

龟裂霉素新产生菌株的鉴定及其产量优化

曹浩榄^{1,2}, 王立军², 冯颖赢^{2,4}, 马博洋^{2,5}, 范可强², 王立艳⁵, 夏焕章¹, 潘国辉^{*2,3}

1 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 本溪 117004

2 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学 存济医学院, 北京 100049

4 山东第一医科大学(山东省医学科学院) 生物医学科学学院(省医药生物技术研究中心), 山东 济南 250117

5 中国矿业大学(北京) 化学与环境工程学院, 北京 100083

曹浩榄, 王立军, 冯颖赢, 马博洋, 范可强, 王立艳, 夏焕章, 潘国辉. 龟裂霉素新产生菌株的鉴定及其产量优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3133-3147.

CAO Haolan, WANG Lijun, FENG Yingying, MA Boyang, FAN Keqiang, WANG Liyan, XIA Huanzhang, PAN Guohui. Identification and yield improvement of a new rimocidin-producing strain[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3133-3147.

摘要:【背景】龟裂霉素(rimocidin)是一种具有广谱抗真菌活性的四烯大环内酯类化合物, 对多种真菌性植物病害具有较强的防治作用, 因此具有开发成农用抗生素药物的潜力。目前已经陆续发现几株链霉菌可以生产龟裂霉素, 如龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*) M527, 但是龟裂霉素的低产量仍限制其在农用抗生素方面的开发。【目的】系统揭示链霉菌基因组中龟裂霉素生物合成基因簇(*rim* 基因簇)的分布及特征, 发现新的龟裂霉素生产菌株, 并基于基因工程等策略提高其产量。

【方法】采用 BLASTp 在链霉菌基因组中搜索龟裂霉素已知生物合成酶的同源蛋白, 进一步筛选出预测可合成龟裂霉素的基因簇及所在菌株。使用多位点序列分析方法(multi-locus sequence analysis, MLSA)评价含有龟裂霉素生物合成基因簇的菌株的进化关系。基于代谢产物分析鉴定新的龟裂霉素生产菌株, 并通过筛选发酵培养基和过表达调控蛋白 RimoR2 来提高龟裂霉素的产量。

【结果】共发掘获得 36 个新的含有龟裂霉素生物合成基因簇的链霉菌菌株。并通过培养基筛选、发酵及代谢产物分析等证实其中的白色链霉菌(*Streptomyces albobacillus*) JCM 4342 能够合成龟裂霉素及其类似物 CE-108。经过培养基优化的龟裂霉素产量为 172.5 mg/L。此外, 过表达调控蛋白 RimoR2 后龟裂霉素的产量较出发菌株提高了 2.3 倍, 达到 397.1 mg/L。【结论】本研究系统分析了链霉菌中龟裂霉素生物合成基因簇及其所在菌株的分布特点, 并通过实验证实其中的 *S. albobacillus* JCM 4342 能够合成龟裂霉素及其类似物 CE-108。此外, 通过基因工程方法实现了龟裂霉素产量的提高。

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFA0914700); 国家自然科学基金(32070067, 32270081)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFA0914700) and the National Natural Science Foundation of China (32070067, 32270081).

*Corresponding author. E-mail: panguohui@im.ac.cn

Received: 2024-04-07; Accepted: 2024-04-26; Published online: 2024-05-22

本研究为构建更优的龟裂霉素高产菌株提供了新的元件、菌株和理论基础,将有助于推动龟裂霉素的进一步应用开发研究。

关键词:次级代谢产物;龟裂霉素;抗真菌;链霉菌;产量提高

Identification and yield improvement of a new rimocidin-producing strain

CAO Haolan^{1,2}, WANG Lijun², FENG Yingying^{2,4}, MA Boyang^{2,5}, FAN Keqiang², WANG Liyan⁵, XIA Huanzhang¹, PAN Guohui^{2,3}

1 School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, Liaoning, China

2 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 School of Biomedical Sciences & Shandong Medicinal and Biotechnology Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, Shandong, China

5 School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

Abstract: [Background] Rimocidin is a tetraene macrolide with broad-spectrum antifungal activities, there being developed into a potential agricultural antibiotic. Until now, several *Streptomyces* producers (such as *S. rimosus* M527) have been discovered, while the low yield of rimocidin limits the application of these strains in the development of the agricultural antibiotic. [Objective] To systematically reveal the distribution and characteristic of the biosynthetic gene clusters (BGCs) for rimocidin (*rim* BGCs) in *Streptomyces* genomes, identify a new strain which can produce rimocidin, and improve its yield via genetic engineering and other strategies. [Methods] We employed BLASTp to search for the homologous proteins of the known synthetases of rimocidin in *Streptomyces* genomes to discover the strains with predicted *rim* BGCs and capable of producing rimocidin. The multi-locus sequence analysis (MLSA) was conducted to analyze the phylogenetic relationships among these strains and publicly available *Streptomyces* strains. A new rimocidin-producing strain was identified based on the metabolite analysis and the titer of rimocidin was increased by medium optimization and RimoR2 overexpression. [Results] A total of 36 *Streptomyces* strains carrying *rim* BGCs were predicted, in which *S. albofaciens* JCM 4342 was capable of producing rimocidin and its congener CE-108. The medium optimization led to a rimocidin titer of 172.5 mg/L. Moreover, the RimoR2 overexpression increased the rimocidin titer by 2.3 folds, which reached 397.1 mg/L. [Conclusion] This study systematically revealed the distribution of *rim* BGCs in *Streptomyces*. We confirmed that *S. albofaciens* JCM 4342 can produce rimocidin and its congener CE-108. Moreover, the titer of rimocidin was improved by genetic engineering. Our findings provide new catalytic elements, strains, and a theoretical basis for the design and construction of strains with high yields of rimocidin and the application and development of rimocidin.

Keywords: secondary metabolites; rimocidin; anti-fungal; *Streptomyces*; yield improvement

多烯大环内酯类天然产物是高效广谱抗真菌药物的重要来源之一，其主要结构特征是含有一个由多个碳原子组成的内酯环骨架和环上的 3-7 个共轭双键^[1-2](图 1)。其中，两性霉素 B (amphotericin B)、制霉菌素 A1 (nystatin A1)、纳他霉素(natamycin, 又称匹马霉素, pimaricin)、杀念菌素(candicidin, 又称 FR-008)、四霉素(tetramycin)和龟裂霉素(rimocidin)等是目前研究较多的多烯大环内酯类化合物^[3]。该类化合物能够结合真菌细胞膜上的麦角甾醇,改变真菌细胞膜的通透性,使细胞内容物小分子与离子从跨膜孔洞逸出,最终造成真菌细胞的死亡^[4-5]。这种独特的抗菌机制使得真菌一般较难产生耐药性^[1]。龟裂霉素具有广谱的抗真菌活性,对多种植物病原真菌具有较强的抑制作用。早期研究发现,豌豆种子在龟裂霉素溶液中浸泡 24 h,可阻止已感染真菌的种子的病害发展,同时不

影响发芽^[6]。近期发现龟裂霉素在辣椒植株中可阻止炭疽病球炭疽菌(*Colletotrichum coccodes*)感染的发展,甚至使用浓度比商业杀菌剂氯硝硫苯还要低^[7]。此外,我国学者还发现龟裂霉素可完全抑制导致黄瓜枯萎病的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)的孢子萌发;相较于传统农药乙蒜素,龟裂霉素对黄瓜枯萎病的治疗效果维持时间更久^[8-9]。因此龟裂霉素具有开发成新型农用抗生素药物的重要潜力^[10]。

1951 年,研究人员首次从龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*) R7 (ATCC 10970)发酵产物中发现龟裂霉素^[11]。之后,通过质谱分析和核磁共振技术对龟裂霉素平面结构进行了表征^[12-14]。直到 1995 年,才完整解析龟裂霉素的立体化学结构,其主体结构为 28 元的多烯大环内酯,其结构中含有四烯、放线菌糖胺和半缩酮吡喃环

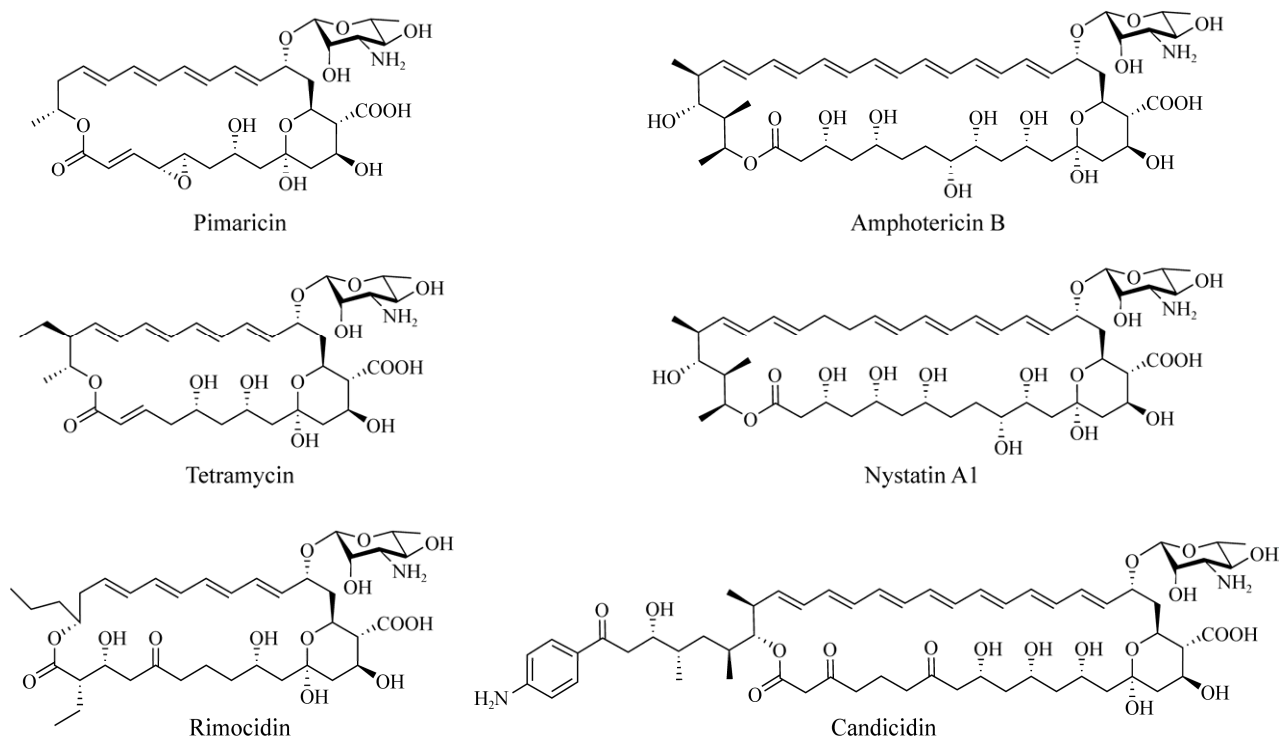


图 1 代表性多烯大环内酯类天然产物

Figure 1 Representative polyene macrolide natural products.

等独特的结构单元^[15]。2004年,在淀粉酶链霉菌(*Streptomyces diastaticus*) var. 108中不仅分离得到龟裂霉素,还鉴定了一个新结构类似物CE-108,两者的结构区别仅在于酯键附近的烷基侧链不同^[15-16]。2016年,研究人员又从苯胺紫链霉菌(*Streptomyces mauvecolor*) BU16和龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*) M527这2株链霉菌中发现龟裂霉素及其结构类似物^[7,9]。由此可见,链霉菌是龟裂霉素及其类似物(如CE-108)的主要生产源^[17]。通过对*S. diastaticus* var.108中*rim*基因簇的体内研究表明,龟裂霉素和CE-108由模块化的I型聚酮合酶(polyketide synthase 1, PKS I)催化合成;具体来说,PKS I催化13次链延伸反应形成含有四烯结构的聚酮链,接着在硫酯酶结构域的作用下环化成多烯大环内酯结构,再经过放线菌糖胺(mycosamine)糖基化和P450氧化修饰形成最终产物龟裂霉素和CE-108^[16]。其中,RimA(起始合成模块)中的酰基转移酶(acyltransferase, AT)结构域可以识别乙酰辅酶A和丁酰辅酶A这2种底物,从而导致最终形成的产物分别是龟裂霉素和CE-108^[16]。

近年来也有针对龟裂霉素产量优化的研究报道。例如,以*S. rimosus* M527野生型为出发菌株,利用转座子介导的随机突变库高产菌株筛选^[18]、基于报告基因导向突变筛选^[19]、增加生物合成前体供应^[20]、敲除全局性负调控蛋白编码基因^[21]和添加生物诱导子^[22]手段分别将龟裂霉素的产量提高82.8%、44.1%、34%、46%和68.3%。另外,在*S. rimosus* M527的*rim*基因簇中存在一个*rimR2*基因,其编码一个large ATP-binding regulators of the LuxR family (LAL)类型调控因子;敲除*rimR2*导致龟裂霉素不再产生,表明RimR2正调控龟裂霉素的生物合成^[23]。有研究人员使用*permE**、*kasOp**、SPL21和SPL57等启动子过表达*rimR2*以提高龟裂霉素

的产量,其中使用*kasOp**启动子时提高幅度最大,达到81.8%^[23]。此外,在其他已经报道的龟裂霉素生物合成基因簇中也含有*rimR2*的同源基因^[23]。尽管如此,龟裂霉素的产量较低仍然是限制其作为农用抗生素应用的原因之一。

基于此,本研究旨在通过系统发掘链霉菌基因组数据,以期发现含有龟裂霉素生物合成基因簇的新产生菌株,并采用多位点序列分析(multi-locus sequence analysis, MLSA)方法评价这些链霉菌基因组的进化关系。进一步通过代谢产物分析,预期鉴定出能够合成龟裂霉素的新产生菌株。此外,本研究将探索通过过表达关键调控基因*rimR2*(*rimR2*的同源基因)来提高龟裂霉素的产量,为未来设计和构建更优的龟裂霉素高产菌株提供新的元件、途径和菌株,从而为龟裂霉素的进一步应用开发和研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株白色链霉菌(*Streptomyces albobacillus*) JCM 4342 (CGMCC 4.1655),中国普通微生物菌种保藏管理中心。大肠杆菌(*Escherichia coli*) ET12567/pUZ8002和质粒pSET152-*kasO**^[24]为本实验室保藏。龟裂霉素的标准品由中国计量大学马正教授赠予。

1.1.2 培养基

用于培养大肠杆菌的培养基:LB培养基和2×YT培养基参考文献[25]配制。*S. albobacillus* JCM 4342产孢培养基:MS培养基参考文献[26]配制,ISP2培养基、ISP3培养基、ISP4培养基参考文献[27]配制。用于龟裂霉素产量优化的培养基:M1(g/L):可溶性淀粉20.0,葡萄糖10.0,蛋白胨5.0,酵母提取物5.0,NaCl 4.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 2.0, pH 7.0; M2

(g/L): 蔗糖 100.00, 葡萄糖 10.00, 酸水解酪蛋白 0.10, 酵母提取物 5.00, 4-吗啉丙磺酸(4-morpholinepropanesulfonic acid, MOPS) 21.00, 微量元素溶液[40 mg/L ZnCl₂, 200 mg/L FeCl₃·6H₂O, 10 mg/L CuCl₂·2H₂O, 10 mg/L MnCl₂·4H₂O, 10 mg/L NaB₄O₇·10H₂O, 10 mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O] 1 mL, K₂SO₄ 0.25, MgCl₂·6H₂O 10.00, pH 7.0; M4 (g/L): 甘油 50.0 mL, 可溶性淀粉 25.0, 酵母提取物 5.0, pH 7.0; FM2 (g/L): 酵母提取物 2.0, 可溶性淀粉 5.0, 蛋白胨 2.0, 葡萄糖 20.0, 黄豆粉 5.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, CaCO₃ 3.0, NaCl 4.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, pH 7.4。

1.1.3 主要试剂和仪器

甲醇和二甲基亚砜, 康科德试剂有限公司; 色谱乙腈, 北京伊诺凯科技有限公司; 酶和 DNA 分子质量标准, NEB 公司; DNA 回收试剂盒和质粒小提试剂盒, 北京博迈德生物技术有限公司; 氨苄青霉素(100 mg/mL, 下同), 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 安普霉素(100 mg/mL)、链霉素(50 mg/mL)、壮观霉素(50 mg/mL)和潮霉素 B(100 mg/mL), 上海麦克林生化科技有限公司; 卡那霉素(50 mg/mL), 上海源叶生物科技有限公司; 硫链丝菌素(25 mg/mL), 北京沃凯生物科技有限公司。PCR 引物合成及 DNA 测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 制备型高效液相色谱, 安捷伦科技有限公司; 分析型高效液相色谱, 岛津企业管理有限公司; 500 MHz 核磁共振波谱仪, 布鲁克拜厄斯宾有限公司; 超高压相高分辨液质联用仪, 沃特世科技有限公司; PCR 扩增仪, 赛默飞世尔科技有限公司; 凝胶成像仪, 上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

链霉菌属细菌基因组数据下载自 NCBI

Genome 数据库(截至 2023 年 11 月)。以已知龟裂霉素生物合成基因簇中的蛋白序列为查询蛋白, 使用 BLASTp 在链霉菌基因组中系统搜索^[28], 找出成簇排列的同源蛋白, 并与 MIBiG 数据库中已知天然产物生物合成基因簇进行比较^[29], 通过人工复筛挑选出可能合成龟裂霉素的生物合成基因簇。

使用 MLSA 对含有龟裂霉素生物合成基因簇的链霉菌宿主的基因组进行相似性比较。参考文献[30-31]中的方法, 选择 ATP 合酶 β 链(AtpD)、DNA 旋转酶 β 亚基(GyrB)、重组酶 A(RecA)、RNA 聚合酶 β 亚基(RpoB)和色氨酸合酶 β 亚基(TrpB)这 5 个蛋白的编码基因进行分析。使用 MEGA 11.0 进行多重序列比对、Kimura 双参数距离计算并构建进化树^[32], 使用 iTOL 进行可视化^[33]。

1.2.2 菌株发酵及产物分析及培养基优化

将 *S. albobacillus* JCM 4342 菌液均匀涂布在 MS、ISP2、ISP3、ISP4 固体培养基上, 28 °C 培养 6-7 d 后, MS 培养基孢子长势最好, 之后用无菌水收集孢子。取 500 μL 孢子液转接至 25 mL 的 TSB 液体培养基, 28 °C、180 r/min 培养 36 h。各取 1 mL 种子培养液, 分别转接 50 mL 的 MS、M1、M2、M4 和 FM2 液体培养基, 30 °C、180 r/min 振荡培养 5 d。将发酵液在 6 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析并与龟裂霉素标准品进行对比。HPLC 分析色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT (4.6 mm×100 mm, 粒径 1.8 μm), 采用乙腈和水为流动相(两相均添加 0.1%甲酸), 其程序为: 0-3 min 内以 5%乙腈进行等度洗脱, 4-18 min 内以 5%-95%乙腈梯度洗脱, 19-21 min 内以 95%乙腈冲洗色谱柱, 流速为 0.5 mL/min。

将 WT (JCM 4342 野生型菌株) 和 WT-RimoR2 (过表达 RimoR2 的重组菌株, 见 1.2.6) 的种子培养物按 2% 的接种量接种至 50 mL 发酵培养基和优化培养基中, 28 °C、180 r/min 培养, 在发酵过程中分别取 12、24、36、48、60、72、96、108 h 的发酵液样品进行取样, 并置于 -80 °C 冰箱保存。以上每种培养基做 3 组平行实验, 并进行了 3 次以上的重复实验。采用二苯胺法测生物量^[34]。

1.2.3 龟裂霉素的分离纯化和结构鉴定

JCM 4342 重组菌株 WT-RimoR2 发酵培养 5 d 后, 向其发酵液中加入 XAD-16 树脂(每 50 mL 培养基加 1 g 树脂), 充分吸附后, 收集树脂并阴干, 用甲醇浸泡提取发酵产物。首先使用反相 C18 填料柱进行分离, 依次使用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、90% 的乙腈/水溶液进行减压梯度洗脱。收集各个洗脱组分, 经 HPLC 检测并与标准品对照, 选择含有龟裂霉素的 40% 乙腈洗脱组分进行浓缩。随后使用 Sephadex LH20 凝胶柱进一步分离, 使用甲醇洗脱。分段收集洗脱组分, 经 HPLC 检测后将含有较纯目标化合物的组分进行合并、浓缩。最后采用制备型 HPLC 进行制备, 采用乙腈和水为流动相(两相均添加 0.1% 甲酸), 60% 等度洗脱, 收集目标产物, 浓缩后冻干, 最终获得 12.3 mg 龟裂霉素。

1.2.4 抗生素敏感性测试

收集 JCM 4342 新鲜孢子, 分别涂布在含有不同浓度安普霉素、卡那霉素、硫链丝菌素、链霉素、壮观霉素或潮霉素的 ISP2 或 MS 固体培养基上, 28 °C 培养 5–7 d; 观察菌落在不同浓度抗生素平板上的生长状况, 确定最小抑菌浓度。

1.2.5 质粒的构建

本研究中所用的引物见表 1。

菌株 JCM 4342 中 *rimoR2* 基因高表达质粒的构建: 以 JCM 4342 基因组为模板, 以 kasO-rimoR2-3th-F 和 4.1655-kasO-rimoR2-R 为引物(表 1), 扩增 *rimoR2* 基因。PCR 反应体系 (50 μL): 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1.5 μL, 模板 DNA (50 mg/L) 0.5 μL, DMSO 2.5 μL, KOD One Mix 44 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。使用 *Alf* II 和 *Eco*R I 内切酶对 pSET152-kasO* 质粒进行双酶切。将 *rimoR2* 基因片段和载体骨架片段通过 Gibson 组装进行连接, 获得重组质粒 pSET-kasO*-RimoR2。

1.2.6 接合转移

将含有 *oriT* 的质粒转化大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 感受态细胞, 涂布在含有 100 μg/mL 安普霉素、25 μg/mL 氯霉素、50 μg/mL 卡那霉素抗生素的固体 LB 培养基上, 37 °C 培养; 挑

表 1 本研究所涉及的引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Usage
secER23370-F	GGGATGAAGATGGTGCT	Verification of <i>rimM</i> sequence
secER23370-R	ATCAGGACGAGGTGCTTGAC	
kasO-rimoR2-3th-F	AGGACTGGGGGAGTTATGCTGTATGAGCGGGAGTC	Construction of <i>rimoR2</i> overexpression plasmid
4.1655-kasO-rimoR2-R	ACATGATTACGAATTCTCAGCCCGCGCCAGCGCGGCGCTC	
rimR2-cexu-F	GACCAACCAGGAAATCGCCC	Verification of <i>rimoR2</i> overexpression plasmid
4.1655-23400-test-F	GGAAGAAGAACGAGGCCGAA	
4.1655-23405-test-R	TGCGGAGGAGAGGAATGAGA	Verification of <i>S. albobacillus</i> JCM 4342 wild type
4.1655plasmid-test-F	AGCTTCCCCTTGACCAATGG	Verification of recombinant strains
4.1655plasmid-test-R	TTCGAGGAAGAGAGGGTTGC	

取单菌落接种到 4 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 安普霉素的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜; 取 1 mL 培养过夜的菌液接种在 50 mL 含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 安普霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6; 6 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 用等体积液体 LB 培养基洗涤菌体 2 次, 用 500 μL 液体 LB 培养基悬浮菌体; 在洗涤大肠杆菌细胞的同时, 用 2 \times YT 培养基收集链霉菌孢子, 50 $^{\circ}\text{C}$ 热激 10 min, 随后于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 复苏 1 h; 将 500 μL 的大肠杆菌细胞与 50 μL 孢子混合, 涂布在含有 10 mmol/L MgCl_2 、30 mmol/L CaCl_2 的固体 MS 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16–18 h 后涂布终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的萘啶酮酸和 600 $\mu\text{g/mL}$ 的安普霉素, 28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 7–8 d 获得接合子 WT-RimoR2。

1.2.7 龟裂霉素标准曲线的绘制及产量计算

将分离纯化好的龟裂霉素配制为 1 mg/mL 母液, 采用等量稀释法配制不同浓度梯度, 采用 1.2.2 节中方法进行 HPLC 分析, 并计算得到龟裂霉素的浓度(x , mg/L)与峰面积(y)的标准曲线 $y=b_0+b_1\times x$ 。截距 $b_0=12.6\pm 14.9$, 斜率 $b_1=7.45\times 10^{-5}\pm 0.22\times 10^{-5}$, 线性回归系数 $r=0.998\ 709$ 。

2 结果与分析

2.1 龟裂霉素生物合成基因簇的发掘与分布

从 NCBI Genome 数据库中共下载得到 3 178 个链霉菌属细菌基因组(截至 2023 年 11 月), 其中包含了已报道可以合成龟裂霉素的龟裂链霉菌 *S. rimosus* ATCC 10970、M527 以及 R6-500 等菌株的基因组序列。在龟裂链霉菌 ATCC 10970 中搜索与已报道的龟裂霉素生物合成基因簇中蛋白序列高度相似(序列一致性大于 95%)、编码基因排列顺序一致的同源蛋白, 结合已有的关于龟裂霉素生物合成酶以及生物合成途径的研究结果^[16,23], 确定了龟裂链霉菌 ATCC 10970 中完整的龟裂霉素生物合成基因簇(图 2)。随后以此基因簇中的蛋白为查询序列, 在 3 178 个链霉菌属细菌基因组中搜索成簇排列的同源蛋白, 并进一步与 MIBiG 数据库中已知天然产物生物合成基因簇进行蛋白序列比较^[29], 经过人工检验复核, 最终获得了 36 个新的预测可合成龟裂霉素的基因簇。如图 2 所示, 这些龟裂霉素生物合成基因簇的蛋白序列相似、编码基因排列顺序也基本一致。按照基因簇中的基因组成方式, 大体可以分为 3 种情

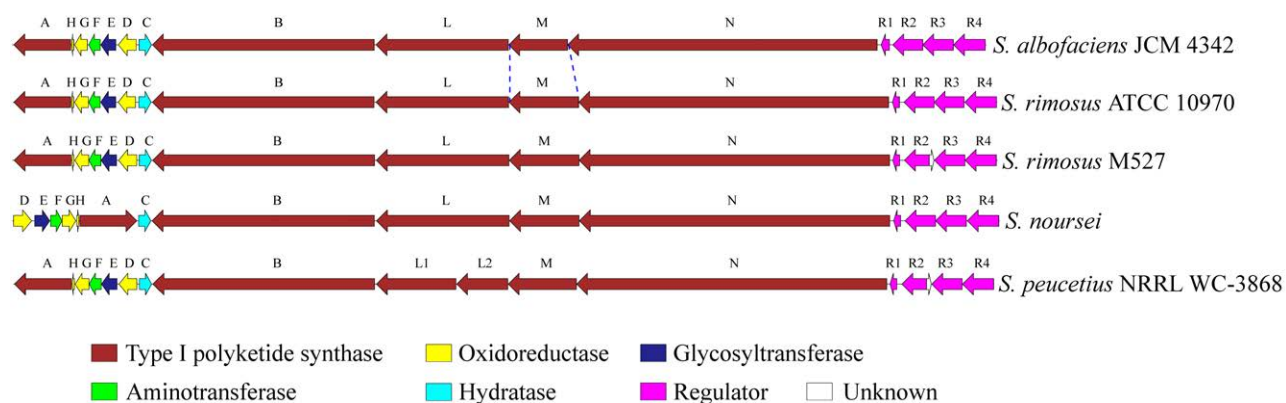


图 2 链霉菌属中龟裂霉素的几种代表性生物合成基因簇比较

Figure 2 Comparison of several representative biosynthetic gene clusters of rimocidin from *Streptomyces*.

况：(1) 与龟裂链霉菌 ATCC 10970 一致。尽管如此，基因簇之间仍存在一些微小区别，如 M527 在 *rimR2* 右侧多出一个未知功能基因，JCM 4342 中 *rimoM* 相对于已知的 *rimM* 同源基因偏小等；(2) 结构基因 *rimA* 和 *rimDEFGH* 反向排布(如 *S. noursei* 中的基因簇)。基因组比较也显示这几个菌株单独构成了一个亚分支(图 3)，可能与特定的进化事件有联系；(3) 其中一些基因簇中的 PKS I 的编码蛋白数目和长度有不同，但是总长度和结构域顺序基本一致，如 *S. peucetius* NRRL WC-3868 中的基因簇。

进一步 MLSA 计算这些潜在龟裂霉素产生菌之间的基因组相似度。除了这些含有龟裂霉素生物合成基因簇的链霉菌之外，随机挑选 21 个模式链霉菌基因组，同时以 *Saccharothrix australiensis* DSM 43800 和 *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229 为外群，进行多基因序列分析比较。分析结果如图 3 所示，含有龟裂霉素生物合成基因簇的 41 个链霉菌(其中含 5 个已经报道可以产生龟裂霉素的菌株)聚成一个分支，并进一步分为两个亚分支。其中较小的亚分支包含 *S. yunnanensis* 以及 *S. noursei* 等菌株；较大的亚分支以龟裂链霉菌为主，也包含 *S. albobaciens* JCM 4342、*S. peucetius* 等菌株。这一结果表明链霉菌属中高度相似的龟裂霉素生物合成基因簇可能具有共同的进化起源。

基因组序列比较显示，菌株 JCM 4342 与大部分龟裂链霉菌聚成一个分支，但是 Kimura 双参数距离均大于 0.007 (为 0.013–0.049)。已有的关于链霉菌属多基因序列分析的研究通常认为 0.007 是区分是否为同一物种的 Kimura 双参数距离阈值^[30-31]，因此，菌株 JCM 4342 与龟裂链霉菌不属于同一物种。同时，龟裂链霉菌 M527 很明显地与模式菌种 ATCC 10970 以及菌株 R6-500 分开了，它们之间的距离为 0.040，

大于该阈值。菌株 JCM 4342 与菌株 M527 之间的 Kimura 双参数距离为 0.050，也大于该阈值。这些结果预示，*S. albobaciens* JCM 4342、龟裂链霉菌 ATCC 10970 以及 M527 属于不同的物种。

2.2 *S. albobaciens* JCM 4342 是新的龟裂霉素生产菌

选择 5 种不同的培养基(MS^[19]、M1、M2、M4 和 FM2)对 JCM 4342 进行摇瓶发酵，以确定其是否可以生产龟裂霉素。HPLC 分析结果显示在 5 种培养基中都可以产生一类符合四烯大环内酯特征紫外吸收的化合物，同时通过与标准品对比，初步确定其为龟裂霉素(图 4A)。其中使用 FM2 培养基进行发酵培养时对应的产物量最高。因此，使用 FM2 培养基进行了 JCM 4342 的扩大发酵(2 L)，并通过 C18 柱层析、Sephadex LH20 柱层析、制备 HPLC 等方法从中纯化到了化合物 1，根据高分辨电喷雾质谱(high resolution electrospray ionization mass spectroscopy, ESI-HR-MS)(图 4B)、¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据，确定化合物 1 为龟裂霉素。

化合物 1 (=rimocidin, 12.3 mg): 淡黄色，高分辨质谱 766.402 7 [M-H]⁻ (calc. 766.401 4, $\Delta=1.7$ ppm)，分子式为 C₃₉H₆₁NO₁₄；¹H 和 ¹³C NMR 数据与文献中数据进行比较，化合物 1 被确定为龟裂霉素^[15,35]。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.31–6.10 (overlapped, 5H), 6.04 (dd, $J=15.9, 10.5$ Hz), 5.76 (dd, $J=15.6, 7.7$ Hz), 5.64 (ddd, $J=12.3, 12.3, 4.5$ Hz), 5.04 (m), 4.55 (s), 4.35 (br. s), 4.30 (t, $J=9.5$ Hz), 4.26 (ddd, $J=12.0, 12.0, 5.0$ Hz), 3.99 (br. s), 3.51 (t, $J=9.0$ Hz), 3.37 (t, $J=9.3$ Hz), 3.18 (dd, $J=10.5, 2.0$ Hz), 2.83 (d, $J=15.6$ Hz), 2.57 (d, $J=15.9$ Hz), 2.54 (dd, $J=16.4, 15.3$ Hz), 2.45 (dd, $J=15.2, 2.0$ Hz), 2.33 (br.d, $J=17.2$ Hz), 2.28(m), 2.20 (dd, $J=13.9, 4.4$ Hz), 2.07 (td, $J=10.5, 3.5$ Hz), 2.01 (m), 1.92 (m), 1.73 (q-like), 1.48–1.62 (overlapped, 4H),

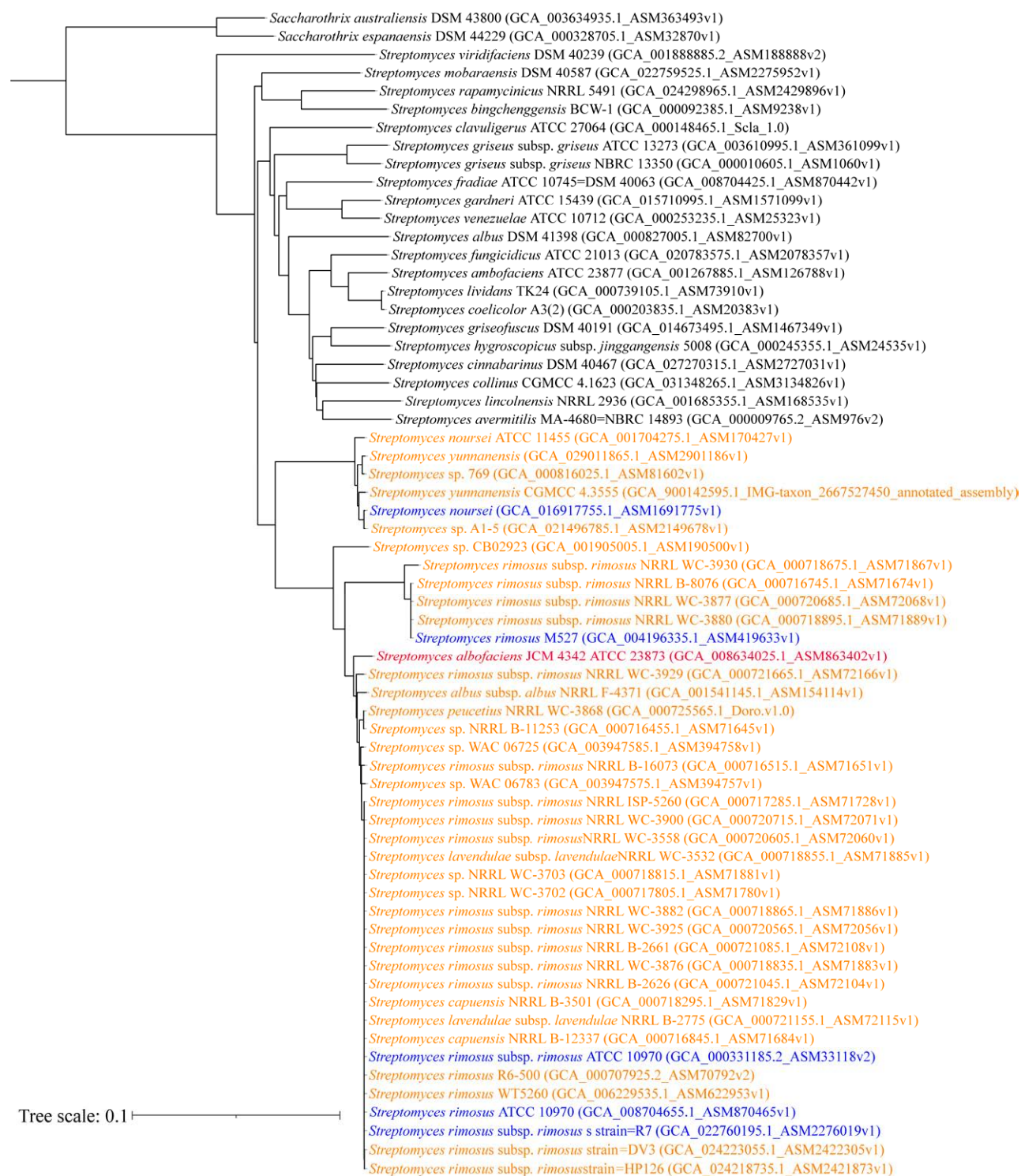


图3 含龟裂霉素生物合成基因簇的菌株的多基因序列分析 蓝色：已报道生产龟裂霉素菌株；红色：本研究证实的新生产菌株；橙色：含有龟裂霉素生物合成基因簇的菌株；黑色：其他模式菌株

Figure 3 Multi-locus sequence analysis of strains containing rimocidin biosynthetic gene clusters. Blue: Reported rimocidin producers; Red: New producing strain confirmed in this study; Orange: *Streptomyces* genomes containing rimocidin biosynthetic gene clusters; Black: Other model strains.

1.31–1.46 (overlapped, 4H), 1.27 (q-like, 2H), 1.03–1.23 (overlapped, 3H), 0.93 (t, $J=6.5$ Hz, Me), 0.89 (t, $J=6.5$ Hz, Me); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 213.7, 175.3, 169.9, 136.6, 134.3, 134.0, 133.9, 133.4, 132.9, 132.5, 130.5, 99.0, 98.7, 79.1, 74.5, 74.3, 72.4, 70.3, 69.1, 69.0, 67.66, 67.65, 61.1, 59.2, 58.7, 57.0, 53.8, 53.5, 49.9, 49.6, 39.6, 38.6, 38.4, 37.4, 23.4, 19.5, 17.7, 14.2, 12.4。

除了分离得到目标产物龟裂霉素，通过紫外吸收光谱和高分辨质谱分析，从发酵产物中鉴定一个龟裂霉素结构类似物 **2**，高分辨质谱显示 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 738.368 3 (calc. 738.370 0, $\Delta=-2.2$ ppm)，分子式为 $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{NO}_{14}$ 。基于以上结果，确定化合物 **2** 为已知化合物 CE-108^[16,35]。这些实验结果表明 *S. albobacillus* JCM 4342 是龟裂霉素及其类似物 CE-108 的新生产菌株。

2.3 *S. albobacillus* JCM 4342 中龟裂霉素的生物合成途径分析

为了与已报道的 *rim* 基因簇进行区分，将

JCM 4342 中龟裂霉素生物合成基因簇命名为 *rimo*。对 *rimo* 基因簇的 antiSMASH 分析显示，该基因簇中含有 5 个 PKS I 编码基因，包含 1 个起始模块和 13 个延伸模块，与文献[16]报道一致。其中，RimoA 中的酰基转移酶结构域可以识别乙酰辅酶 A 和丁酰辅酶 A 两种起始底物；RimoB 和 RimoL 中分别负责 3 个双键和 1 个双键的形成，从而共同构建四烯结构单元；第 7 步和第 13 步所使用的延伸单元分别是甲基丙二酰辅酶 A 和乙基丙二酰辅酶 A，其余延伸步骤均使用的是丙二酰辅酶 A；链释放是通过 RimoN 中硫酯酶结构域催化形成大环内酯完成的。最后，经过糖基转移酶 RimoE 催化放线菌糖胺糖基化、P450 氧化酶 RimoG 催化甲基氧化生成羧基的后修饰反应，形成龟裂霉素和 CE-108 (图 5)^[15-16]。

另外，通过与已报道的 *rim* 基因簇比对发现，JCM 4342 中的 *rimoM* 比其他两个已报道的

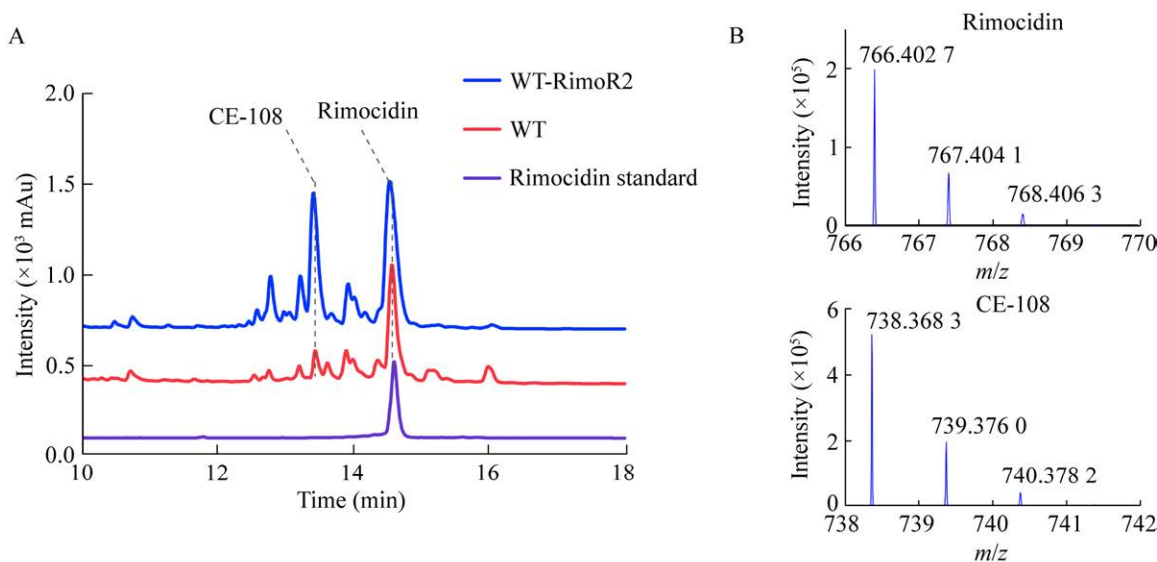


图 4 菌株 JCM 4342 发酵产物分析 A: 菌株 JCM 4342 发酵液与龟裂霉素标准品的 HPLC 分析结果; B: 从高分辨质谱数据中提取龟裂霉素和 CE-108 的分子离子峰

Figure 4 Fermentation products analysis of strain JCM 4342. A: HPLC profile of strain JCM 4342 fermentation product and rimocidin standard; B: Extract ions of rimocidin and CE-108 from HR-ESI-MS data.

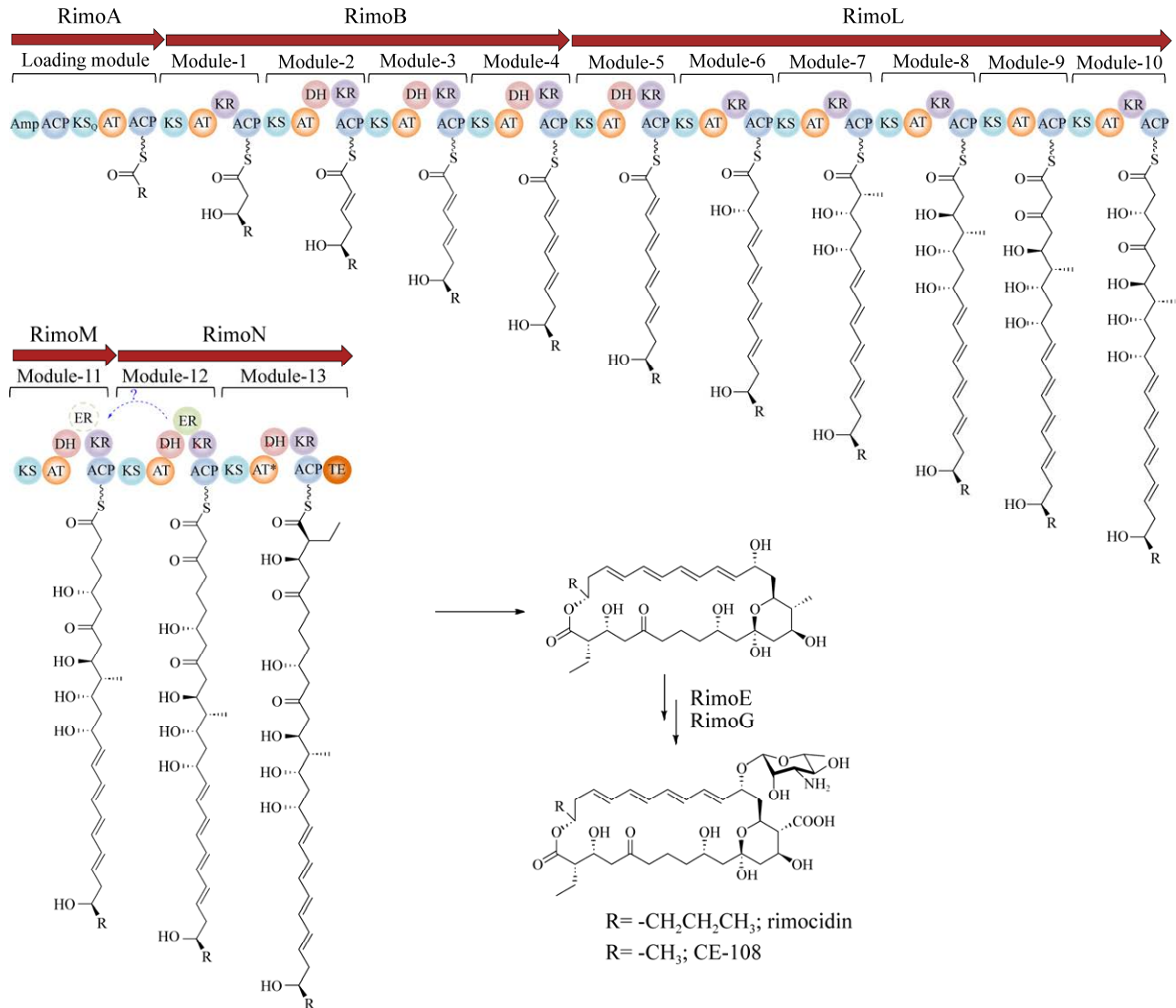


图 5 来源于 JCM 4342 龟裂霉素和 CE-108 的可能生物合成途径

Figure 5 Putative biosynthetic pathway of rimocidin and CE-108 isolated from JCM 4342.

rimM 同源基因序列短一些。antiSMASH 分析显示, RimoM 编码的第 11 个模块中缺少了烯基还原酶(enoylreductase, ER)结构域。对 *rimoM* 基因的相应区域进行 PCR 扩增并重新测序(表 1), 验证原有报道的基因组碱基序列信息正确。我们注意到负责抗真菌天然产物阿扎霉素 F 生物合成的聚酮合酶中 ER 结构域存在独特的跨模块双键还原机制, 即可通过跨模块“借用” ER

催化下游聚酮链中间体的双键还原^[36]。基于此, 推测 RimoM 编码的第 11 个模块可能通过“借用”下一个模块(RimoN 编码的第 12 个模块)中的 ER 结构域来催化双键的还原反应(图 5)。然而, 双键还原反应发生的具体时间(聚酮链中间体连接在模块 11 的酰基载体蛋白上还是模块 12 的酰基载体蛋白上)仍需进一步探究。

此外, 在 JCM 4342 中的 *rimo* 基因簇附近

未发现来源于 ATCC 10970 的 *rim* 基因簇中的 *rimJ* (编码 crotonyl-CoA carboxylase) 与 *rimK* (编码乙酰基转移酶)。有研究显示, 将 *S. diastaticus* var. 108 菌株中的 *rimJK* 基因敲除得到的突变株仍然产生龟裂霉素及类似物^[37]。因此, 推测 *rimJ* 和 *rimK* 所编码的酶可能在龟裂霉素生物合成途径中并不是必需的。

2.4 *S. albobacillus* JCM 4342 中龟裂霉素的产量优化

基于对 JCM 4342 的培养条件摸索(表 2), 确定了接合转移条件为安普霉素 600 $\mu\text{g/mL}$, 萘啶酮酸 50 $\mu\text{g/mL}$ 。将构建的 pSET-kasO*-RimoR2 通过大肠杆菌-链霉菌间的接合转移转入 JCM 4342, 获得 *rimoR2* 高表达重组菌株 WT-RimoR2。随后, 将 WT 和 WT-RimoR2 平行发酵并进行 HPLC 分析。

基于 HPLC 分析, 绘制了在 310 nm 波长下峰面积与龟裂霉素浓度的标准曲线, 用于龟裂霉素的定量研究。由于 CE-108 与龟裂霉素的紫外吸收特征基本一致, 用上述标准曲线估算 CE-108 的产量。在 5 种培养基中, 使用 FM2 培养基时龟裂霉素的产量最高, 达到 172.5 mg/L (图 6A),

表 2 白色链霉菌 JCM 4342 抗生素敏感性

Table 2 Antibiotics sensitivity of *Streptomyces albobacillus* JCM 4342

抗生素浓度 Antibiotics concentration ($\mu\text{g/mL}$)	安普霉素 Apramycin	萘啶酮酸 Nalidixic acid
30	++	++
50	++	-
100	++	-
200	++	-
400	+	-
600	-	-
800	-	-

-: 不生长; +: 生长缓慢; ++: 正常生长

-: Does not grow; +: Grows slowly; ++: Grows normally.

因此 FM2 培养基被用于后续研究。为了提高龟裂霉素的产量, 利用高强度的启动子 *kasOp** 过表达 *rimoR2* 基因, 获得重组菌株 WT-RimoR2。发酵结果显示过表达 *rimoR2* 基因使得龟裂霉素的产量较出发菌株(菌株 JCM 4342) 提高了 2.3 倍, 达到了 397.1 mg/L (图 6A)。此外, 本研究评价了两个菌株的生长情况, 结果表明过表达 *rimoR2* 基因未导致菌体生长发生显著变化(图 6B)。

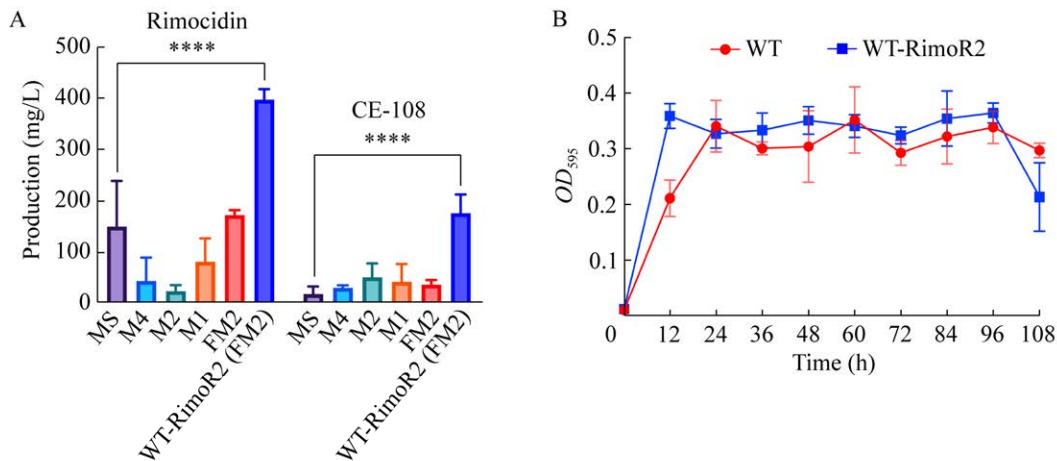


图 6 菌株 JCM 4342 和 WT-RimoR2 的龟裂霉素、CE-108 产量分析(A)及其生长曲线(B)

Figure 6 Analysis of production of rimocidin and CE-108 from strain JCM 4342, strain WT-RimoR2 (A) and growth curve (B). ****: $P < 0.0001$.

3 讨论与结论

龟裂霉素可以用于防治多种病原真菌导致的作物病害,因此具有开发成新型农用抗生素药物的重要潜力^[7]。本研究基于对链霉菌属细菌基因组数据的系统分析,共发掘获得 36 个新的含有龟裂霉素生物合成基因簇的菌株。基于这些基因簇的特点,将它们大致分为三类:第一类与已报道的龟裂霉素生物合成基因簇高度相似,基因组成和排布一致;第二类和第三类在基因组成、排布及所编码的 PKS I 的结构域组成等方面有细微不同,预测这些基因簇可合成龟裂霉素或与其结构高度相似的化合物。进一步对这些基因簇所在菌株开展多基因序列相似性分析,结果表明这些宿主菌株亲缘关系较近,提示这些菌株可能是通过基因垂直转移的方式获得龟裂霉素生物合成基因簇。选择新的潜在龟裂霉素生产菌株 *S. albobaciens* JCM 4342 为研究对象,通过培养基优化、发酵产物分离纯化、高分辨质谱和一维核磁共振技术证实 JCM 4342 可以产生龟裂霉素及其类似物 CE-108。另外,在 JCM 4342 基因组中 *rimo* 基因簇编码的 RimM 相比已知的 RimM 及其同源蛋白缺少了 ER 结构域^[16,38]。基于此,推测下游第 12 个模块中的 ER 结构域可能被“借用”,以完成相应的双键还原反应(图 5)。

过表达途径特异性的正调控因子是提高天然产物产量的一种常用有效策略^[23]。龟裂霉素生物合成基因簇中存在一个保守的调控基因亚簇,编码 1 个 LuxR 家族调控因子(RimR1 及其同源蛋白)和 3 个 LAL 类型的调控因子(RimR2、R3、R4 及其同源蛋白)。前期研究表明 RimR2 可以正调控龟裂霉素的生物合成,而其余 3 个调控因子对龟裂霉素的生物合成无显著影响或者起到负调控作用^[23]。因此,使用高强度启动

子 *kasOp** 在 JCM 4342 中过表达 *rimoR2* (*rimR2* 同源基因),成功将龟裂霉素的产量提高 2.3 倍,达到 397.1 mg/L,略高于此前在 M527 菌株中过表达 *rimR2* 所获得的最高产量 376.7 mg/L^[23]。前期有研究者还尝试不同的方法和策略以提高龟裂霉素的产量。例如,通过在 M527 菌株中过表达乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACCase)编码基因,以加强龟裂霉素生物合成前体丙二酰辅酶 A 的供应,使得龟裂霉素产量提高到 320.7 mg/L^[20]。在后续的研究中,通过整合这些有效策略,有望进一步提高龟裂霉素的产量。

本研究通过对链霉菌基因组的系统发掘,共获得 36 个新的预测可合成龟裂霉素的菌株,并对这些新鉴定龟裂霉素生物合成基因簇的特点进行总结分析。基于代谢产物鉴定的方法证实其中的 *S. albobaciens* JCM 4342 是一株新的龟裂霉素及其类似物 CE-108 的产生菌。此外,*S. albobaciens* JCM 4342 的龟裂霉素生物合成途径中可能存在一种 ER 结构域“借用”催化模式,对其进行后续研究将有助于加深对 PKS I 丰富催化机制的认识。此外,本研究还通过培养基优化及过表达正调控因子编码基因 *rimoR2* 的方法成功提高了龟裂霉素的产量。该研究工作为未来设计和构建龟裂霉素高产菌株提供了新的基因元件、生产菌株及理论基础,将进一步促进对龟裂霉素的药物开发研究。

REFERENCES

- [1] CAROLUS H, PIERSON S, LAGROU K, van DIJCK P. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical use, mode of action and drug resistance[J]. *Journal of Fungi*, 2020, 6(4): 321.
- [2] APARICIO JF, CAFFREY P, GIL JA, ZOTCHEV SB. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(3): 179-188.

- [3] LETEK M, MATEOS LM, GIL JA. Genetic analysis and manipulation of polyene antibiotic gene clusters as a way to produce more effective antifungal compounds[M]//Antimicrobial Compounds. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 177-214.
- [4] 齐震, 白林泉. 多烯大环内酯抗生素的结构改造与高产[J]. 科学通报, 2017, 62(31): 3533-3547.
QI Z, BAI LQ. Structural modifications and yield improvements of polyene macrolide antibiotics[J]. Chinese Science Bulletin, 2017, 62(31): 3533-3547 (in Chinese).
- [5] GRAY KC, PALACIOS DS, DAILEY I, ENDO MM, UNO BE, WILCOCK BC, BURKE MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(7): 2234-2239.
- [6] MAUDE RB. Pea seed infection by *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pisi* and its control by seed soaks in thiram and captan suspensions[J]. Annals of Applied Biology, 1966, 57(2): 193-200.
- [7] JEON BJ, KIM JD, HAN JW, KIM BS. Antifungal activity of rimocidin and a new rimocidin derivative BU16 produced by *Streptomyces mauvecolor* BU16 and their effects on pepper anthracnose[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(5): 1219-1228.
- [8] LU DD, MA Z, XU XH, YU XP. Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(8): 929-933.
- [9] 路丹丹, 赵艳芳, 马正, 张永勇, 王继栋, 俞晓平. 龟裂链霉菌 M527 抗真菌物质的分离鉴定及其在黄瓜枯萎病防治中的应用[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(6): 783-787.
LU DD, ZHAO YF, MA Z, ZHANG YY, WANG JD, YU XP. Identification of antifungal compound from *Streptomyces rimosus* M527 and its application in biocontrol of pathogenic *Fusarium* wilt on cucumber[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(6): 783-787 (in Chinese).
- [10] PETKOVIĆ H, CULLUM J, HRANUELI D, HUNTER IS, PERIĆ-CONCHA N, PIGAC J, THAMCHAIPENET A, VUJAKLIJA D, LONG PF. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2006, 70(3): 704-728.
- [11] DAVISSON JW, TANNER FW Jr, FINLAY AC, SOLOMONS IA. Rimocidin, a new antibiotic[J]. Antibiotics & Chemotherapy, 1951, 1(5): 289-290.
- [12] FALKOWSKI L, GOLIK J, ZIELINSKI J, BOROWSKI E. The structure of rimocidin[J]. The Journal of Antibiotics, 1976, 29(2): 197-198.
- [13] PANDEY RC, RINEHART Jr KL. Polyene antibiotics. VIII. The structure of rimocidin[J]. The Journal of Antibiotics, 1977, 30(2): 146-157.
- [14] FALKOWSKI L, ZIELIŃSKI J, GOLIK J, BYLEC E, BOROWSKI E. The structure of rimocidin: mass spectrometric analysis of derivatives of the antibiotic[J]. The Journal of Antibiotics, 1978, 31(8): 742-749.
- [15] SOWIŃSKI P, PAWLAK J, BOROWSKI E, GARIBOLDI P. Stereostructure of rimocidin[J]. The Journal of Antibiotics, 1995, 48(11): 1288-1291.
- [16] SECO EM, PÉREZ-ZÚÑIGA FJ, ROLÓN MS, MALPARTIDA F. Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in *Streptomyces diastaticus* var. 108[J]. Chemistry & Biology, 2004, 11(3): 357-366.
- [17] VIAENE T, LANGENDRIES S, BEIRINCKX S, MAES M, GOORMACHTIG S. *Streptomyces* as a plant's best friend?[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016, 92(8): fiw119.
- [18] BAO HY, LI HJ, ZHANG YY, BECHTHOLD A, YU XP, MA Z. Transposon-based identification of genes involved in the rimocidin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M527[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 39(12): 359.
- [19] JIANG YJ, ZHANG JY, HUANG XY, MA Z, ZHANG YY, BECHTHOLD A, YU XP. Improvement of rimocidin production in *Streptomyces rimosus* M527 by reporter-guided mutation selection[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2023, 49(6): kuac030.
- [20] LIAO ZJ, ZHANG JY, SHI Y, ZHANG YY, MA Z, BECHTHOLD A, YU XP. Improvement of rimocidin biosynthesis by increasing supply of precursor malonyl-CoA via over-expression of acetyl-CoA carboxylase in *Streptomyces rimosus* M527[J]. Current Microbiology, 2022, 79(6): 174.
- [21] LIAO ZJ, SONG ZQ, XU J, MA Z, BECHTHOLD A, YU XP. Identification of a gene from *Streptomyces rimosus* M527 negatively affecting rimocidin biosynthesis and morphological differentiation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(23): 10191-10202.
- [22] SONG ZQ, MA Z, BECHTHOLD A, YU XP. Effects of addition of elicitors on rimocidin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M527[J]. Applied Microbiology

- and Biotechnology, 2020, 104(10): 4445-4455.
- [23] LI HJ, HU YF, ZHANG YY, MA Z, BECHTHOLD A, YU XP. Identification of RimR2 as a positive pathway-specific regulator of rimocidin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M527[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 32.
- [24] PAN GH, XU ZR, GUO ZK, Hindra, MA M, YANG D, ZHOU H, GANSEMANS Y, ZHU XC, HUANG Y, ZHAO LX, JIANG Y, CHENG JH, van NIEUWERBURGH F, SUH JW, DUAN YW, SHEN B. Discovery of the leinamycin family of natural products by mining actinobacterial genomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(52): E11131-E11140.
- [25] SAMBROOK J, RUSSELL DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [26] KIESER T, BIBB MJ, BUTTNER MJ, CHATER KF, HOPWOOD DA. Practical *Streptomyces* Genetics[M]. The United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000.
- [27] SHIRLING EB, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.
- [28] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPAPOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL. BLAST+: architecture and applications[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [29] TERLOUW BR, BLIN K, NAVARRO-MUÑOZ JC, AVALON NE, CHEVRETTE MG, EGBERT S, LEE S, MEIJER D, RECCHIA MJJ, REITZ ZL, van SANTEN JA, SELEM-MOJICA N, TØRRING T, ZAROUBI L, ALANJARY M, ALETI G, AGUILAR C, AL-SALIHI SAA, AUGUSTIJN HE, AVELAR-RIVAS JA, et al. MIBiG 3.0: a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D603-D610.
- [30] LABEDA DP, DUNLAP CA, RONG XY, HUANG Y, DOROGHAZI JR, JU KS, METCALF WW. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 563-583.
- [31] RONG XY, HUANG Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygrosopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(1): 7-18.
- [32] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [33] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [34] ZHAO YB, XIANG SH, DAI XD, YANG KQ. A simplified diphenylamine colorimetric method for growth quantification[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(11): 5069-5077.
- [35] PÉREZ-ZÚÑIGA FJ, SECO EM, CUESTA T, DEGENHARDT F, ROHR J, VALLÍN C, IZNAGA Y, PÉREZ ME, GONZÁLEZ L, MALPARTIDA F. CE-108, a new macrolide tetraene antibiotic[J]. The Journal of Antibiotics, 2004, 57(3): 197-204.
- [36] ZHAI GF, ZHU Y, SUN G, ZHOU F, SUN YN, HONG Z, DONG C, LEADLAY PF, HONG K, DENG ZX, ZHOU FL, SUN YH. Insights into azalomycin F assembly-line contribute to evolution-guided polyketide synthase engineering and identification of intermodular recognition[J]. Nature Communications, 2023, 14: 612.
- [37] ESCUDERO L, AL-REFAI M, NIETO C, LAATSCH H, MALPARTIDA F, SECO EM. New rimocidin/CE-108 derivatives obtained by a crotonyl-CoA carboxylase/reductase gene disruption in *Streptomyces diastaticus* var. 108: substrates for the polyene carboxamide synthase PcsA[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135891.
- [38] ZHAO YF, SONG ZQ, MA Z, BECHTHOLD A, YU XP. Sequential improvement of rimocidin production in *Streptomyces rimosus* M527 by introduction of cumulative drug-resistance mutations[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(5): 697-708.