

纳他霉素生物合成和调控机制的相关研究进展

王大红^{1,3}, 沈文浩^{1,2}, 原江锋^{1,3}, 孙建瑞^{1,2}, 王梦洋¹

1 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023

2 河南省食品微生物工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

3 东部战区总医院 药理科, 江苏 南京 210002

王大红, 沈文浩, 原江锋, 等. 纳他霉素生物合成和调控机制的相关研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1107-1119.

Wang DH, Shen WH, Yuan JF, et al. Advances in the biosynthesis of natamycin and its regulatory mechanisms. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1107-1119.

摘要: 纳他霉素是一种对真菌具有广谱抗菌活性的多烯大环内酯类抗生素, 它不仅能够有效地抑制真菌的生长和繁殖, 而且能够抑制一些真菌毒素的形成, 已被大多数国家批准为抗真菌食品防腐剂使用, 也被广泛应用于农业和医疗领域。纳塔尔链霉菌 *Streptomyces natalensis* 和恰努塔加链霉菌 *Streptomyces chatanoogensis* 是纳他霉素的主要产生菌, 其生物合成过程及调控机制相关研究比较清楚。文中主要归纳了纳他霉素的生物合成和调控机制, 探讨了提高纳他霉素产量的方法, 并展望了纳他霉素未来的研究方向。

关键词: 纳他霉素, 食品防腐剂, 生物合成, 调控机制

Advances in the biosynthesis of natamycin and its regulatory mechanisms

Dahong Wang^{1,3}, Wenhao Shen^{1,2}, Jiangfeng Yuan^{1,3}, Jianrui Sun^{1,2}, and Mengyang Wang¹

1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

2 Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Luoyang 471023, Henan, China

3 Department of Pharmacology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, Jiangsu, China

Abstract: Natamycin is a polyene macrolide antibiotics with strong and broad spectrum antifungal activity. It not only effectively inhibits the growth and reproduction of fungi, but also prevents the formation of some mycotoxins. Consequently, it has been approved for use as an antifungal food preservative in most countries, and is also widely used in agriculture and healthcare. *Streptomyces natalensis* and *Streptomyces chatanoogensis* are the main producers of natamycin. This review summarizes the biosynthesis and regulatory mechanism of natamycin, as well as the strategies for improving natamycin production. Moreover, the future perspectives on natamycin research are discussed.

Keywords: natamycin, food preservative, biosynthesis, regulatory mechanism

Received: June 30, 2020; **Accepted:** September 25, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31401672), Fund of Young Teachers in Colleges and Universities of Henan Province, China (No. 2016GGJS-060).

Corresponding author: Dahong Wang. Tel: +86-379-64282342; E-mail: wangdahong2003@163.com

国家自然科学基金 (No. 31401672), 河南省高校青年骨干教师项目 (No. 2016GGJS-060) 资助。

1955年, Struyk等从南非纳他州的土壤中发现一株纳塔尔链霉菌 *Streptomyces natalensis*, 从其发酵液中分离并得到匹马菌素 (Pimaricin); Burns等从土壤中分离出一株恰努塔加链霉菌 *Streptomyces chatanoogensis*, 从其发酵液中分离得到田纳西菌素, 后来研究证实, 匹马菌素和田纳西菌素为同一物质, 并被 WHO 统一命名为纳他霉素^[1]。此外, 褐黄孢链霉菌 *Streptomyces gilvosporeus* 也是纳他霉素的产生菌。纳他霉素是一种多烯大环内酯类抗生素, 它在极低浓度下就能表现出极强的广谱抗真菌活性, 且安全高效。纳他霉素作用机理是与真菌细胞膜的麦角甾醇结合, 从而使细胞膜畸变, 导致细胞内容物渗漏而死亡。纳他霉素能有效抑制霉菌和酵母菌的生长, 还能阻止丝状真菌中黄曲霉毒素的形成。此外, 其对哺乳动物细胞表现出低毒、无副作用, 这也使它广泛应用于食品防腐领域, 迄今为止, 全球已有 40 多个国家批准将纳他霉素用于水果、饮品、乳制品、肉制品等保鲜和防腐^[2]; 在医疗方面, 它被用于真菌性角膜炎的治疗^[3]; 在农业保护领域, 它作为农作物保护剂用于防止真菌污染。本文阐述了纳他霉素的生物合成和代谢工程改造, 同时, 对近年来的重大研究成果进行了剖析, 揭示了其复杂的生物合成代谢网中的调控机制, 最后讨论了提高纳他霉素产量的策略, 并对纳他霉素未来的研究方向进行了展望。

1 纳他霉素的结构和性质

纳他霉素分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{13}$, 核心结构是一个四共轭双键二十六元内酯环 (图 1), 与大多数糖基多烯化合物一样, 纳他霉素结构中含有的海藻糖胺, 通过 β -糖苷键将内酯环连接到 C15 上, C4-C5 上的含环氧基团由双键衍变而来; C12 位环外羧基衍生于甲基, C9 的羰基和 C13 的羟基自环化产生一个内部半缩酮环, 其结构中的发色基团含有一个平面和刚性的亲脂结构, 其羟基化的部

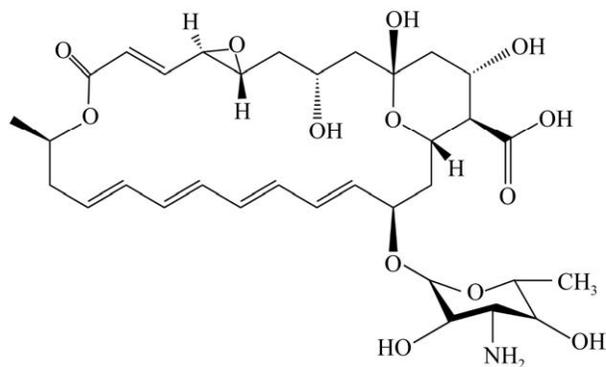


图 1 纳他霉素的结构^[1]

Fig. 1 Structure of natamycin^[1].

分显示柔性和亲水性, 使纳他霉素成为强的两性分子, 它难溶于水而且几乎不溶于非极性溶剂, 在避光条件下以粉末状存在时, 处于稳定状态且无活性损失, 但其水溶液对光敏感。

2 纳他霉素的生物合成和转运

2.1 纳他霉素的生物合成

纳他霉素又称匹马菌素, 其在 *S. natalensis* 和 *S. chatanoogensis* 中的生物合成基因簇分别被命名为 *pim* 和 *scn* (图 2)。1999年, Aparicio等研究了纳他霉素的生物合成基因; 之后 *pim* 和 *scn* 先后被报道, 证实纳他霉素是由 12 个乙酸单位和 1 个丙酸单位合成的^[4-5]。纳他霉素骨架结构由 PKS I 类聚酮合酶催化完成, PKS 包含 13 个同源模块和 60 个催化结构域, 这些模块分布在由 *pimS0-pimS4* 编码的 5 个多功能酶 PimS0-PimS4 中。骨架环再由 *pimC*、*pimD*、*pimF*、*pimG*、*pimJ* 和 *pimK* 编码的蛋白进行后修饰, *pimA*、*pimB* 和 *pimH* 编码的蛋白负责纳他霉素的转运, *pimT*、*pimE*、*pimM* 和 *pimR* 编码的蛋白负责调控纳他霉素合成基因的表达^[6]。尽管 *pim* 和 *scn* 基因簇的编码区域高度保守一致, 但不同菌种基因间结构域的差别导致它们的转录机制存在一定的区别, 与 *scn* 基因簇相比, *pim* 基因簇含有 *pimH* 和 *pimT*, 两个基因分别位于 PKS 基因簇的两端, *pimH* 通

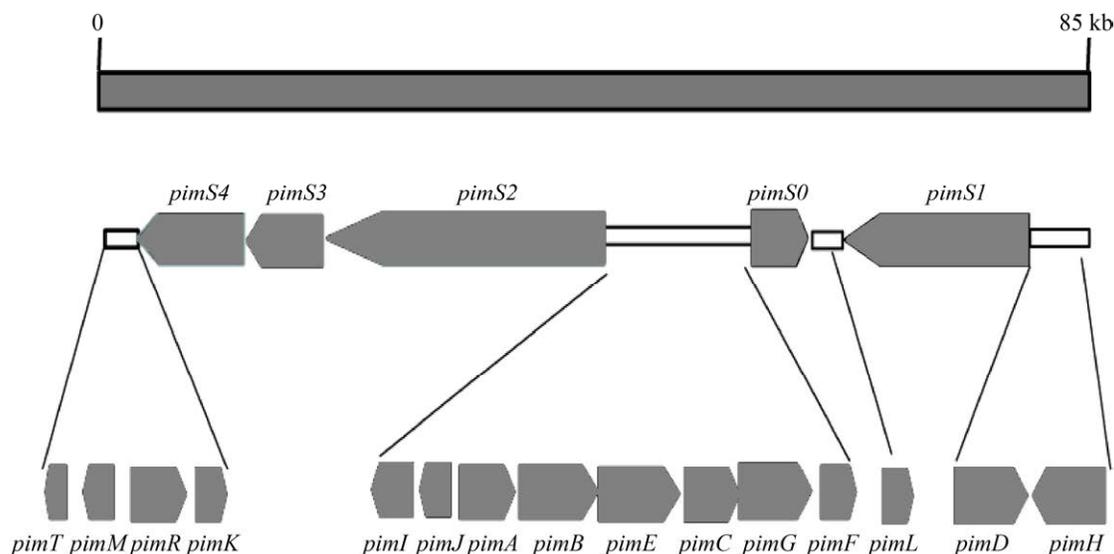


图 2 *S. natalensis* 中纳他霉素合成基因簇

Fig. 2 The gene cluster for natamycin biosynthesis in *S. natalensis*.

过编码一种外排泵参与纳他霉素的转运, *pimT* 编码一个氨基酸外排子, 通过分泌诱导子 2,3-二氨基-2,3-双(羟甲基)-1,4-丁二醇 (PI 因子) 参与调节纳他霉素的产生^[7]; 与 *pim* 基因簇相比, *scnS1* 的下游含有一个假定转座酶基因 *scnL* (编码酪氨酸磷酸酯酶)。 *S. natalensis* 与 *S. chatanoogensis* 合成基因簇中各个基因和编码相应的蛋白见表 1。

纳他霉素骨架的合成从 PimS0 开始, 由 CoA 连接酶-ACP-KS-AT-ACP 催化乙酸形成酰基腺苷酸, 为 PimS1 模块 1 的 KS 结构域提供乙酰单元^[4], 但是模块 0 中的 KS 结构域是失活的; PimS1 的 4 个模块分别完成骨架链延长的前 4 个循环, 并构成大部分的多烯发色团; 然后, PimS2、PimS3、PimS4 上的 8 个模块催化 8 个羧酸模块单元的缩合, 并进行适当的结构修饰从而形成纳他霉素的骨架。在 PimS2 中, 模块 5 负责形成发色团的最后一个双键, 模块 6-10 中缺失 DH 结构域, 模块 7 中的 AT 结构域选择的延伸单元为丙酸; PimS2 的模块 9 中的 KR 是非活性的, β -酮基不能被还原, 因此, 在模块 7 中 KR 结构域的作用下 C9 羰基和 C13 羟基形成了纳他霉素结构中的半缩酮

环; PimS3 负责合成 C3 和 C4, 并引入一个双键, 之后会形成一个环氧结构; 在 PimS4 的 C 末端硫酯酶结构域 (Terminal thioesterase domain, TE) 催化下释放碳链, 并形成二十六元内酯环。骨架形成的准确性依赖于基因 *pimI* 编码的硫酯酶, 该酶能有效地筛选酰基起始单元以及去除错误的延伸单位, 它可以被其他的硫酯酶补充, 而且与 PimS4 末端的 TE 具有互补作用^[8-9]。酰基载体蛋白 (Acyl carrier protein, ACP) 是 PKS 中关键功能域, 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (Phosphopantetheinyl transferases, PPTase) 催化磷酸泛酰巯基乙胺基从 CoA 转移到 ACP 的活性丝氨酸的残基上, 将 ACP 从无活性的脱辅基形态转化为有活性的全辅基形态, PPTase 作为 PKS 的活性开关, 对 PKS 产物的生物合成起着不可或缺的作用^[10]。研究证实 *S. chatanoogensis* 中含有 1 个 I 型 PPTase 基因 (*schACPS*) 和 1 个 II 型 PPTase 基因 (*schPPT*), SchPPT 倾向于催化次级代谢中 ACP 的辅基化, 而 SchACPS 倾向于催化独立 ACP 的辅基化^[11]。

在 *S. natalensis* 中, *pimJ* 编码的脱水酶催化 GDP-甘露糖 (来源于 6-磷酸-果糖) 转化为 GDP-

表 1 纳塔尔链霉菌和恰塔努加链霉菌基因簇对比

Table 1 Comparison of the gene clusters for natamycin biosynthesis from *S. natalensis* and *S. chattanoogensis*

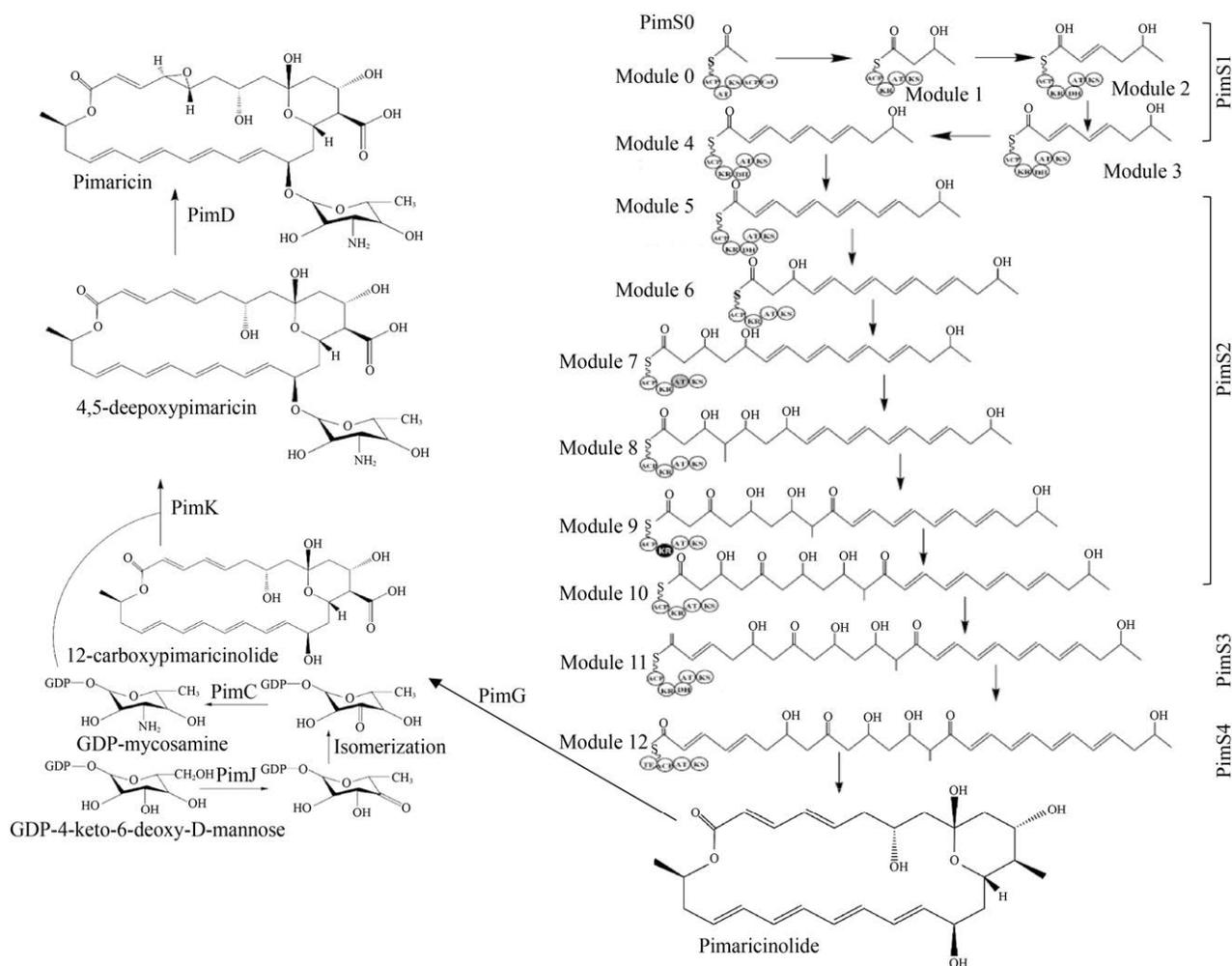
Gene name		Encoded protein
<i>S. natalensis</i>	<i>S. chattanoogensis</i>	
<i>pimS0</i>	<i>scnS0</i>	Pks loading module
<i>pimS1</i>	<i>scnS1</i>	Pks extension modules 1–4
<i>pimS2</i>	<i>scnS2</i>	Pks extension modules 5–10
<i>pimS3</i>	<i>scnS3</i>	Pks extension module 11
<i>pimS4</i>	<i>scnS4</i>	Pks extension module 12, cyclisation and chain release
<i>pimA</i>	<i>scnA</i>	ABC transporter (PIM export)
<i>pimB</i>	<i>scnB</i>	ABC transporter (PIM export)
<i>pimC</i>	<i>scnC</i>	GDP-3-keto-6-deoxymannose aminotransferase
<i>pimD</i>	<i>scnD</i>	P450 monooxygenase (C4,5 epoxidase)
<i>pimE</i>	<i>scnE</i>	Cholesterol oxidase
<i>pimF</i>	<i>scnF</i>	Ferredoxin
<i>pimG</i>	<i>scnG</i>	P450 monooxygenase (C12 hydroxylase)
<i>pimH</i>	not found	PIM efflux pump
<i>pimI</i>	<i>scnI</i>	Thioesterase (type II)
<i>pimJ</i>	<i>scnJ</i>	GDP-mannose 4,6-dehydratase
<i>pimK</i>	<i>scnK</i>	Mycosamine transferase
<i>pimL</i>	<i>scnL</i>	Tyrosine phosphatase
<i>pimM</i>	<i>scnR II</i>	PAS-LuxR regulator
<i>pimR</i>	<i>scnR I</i>	SARP-LAL regulator
<i>pimT</i>	not found	PIM inducer PI factor secretion

4-酮-6-脱氧甘露糖，并通过自发异构反应生成 GDP-3-酮-6-脱氧甘露糖 (GDP 放线菌糖胺)^[12-13]。随后，*pimC* 编码的转氨酶经转氨作用生成 GDP-海藻糖胺，通过 *pimK* 编码的糖基转移酶催化海藻糖胺与大环内酯的连接，合成糖苷配基后，*pimG* 编码的 P450 单加氧酶催化环外甲基在 C₁₂ 氧化形成环外羧基，产生 12-羧基嘧啶酮。最后，*pimD* 编码的 P450 单加氧酶催化最后一个氧化反应，将 C₄ 和 C₅ 双键形成环氧基团，转化为纳他霉素 (图 3)。

2.2 纳他霉素的转运

虽然纳他霉素对产生菌没有抗性，但在细胞内大量积累对产生菌是有害的，因此，产生菌体内存在转运系统将纳他霉素排出胞外。在 *S. natalensis* 中，*pimA*、*pimB* 和 *pimH* 三个基因参与了纳他霉

素的转运，*pimA* 和 *pimB* 编码 III 型 ABC 转运蛋白，它们能结合 ATP 和跨膜结构域从而发挥转运作用，它们可能会结合形成一个异二聚体^[9]。研究发现基因 *nysH*、*nysG* (*pimA*、*pimB* 的同源基因) 失活的诺尔斯氏链霉菌 *Streptomyces noursei* 突变株也可将制霉菌素运出胞外，说明链霉菌中存在除 ABC 转运子外还有其他转运系统。因此，推测 *pimH* 编码的外排泵也会参与纳他霉素的转运。在 *S. chattanoogensis* 基因簇中的编码 ABC 转运蛋白的基因 *scnA* 和 *scnB*，与 *pimA* 和 *pimB* 的相似度在 95% 以上，虽然没有发现 *pimH* 的相似基因，但发现了可起补充作用的转运蛋白 Nep I / Nep II 和 Mfs1，以上 4 个转运蛋白构成了一个新的纳他霉素转运系统^[14]。

图3 纳他霉素生物合成途径^[5]Fig. 3 Natamycin biosynthetic pathway^[5].

3 纳他霉素的代谢工程改造

多烯类抗生素与哺乳动物细胞膜内的胆固醇非特异性结合, 导致多烯类具有良好的抗真菌效果的同时, 也具有严重的溶血毒性和肾毒性, 这严重限制了多烯类抗生素的应用^[15]。因此, 根据纳他霉素生物合成途径, 可以通过代谢工程得到一些低毒或水溶性高的纳他霉素衍生物 (图4)。

通过基因工程敲除 *pimD*, 获得纳他霉素衍生物 4,5-去环氧匹马菌素, 其抗真菌活性较纳他霉素明显降低, 说明环氧基在纳他霉素发挥抗真菌活性时是重要的^[16]。在研究 *S. chatanoogensis* 中

纳他霉素生物合成的途径时, *scnG* 基因的敲除导致 4,5-去环氧基-12-脱羧基-12-甲基匹马菌素的积累, 且该研究证实糖基转移酶 *ScnK* 能够将海藻糖胺连接到脱羧糖苷配基上, *ScnD* 催化环氧化作用^[17]。Qi 等通过敲除 *scnG* 不仅导致 4,5-去环氧基-12-脱羧基-12-甲基匹马菌素的积累, 同时还有 12-脱羧基-12-甲基匹马菌素的积累, 证实了 *ScnD* 在一定程度上能催化环氧化作用^[18]。12-脱羧基-12-甲基纳他霉素的抗真菌活性是纳他霉素的 2 倍, 其溶血毒性比纳他霉素降低了 4.5 倍, 具有良好的应用前景^[19]。随后, 又获得了一株产生 3-羟基-4,5-去环氧基-12-脱羧基-12-甲基匹马菌素的

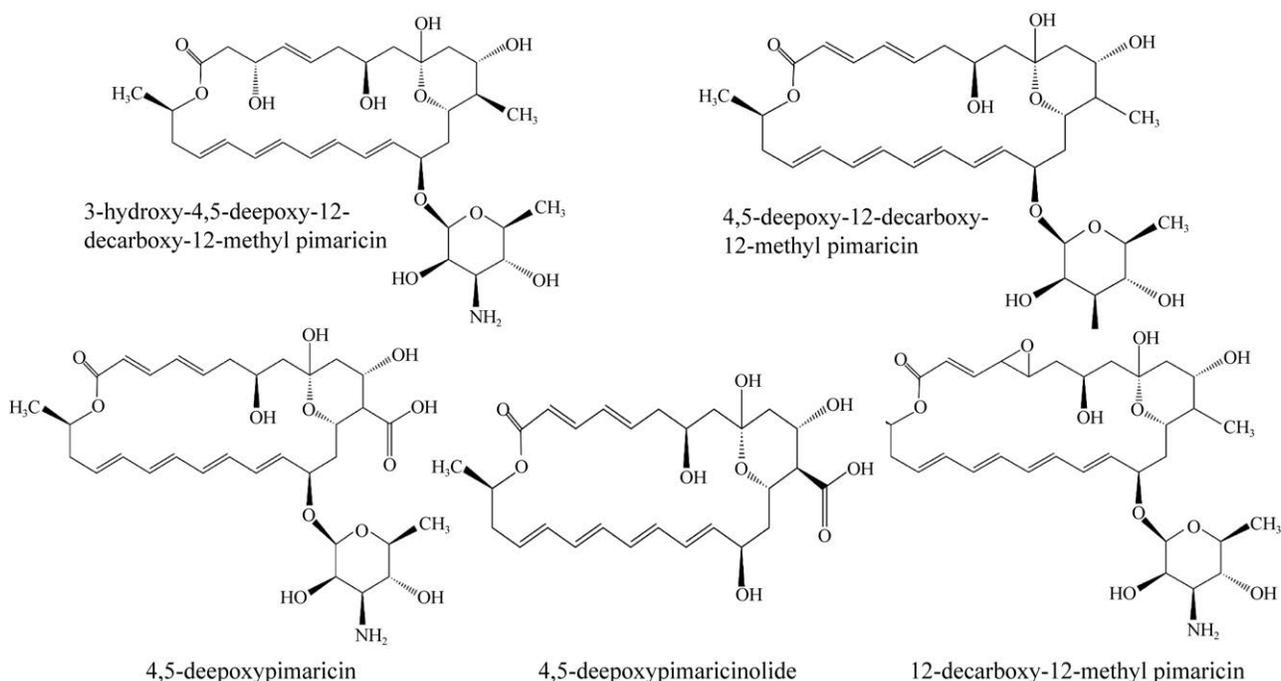


图4 纳他霉素的衍生物^[17-18]

Fig. 4 Derivatives of natamycin^[17-18].

突变株, 但该衍生物却没有表现出明显的抗真菌和溶血活性。ScnK 催化纳他霉素内酯与糖基的连接, 将 *S. chatanoogensis* 中的 *scnK* 基因敲除导致 4,5-去环氧匹马菌素内酯的积累, 该物质本身不具有抗真菌活性, 如果通过半合成或蛋白质工程等方法引入糖基, 就会变成一种很有价值的物质, 4,5-去环氧匹马菌素内酯的积累证实了 ScnG (PimG) 在纳他霉素生物合成的糖基化反应之前发挥催化作用^[17]。

4 纳他霉素的生物合成调控机制

在纳他霉素生物合成过程中, 会受到多种因素的调控, 如菌体密度、外界环境和信号分子等, 纳他霉素合成的代谢调控主要包括途径特异性转录调控和全局多效调控。

4.1 途径特异性转录调控

PimR 是纳他霉素生物合成中第一个途径特异性转录调节因子, 也是一个具有特殊结构的转录激活子, 敲除 *pimR* 后获得的突变体不能产生纳

他霉素, 负责内酯形成的关键酶基因表达量明显降低, 且完全中断了 *pimE* 的转录, 说明 PimR 是一个正调控蛋白^[20]。PimR 的 N 端含链霉菌抗生素调控蛋白 (*Streptomyces antibiotic regulatory protein*, SARP) 的 DNA 结合结构域, C 末端包含同源的半鸟苷酸环化酶和 LuxR 家族 ATP 结合调节因子 (Large ATP-binding regulators of the LuxR family, LAL)。在其他链霉菌中, 菲律宾菌素、尼可霉素和多氧霉素生物合成过程中的调节因子分别为 FilR、SanG 和 PolR, 与 PimR 一样, 对生物合成基因簇的启动子区域进行调控而控制化合物的产生, 虽然这些化合物的结构不同, 但都显示出良好的抗真菌作用^[21-23]。PimM 是纳他霉素生物合成的第二个转录激活子, *pimM* 缺失的突变体不能合成纳他霉素, 说明 PimM 也是一个正调控蛋白^[24]。PimM 的 N 末端包含一个 PAS (Per ARNT Sim, 一种结构域家族) 传感器结构域, C 末端含与 DNA 结合的 LuxR 型 α 螺旋-转角- α 螺旋基元 (Helix-turn-helix, HTH) 结构, PAS 能够检测外界

物理或化学信号且具有响应该调节效应的活性, PAS 位于细胞溶质中, 但 PimM 不属于双组分系统^[25]。 *pimM* 不仅存在于纳他霉素的合成基因簇中, 在其他已知抗真菌多烯的生物合成基因簇中还发现了其同源基因编码的调节蛋白, 且已被证明它们的功效与 PimM 相同。 Amphotericin 合成基因 *amphRIV*、nystatin 合成基因 *nysRIV* 和 filipin 合成基因 *pteF* 是 PAS-LuxR 类的同源调节因子, 分别将它们引入到 *S. natalensis* Δ *pimM* 中, 突变体恢复了纳他霉素的部分生产能力; 将 *pimM* 分别导入 amphotericin 产生菌结节链霉菌 *Streptomyces nodosus*、filipin 产生菌阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 和 rimocidin 产生菌龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus*, 也会提高这些多烯类的产量, 所以这些调节因子是完全可交换的^[26]。 PimR 和 PimM 以协同方式起作用, PimR 结合到 PimM 启动子上并激活其转录, PimM 直接激活纳他霉素 8 个结构基因的启动子 (*pimS2S3S4*、*pimS1*、*pimAB*、*pimD*、*pimE*、*pimI*、*pimK* 和 *pimJ*), 并影响其转录^[27]。 PimM 发挥作用并不依赖于 PimR 调控蛋白, 但增加 PimM 的表达量可以显著提高纳他霉素的产量, 而提高 PimR 表达却不影响纳他霉素的产量^[28]。此外, PimM 能通过激活其他调节因子间接调节 *pimC* 基因的表达 (图 5)。

纳他霉素生物合成基因簇的调控因子有时直

接结合在下游靶基因的启动子上激活其转录, 有时多个调控基因构成一个级联的调控系统, 在大部分情况下途径特异性调控基因所起的作用是激活相关基因簇的表达, 虽然这些正调控因子作用相似, 但在结构组成上有很大区别, 对 DNA 结合结构域起着不同的调控作用。

4.2 全局多效调控

在抗生素的合成、形态分化过程中还存在一些能够调控多个代谢途径的全局多效调控基因, 它们常存在于抗生素的合成基因簇之外, 通常它们通过途径特异性调控因子实现对抗生素生物合成的调控。

phoR-phoP 双组分系统是链霉菌中研究较详细的磷酸双组分调控系统, 它由信号激酶和受体调控蛋白两个部分组成, 磷酸可以作为信号分子参与代谢以及调控^[29]。 Mendes 等对 *S. natalensis* 中的 *phoU-phoR-phoP* 区域进行了研究, 发现来自天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 的 PhoP 蛋白能与 *S. natalensis* 的 *phoU-phoRP* 基因间的 PHO 盒 (*phoP* 基因的操纵子) 结合, 说明该系统是自发调控的。在 *phoP* 缺失的突变体中, *pim* 基因簇的部分基因表达得到上调, 但在 *pim* 基因簇中却未发现 PHO 盒, 且 PhoP 蛋白是不能直接结合到纳他霉素合成基因簇内启动子区域, 表明这些 *pim* 基因的磷酸调控是由 PhoP 通过其他调控因子介导的^[30]。

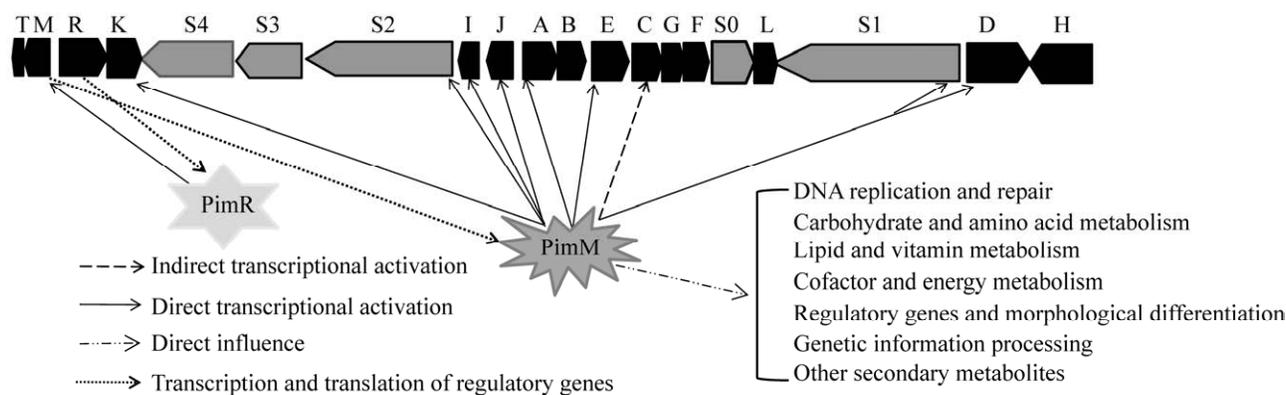


图 5 PimR 和 PimM 对纳他霉素生物合成基因的调控模型

Fig. 5 Model of regulation for natamycin biosynthesis by PimR and PimM.

纳他霉素的发酵是一个耗氧过程,低浓度氧会限制菌株的生长及纳他霉素的合成,高浓度氧则会升高胞内活性氧水平,破坏细胞组分。在 *S. natalensis* 中,细胞内活性氧失衡时, H_2O_2 将 PimM 作为直接或间接靶点,通过氧化还原机制调控并提高纳他霉素的合成。超氧化物歧化酶 *sodF* 的失活导致纳他霉素产量降低;抑制 H_2O_2 分解酶,如烷基过氧化氢酶系统中的 *ahpCD* 或过氧化氢酶 *kata1*,会导致纳他霉素产量的提高,因此,胞内 H_2O_2 与纳他霉素的产生呈正相关。转录分析显示 *S. natalensis* 磷酸盐代谢和氧化应激之间有交互作用,*sodF* 或 *ahpCD* 的缺失都导致纳他霉素合成基因簇的转录延迟激活,推测该现象与培养液中磷酸耗尽有关。此外,研究发现在氧胁迫条件下,细胞 NADPH/NADH 的比例和支链氨基酸代谢提供的前体水平是制约纳他霉素合成的主要瓶颈^[31-32]。

γ -丁内酯(γ -butyrolactones, GBL)(图 6)是由一些链霉菌合成的、具有群体效应功能的小分子信号分子,链霉菌将 GBL 作为自身诱导剂,通过这些自动诱导因子与受体的相互作用介导信号传导,受体从 DNA 解离,从而引导了目的基因转录。GBL 受体属于 TetR 家族的转录调节子,在 *S. natalensis* 和 *S. chatanoogensis* 中发现了与 GBL 受体同源的蛋白(SngR 和 SprA),却没有发现这两种菌产生 GBL。但在 *S. natalensis* 中发现了一种新型的诱导化合物——PI 因子(2,3-diamino-2,3-bis(hydroxymethyl)-1,4-butanediol, PI factor)(图 6),PI 因子能诱导丧失纳他霉素合成能力的 *S. natalensis* 突变株合成多烯类物质,这些物质通过氨基酸转运子 PimT 从细胞内运出,但 PI 因子的详细作用机制未知^[33]。寇美辰等通过化学合成 PI 因子,在发酵过程中添加 PI 因子纳他霉素发酵产量可达 5.456 g/L,是对照组的 2.22 倍^[34]。同时, *S. natalensis* 可能会结合不同的群体感应信号分子,如灰色链霉菌中的 A 因子(一种高效的 GBL 类自动调节子),虽然 *S. natalensis* 并不会合成 A

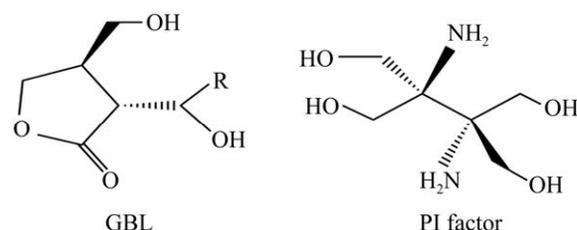


图 6 γ -丁内酯与 PI 因子的结构^[33]

Fig. 6 The structure of γ -butyrolactone and PI factor^[33].

因子,但是在不产纳他霉素的突变体中加入 A 因子后却恢复了纳他霉素的生产能力^[33]。此外,研究还发现添加一定浓度的 PI 因子结构类似物,如丙三醇、乙二醇和 1,2-丙二醇等,也能促进纳他霉素的合成^[35]。

5 纳他霉素产量的提高

从自然界分离的野生型菌株中纳他霉素产量过低,不能满足工业化生产的需要,一些研究者采用菌株选育、基因工程和代谢调控等方法提高纳他霉素的发酵产量。

5.1 菌种选育

Wang 等采用亚硝基胍诱变褐黄孢链霉菌,使纳他霉素的产量提高了 340%^[36];Luo 等采用递归原生质体融合进行基因改组,使突变菌株纳他霉素的产量提高了 379%^[37]。笔者课题组为了提高纳他霉素菌株的产能,选用纳塔尔链霉菌为出发菌株,以紫外线作为诱变剂获得 1 株突变株 *S. natalensis* HW-2 (0.8 g/L),优化发酵工艺后,纳他霉素产量较原始菌株提高了 242.6%^[38];以 *S. natalensis* HW-2 为初始菌株,采用紫外-常温室压等离子体-硫酸二乙酯(Diethyl sulfate, DES)复合诱变,选育出 1 株遗传性状稳定的优良突变株 *S. natalensis* DES-26,较初始菌株提高了 86.36%,通过对差异菌株的转录组学分析发现,优良菌株的丙酮酸激酶、葡萄糖酸激酶、异柠檬酸脱氢酶等基因的表达水平上调,脂肪酸代谢平衡被打破,与纳他霉素生物合成相关的大部分基因的表达水平上调,如 *pimB*、*pimC*、*pimD*、*pimR* 等,使调节纳他霉

素骨架结构合成、修饰和转运能力得到提高, 纳他霉素合成能力增强。

5.2 基因工程

基因工程是提高代谢产物产量的常用方式, 可以通过提高纳他霉素基因的表达水平而提高其产量, 降低了诱变技术的盲目性和随机性^[39]。在 *S. natalensis* 中过表达 *pimM*, 增加 *pimM* 的基因表达量, 纳他霉素产量提高了 1.4 倍^[24]; 将透明颤菌 *Vitreoscilla* 的血红蛋白 *vgb* 基因整合到 *S. gilvosporeus* 中, 纳他霉素产量增加了 407%^[40]。本课题组采用基因工程方法过表达 *S. natalensis* HW-2 中编码乙酰乙酸合酶的基因 *ilvH*, 得到 1 株工程菌 *S. natalensis* ZS101 较原始菌株纳他霉素产量提高了 37.93%^[41]。为了获得更多的前体物质, 如乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A, 我们过表达支链氨基酸 (Branched-chain amino acids, BCAAs) 降解的关键酶支链氨基酸转氨酶 (BCAT) 的基因 *ilvE*, 在 *S. natalensis* HW-2 中同源表达, 获得的工程菌 *S. natalensis* LY08 的纳他霉素产量提高了 78.72%, 达到了 1.52 g/L。以上结果表明, 通过代谢工程提高 BCAAs 合成和代谢能力, 提高前体物质的供应, 能有效促进纳他霉素的合成。其他提高产量的策略包括高表达 PPTase^[42]、增强启动子 *groESp*^[43] 和多效调节基因 *wblA*^[44] 等。近年来, 随着合成生物学的发展, PKS 异源表达已获得成功, 通过对纳他霉素基因簇的异源表达可以获得产量的提高^[45]。以 *S. chatanoogensis* L10 为改造对象, 针对纳他霉素生物合成途径, 通过敲除副产物合成途径、过表达相关激活子及基因表达浓度梯度技术全面优化了纳他霉素的生物合成途径, 构建的高产菌株发酵水平最高达 15.9 g/L^[46]。

5.3 代谢调控

通过添加前体和诱导物、优化发酵条件等代谢调控方式也是提高纳他霉素产量的有效方法。Elsayed 等在 *S. natalensis* 发酵液中添加乙酸和丙酸 (7:1), 使纳他霉素的产量提高了 50%^[47]; Li 等

发现在培养基中添加过丙醇也可以提高其产量^[48]; Zeng 等采用固定化 *S. gilvosporeus* 的方法进行发酵, 使纳他霉素产量提高了 1.8 倍^[49]; Elsayed 等采用连续补糖 30 h, 在 7.5 L 发酵罐中纳他霉素的产量提高了 1.6 倍^[50]; Zeng 等采用固态发酵方法, 使每克干底物能产纳他霉素 9.62 mg, 比液态发酵减少 50.05% 成本支出^[51]。笔者课题组在 *S. natalensis* HW-2 发酵 24 h 时添加源于产黄青霉 AS 3.5163 的真菌诱导子, 使纳他霉素产量提高了 2.3 倍, 添加真菌诱导子后, 菌落、菌丝形态差异显著, 细胞干重下降了 17.7%, 葡萄糖的利用率显著提高, 胞内 Ca^{2+} 浓度提高了 32.8%, 胞内活性氧浓度提高了一倍^[52]; 采用 RNA-seq 对诱导后转录组学分析发现, 碳代谢、氮代谢、氨基酸代谢和脂肪代谢等途径中的关键酶的基因转录水平出现明显变化, 大部分与纳他霉素生物合成相关的酶的转录水平得到提高; 研究发现在纳他霉素发酵至 36 h 时添加 0.5 g/L L-缬氨酸, 纳他霉素产量比对照组提高了 80%, 菌体内与糖代谢有关的关键酶活力得到不同程度的提高; RNA-seq 代谢组学分析显示, 与支链氨基酸 (BCAAs) 代谢有关酶的转录水平上调, 从而提高了 BCAAs 的降解能力^[53]。纳他霉素的发酵是好氧的, 供氧水平对其产量高低有重要影响, 研究发现大豆油可以作为氧载体, 添加 1% (V/V) 的大豆油可使纳他霉素产量提高 43.9%^[54]。在纳他霉素发酵过程中采用发酵-吸附耦合工艺, 通过优化 HPD450 添加工艺后, 发酵产量提高了 66.27%^[55]。

6 展望

纳他霉素主要应用于食品、医疗、农业等行业, 从它的发现、研究到使用已超过 60 年, 是国际上唯一获得批准的高效、安全的抗真菌生物防腐剂。当前, 纳他霉素的生产和应用已取得了巨大进步, 但仍然存在生产成本低、菌种性能低、使用面窄等缺点。因此, 接下来的研究可以集中

于以下几个方面：(1) 阐明纳他霉素的全局多效调控。该调控对链霉菌抗生素的产生、形态分化等进行控制，除了 *phoR-phoP* 调控、丁内酯-受体调控和 AdpA 调控外，机体内是否存在其他对纳他霉素产生有重大影响的调控因子，如 TetR、Lrps 家族调节因子。可以采用诱导的方法并结合基因组学、转录组学等系统生物学技术鉴定该调控因子，可为纳他霉素生物合成的全局性调控和提高产量提供更好的思路。(2) 采用高通量筛选方法选育高产菌株。虽然诱变育种、定向进化等非理性菌种选育技术具有工作量大、效率低等缺点，但其在基因突变的广度方面具有巨大的优势。近年来，代谢产物生物传感器的开发推动了高通量筛选方法的迅猛发展^[56]，若能借助系统生物学研究方法找出响应纳他霉素的合成生物学元件，构建高通量筛选方法，再结合常规诱变、离子束诱变和常压室温等离子体诱变等技术，可以获得较为理想的纳他霉素高产菌种。(3) 结合 CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 技术高效改造纳他霉素生物合成途径。CRISPR/Cas9 系统能够进行高效基因编辑、沉默基因簇激活、生物合成机制解析、生物合成元件构建和目标化合物产量提升等，该技术已在天蓝色链霉菌等多个放线菌中实现基因删除、插入和定向突变等功能，极大地促进了放线菌的合成生物学研究及其天然产物的开发^[57]。根据纳他霉素的代谢调控策略，在该技术下对纳他霉素的合成途径中关键基因的表达实行精细调控，构建基因组尺度代谢网络模型，改变代谢通量，解决限制支链氨基酸代谢等产生前体供应的瓶颈问题，调控全局和特效转录调节因子，实现纳他霉素合成的高效和高产。(4) 强化纳他霉素的外排能力。PimA 和 PimB 是纳他霉素的 2 个转运蛋白，可利用基因工程或插入强启动子等方法对其进行过表达，不仅可以加强纳他霉素向胞外的运输能力，而且还能解决因胞内积累产生的毒性和反馈调控问题，可为发酵法生产

纳他霉素提供推动力。(5) 提高发酵强度，实现环境友好型生产。筛选合适的前体和诱导子，优化添加和中间补料工艺，设计和实现基于多尺度理论的发酵过程优化控制系统 (溶氧、pH、补料等参数的控制)，缩短发酵周期，提高发酵强度；有针对性地开发氮源，降低发酵培养基中酵母粉的使用量，降低发酵成本；研发环境友好型的纳他霉素提取和精制工艺，减少或停止下游过程中甲醇的使用。(6) 拓宽纳他霉素的使用范围。受限于《食品安全国家标准食品添加剂使用标准 GB 2760-2014》的使用范围^[58]，纳他霉素目前只能用于糕点、烤肉、果酱、火腿、发酵酒等食品中，因此需要加强纳他霉素或与其他食品防腐剂 (乳酸菌素和聚赖氨酸) 联用在食品中应用的基础研究，为大范围推广提供理论支撑；与药物研究人员加强合作，研究纳他霉素治疗真菌疾病的药理和药效，扩大纳他霉素在医疗上的应用。

REFERENCES

- [1] Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, et al. Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(1): 61-78.
- [2] Teixeira GHDA, Ma SH, Stewart AC, et al. Natamycin photostability in acidified green tea beverage is dependent on mycosporine-like amino acids and epigallocatechin gallate interaction. *LWT*, 2019, 116: 108572.
- [3] Patil A, Lakhani P, Majumdar S. Current perspectives on natamycin in ocular fungal infections. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2017, 41: 206-212.
- [4] Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin: a new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J Biol Chem*, 1999, 274(15): 10133-10139.
- [5] Martín JF, Aparicio JF. Enzymology of the polyenes

- pimaricin and candicidin biosynthesis. *Method Enzymol*, 2009, 459: 215-242.
- [6] Du YL, Li SZ, Zhou Z, et al. The pleiotropic regulator AdpA_{ch} is required for natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis*. *Microbiology*, 2011, 157(5): 1300-1311.
- [7] Vicente CM, Santos-Aberturas J, Guerra SM, et al. *PimT*, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimaricin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb Cell Fact*, 2009, 8(1): 33.
- [8] Sharma KK, Boddy CN. The thioesterase domain from the pimaricin and erythromycin biosynthetic pathways can catalyze hydrolysis of simple thioester substrates. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(11): 3034-3037.
- [9] 卢诗瑶, 孙立洁, 袁丽霞, 等. 纳他霉素在纳塔链霉菌中的合成及其调控机制的研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(5): 26-33.
Lu SY, Sun LJ, Yuan LX, et al. Research progress on the biosynthetic and regulatory mechanisms of natamycin in *Streptomyces natalensis*. *Biotech Bull*, 2016, 32(5): 26-33 (in Chinese).
- [10] 姚黎栋, 王月月, 樊伟明, 等. 链霉菌磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶对载体蛋白的底物选择性的研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(6): 1188-1194.
Yao LD, Wang YY, Fan WM, et al. Substrate specificity of phosphopantetheinyl transferases to carrier proteins in *Streptomyces*. *Microbiol China*, 2014, 41(6): 1188-1194 (in Chinese).
- [11] 王月月. 工业链霉菌中磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的研究及应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
Wang YY. Study and application of phosphopantetheinyl transferases from industrial *Streptomyces*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015 (in Chinese).
- [12] Aparicio JF, Caffrey P, Gil JA, et al. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(3): 179-188.
- [13] Shan YM, Guo D, Gu QS, et al. Genome mining and homologous comparison strategy for digging exporters contributing self-resistance in natamycin-producing *Streptomyces* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 817-831.
- [14] Wang TJ, Shan YM, Li H, et al. Multiple transporters are involved in natamycin efflux in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Mol Microbiol*, 2017, 103(4): 713-728.
- [15] Hossain MA, Ghannoum MA. New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9(8): 1797-1813.
- [16] Mendes MV, Antón N, Martín JF, et al. Characterization of the polyene macrolide P450 epoxidase from *Streptomyces natalensis* that converts deepoxypimaricin into pimaricin. *Biochem J*, 2005, 386(1): 57-62.
- [17] Qi Z, Kang QJ, Jiang CY, et al. Engineered biosynthesis of pimaricin derivatives with improved antifungal activity and reduced cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(16): 6745-6752.
- [18] 齐震. 新型低毒匹马霉素衍生物的基因工程创制及其定向高产[D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
Qi Z. Engineered biosynthesis and directed accumulation of pimaricin derivatives with reduced cytotoxicity[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2017 (in Chinese).
- [19] Liu SP, Yuan PH, Wang YY, et al. Generation of the natamycin analogs by gene engineering of natamycin biosynthetic genes in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Microbiol Res*, 2015, 173: 25-33.
- [20] Antón N, Mendes MV, Martín JF, et al. Identification of PimR as a positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol*, 2004, 186(9): 2567-2575.
- [21] Payero TD, Vicente CM, Rumbero Á, et al. Functional analysis of filipin tailoring genes from *Streptomyces filipinensis* reveals alternative routes in filipin III biosynthesis and yields bioactive derivatives. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 114.
- [22] Liu G, Tian YQ, Yang HH, et al. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes* that also influences colony development. *Mol Microbiol*, 2005, 55(6): 1855-1866.
- [23] Li R, Xie ZJ, Tian YQ, et al. *PoIR*, a pathway-specific transcriptional regulatory gene, positively controls polyoxin biosynthesis in *Streptomyces*

- cacaoi* subsp. *asoensis*. Microbiology, 2009, 155(6): 1819-1831.
- [24] Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. Microbiology, 2007, 53(9): 3174-3183.
- [25] Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, et al. Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: pimR modulates pimaricin production via the PAS-LuxR transcriptional activator pimM. PLoS ONE, 2012, 7(6): e38536.
- [26] Santos-Aberturas J, Payero TD, Vicente CM, et al. Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis. Metab Eng, 2011, 13(6): 756-767.
- [27] Santos-Aberturas J, Vicente CM, Guerra SM, et al. Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimaricin genes and identification of binding boxes. J Biol Chem, 2011, 286(11): 9150-9161.
- [28] Jang BY, Hwang YI, Choi SU. Effects of *pimM* and *pimR* on the increase of natamycin production in *Streptomyces natalensis*. J Korean Soc Appl Biol Chem, 2011, 54(1): 141-144.
- [29] Lochlainn LN, Caffrey P. Phosphomannose isomerase and phosphomannomutase gene disruptions in *Streptomyces nodosus*: impact on amphotericin biosynthesis and implications for glycosylation engineering. Met Eng, 2009, 11(1): 40-47.
- [30] Mendes MV, Tunca S, Antón N, et al. The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. Met Eng, 2007, 9(2): 217-227.
- [31] Beites T, Pires SDS, Santos CL, et al. Crosstalk between ROS homeostasis and secondary metabolism in *S. natalensis* ATCC 27448: modulation of pimaricin production by intracellular ROS. PLoS ONE, 2011, 6(11): e27472.
- [32] Beites T, Rodríguez-García A, Moradas-Ferreira PSantos-Beneit F, et al. Genome-wide analysis of the regulation of pimaricin production in *Streptomyces natalensis* by reactive oxygen species. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(5): 2231-2241.
- [33] Recio E, Colinas AA, Rumbero A, et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. J Biol Chem, 2004, 279(40): 41586-41593.
- [34] 寇美辰. PI 因子促进纳塔尔链霉菌合成纳他霉素及其发酵工艺优化[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- Kou MC. PI factor promotes synthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* and optimization of its fermentation process[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [35] Recio E, Aparicio JF, Rumbero A, et al. Glycerol, ethylene glycol and propanediol elicit pimaricin biosynthesis in the PI-factor-defective strain *Streptomyces natalensis* npi287 and increase polyene production in several wild-type actinomycetes. Microbiology, 2006, 152(10): 3147-3156.
- [36] Wang YM, Tao ZS, Zheng HL, et al. Iteratively improving natamycin production in *Streptomyces gilvosporeus* by a large operon-reporter based strategy. Met Eng, 2016, 38: 418-426.
- [37] Luo JM, Li JS, Liu D, et al. Genome shuffling of *Streptomyces gilvosporeus* for improving natamycin production. J Agric Food Chem, 2012, 60(23): 6026-6036.
- [38] 张帅滢, 韦兰兰, 张颖, 等. 纳他霉素高产菌株选育及发酵工艺优化. 河南科技大学学报(自然科学版), 2016, 37(4): 81-86.
- Zhang SY, Wei LL, Zhang Y, et al. Screening of high-yield natamycin strains and optimization of fermentation process. J Henan Univ Sci Technol (Nat Sci), 2016, 37(4): 81-86 (in Chinese).
- [39] Xie X, Zhu JW, Liu Y, et al. Application of genetic engineering approaches to improve bacterial metabolite production. Curr Protein Pept Sci, 2020, 21(5): 488-496.
- [40] Wang SH, Liu F, Hou ZW, et al. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*). World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(4): 1369-1376.
- [41] Shen WH, Wang DH, Wei LL, et al. Fungal elicitor-induced transcriptional changes of genes related to branched-chain amino acid metabolism in *Streptomyces natalensis* HW-2. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(10): 4471-4482.

- [42] Jiang H, Wang YY, Ran XX, et al. Improvement of natamycin production by engineering of phosphopantetheinyl transferases in *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(11): 3346-3354.
- [43] Wang K, Chen XA, Li YQ, et al. Identification of a secondary metabolism-responsive promoter by proteomics for over-production of natamycin in *Streptomyces*. *Arch Microbiol*, 2019, 201(10): 1459-1464.
- [44] Yu P, Liu SP, Bu QT, et al. WblA_{ch}, a pivotal activator of natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis* L10, is positively regulated by AdpA_{ch}. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(22): 6879-6887.
- [45] Palazzotto E, Tong YJ, Lee SY, et al. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(6): 107366.
- [46] Yu P, Bu QT, Tang YL, et al. Bidirectional regulation of AdpA_{ch} in controlling the expression of *scnRI* and *scnRII* in the natamycin biosynthesis of *Streptomyces chattanoogensis* L10. *Front Microbiol*, 2018, 9: 316.
- [47] Elsayed EA, Farid MAF, Ali El Enshasy H. Improvement in natamycin production by *Streptomyces natalensis* with the addition of short-chain carboxylic acids. *Pro Biochem*, 2013, 48(12): 1831-1838.
- [48] Li M, Chen SW, Li JH, et al. Propanol addition improves natamycin biosynthesis of *Streptomyces natalensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 172(7): 3424-3432.
- [49] Zeng X, Zen HW, Meng Y, et al. Continuous natamycin production by using immobilized *Streptomyces gilvosporeus* Z8 via repeated batch culture. *J Chem Technol Biotechnol*, 2020, 95(1): 73-77.
- [50] Elsayed EA, Farid MA, El-Enshasy HA. Enhanced natamycin production by *Streptomyces natalensis* in shake-flasks and stirred tank bioreactor under batch and fed-batch conditions. *BMC Biotechnol*, 2019, 19: 46.
- [51] Zeng X, Miao WY, Zeng HW, et al. Production of natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* Z28 through solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Bioresour Technol*, 2019, 273: 377-385.
- [52] Wang DH, Yuan JF, Gu SB, et al. Influence of fungal elicitors on biosynthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* HW-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(12): 5527-5534.
- [53] 王大红, 张颖, 郑迎莹, 等. L-缬氨酸对 *Streptomyces natalensis* HW-2 合成纳他霉素的影响. *精细化工*, 2019, 36(4): 708-714.
Wang DH, Zhang Y, Zheng YY, et al. Effect of L-valine on biosynthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* HW-2. *Fine Chem*, 2019, 36(4): 708-714 (in Chinese).
- [54] 王大红, 韦兰兰, 张帅滢, 等. 基于响应面法的纳他霉素生产菌株发酵培养基优化. *精细化工*, 2017, 34(11): 1233-1238, 1245.
Wang DH, Wei LL, Zhang SY, et al. Optimization of fermentation medium for producing strain of natamycin using response surface methodology. *Fine Chem*, 2017, 34(11): 1233-1238, 1245 (in Chinese).
- [55] 郑迎莹, 王大红, 徐鹏, 等. 纳他霉素的大孔树脂原位吸附动力学研究. *食品与机械*, 2019(12): 42-46.
Zheng YY, Wang DH, Xu P, et al. *In situ* adsorption kinetics of macroporous resin on natamycin. *Food Machin*, 2019(12): 42-46 (in Chinese).
- [56] Lim HG, Jang S, Jang S, et al. Design and optimization of genetically encoded biosensors for high-throughput screening of chemicals. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 54: 18-25.
- [57] Tong YJ, Weber T, Lee SY. CRISPR/Cas-based genome engineering in natural product discovery. *Nat Product Rep*, 2019, 36(9): 1262-1280.
- [58] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品添加剂使用标准 GB 2760-2014. 北京: 中国标准出版社, 2014.
National Health and Family Planning Commission of PRC. Chinese standards for Food Additives GB 2760-2014. Beijing: Standards Press of China, 2014 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)