



利用代谢工程技术强化肉桂地链霉菌莫能菌素的生物合成

刘旻炜^{1,2}, 张善飞^{1,2*}, 黄子瑄^{1,2}, 邢浩博^{1,2}, 孙付保^{1,2*}

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

刘旻炜, 张善飞, 黄子瑄, 邢浩博, 孙付保. 利用代谢工程技术强化肉桂地链霉菌莫能菌素的生物合成[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3521-3532.

LIU Minwei, ZHANG Shanfei, HUANG Zixuan, XING Haobo, SUN Fubao. Metabolic engineering of *Streptomyces cinnamonensis* enhances biosynthesis of monensin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3521-3532.

摘要:【目的】莫能菌素(monensin)是由肉桂地链霉菌(*Streptomyces cinnamonensis*)产生的聚醚类抗生素。本研究以肉桂地链霉菌 2110 为研究材料, 利用代谢工程技术开展其重要前体甲基丙二酰 CoA 合成途径强化的研究, 以此提高莫能菌素产量。【方法】首先过表达巴豆酰 CoA 还原酶(crotonyl-CoA reductase, CCR)强化乙酰乙酰 CoA 途径, 接着过表达甲基丙二酰 CoA 变位酶(methylmalonyl-CoA mutase, MCM)强化琥珀酰 CoA 途径, 最后串联过表达 CCR 和 MCM 并评估工程菌株的发酵性能。【结果】过表达 CCR 能促进菌体生长, 同时提高莫能菌素产量, 摇瓶发酵 10 d 后过表达菌株的生物量和发酵效价分别提高 10.4%和 19.0%; 过表达 MCM 未能促进菌体生长, 但提高了莫能菌素产量, 过表达菌株摇瓶发酵 10 d 时效价提升 9.9%; 串联过表达 CCR 和 MCM 也使菌株的生物量和发酵效价提高, 工程菌株 2110-CCR-MCM 在摇瓶发酵 10 d 时生物量和发酵效价分别提升 9.4%和 26.8%, 在 5 L 罐上发酵 6 d 时达到最高的生物量和发酵效价分别为 54.6 g/L 和 11.3 kU/mL, 比原始菌株分别增加 12.7%和 36.2%。【结论】CCR 和 MCM 的确介导了莫能菌素生物合成的关键代谢途径, 串联过表达 CCR 和 MCM 更有效地促进了莫能菌素的合成。本研究为其他聚酮类化合物高产工程菌株的构建提供技术借鉴。

关键词: 肉桂地链霉菌; 莫能菌素; 巴豆酰 CoA 还原酶; 甲基丙二酰 CoA 变位酶; 前体供应; 串联过表达

资助项目: 国家自然科学基金(21776114)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21776114).

*Corresponding authors. E-mail: SUN Fubao, fubaosun@jiangnan.edu.cn; ZHANG Shanfei, zhangsf@shenglibio.cn

Received: 2024-03-21; Accepted: 2024-06-17; Published online: 2024-06-19

Metabolic engineering of *Streptomyces cinnamonensis* enhances biosynthesis of monensin

LIU Minwei^{1,2}, ZHANG Shanfei^{1,2*}, HUANG Zixuan^{1,2}, XING Haobo^{1,2}, SUN Fubao^{1,2*}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Monensin is a polyether antibiotic produced by *Streptomyces cinnamonensis*. To enhance the production of monensin by microbial fermentation, we employed metabolic engineering to strengthen the synthesis pathway of the key precursor methylmalonyl-CoA in *S. cinnamonensis* 2110. [Methods] Firstly, crotonyl-CoA reductase (CCR) was overexpressed to strengthen the acetoacetyl-CoA pathway. Subsequently, methylmalonyl-CoA mutase (MCM) was overexpressed to improve the succinyl-CoA pathway. Finally, an engineered strain with tandem overexpression of CCR and MCM was constructed and evaluated for the fermentation performance. [Results] The overexpression of CCR increased the strain biomass and monensin titer by 10.4% and 19.0%, respectively, after 10 days of shake-flask fermentation. The overexpression of MCM increased the monensin titer by 9.9%, whereas it did not increase the strain biomass after 10 days of shake-flask fermentation. The tandem overexpression of CCR and MCM increased the biomass and monensin titer by 9.4% and 26.8%, respectively, after 10 days of shake-flask fermentation. In a 5 L bioreactor, the engineered strain 2110-CCR-MCM reached the highest biomass of 54.6 g/L and monensin titer of 11.3 kU/mL, which increased by 12.7% and 36.2%, respectively, compared with those of the starting strain 2110. [Conclusion] CCR and MCM mediated the key metabolic pathway of monensin biosynthesis in *S. cinnamonensis*, and the overexpression of CCR and MCM was highly favorable for monensin synthesis. This study provides technical reference for the engineering of strains with high yields of other polyketides.

Keywords: *Streptomyces cinnamonensis*; monensin; crotonyl-CoA reductase; methylmalonyl-CoA mutase; precursor supply; tandem overexpression

莫能菌素(monensin), 又称莫能霉素, 是由肉桂地链霉菌(*Streptomyces cinnamonensis*)发酵产生的一种具有五环单羧酸多醚结构的聚醚类抗生素, 主要成分为莫能菌素 A 和 B。从 20 世纪 70 年代上市以来, 莫能菌素作为显著杀灭鸡、兔、牛、羊等畜禽体内球虫的首选抗球虫药物, 也被用作促进畜禽生长发育的饲料添加剂, 而且在组织内几乎无残留^[1-2]。近年来, 莫

能菌素还被发现具有广泛的抗肿瘤、抗癌活性, 有望成为抗肿瘤抗癌的新型药物^[3]。莫能菌素具备高效低毒、绿色安全、不易产生耐药性等优势, 在农业、医药等领域已凸显出重要的应用价值。

然而, 莫能菌素发酵生产普遍存在发酵水平低、生产周期长、生产成本高等问题, 因此通过代谢工程改善莫能菌素生产菌的发酵性能

以提高莫能菌素产量, 是解决现行发酵生产中这些问题的有效途径^[4]。随着现代生物技术的蓬勃发展, 莫能菌素的生物合成途径及基因调控逐渐清晰: 其主要由模块化的 I 型聚酮合酶催化合成, 同时需要丙二酰 CoA (衍生自乙酰 CoA)、甲基丙二酰 CoA 和乙基丙二酰 CoA (衍生自丁酰 CoA) 的共同参与^[5], 其中甲基丙二酰 CoA 作为莫能菌素生物合成过程中的一个限制因素^[6]。甲基丙二酰 CoA 的生物合成途径较为复杂(图 1), 主要来源于琥珀酰 CoA 经过甲基丙二酰 CoA 变位酶(methylmalonyl-CoA mutase, MCM)催化形成^[7]、丙酰 CoA 经过丙酰 CoA 羧化酶(propionyl-CoA carboxylase, PCC)羧化形成^[8]、缬氨酸分解产生异丁酰 CoA 的多步氧化生成^[9]、乙酰乙酰 CoA 的多步转化生成^[10-11]等 4 种途径(图 1)。在很多细菌中, 甲基丙二酰 CoA 主要来自甲基丙二酰 CoA 变位酶催化的琥珀酰 CoA 途径^[12]。Reeves 等^[13]通过中断红霉素产生

菌糖多孢红霉菌中的甲基丙二酰 CoA 变位酶, 突变菌在碳水化合物(如葡萄糖)作为碳源的培养基中红霉素产量提高 126%, 而在豆油作为碳源的培养基中红霉素产量却降低了 66%, 结果表明了甲基丙二酰 CoA 合成与培养基成分是密切相关的。Li 等^[11]研究发现肉桂地链霉菌在含油培养基的发酵过程中, 巴豆酰 CoA 还原酶(crotonyl-CoA reductase, CCR)在为生物合成莫能菌素提供甲基丙二酰 CoA 前体方面起着重要作用。此外, 代谢工程在提高其他聚酮化合物生产方面也已得到有效应用。孔德真等^[14]在褐黄孢链霉菌中通过同时过表达乙酰 CoA 合成酶和甲基丙二酰 CoA 变位酶, 使纳他霉素产量提高 66%。类似地, Lu 等^[15]在白色链霉菌中通过巴豆酰 CoA 还原酶基因的过表达, 使盐霉素产量提高 24%。由此可见, 前体合成途径中的关键酶可成为代谢工程改造的靶标来增强目标产物前体物质的生物合成, 以此促进产量的提升。

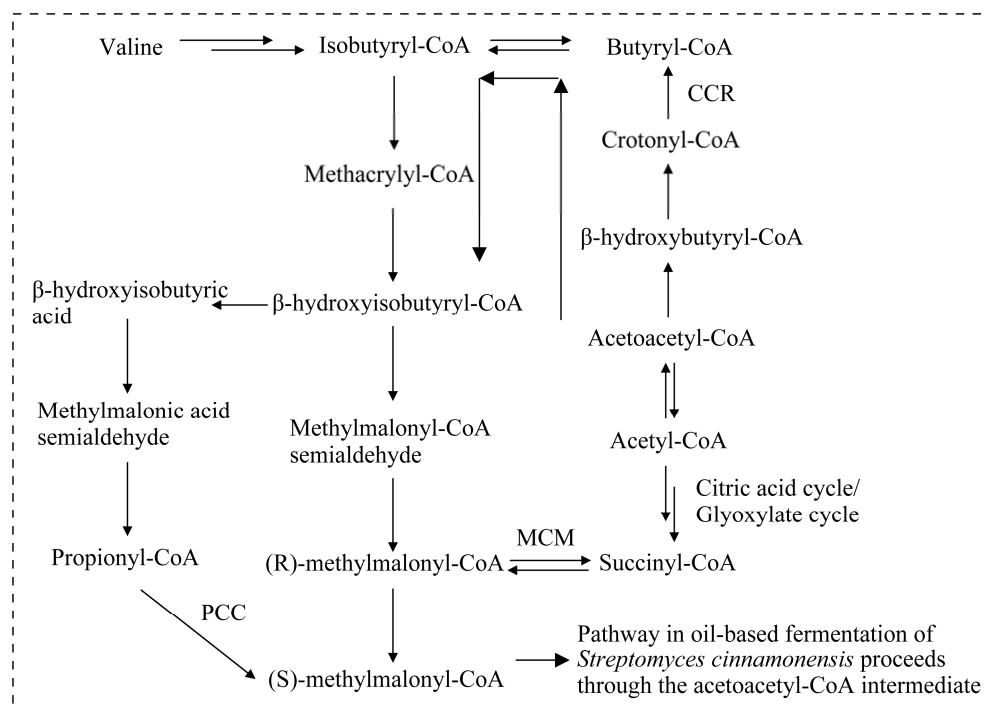


图 1 甲基丙二酰 COA 的生物合成途径^[11]

Figure 1 Biosynthetic pathway of methylmalonyl-CoA^[11].

本研究利用代谢工程技术开展肉桂地链霉菌发酵生产莫能菌素的重要前体——甲基丙二酰 CoA 的研究。首先通过过表达 CCR 强化乙酰乙酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成途径，接着过表达 MCM 强化琥珀酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成途径，最后串联过表达 CCR 和 MCM 并评估工程菌株的发酵性能，为莫能菌素工业高产菌株的构建提供新的方向。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所使用菌株和质粒见表 1。

1.1.2 培养基

高氏培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, FeSO₄ 0.01, NaCl 0.5, 琼脂粉 30.0, 用于培养链霉菌。LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0, 固体培养基加入 1.5%琼脂粉, pH 7.0, 用于培养大肠杆菌。SM 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 4.0, 酵母提取物 4.0,

KH₂PO₄ 0.2, K₂HPO₄ 0.4, MgSO₄ 0.05, pH 7.2, 用于培养链霉菌菌丝体。MS 培养基(g/L): 黄豆饼粉 20.0, 甘露醇 10.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.2, 用于链霉菌与大肠杆菌属间接合转移。2×YT 培养基(g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母提取物 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2, 用于接合转移时链霉菌孢子的悬浮。种子培养基及发酵培养基参考文献[17]配制。

1.1.3 抗生素、酶及试剂

安普霉素(100 mg/mL in H₂O)、卡那霉素(100 mg/mL in H₂O)、氯霉素(100 mg/mL in ethanol absolute)、萘啶酮酸(25 mg/mL in 0.15 mol/L NaOH)作为储备液于-20 °C保存。在 LB 培养基中, 安普霉素的使用浓度为 50 μg/mL, 卡那霉素为 25 μg/mL, 氯霉素为 20 μg/mL。在高氏培养基和 MS 培养基中, 安普霉素的使用浓度为 30 μg/mL, 萘啶酮酸为 20 μg/mL。

2×Super Pfx Master Mix、One Step Seamless Cloning Mix 购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司; 2×Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 莫能菌素标

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Features	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ⁻ , Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK⁻</i> , <i>mK⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	[16]
ET12567(pUZ8002)	Donor for intergeneric conjugation, with pUZ8002 helper plasmids, <i>Chl^r</i> , <i>Kan^r</i>	Lab collection
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>		
2110	Industrial strain for monensin production	Lab collection
2110-CCR	2110 containing pCCR	This study
2110-MCM	2110 containing pMCM	This study
2110-CCR-MCM	2110 containing pCAB	This study
pIB139	<i>ermEp*</i> promoter, ΦC31 integrase, <i>oriT</i> , <i>Apr^r</i>	Lab collection
pCCR	pIB139 containing <i>ccr</i>	This study
pMCM	pIB139 containing <i>mcm</i>	This study
pCAB	pIB139 containing <i>ccr</i> and <i>mcm</i>	This study

准品购自上海泰坦科技股份有限公司;细菌基因组提取试剂盒、质粒 DNA 小提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 DNA 基本操作

链霉菌基因组的提取、大肠杆菌质粒的提取、PCR 产物的纯化均按照试剂盒说明书进行。感受态细胞的制备和质粒转化等操作参考文献[18]。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Super Pfx Master Mix 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 2.5 μ L, 模板 DNA (100 ng/ μ L) 2 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, T 退火 30 s (T 由引物的熔解温度 T_m 计算); 72 $^{\circ}$ C 延伸 t_s (t_s 由所扩增片段长度和酶的扩增效率计算), 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。引物合成、DNA 测序由天霖生物科技(上海)有限公司完成。本研究所用引物见表 2。

1.3 重组质粒的构建

巴豆酰 CoA 还原酶过表达质粒 pCCR 的构建: 以 *S. cinnamonensis* 2110 基因组 DNA 为模

板, 以引物对 CCR1-F/CCR1-R 扩增巴豆酰 CoA 还原酶基因(*ccr*); 以质粒 pIB139 为模板, 引物对 pIB139-F/pIB139-R 反向 PCR 扩增制备线性化载体。按照无缝克隆试剂盒说明书将带有同源臂的片段与载体进行连接, 转化至 *E. coli* DH5 α , 挑取转化子提取质粒进行 PCR 验证是否含有目的基因, 获得质粒 pCCR。

甲基丙二酰 CoA 变位酶过表达质粒 pMCM 的构建: 甲基丙二酰 CoA 变位酶有 2 个亚基, 分别由 *mutA* 和 *mutB* 这 2 个基因编码^[19]。以 *S. cinnamonensis* 2110 基因组 DNA 为模板, 以引物对 MUTA-F/MUTA-R 扩增基因 *mutA*, 引物对 MUTB-F/MUTB-R 扩增基因 *mutB*; 以质粒 pIB139 为模板, 使用引物对 pIB139-F/pIB139-R 反向扩增制备线性化载体。将带有同源臂的 2 个片段与载体进行连接转化, 提取质粒进行 PCR 验证, 获得质粒 pMCM。

巴豆酰 CoA 还原酶与甲基丙二酰 CoA 变位酶串联过表达质粒 pCAB 的构建: 以 *S. cinnamonensis* 2110 基因组 DNA 为模板, 以引物对 CCR2-F/CCR2-R 扩增基因 *ccr*; 以质粒

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
CCR1-F	CCGGTTGGTAGGATCCACATGTGAAGGAAATCCTGGACGCG
CCR1-R	CTCTAGAGGATCCCCAACATTCAGACGTTGCGGAAACGG
pIB139-F	ATGTTGGGGATCCTCTAGAGGATCCG
pIB139-R	ATGTGGATCCTACCAACCGG
MUTA-F	CCGGTTGGTAGGATCCACATATGACGGTCCTGCCTGACG
MUTA-R	GATCCGCATCCTCCTTATTACGCCACTCCCATGCG
MUTB-F	TGGCGTAATAAGGAGGATGCGGATCCCCGAATTC
MUTB-R	CTCTAGAGGATCCCCAACATTCACAGTTCGTGGCCGAGG
CCR2-F	CCGGTTGGTAGGATCCACATGTGAAGGAAATCCTGGACGCG
CCR2-R	TCAGGCAGGACCGTCATCCTCCTTATCAGACGTTGCGG
pMCM-F	TAAGGAGGATGACGGTCCTGCCTGA
pMCM-R	ATGTGGATCCTACCAACCGG
APR-F	GTGCAATACGAATGGCGAAA
APR-R	TCAGCCAATCGACTGGCGAG

pMCM 为模板, 引物对 pMCM-F/pMCM-R 反向 PCR 扩增制备线性化载体。将片段与载体连接转化后提取质粒进行 PCR 验证, 获得质粒 pCAB。

1.4 重组菌株的构建

将构建好的重组质粒转化至供体菌 ET12567(pUZ8002), 与 *S. cinnamonensis* 2110 进行属间接接合转移^[18], 30 °C 培养 18 h, 使用安普霉素和萘啶酮酸进行覆盖, 30 °C 继续培养 5 d 即可挑取接合子提取基因组, 以引物对 APR-F/APR-R 验证基因组中是否含有重组质粒携带的抗性基因 *aac(3)IV*, 获得重组菌株。将重组菌株在无抗培养基上松弛培养两代至充分产孢, 选取生长状况良好的菌株保存用于后续研究。

1.5 链霉菌菌株的发酵培养

摇瓶发酵: 将链霉菌划线于高氏平板上, 30 °C 培养 7 d。挑取单菌落至种子培养基(装液量 100 mL/500 mL 摇瓶), 30 °C、200 r/min 培养

24 h, 将种子液按 10% 接种量转接至发酵培养基(装液量 50 mL/500 mL 摇瓶), 30 °C、200 r/min 培养 10 d。

发酵罐发酵: 培养基配方参考摇瓶发酵, 5 L 发酵罐装液量为 3 L, 接种量 10%。培养温度 33 °C、转速 500 r/min、通气量 3 L/min, 溶氧控制在 30% 左右。

1.6 分析检测方法

莫能菌素效价测定采用香草醛显色法^[20](回归方程 $y=0.019\ 3x+0.034\ 8$, $R^2=0.999\ 6$)。葡萄糖浓度使用生物传感分析仪进行测定^[17], 生物量测定采用干重法^[21]。

2 结果与分析

2.1 肉桂地链霉菌巴豆酰 CoA 还原酶的过表达

2.1.1 过表达菌株 2110-CCR 的构建

通过同源重组方式构建巴豆酰 CoA 还原酶过表达菌株 2110-CCR, 如图 2 所示。按照 1.3 方

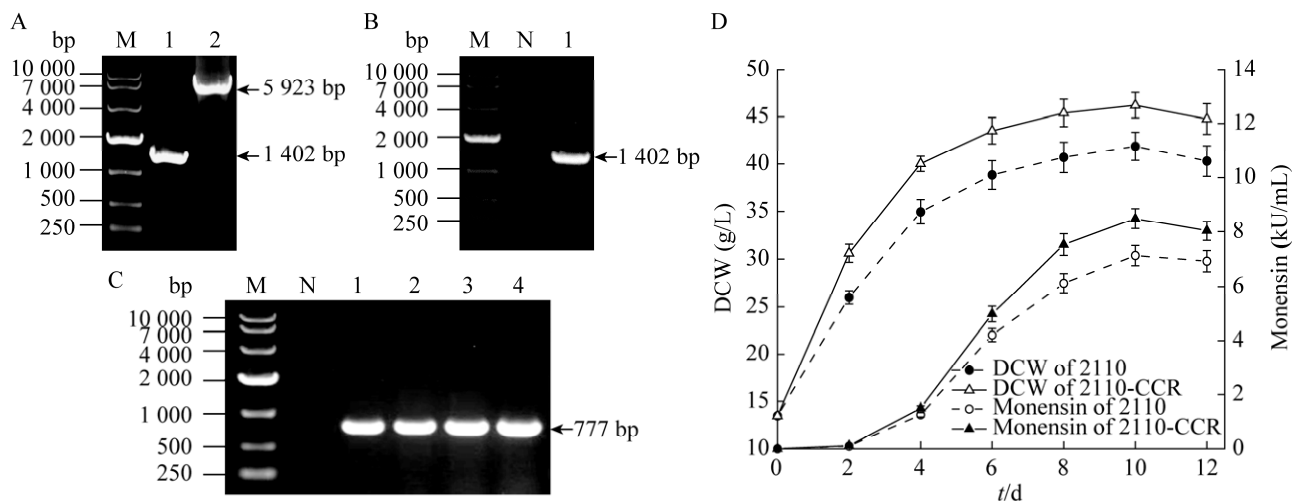


图 2 过表达菌株 2110-CCR 构建(A-C)及摇瓶发酵验证(D)

Figure 2 Construction of overexpressed strain 2110-CCR (A-C) and verification of flask fermentation (D). A: PCR amplification. 1, 2: Amplification of *ccr* fragment and linearized vector pIB139. B: PCR validation of the recombinant plasmid pCCR. N: Using pIB139 vector as template; 1: Using pCCR plasmid as template to amplify the *ccr* fragment. C: PCR validation of the resistance gene *aac(3)IV*. N: Using total DNA of the original strain 2110 as template; 1-4: The selected transformants.

法首先扩增出 *ccr* 和线性化载体, 大小分别为 1 402 bp 和 5 923 bp (图 2A)。接着将上述片段及载体纯化后进行连接转化, 对转化子提取质粒进行 PCR 验证, 结果如图 2B 所示, 该条带符合目的基因大小(1 402 bp), 表明质粒 pCCR 构建成功。之后将重组质粒进行测序以进一步验证其正确性。最后将重组质粒 pCCR 转入原始菌株 2110 中, 挑选 4 个转化子提取基因组并 PCR 验证抗性基因 *aac(3)IV*。结果如图 2C 所示, 条带理论大小为 777 bp, 符合预期, 表明过表达质粒 pCCR 成功整合到肉桂地链霉菌染色体上。

2.1.2 过表达菌株 2110-CCR 的摇瓶发酵

通过摇瓶发酵来验证过表达菌株 2110-CCR 的发酵性能, 结果如图 2D 所示。过表达菌株 2110-CCR 和原始菌株 2110 的生长趋势基本一致: 在发酵前期菌体快速生长, 迅速进入对数生长期; 第 4 天开始进入稳定期, 此时莫能菌素开始大量合成。与原始菌株 2110 相比, 过表达菌株 2110-CCR 生长快速, 生物量为 46.2 g/L, 提高了 10.4%; 过表达菌株发酵性能也得以明显提升, 发酵 10 d 效价达到 8.5 kU/mL, 提高了 19.0%。研究表明乙酰乙酰 CoA 途径中巴豆酰 CoA 还原酶的确在肉桂地链霉菌生长代谢过程中起着关键作用, 过表达 CCR 以提高甲基丙二酰 CoA 前体供应是有效的, 其在促进菌体快速生长繁殖的同时也导致莫能菌素产量的提升。此外, 过表达菌株 2110-CCR 的单位菌体效价(183.5 kU/g)也明显高于原始菌株(170.2 kU/g), 这表明莫能菌素效价的提高不是单纯依靠菌体生物量增加而达到的, 过表达 CCR 的确增加了肉桂地链霉菌的莫能菌素发酵鲁棒性。

2.2 肉桂地链霉菌甲基丙二酰 CoA 变位酶的过表达

2.2.1 过表达菌株 2110-MCM 的构建

本研究通过同源重组方式构建甲基丙二酰 CoA 变位酶过表达菌株 2110-MCM, 如图 3 所

示。按照 1.3 方法首先扩增出 *mutA*、*mutB* 和线性化载体, 大小分别为 1 888、2 238 和 5 923 bp (图 3A)。接着将上述片段及载体纯化后进行连接转化, 提取质粒进行 PCR 验证, 结果如图 3B 所示。该条带符合 *mutA-mutB* 片段大小(4 101 bp), 表明质粒 pMCM 构建成功。之后将重组质粒送去测序。最后将重组质粒 pMCM 转入原始菌株 2110 中, 挑选 4 个转化子提取基因组并 PCR 验证抗性基因 *aac(3)IV*。结果如图 3C 所示, 条带符合预期(777 bp), 表明过表达质粒 pMCM 成功整合到肉桂地链霉菌染色体上。

2.2.2 过表达菌株 2110-MCM 的摇瓶发酵

在添加豆油作为碳源的培养基中, 来自于三羧酸循环的琥珀酰 CoA 经过 MCM 催化生成甲基丙二酰 CoA, 有利于聚酮化合物的合成^[13]。通过摇瓶发酵来验证过表达菌株 2110-MCM 的发酵性能, 结果如图 3D 所示。发酵至第 10 天, 两株菌的生物量达到最高, 此时莫能菌素的效价达到最大值。在菌体生长无明显差异的情况下, 过表达菌株 2110-MCM 发酵 10 d 效价达到 7.8 kU/mL, 较原始菌株 2110 提升 9.9%。研究表明 MCM 主要在肉桂地链霉菌次级代谢过程中起关键作用, 过表达 MCM 能够提高甲基丙二酰 CoA 前体供应, 从而促进莫能菌素的合成。

2.3 肉桂地链霉菌巴豆酰 CoA 还原酶和甲基丙二酰 CoA 变位酶的串联过表达

2.3.1 串联过表达菌株 2110-CCR-MCM 的构建

在上述甲基丙二酰 CoA 合成途径的遗传改造中, 通过过表达 CCR 加强乙酰乙酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成过程, 或者过表达 MCM 加强琥珀酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成过程, 均能获得莫能菌素产量的增加。为了确定两种途径的联合改造能否协同提升莫能菌素的产量, 将 CCR 与 MCM 进行串联过表达。按照 1.3 方法扩增出 *ccr* 和线性化载体, 大小分别为 1 407 bp 和 9 992 bp (图 4A)。将上述片段

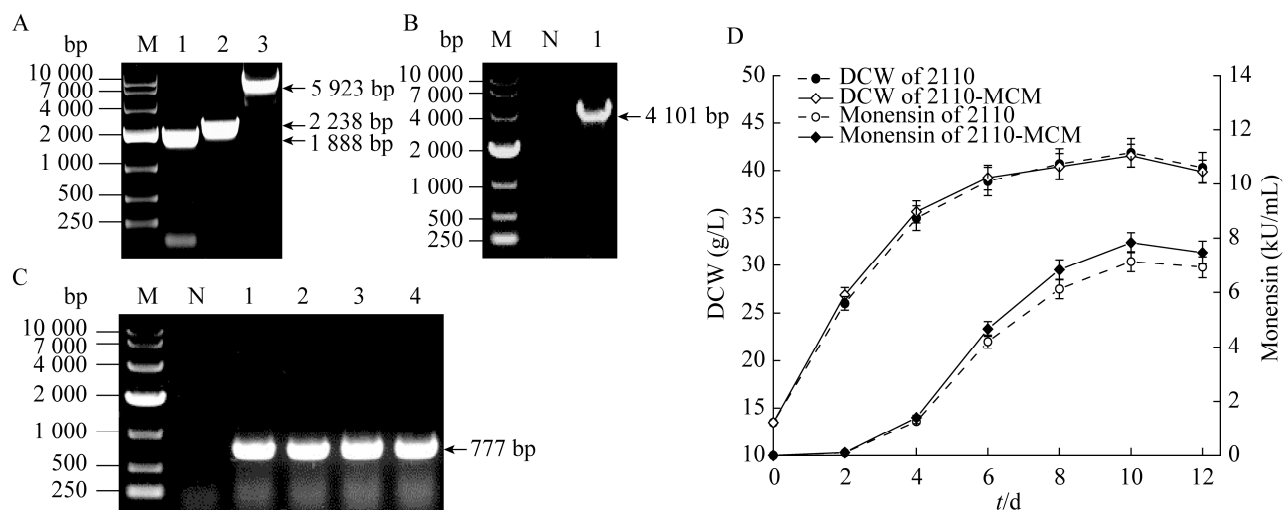


图3 过表达菌株 2110-MCM 构建(A-C)及摇瓶发酵验证(D)

Figure 3 Construction of overexpressed strain 2110-MCM (A-C) and verification of flask fermentation (D). A: PCR amplification. 1-3: Amplification of *mutA*, *mutB* fragments and linearized vector pIB139. B: PCR validation of the recombinant plasmid pMCM. N: Using pIB139 vector as template; 1: Using pMCM plasmid as template to amplify *mutA* and *mutB* fragments. C: PCR validation of the resistance gene *aac(3)IV*. N: Using total DNA of the original strain 2110 as template; 1-4: The selected transformants.

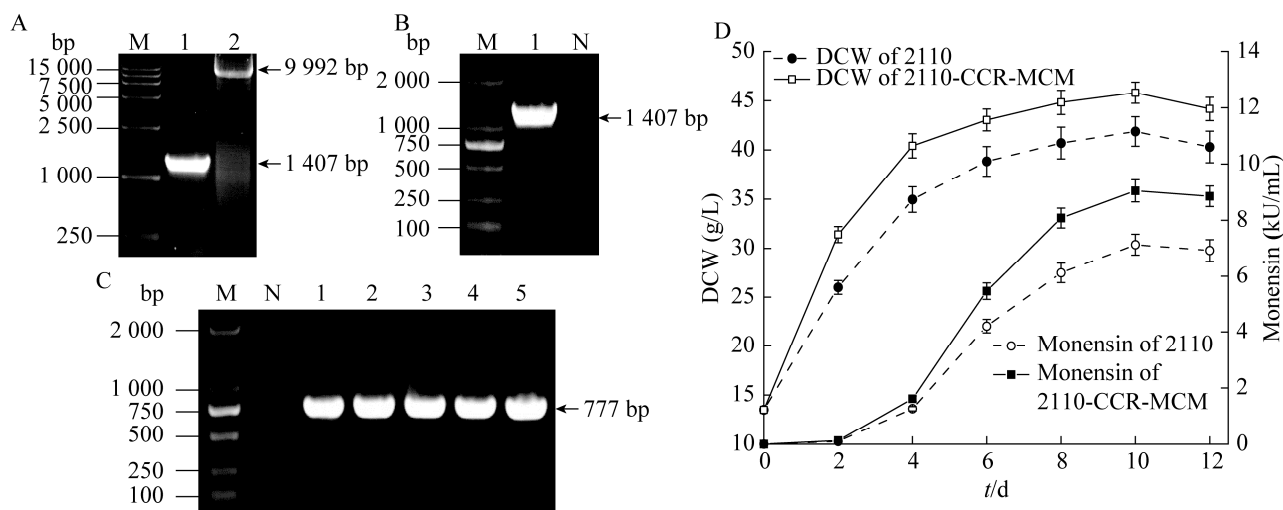


图4 过表达菌株 2110-CCR-MCM 构建(A-C)及摇瓶发酵验证(D)

Figure 4 Construction of overexpressed strain 2110-CCR-MCM (A-C) and verification of flask fermentation (D). A: PCR amplification. 1, 2: Amplification of *ccr* fragment and linearized vector pMCM. B: PCR validation of the recombinant plasmid pCAB. N: Using pIB139 vector as template; 1: Using pCAB plasmid as template to amplify *ccr* fragment. C: PCR validation of the resistance gene *aac(3)IV*. N: Using total DNA of the original strain 2110 as template; 1-5: The selected transformants.

及载体纯化后进行连接转化，提取质粒进行 PCR 验证。如图 4B 所示，该条带符合目的基因大小(1 407 bp)，表明质粒 pCCR 构建成功。随后

将重组质粒进行测序分析，将确认无误的重组质粒 pCAB 转入原始菌株 2110 中。挑选 5 个转化子，提取基因组并 PCR 验证抗性基因 *aac(3)IV*。结果

图 4C 所示, 条带符合预期, 表明过表达质粒 pCAB 成功整合到肉桂地链霉菌染色体上。

2.3.2 串联过表达菌株 2110-CCR-MCM 的摇瓶发酵

通过摇瓶发酵验证过表达菌株 2110-CCR-MCM 的发酵性能, 结果如图 4D 所示。2 株菌在发酵第 10 天时生物量达到最高, 此时莫能菌素效价达到最大值。其中串联过表达菌株 2110-CCR-MCM 的生物量为 45.8 g/L, 较原始菌株 2110 提升了 9.4%; 发酵效价达到 9.0 kU/mL, 较 2110 提升了 26.8%。与 2110-CCR 相比, 效价提升 6.6%, 生物量并无明显差异; 与 2110-MCM 相比, 效价提升 15.4%, 生物量提

升 10.2%。研究表明两种途径的联合加强可以进一步提升肉桂地链霉菌的发酵性能, 从而导致莫能菌素发酵效价的提高。

2.4 过表达菌株的罐上发酵

在发酵罐水平上进一步评估过表达菌株 2110-CCR、2110-MCM 和 2110-CCR-MCM 的发酵性能, 结果如图 5 所示。与原始菌株 2110 相比, 3 株过表达菌株在糖耗方面并无明显差异, 但过表达菌株 2110-CCR 和 2110-CCR-MCM 的生物量在发酵全程均高于原始菌株, 最大生物量分别为 54.9 g/L 和 54.6 g/L, 分别提高了 13.3% 和 12.7%, 而 2110-MCM 与原始菌株在生长上无明显差异。在发酵效价方面, 3 株过表达菌株

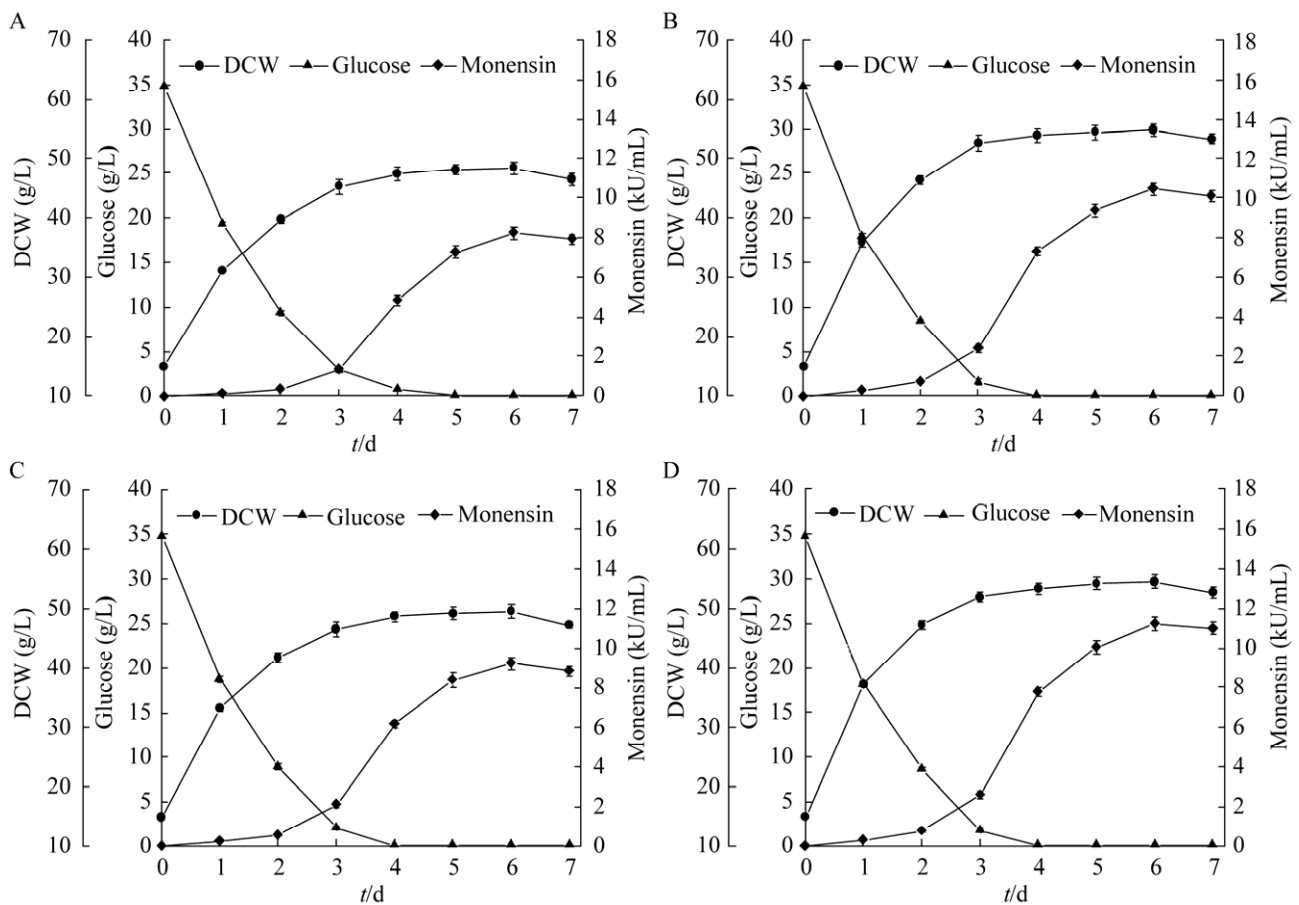


图 5 过表达菌株在 5 L 罐的发酵情况

Figure 5 Fermentation conditions of overexpressing strains in a 5 L bio-fermentor. A: The original strain 2110. B: 2110-CCR. C: 2110-MCM. D: 2110-CCR-MCM.

和原始菌株变化趋势一致：在发酵 3 d 后进入莫能菌素快速合成阶段，在第 6 天效价达到最高值，分别为 10.5、9.2、11.3 kU/mL，较原始菌株相应提高 26.6%、11.9%、36.2%。就这些过表达菌株而言，串联过表达菌株 2110-CCR-MCM 与过表达菌株 2110-MCM 相比，生物量和效价均明显提升，分别提高 10.0% 和 21.8%。这与前面的摇瓶发酵结果相一致，再次证明巴豆酰 CoA 还原酶在肉桂地链霉菌生长代谢过程中起着关键作用，过表达 CCR 能够在促进菌体快速生长繁殖的同时提升莫能菌素产量。该串联过表达菌株与过表达菌株 2110-CCR 相比，生物量上并无明显差异，但发酵效价提升 7.6%。这也与前面摇瓶发酵结果是一致的，再次证明甲基丙二酰 CoA 变位酶主要在肉桂地链霉菌次级代谢产物合成方面发挥积极作用。此外，这些数据也表明，巴豆酰 CoA 还原酶介导的乙酰乙酰 CoA 途径与甲基丙二酰 CoA 变位酶催化的琥珀酰 CoA 途径相比，前者可能对甲基丙二酰 CoA 合成具有更大的贡献，从而导致了更高的莫能菌素产量。毫无疑问，联合两种途径更有效地提高了肉桂地链霉菌生长代谢能力，从而导致其快速生长繁殖和莫能菌素发酵效价的提高。

3 讨论与结论

甲基丙二酰 CoA 是模块化 I 型聚酮合酶最常见的前体之一，其水平的变化会影响发酵过程中莫能菌素的产量^[22]。已有资料显示，肉桂地链霉菌在含油培养基中培养时，CCR 介导的途径贡献了大多数莫能菌素合成所需的甲基丙二酰 CoA；这一途径较为复杂：脂肪酸 β 氧化产物乙酰 CoA 首先形成乙酰乙酰 CoA，随后经过多步反应生成甲基丙二酰 CoA，其中涉及到 CCR 催化巴豆酰 CoA 生成丁酰 CoA 的过程^[11]。

另外，也有研究显示莫能菌素生物合成的另一种前体乙基丙二酰 CoA 主要由 CCR 催化的丁酰 CoA 羧化而成，该前体经过一系列中间步骤最终又生成了甲基丙二酰 CoA^[23-24]。这些研究表明，CCR 介导的甲基丙二酰 CoA 合成途径在莫能菌素生物合成途径中起着关键作用。此外，甲基丙二酰 CoA 合成的另一个重要前体是三羧酸循环的中间产物琥珀酰 CoA；这是因为琥珀酰 CoA 在 MCM 催化下能生成(2R)-甲基丙二酰 CoA，随后在异构酶作用下转变为(2S)-甲基丙二酰 CoA，从而有助于后续聚酮链的延伸^[25]。由此可见，MCM 通过参与琥珀酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成，从而在莫能菌素生物合成过程中具有重要作用。

本研究利用代谢工程手段，通过过表达 CCR 强化乙酰乙酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成途径，提升莫能菌素的产量(在摇瓶与 5 L 罐水平分别较原始菌株提高 19.0% 和 26.6%)。本研究还通过过表达 MCM 强化琥珀酰 CoA 到甲基丙二酰 CoA 的合成途径，最终提高了菌株的莫能菌素合成(在摇瓶与 5 L 罐水平分别较原始菌株提高和 9.9% 和 11.9%)，这与前人研究报道是一致的^[13,26]。

在本研究中，我们观察到肉桂地链霉菌中过表达 CCR 比 MCM 对莫能菌素产量的贡献更大，推测认为 CCR 介导的乙酰乙酰 CoA 途径比 MCM 介导的琥珀酰 CoA 途径更有助于甲基丙二酰 CoA 前体的供应。CCR 和 MCM 串联过表达通过加强这两种代谢途径，从而为莫能菌素合成提供了更多的甲基丙二酰 CoA 前体，导致工程菌株的莫能菌素产量在摇瓶和发酵罐水平比原始菌株分别增加了近 30.0% 和 40.0%，结果表明 CCR 和 MCM 在莫能菌素合成中可能发挥了协同作用。尽管目前尚未全面地研究 CCR 和 MCM 串联过表达的表达式比例对产量的影响，但

我们推测,通过调控这两个酶的表达水平以达到最优表达比例,对增强莫能菌素的生物合成至关重要。未来我们将采用代谢流分析技术探索并控制 CCR 和 MCM 的表达,进而优化甲基丙二酰 CoA 的供应,并推动莫能菌素生产的最大化,同时揭示代谢途径中关键酶表达比例调控的深层机制。此外,鉴于甲基丙二酰 CoA 的合成与培养基成分密切相关^[13],培养基优化可能是提高甲基丙二酰 CoA 供应量进而增强莫能菌素生物合成的另一重要研究方向。总之,本研究不仅为莫能菌素的工业化生产提供新策略,对于其他聚酮类化合物的菌株构建也具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 朱俊红, 刘兴能, 吴学红, 和晓明, 岳丹, 陆颖, 邓卫东, 席冬梅. 莫能菌素在反刍动物应用中的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2022, 43(4): 8-13.
ZHU JH, LIU XN, WU XH, HE XM, YUE D, LU Y, DENG WD, XI DM. Research progress of monensin in ruminants[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2022, 43(4): 8-13 (in Chinese).
- [2] 贾鹏, 马涛, 杨开伦, 刁其玉. 莫能菌素作为饲料添加剂在反刍动物中的应用[J]. 饲料工业, 2018, 39(3): 56-58.
JIA P, MA T, YANG KL, DIAO QY. Application of monensin as feed additive in ruminant[J]. Feed Industry, 2018, 39(3): 56-58 (in Chinese).
- [3] MARKOWSKA A, KAYSIEWICZ J, MARKOWSKA J, HUCZYŃSKI A. Doxycycline, salinomycin, monensin and ivermectin repositioned as cancer drugs[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2019, 29(13): 1549-1554.
- [4] 夏焕章, 翟航. 放线菌次级代谢产物研究进展[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(4): 1-9.
XIA HZ, ZHAI H. Advances in secondary metabolites of actinomycetes[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(4): 1-9 (in Chinese).
- [5] OLIYNYK M, STARK CBW, BHATT A, JONES MA, HUGHES-THOMAS ZA, WILKINSON C, OLIYNYK Z, DEMYDCHUK Y, STAUNTON J, LEADLAY PF. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamomensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(5): 1179-1190.
- [6] ZHANG W, REYNOLDS KA. MeaA, a putative coenzyme B12-dependent mutase, provides methylmalonyl coenzyme A for monensin biosynthesis in *Streptomyces cinnamomensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(6): 2071-2080.
- [7] SATO T, ATOMI H. Novel metabolic pathways in archaea[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14(3): 307-314.
- [8] DIACOVICH L, MITCHELL DL, PHAM H, GAGO G, MELGAR MM, KHOSLA C, GRAMAJO H, TSAI SC. Crystal structure of the beta-subunit of acyl-CoA carboxylase: structure-based engineering of substrate specificity[J]. Biochemistry, 2004, 43(44): 14027-14036.
- [9] OMURA S, TSUZUKI K, TANAKA Y, SAKAKIBARA H, AIZAWA M, LUKACS G. Valine as a precursor of n-butyrate unit in the biosynthesis of macrolide aglycone[J]. The Journal of Antibiotics, 1983, 36(5): 614-616.
- [10] LIU H, REYNOLDS KA. Precursor supply for polyketide biosynthesis: the role of crotonyl-CoA reductase[J]. Metabolic Engineering, 2001, 3(1): 40-48.
- [11] LI CX, FLOROVA G, AKOPIANTS K, REYNOLDS KA. Crotonyl-coenzyme A reductase provides methylmalonyl-CoA precursors for monensin biosynthesis by *Streptomyces cinnamomensis* in an oil-based extended fermentation[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 10): 3463-3472.
- [12] HAYDOCK SF, MIRONENKO T, GHOORAHOO HI, LEADLAY PF. The putative elaiophyllin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 is adjacent to genes encoding adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl CoA mutase and to genes for synthesis of cobalamin[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 113(1/2/3): 55-68.
- [13] REEVES AR, BRIKUN IA, CERNOTA WH, LEACH BI, GONZALEZ MC, WEBER JM. Effects of methylmalonyl-coa mutase gene knockouts on erythromycin production in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(7): 600-609.

- [14] 孔德真, 李浩, 李晓杰, 谢周杰, 刘浩. 基于前体供给途径遗传改造提高褐黄孢链霉菌纳他霉素的产量[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4630-4643.
KONG DZ, LI H, LI XJ, XIE ZJ, LIU H. Engineering the precursor supply pathway in *Streptomyces gilvosporeus* for overproduction of natamycin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4630-4643 (in Chinese).
- [15] LU CY, ZHANG XJ, JIANG M, BAI LQ. Enhanced salinomycin production by adjusting the supply of polyketide extender units in *Streptomyces albus*[J]. Metabolic Engineering, 2016, 35: 129-137.
- [16] HANAHAHAN D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*[M]//GLOVER DM ed. DNA Cloning: A Practical Approach. London: Oxford University Press, 1985, 1: 109-135.
- [17] 李欣颖, 张善飞, 刘旻炜, 黄子瑄, 孙付保. 高产莫能菌素肉桂地链霉菌的透明颤菌 *vgb* 基因异源表达[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(10): 1-9.
LI XY, ZHANG SF, LIU MW, HUANG ZX, SUN FB. Heterologous integrated expression of *Vitreoscilla vgb* in highly monensin producing *Streptomyces cinnamonensis*[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(10): 1-9 (in Chinese).
- [18] TANG ZK, LI XM, PANG AP, LIN CY, ZHANG Y, ZHANG J, QIAO JJ, ZHAO GR. Characterization of three pathway-specific regulators for high production of monensin in *Streptomyces cinnamonensis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6083-6097.
- [19] VRIJBLOED JW, ZERBE-BURKHARDT K, RATNATILLEKE A, GRUBELNIK-LEISER A, ROBINSON JA. Insertional inactivation of methylmalonyl coenzyme A (CoA) mutase and isobutyryl-CoA mutase genes in *Streptomyces cinnamonensis*: influence on polyketide antibiotic biosynthesis[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(18): 5600-5605.
- [20] 曾兆国, 刘波, 陈永辉, 张旭. 分光光度法测定莫能菌素含量[J]. 中国兽药杂志, 2007, 53(4): 19-21.
ZENG ZG, LIU B, CHEN YH, ZHANG X. Determination of monensin in zymotic fluid by spectrophotometry[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2007, 53(4): 19-21 (in Chinese).
- [21] 柳天一, 张越, 王靓, 张宏建, 张建华, 陈旭升. 基于低pH适应性进化策略提高小白链霉菌 ϵ -聚赖氨酸合成能力[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(1): 14-21.
LIU TY, ZHANG Y, WANG L, ZHANG HJ, ZHANG JH, CHEN XS. Improvement of ϵ -poly-L-lysine production by *Streptomyces albus* based on low-pH adaptive evolution strategy[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(1): 14-21 (in Chinese).
- [22] 王安琪, 黄群刚, 康前进, 白林泉. 安丝菌素聚酮合酶模块 2 中脱水酶结构域的生化功能[J]. 微生物学报, 2021, 61(3): 607-620.
WANG AQ, HUANG QG, KANG QJ, BAI LQ. Biochemical analysis of the dehydratase domain in module 2 involved in ansamitocin biosynthesis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(3): 607-620 (in Chinese).
- [23] 郭松松, 孙羽, 杨怡萱, 余怡铖, 朱振洪. 盐霉素在白色链霉菌中的生物合成及代谢调控研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 732-742.
GUO SS, SUN Y, YANG YX, YU YC, ZHU ZH. Research progress on biosynthesis and metabolic regulation of salinomycin in *Streptomyces albus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 732-742 (in Chinese).
- [24] ERB TJ, BERG IA, BRECHT V, MÜLLER M, FUCHS G, ALBER BE. Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(25): 10631-10636.
- [25] CHAN YA, PODEVELS AM, KEVANY BM, THOMAS MG. Biosynthesis of polyketide synthase extender units[J]. Natural Product Reports, 2009, 26(1): 90-114.
- [26] RAMIREZ-MALULE H, JUNNE S, NICOLÁS CRUZ-BOURNAZOU M, NEUBAUER P, RÍOS-ESTEPA R. *Streptomyces clavuligerus* shows a strong association between TCA cycle intermediate accumulation and clavulanic acid biosynthesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 4009-4023.