为 25 °C,其灵菌红素产量比恒定 30 °C 条件下有明显提高^[41]。该研究还考察了溶氧对灵菌红素发酵的影响,当采用含挡板的锥形瓶代替普通锥形瓶进行发酵时,灵菌红素的产量从 0.84 g/L 提高至 2.48 g/L^[41],由此可以看出,在其他条件确定的情况下,适当提高溶

氧可以增加灵菌红素的产量。因此对氧传递的进一步研究对灵菌红素的发酵具有促进作用,特别是在发酵规模放大过程中对溶氧的控制具有指导意义。

液体分批培养是微生物发酵最常用的培养策略之一,也是实验室发酵灵菌红素所采用的基本培养模式。但是,灵菌红素的生产也可采用固体发酵的模式,如:Miao 等比较了 *Serratia proteamacula* 657 的液体培养和固体培养过程,发现两者的灵菌红素产量分别为 0.07 g/L 和 0.18 g/L^[42]。此外,在微生物次级代谢产物生产过程中,分批补料发酵策略也常用于提高产物的产量。Tao 等将该策略应用于灵菌红素的发酵,使菌体的生长和色素的合成分成两个阶段:第一阶段,以葡萄糖为主要碳源,有利于细胞的生长;第二阶段,通过补料的方式向培养基中添加甘油,促进灵菌红素的合成。在该策略的作用下,灵菌红素的产量比初始产量提高了 7.8 倍^[28]。另外还有一些不同的细胞培养模式用于灵菌红素的发酵,例如:固定化细胞培养等。Chen 等首先将 *S. marcescens* C3 在液体培养基中培养至 $OD_{600}=10$,离心收集菌体后包埋于海藻酸钙凝胶小球中继续发酵,最终色素的产量比对照组提高了近 2 倍,达 15.6 g/L^[43]。Bae 等开发了一套新的一体式生物反应器,该反应器不仅提高了灵菌红素的产量,而且还简化了色素的分离步骤。其主要特点是:反应器内部包含 1 个由不锈钢滤网制成的平台,平台内填充聚合树脂用于吸附发酵过程中产生的色素,结果该反应器中灵菌红素的产量达 13.1 g/L,比普通反应器提高了 2.6 倍^[44]。

2.3 灵菌红素的分离纯化

在微生物发酵过程中灵菌红素主要存在于

细胞内,特别是附着在细胞膜上,因此需要经过一系列的分离纯化过程才能得到高质量的产品。目前,灵菌红素的分离方法主要包括有机溶剂提取法和树脂吸附法。有机溶剂提取法常用的试剂包括甲醇、丙酮、乙酸乙酯和氯仿等。Chen 等将发酵液与甲醇混合振荡,离心收集上清,浓缩后经氯仿萃取得到灵菌红素粗品^[43]。如此直接抽提发酵液会使液体的处理量增大,Juang 等开发了一种以截留分子量为 1 kDa 的再生纤维素膜为材料,对甲醇抽提液进行超滤浓缩的方法,该方法可以使抽提液浓缩 4 倍,回收率为 81%^[45]。为了减少液体处理量,也可将发酵液离心后直接从细胞中抽提灵菌红素。笔者实验室对利用超声辅助提取 *S. marcescens* jx1 细胞中灵菌红素的条件进行了研究,结果发现以酸性丙酮为溶剂(用量为 27.2 mL/g 细胞),在 23.4 °C 条件下提取 17.5 min 可以获得最好的提取效果^[13]。

树脂吸附法主要利用树脂对灵菌红素的物理吸附作用,从发酵液中分离灵菌红素。但灵菌红素的水溶性差,在树脂吸附过程中仍需有机溶剂或表面活性剂的参与。Juang 等利用明矾和甲醇对 *S. marcescens* SMDR 的发酵液进行预处理,去除菌体后的清液用大孔树脂 HP-20 进行吸附,最后用含 90% 甲醇和 10% 0.2 mol/L HCl 的混合液进行洗脱得到灵菌红素样品,该研究还发现树脂 HP-20 对灵菌红素的吸附过程是自发的放热过程($\Delta H = -1.78$ kJ/mol),仅受疏水作用的影响^[46]。Wang 等利用树脂 X-5 建立了灵菌红素发酵与分离相耦联的系统,该系统主要由发酵罐、泵和吸附柱组成,当发酵进行 20 h 后,发酵液经泵在吸附柱和发酵罐间循环,直至发酵结束,从吸附柱上洗脱得到灵菌红素,该耦联系统不仅免去了细胞分离的步骤,而且直接获得一

定纯度的灵菌红素,该过程的总收率达 83%^[47]。

3 灵菌红素的合成途径及基因调控

关于灵菌红素在微生物细胞内的合成途径、相关基因及代谢调控一直是科研人员努力研究的方向,以期能为灵菌红素的工业生产提供足够的理论依据。目前普遍认为灵菌红素的合成主要是由 *pig* 基因簇控制,通过两个分支途径共同完成,这两个分支途径分别合成灵菌红素的两个前体物质(2-甲基-3-戊基吡咯(MAP)和 4-甲氧基-2,2-二吡咯-5-羧甲基乙醛(MBC)),两者再经一步缩合反应生成灵菌红素^[17]。下面将对灵菌红素的合成基因簇、合成途径及相关基因调控机制进行详细讨论。

3.1 合成基因簇

到目前为止,已有多个微生物的灵菌红素合成基因簇被克隆、表达并测序,包括 *Serratia* sp. ATCC 39006 (S39006)、*S. marcescens* ATCC 274 (Sma274)、*H. chejuensis* KCTC 2396 (Hch2396) 和詹森杆菌 *Janthinobacterium lividum* strain BR01 (JliBR01) 等^[17,48-49]。其中 Hch2396 的基因簇命名为 *hap* 基因簇,其他 3 种微生物的基因簇均命名为 *pig* 基因簇。此外,*S. marcescens* FS14 和 *S. marcescens* WW4 的 *pig* 基因簇也被测序鉴定,其结构与 Sma274 的 *pig* 基因簇非常相似^[50]。*hap* 基因簇和 *pig* 基因簇均包含 13-15 个与灵菌红素合成密切相关的基因(如 S39006 的 *pigA-pigO*),如图 1 所示。通过对这些基因的序列比对发现,尽管来自不同的微生物,但它们之间仍保持一定的序列相似性,其中, S39006 和 Sma274 的 *pig* 基因簇相似性高达 56.0%,相似性最低的是 S39006 和 Hch2396 的基因簇,仅为 28.4%,其余的相似性均在 30%-40% 之间。

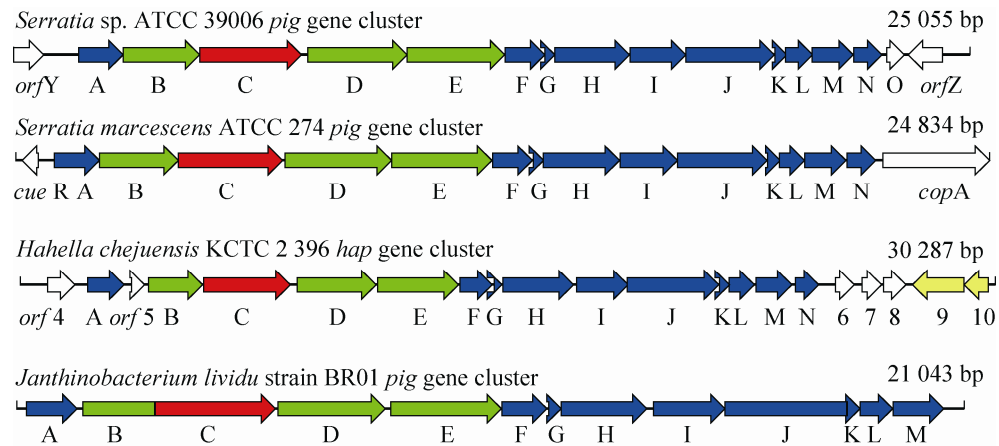


图 1 灵菌红素合成基因簇^[17,48-49]

Fig. 1 Comparison of the gene clusters for prodigiosin biosynthesis^[17,48-49]. Genes that encode proteins required for the biosynthesis of MBC are showed in blue. Genes that encode proteins required for the biosynthesis of MAP are showed in green. Red block arrows show genes encoding the condensing enzyme.

在基因的构成上，各个基因簇存在一定的差异，S39006的 *pig* 基因簇在 3'端比其他基因簇多一个 *pigO* 基因，而且在其他基因簇中未发现同源基因，Harris 等研究发现，*pigO* 并不直接参与灵菌红素的合成，而是起到一定的调控作用^[17]。此外，S39006 *pig* 基因簇两端的基因 *orfY* 和 *orfZ* 也是该基因簇独有的，其中 *orfY* 编码的蛋白包含吡啶核苷酸二硫键氧化还原酶结构域，它与 NADH 氧化酶有较高的序列相似性，而 *orfZ* 的功能仍然未知^[17]。Sma274 的 *pig* 基因簇两端则是 *cueR* 和 *copA* 基因，Williamson 等研究发现，*cueR* 和 *copA* 与细胞内铜稳态平衡有关，当 *copA* 发生突变时，突变菌株对铜离子更加敏感，而且灵菌红素的产量得到提升，因此可以看出 *copA* 对灵菌红素的合成具有调节作用^[51]。在 Hch2396 的 *hap* 基因簇的 3'末端存在两个转录方向与 *hap* 基因簇相反基因 (*orf9* 和 *orf10*)，它们与 *Vibrio vulnificus* 的组氨酸激酶和应答调控子具有较高的同源性，因此，认为这两

个基因可以调控 Hch2396 合成灵菌红素^[48]。JliBR01 的 *pig* 基因簇与其他基因簇最大的区别是，*pigB* 与 *pigC* 及 *pigJ* 与 *pigK* 以融合基因的形式存在，且在该基因簇中缺少 *pigN* 基因^[49]。

在获得灵菌红素合成基因簇序列的基础上，研究人员对基因簇中各基因所编码的蛋白质进行了序列分析及功能研究。Williamson 等对 S39006 *pig* 基因簇中各基因进行基因敲除或片段插入以构建相应的突变体，再通过液质联用 (LC-MS)、营养共生 (Cross-feeding) 及遗传互补 (Genetic complementation) 的方法分析各突变体发酵过程中产生的中间产物，从而确定各基因编码的蛋白在灵菌红素合成过程中的作用，结果发现 *PigB*、*PigD* 和 *PigE* 参与了 MAP 的合成，*PigA*、*PigF*、*PigG*、*PigH*、*PigI*、*PigJ*、*PigM* 和 *PigN* 参与了 MBC 的合成，而 MBC 和 MAP 的缩合反应则由 *PigC* 催化实现，其中各蛋白的功能见表 3^[52]。在上述蛋白中不包括 *PigK* 和 *PigL*，因为两者并未直接参与灵菌红素的合

成,其中 PigK 的作用是充当分子伴侣,协助一种或多种参与合成 MBC 的 Pig 蛋白进行正确折叠;PigL 的序列同源性分析显示该蛋白是一种 4⁺-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,而在 MBC 合成过程中存在磷酸泛酰巯基乙胺基的转移,在 MAP 合成时则不存在该转移过程,因此将 PigK 和 PigL 归属于 MBC 的合成途径^[52]。Sma274、Hch2396 和 JliBR01 的基因簇所编码的蛋白与 S39006 的相应 Pig 蛋白相比,其序列的一致性远远高于核酸序列的一致性(表 3),因此,它们与 S39006 的 Pig 蛋白具有较高的同源性,在蛋白的功能上也与 S39006 的 Pig 蛋白保持一致^[17,48-49]。

除了对 *pig/hap* 基因簇所编码的蛋白进行系统性研究外,研究人员也对其中的某些蛋白进

行了深入的研究。例如,PigC 作为最终合成灵菌红素的关键酶,通过序列比对发现其包含 ATP 结合域和磷酸转移域,Chawrai 等对 *Serratia* 39006 的 PigC 和 *H. chejuensis* 的 HapC 进行了克隆表达,并利用定点突变技术证实了在 PigC 中,Glu-281、Arg295 和 His-840 是该酶结合 ATP 及催化磷酸转移的关键氨基酸残基;底物特异性研究发现 PigC 除能够催化 MAP 和 MBC 的缩合反应外,还可以催化两者的结构类似物之间的缩合反应,最终生成灵菌红素结构类似物,为合成新的灵菌红素类色素提供了理论基础^[53-54]。此外,包括 PigE、PigF、PigI 和 HapK 在内的多个蛋白的晶体结构得到解析^[55-58],从而能够更好地理解该蛋白在灵菌红素合成过程中的作用。

表 3 灵菌红素合成基因簇编码蛋白的功能

Table 3 Functions and homologues of the gene products from the gene clusters for prodigiosin biosynthesis

Protein	Function	Pathway	Comparison of homologous proteins (identity %)**		
			Pig (Sma274)	Hap (Hch2396)	Pig (JliBR01)
PigA	L-prolyl-PCP dehydrogenase	MBC	79.0	50.3	51.0
PigB	H ₂ MAP oxidase/dehydrogenase	MAP	71.3	39.3	41.0
PigC	Condensing enzyme	Terminal step	74.7	47.6	52.0
PigD	3-Acetyloctanal synthase	MAP	82.8	50.3	52.9
PigE	3-Acetyloctanal aminotransferase	MAP	85.2	58.2	60.7
PigF	HBC O-methyl transferase	MBC	82.8	58.7	58.2
PigG	Peptidyl carrier protein (PCP)	MBC	78.2	46.3	44.8
PigH	HBM synthase (seryl transferase)	MBC	77.0	53.4	55.6
PigI	L-prolyl-AMP ligase	MBC	67.1	41.1	39.5
PigJ	Pyrrolyl-b-ketoacyl synthase	ACP	67.3	22.9	28.6
PigK	Unknown	MBC	71.2	45.2	45.3
PigL	4 ⁺ -Phosphopantetheinyl transferase	MBC	45.6	17.5	20.1
PigM	HBM oxidase/dehydrogenase	MBC	59.9	29.0	26.7
PigN	Oxidoreductase*	MBC	76.9	55.4	/
PigO	Unknown	None	/	/	/

*It was putative function from sequence homology. **Percentage of identity was obtained by aligning the deduced amino acid sequences using CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

3.2 生物合成途径

3.2.1 MAP 的合成

MAP 的合成途径如图 2 所示。该途径以脂肪酸合成或不饱和脂肪酸自氧化过程中产生的 2-辛烯醛为起始前体，在 PigD 的作用下与丙酮酸反应，其中，PigD 与乙酰乳酸合成酶同源，可以催化丙酮酸脱羧，并将脱羧后的 2C 单元与 2-辛烯醛结合生成 3-Acetyloctanal；再由具有氨基转移活性的 PigE 催化合成氨基酮，氨基酮自环化形成环亚胺 H₂MAP；最后，H₂MAP 在 PigB 的催化下氧化脱氢形成 MAP。

3.2.2 MBC 的合成

MBC 的合成以 L-脯氨酸为起始底物，在 PigI 的作用下，L-脯氨酸酰基与 PigG 中的巯基结合形成复合物 L-脯氨酸酰基-S-PigG，再经 PigA 的催化下氧化脱氢得到吡咯-2-羧基-S-PigG，然后吡咯-2-羧基单元从 PigG 转移至 PigJ 活性中心的半胱氨酸得到吡咯-2-羧基-S-PigJ，同时 PigH 从一分子丙二酰辅酶 A 中夺取了丙二酰基，形

成了复合物丙二酰基-S-PigH，该复合物脱羧后进攻吡咯-2-羧基-S-PigJ 的硫酯键，生成了一种与 PigH 相连接的吡咯-β-酮基硫酯复合物，在 PigH 的作用下吡咯-β-酮基硫酯与丝氨酸反应生成 4-羟基-2,2'-二吡咯-5-甲醇 (HBM)，HBM 在 PigM 的催化下羟基被氧化成醛基得到 4-羟基-2,2'-二吡咯-5-甲醛 (HBC)，最后，HBC 的羟基在 PigF 和 PigN 的作用下被甲基化生成 MBC，合成途径如图 2 所示。

3.2.3 MAP 与 MBC 的缩合

灵菌红素合成的最后一步即为 MAP 和 MBC 的缩合，催化该反应的酶是 PigC，反应过程如图 2 所示^[10,52]。Chawrai 等对该过程的反应机理进行了解析：MBC 和 ATP 首先与 PigC 相结合，分别进入该酶的催化中心及 ATP 结合域，然后 PigC 的磷酸转移域夺取 ATP 的磷酸基团，结合了磷酸基团的转移域进攻 MBC 的醛基，使醛基活化后，MAP 进入催化中心与 MBC 发生缩合反应，最终生成灵菌红素并释放出磷酸基团^[54]。

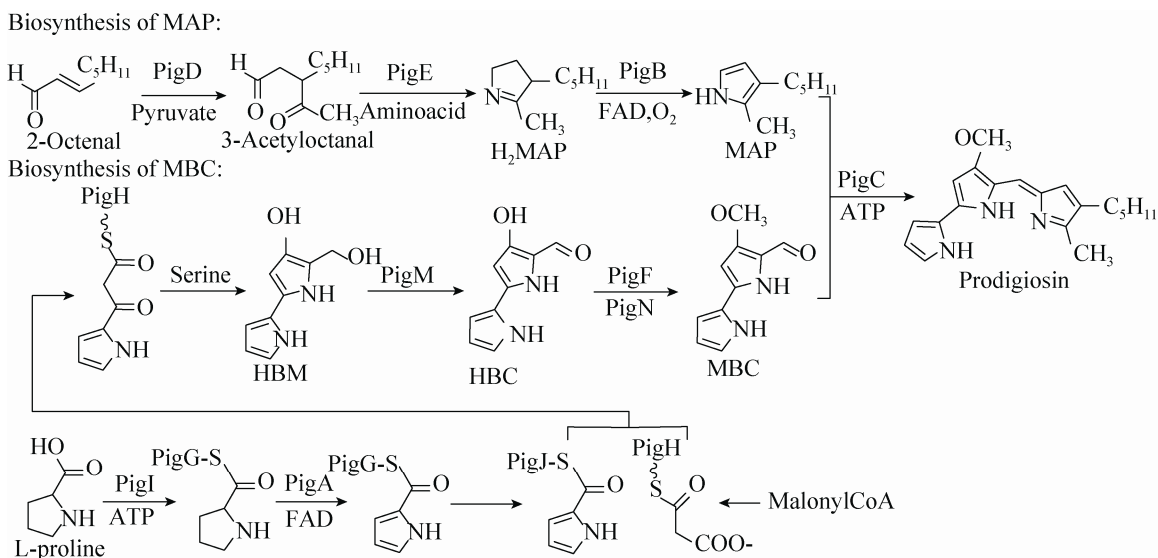


图 2 灵菌红素的合成途径^[10,17,48,52]

Fig. 2 The biosynthetic pathway of prodigiosin^[10,17,48,52].

3.3 合成基因簇的转录调控

灵菌红素合成基因簇的转录受多种因素联合调控，包括微生物本身的多个基因表达调控系统：群体感应系统和双组分系统，此外还包括多种调控蛋白。各调控系统和调控蛋白的作用及相互之间的联系如图 3 所示。

3.3.1 群体感应系统

群体感应 (Quorum sensing) 是细菌根据自身的细胞密度变化进行基因表达调控的系统，其基本原理是细菌通过感受自身在繁殖过程中分泌的某种信号分子，当该信号分子达到一定阈值时，细菌会启动某些基因的表达^[59]。研究

表明，S39006 合成灵菌红素的过程受体感系统系统的调控，该系统主要由 *smaI* 和 *smaR* 两个基因组成，其中 *SmaI* 的作用是合成信号分子 N-酰基-高丝氨酸内酯类 (AHLs) 化合物，当细胞密度较小时，AHLs 浓度较低，*SmaR* 与 *pig* 基因簇相结合，从而抑制该基因簇的转录；随着细胞的生长，AHLs 的浓度不断增大，当 AHLs 浓度达到一定值时可以抑制 *SmaR* 结合 DNA 的活性，使 *pig* 基因簇得到转录表达，细胞开始合成灵菌红素^[60-62]。在 *S. marcescens* SS-1 合成灵菌红素的过程中 *SpnI* 和 *SpnR* 构成了其群体感应系统^[63]。

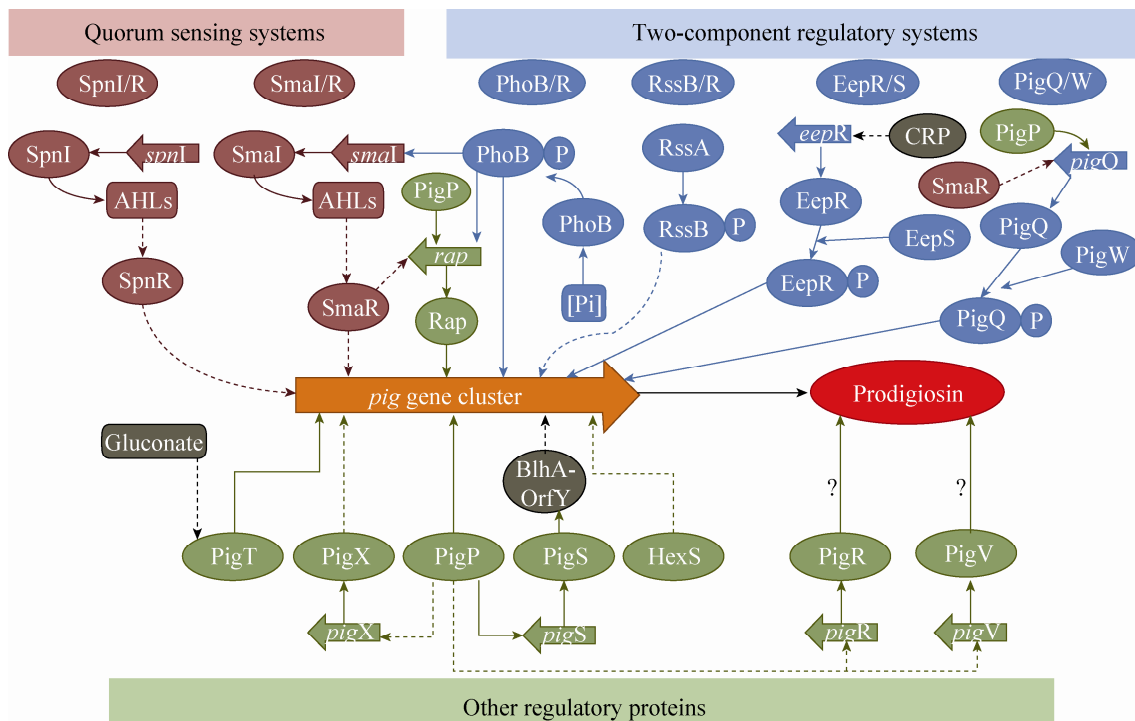


图 3 灵菌红素合成基因簇的转录调控

Fig. 3 The transcriptional regulation of the prodigiosin biosynthetic gene cluster. The solid line arrows represent activation. The dotted line arrows represent suppression.

3.3.2 双组分系统

双组分系统(Two-component regulatory systems)是微生物为适应不同的环境变化而建立的基因表达调控体系,该系统主要由传感器激酶蛋白和应答调节蛋白组成^[64]。研究发现,灵菌红素的合成至少受4个双组分系统的调控:PigQ/PigW、PhoB/PhoR、RssB/RssA和EepR/EepS。Fineran等研究表明,在PigQ/PigW双组分系统中,PigW作为传感器激酶蛋白,PigQ作为应答调节蛋白,当PigW感应到某一生理信号时促使PigQ磷酸化,磷酸化的PigQ促进*pig*基因簇的转录,从而促进灵菌红素的合成。当*pigQ*和*pigW*发生突变时,*pig*基因簇的转录水平和灵菌红素的产量都有所下降,因此,认为PigQ/W双组分系统对灵菌红素的合成具有正调控作用^[62]。PhoB/PhoR是S39006合成灵菌红素的另一个正调控双组分系统,该系统与细胞内磷酸盐(Pi)含量有关^[65]。EepR/EepS是最新发现的一个具有正调控作用的双组分系统,其中EepR可以促进*pig*基因簇的转录,但是EepR的表达受环腺苷酸受体蛋白(cAMP receptor protein,CRP)的抑制,因此,对灵菌红素合成基因簇而言,CRP是一种间接负调控蛋白^[66]。在4个双组分系统中,RssB/RssA是唯一一个具有负调控作用的系统,其中的应答调节蛋白RssB磷酸化后会阻碍*pig*基因簇的转录^[67]。

3.3.3 其他调控机制

除了上述的调控系统外,灵菌红素合成基因簇的转录还受到多种蛋白的调节,主要包括PigP、PigT、PigX、HexS、PigS、PigR和PigV等,其中PigP是1个多功能转录调控因子,它不仅直接调节灵菌红素合成基因簇的转录,还对其他多种调控蛋白的转录具有调节作用^[62]

(图3)。PigT是一种GntR家族转录因子,可以促进*pig*基因簇的转录,但是当环境(培养基)中存在葡萄糖酸盐(Gluconate)时,PigT的DNA结合活力会被抑制,从而削弱其对*pig*基因簇转录的激活作用^[68]。PigX是一种环二鸟苷酸(c-di-GMP)磷酸二酯酶,包含一个GGDEF/EAL结构域,该结构域与细胞合成c-di-GMP有关。研究发现,当*pigX*发生突变时,细胞内PigA和PigF的表达水平显著提高,灵菌红素产量比野生型菌株提高350%,因此,PigX是一种灵菌红素合成基因簇转录抑制因子^[69]。HexS是LysR家族转录因子,对*pig*基因簇的转录起负调控作用,其主要调控机理是与*pigA*上游序列相结合,抑制*pig*基因簇的转录^[70]。PigS属于SmtB/ArsR家族的转录抑制因子,Gristwood等研究发现*pigS*基因两端含有两个独立的操纵子(*blhA-orfY*和*pmpABC*),该操纵子的表达产物会抑制灵菌红素的合成,而PigS可以抑制这两个操纵子的转录表达,因此,对于灵菌红素合成而言,PigS是一种间接正调控因子,同时,PigP对*pigS*的转录具有促进作用^[71]。此外,还包括PigR和PigV两种调控蛋白对灵菌红素的合成具有调节作用,其中PigR是一种腺苷酸环化酶,PigV是一种内膜蛋白,两者都可以促进灵菌红素的合成,但其作用机制尚未得到解析^[62]。

4 结论与展望

灵菌红素作为一种重要的天然色素,近年来随着灵菌红素的应用范围不断扩大,其巨大的市场潜力也不断显现,只有实现灵菌红素的大规模工业化生产才能满足人们对其的需求。目前灵菌红素的合成研究主要集中在微生物发酵方面,以上关于灵菌红素高产菌株选育、发

酵及提取工艺优化和生物合成途径及基因表达调控机制解析等方面的研究为灵菌红素的工业化生产奠定了坚实的基础。然而, 发酵法生产灵菌红素工业化进程的关键瓶颈在于较低的产量和产率, 为进一步加快微生物发酵法生产灵菌红素的进程, 今后的研究应该从以下几个方面展开: 1) 继续选育高产菌株: 目前灵菌红素的发酵研究主要集中在沙雷氏菌属, 自然界这个生物多样性巨大宝库尚未完全打开, 从自然界中筛选稳定高产的灵菌红素产生菌仍然是提高灵菌红素产量的有效方法; 2) 继续深入研究灵菌红素合成途径中的关键酶: 灵菌红素的生物合成涉及 10 多个酶的催化, 各个酶的催化机制及其在灵菌红素合成过程中的重要性并未完全揭示, 利用基因工程技术提高关键酶的活性有利于灵菌红素的产量; 3) 代谢工程改造: 目前, 代谢工程技术应用在微生物生产灵菌红素的研究鲜见报道, 通过代谢工程改造可以增强灵菌红素合成基因簇及其正调控因子的转录表达, 抑制或削弱负调控因子的表达, 从而有效提高微生物的灵菌红素产量; 4) 发酵和提取工艺优化: 继续优化灵菌红素发酵条件, 采用原位分离发酵技术提高灵菌红素的产率。

REFERENCES

- [1] Stankovic N, Senerovic L, Ilic-Tomic T, et al. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(9): 3841–3858.
- [2] Nisha, Kumar K, Kumar V. Prodigiosin alkaloids: recent advancements in total synthesis and their biological potential. *Rsc Adv*, 2015, 5(15): 10899–10920.
- [3] Liu XX, Tang W, Sun SQ, et al. Structural elucidation and stability of red pigment by a new strain of *Serratia marcescens* sub sp. jx1. *J Anhui Agric Univ*, 2010, 37(3): 488–492 (in Chinese). 刘晓侠, 唐威, 孙诗清, 等. 一株新粘质沙雷氏菌所产红色色素的结构鉴定及稳定性研究. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(3): 488–492.
- [4] Song MJ, Bae J, Lee DS, et al. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101(2): 157–161.
- [5] Liu BY, Wei DZ, Lu SR, et al. Algicidal activity of prodigiosin against harmful algae. *China Environ Sci*, 2010, 30(4): 477–482 (in Chinese). 刘伯雅, 魏东芝, 鲁思然, 等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究. *中国环境科学*, 2010, 30(4): 477–482.
- [6] Yang F, Wei HY, Li XQ, et al. Isolation and characterization of an algicidal bacterium indigenous to lake Taihu with a red pigment able to lyse *Microcystis aeruginosa*. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(2): 148–154.
- [7] Chauhan K, Dalsaniya P, Pathak H. Optimization of prodigiosin-type biochrome production and effect of mordants on textile dyeing to improve dye fastness. *Fiber Polym*, 2015, 16(4): 802–808.
- [8] Jissa GK, Ansu J, Philip K, et al. Marine bacterial prodigiosin as dye for rubber latex, polymethyl methacrylate sheets and paper. *Afr J Biotechnol*, 2013, 12(17): 2266–2269.
- [9] Suryawanshi RK, Patil CD, Borase HP, et al. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. *Int J Cosmetic Sci*, 2015, 37(1): 98–107.
- [10] Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(12): 887–899.
- [11] Liu XX, Chen XL, Hu XX. Bacterial strain for producing prodigiosin and method thereof: CN, 102002469A. 2011-04-06 (in Chinese). 刘晓侠, 陈晓丽, 胡星夏. 生产灵菌红素的菌株及其方法: CN, 102002469A. 2011-04-06.
- [12] Liu XX, Wang YJ, Sun SQ, et al. Mutant breeding

- of *Serratia marcescens* strain for enhancing prodigiosin production and application to textiles. *Prep Biochem Biotechnol*, 2013, 43(3): 271–284.
- [13] Sun SQ, Wang YJ, Xu W, et al. Optimizing ultrasound-assisted extraction of prodigiosin by response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 2015, 45(2): 101–108.
- [14] Liu XX, Qian C, Wang YJ, et al. Dyeing method of non-woven fabrics by employing prodigiosin: CN, 103981736A. 2014-08-13 (in Chinese).
刘晓侠, 钱程, 王玉洁, 等. 一种灵菌红素对无纺布的染色方法: CN, 103981736A. 2014-08-13.
- [15] Liu XX, Shen JJ, Wang YJ, et al. Biological dye containing prodigiosins, preparation method thereof and application thereof: CN, 102199366A. 2011-09-28 (in Chinese).
刘晓侠, 沈加加, 王玉洁, 等. 含有灵菌红素的生物染料、制备与应用: CN, 102199366A. 2011-09-28.
- [16] Liu XX, Wang YJ, Sun SQ. Condensing enzyme used in biosynthesis of prodigiosin: CN, 102653732A. 2012-09-05 (in Chinese).
刘晓侠, 王玉洁, 孙诗清. 用于灵菌红素生物合成的缩合酶: CN, 102653732A. 2012-09-05.
- [17] Harris AK, Williamson NR, Slater H, et al. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 11): 3547–3560.
- [18] Kim D, Lee JS, Park YK, et al. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J Appl Microbiol*, 2007, 102(4): 937–944.
- [19] Li HJ, Cai CH, Zhou YP, et al. The red pigments isolated from *Pseudomonas* sp. from the South China Sea. *Acta Sci Natur Univ Sunyatseni*, 2003, 42(3): 102–104 (in Chinese).
李厚金, 蔡创华, 周毅频, 等. 大亚湾海洋细菌 *Pseudomonas* sp. 中的红色素. *中山大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(3): 102–104.
- [20] Shieh WY, Chen YW, Chaw SM, et al. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(Pt 2): 479–484.
- [21] Bennett JW, Bentley R. Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv Appl Microbiol*, 2000, 47: 1–32.
- [22] Liu XX, Shen ZZ, Hu XX, et al. Identification and fermentation of the strain with high-yield red pigment and its structural elucidation. *Pharmaceut Biotechnol*, 2010, 17(3): 212–216 (in Chinese).
刘晓侠, 沈振忠, 胡星夏, 等. 一株红色素高产菌的鉴定、发酵及结构表征. *药物生物技术*, 2010, 17(3): 212–216.
- [23] Zhang DF, Yang PZ, Jiang ST. Identification of prodigiosin-producing *Serratia marcescens* HFUT1301 strain isolated from mandarin fish intestine. *Modern Food Sci Technol*, 2015, 31(6): 78–83 (in Chinese).
张丹峰, 杨培周, 姜绍通. 一株分离自鳊鱼肠道的粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) HFUT 1301 的鉴定及灵菌红素的分析. *现代食品科技*, 2015, 31(6): 78–83.
- [24] Sundaramoorthy N, Yogesh P, Dhandapani R. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *Indian J Sci Technol*, 2009, 2(10): 32–34.
- [25] Gutierrez-Roman MI, Holguin-Melendez F, Bello-Mendoza R, et al. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(1): 145–153.
- [26] Siva R, Subha K, Bhakta D, et al. Characterization and enhanced production of prodigiosin from the spoiled coconut. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166(1): 187–196.
- [27] Lee JS, Kim YS, Park S, et al. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(14): 4967–4973.
- [28] Tao JL, Wang XD, Shen YL, et al. Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch

- fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, 2005, 21(6/7): 969–972.
- [29] Kim SJ, Lee HK, Lee YK, et al. Mutant selection of *Hahella chejuensis* KCTC 2396 and statistical optimization of medium components for prodigiosin yield-up. *J Microbiol*, 2008, 46(2): 183–188.
- [30] Alihosseini F, Lango J, Ju KS, et al. Mutation of bacterium *Vibrio gazogenes* for selective preparation of colorants. *Biotechnol Prog*, 2010, 26(2): 352–360.
- [31] Tao JL, Shen YL, Wei DZ, et al. Mutagenicity of *Serratia* sp. W0206 producing prodigiosin. *Microbiol China*, 2004, 31(2): 45–48 (in Chinese). 陶金莉, 沈亚领, 魏东芝, 等. 产灵菌红素沙雷氏菌的诱变育种. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 45–48.
- [32] Xia SX, Zhang K, Jia BS, et al. Study on the UV mutagenesis breeding of protoplast in prodigiosin producing bacteria RZ21. *J Anhui Agric Sci*, 2010, 38(6): 2780–2782, 2792 (in Chinese). 夏顺翔, 张魁, 贾秉晟, 等. 红色素产生菌 RZ2721 菌株的原生质体紫外诱变育种研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(6): 2780–2782, 2792.
- [33] El-Bialy HA, Abou El-Nour SA. Physical and chemical stress on *Serratia marcescens* and studies on prodigiosin pigment production. *Ann Microbiol*, 2015, 65(1): 59–68.
- [34] Su WT, Tsou TY, Liu HL. Response surface optimization of microbial prodigiosin production from *Serratia marcescens*. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2011, 42(2): 217–222.
- [35] Kim SJ, Lee HK, Yim JH. Statistical optimization of medium components for the production of prodigiosin by *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(12): 1903–1907.
- [36] Giri AV, Anandkumar N, Muthukumaran G, et al. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol*, 2004, 4: 11–18.
- [37] Lü ZZ, Liu XX, Sun SQ, et al. Effect of surfactants on production of prodigiosins by *Serratia marcescens*. *Pharmaceut Biotechnol*, 2012, 19(4): 324–327 (in Chinese). 吕哲喆, 刘晓侠, 孙诗清, 等. 表面活性剂对天然红色素发酵的影响. *药物生物技术*, 2012, 19(4): 324–327.
- [38] de Araujo HWC, Fukushima K, Takaki GMC. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules*, 2010, 15(10): 6931–6940.
- [39] Sumathi C, MohanaPriya D, Swarnalatha S, et al. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. *Sci World J*, 2014, 2014: 290327.
- [40] Xu H, Xu MJ, Yang TW, et al. Effect of temperature on prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens*. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(5): 517–524 (in Chinese). 徐虹, 徐美娟, 杨套伟, 等. 温度对粘质沙雷氏菌合成灵菌红素的影响. *微生物学报*, 2014, 54(5): 517–524.
- [41] Liang TW, Chen SY, Chen YC, et al. Enhancement of prodigiosin production by *Serratia marcescens* TKU011 and its insecticidal activity relative to food colorants. *J Food Sci*, 2013, 78(11): M1743–M1751.
- [42] Miao L, Wang XL, Jiang W, et al. Optimization of the culture condition for an antitumor bacterium *Serratia proteamacula* 657 and identification of the active compounds. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(5): 855–863.
- [43] Chen WC, Yu WJ, Chang CC, et al. Enhancing production of prodigiosin from *Serratia marcescens* C3 by statistical experimental design and porous carrier addition strategy. *Biochem Eng J*, 2013, 78: 93–100.
- [44] Bae J, Moon H, Oh KK, et al. A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin-like pigment produced from *Serratia* sp. KH-95. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(16): 1315–1319.

- [45] Juang RS, Chen HL, Lin YC. Ultrafiltration of coagulation-pretreated *Serratia marcescens* fermentation broth: flux characteristics and prodigiosin recovery. *Separ Sci Technol*, 2012, 47(13): 1849–1856.
- [46] Juang RS, Yeh CL. Adsorptive recovery and purification of prodigiosin from methanol/water solutions of *Serratia marcescens* fermentation broth. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2014, 19(1): 159–168.
- [47] Wang XD, Tao JL, Wei DZ, et al. Development of an adsorption procedure for the direct separation and purification of prodigiosin from culture broth. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 40(Pt 3): 277–280.
- [48] Kim D, Park YK, Lee JS, et al. Analysis of a prodigiosin biosynthetic gene cluster from the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16(12): 1912–1918.
- [49] Schloss PD, Allen HK, Klimowicz AK, et al. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA Cell Biol*, 2010, 29(9): 533–541.
- [50] Li P, Kwok AH, Jiang J, et al. Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0123061.
- [51] Williamson NR, Simonsen HT, Harris AKP, et al. Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2006, 33(2): 151–158.
- [52] Williamson NR, Simonsen HT, Ahmed RAA, et al. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyI-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol*, 2005, 56(4): 971–989.
- [53] Chawrai SR, Williamson NR, Salmond GPC, et al. Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues-exploring the substrate specificity of PigC. *Chem Commun (Camb)*, 2008, (16): 1862–1864.
- [54] Chawrai SR, Williamson NR, Mahendiran T, et al. Characterisation of PigC and HapC, the prodigiosin synthetases from *Serratia* sp and *Hahella chejuensis* with potential for biocatalytic production of anticancer agents. *Chem Sci*, 2012, 3(2): 447–454.
- [55] Cho HJ, Kim KJ, Kim MH, et al. Structural insight of the role of the *Hahella chejuensis* HapK protein in prodigiosin biosynthesis. *Proteins*, 2008, 70(1): 257–262.
- [56] Liu SW, Ran TT, Shen X, et al. Expression, crystallization and preliminary crystallographic data analysis of PigF, an O-methyltransferase from the prodigiosin-synthetic pathway in *Serratia*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2012, 68(Pt 8): 898–901.
- [57] Han N, Ran TT, Lou XD, et al. Expression, crystallization and preliminary crystallographic data analysis of PigI, a putative L-prolyl-AMP ligase from the prodigiosin synthetic pathway in *Serratia*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2014, 70(Pt 5): 624–627.
- [58] Lou XD, Ran TT, Han N, et al. Crystal structure of the catalytic domain of PigE: a transaminase involved in the biosynthesis of 2-methyl-3-n-amyI-pyrrole (MAP) from *Serratia* sp. FS14. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447(1): 178–183.
- [59] Grandclément C, Tannières M, Moréra S, et al. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev*, 2016: 40(1): 86–116.
- [60] Thomson NR, Crow MA, McGowan SJ, et al. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol*, 2000, 36(3): 539–556.
- [61] Slater H, Crow M, Everson L, et al. Phosphate

- availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol Microbiol*, 2003, 47(2): 303–320.
- [62] Fineran PC, Slater H, Everson L, et al. Biosynthesis of tripyrrole and beta-lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Mol Microbiol*, 2005, 56(6): 1495–1517.
- [63] Horng YT, Deng SC, Daykin M, et al. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol*, 2002, 45(6): 1655–1671.
- [64] Cheung J, Hendrickson WA. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(2): 116–123.
- [65] Gristwood T, Fineran PC, Everson L, et al. The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 112.
- [66] Stella NA, Lahr RM, Brothers KM, et al. *Serratia marcescens* Cyclic AMP receptor protein controls transcription of EepR, a novel regulator of antimicrobial secondary metabolites. *J Bacteriol*, 2015, 197(15): 2468–2478.
- [67] Horng YT, Chang KC, Liu YN, et al. The RssB/RssA two-component system regulates biosynthesis of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia marcescens*. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(5): 304–312.
- [68] Fineran PC, Everson L, Slater H, et al. A GntR family transcriptional regulator (PigT) controls gluconate-mediated repression and defines a new, independent pathway for regulation of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 12): 3833–3845.
- [69] Fineran PC, Williamson NR, Lilley KS, et al. Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *J Bacteriol*, 2007, 189(21): 7653–7662.
- [70] Tanikawa T, Nakagawa Y, Matsuyama T. Transcriptional downregulator hexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol*, 2006, 50(8): 587–596.
- [71] Gristwood T, McNeil MB, Clulow JS, et al. PigS and PigP regulate prodigiosin biosynthesis in *Serratia* via differential control of divergent operons, which include predicted transporters of sulfur-containing molecules. *J Bacteriol*, 2011, 193(5): 1076–1085.

(本文责编 陈宏宇)