

龟裂链霉菌 *zwf2* 基因阻断提高土霉素生物合成

刘志勇, 郭美锦*, 钱江湖, 庄英萍, 张嗣良

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)是链霉菌磷酸戊糖途径中第一个酶(“看家”酶),也是形成NADPH的关键酶,由 *zwf1* 和 *zwf2* 基因编码。以温敏型质粒 pKC1139 为基础构建了用于阻断龟裂链霉菌 *zwf2* 的重组质粒 pKC1139-*zwf2*, 通过大肠杆菌 GM2929 去甲基化 pKC1139-*zwf2* 后电转至原始龟裂链霉菌 M4018 感受态细胞,筛选得到转化子。转化子进一步通过 PCR 鉴定和点杂交印迹分析鉴定,证明是 *zwf2* 基因阻断的阳性突变子命名为 M4018-*zwf2*。以原始菌株为对照,突变子摇瓶发酵结果表明:突变子的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶活是原始菌的 50%左右,但土霉素生物合成水平则提高了 27%;在细胞生长方面,二者均在第 4d 进入生长稳定期而开始大量合成土霉素,发酵结束时细胞菌体浓度基本相同,但突变子的单位菌丝体土霉素生物合成能力则提高了 31%。因此,*zwf2* 的阻断有利于土霉素的生物合成,而对细胞生长没有明显影响。

关键词: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; *zwf2*; 龟裂链霉菌 M4018; 土霉素生物合成

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0021-05

由于链霉菌在抗生素药物开发和工业生产上的重要作用,迄今已有 3 个链霉菌的全基因已测序完成,并公布了其结果,包括除虫菊链霉菌(*S. avermitilis*)(Omura *et al*, 2003)^[1]、天蓝色链霉菌(*S. coelicolor* A3(2))(Bentley *et al*, 2002)^[2]和最近公布的降红色糖多孢菌(Markiyani *et al*, 2007)^[3]。天蓝色链霉菌的全基因组大约含 8.6 兆碱基,编码了 20 个以上天然次级代谢产物合成途径所需的所有酶和别的调控因子。

为了提高抗生素的生成水平,往往先考虑对链霉菌抗生素生物合成途径的研究,因而忽略了链霉菌初级代谢对抗生素生物合成的影响。虽然初级代谢为次级代谢提供了必需的能源、前体和还原力等,但目前为止还尚未完全阐明初级代谢对次级代谢的影响机制(Hodgson, 2000)^[4]。在天蓝色链霉菌的蛋白质组学研究发现已鉴定的 60% 的蛋白质是与初级代谢有关,涉及糖酵解途径、磷酸戊糖途径、三羧酸循环途径和嘌呤、嘧啶核苷酸的合成(Hesketh

et al, 2002)^[5]。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)是磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway, PPP)中“看家”酶,也是形成 NADPH 的关键酶。根据链霉菌全基因序列分析不论是采用聚酮合成酶方式生物合成抗生素的除虫链霉菌链霉菌(*S. avermitilis*),还是聚酮合成酶方式的天蓝色链霉菌(*S. coelicolor* A3(2))的 G6PDH 均由 *zwf1* 和 *zwf2* 基因编码(<http://www.streptomyces.org.uk>)。Butler 等^[6](2002)通过对 G6PDH 的两个基因(*zwf1*, *zwf2*)进行突变,发现放线紫红素(Actinorhodin, ACT)或 Undecylprodigiosin (RED)合成水平明显下降,而 Avignone 等^[7](2002)发现变铅链霉菌(*S. lividan*)的 ACT 和 RED (Undecylprodigiosin)生物合成与磷酸戊糖途径的代谢流成反相关。Bibb^[8]认为链霉菌的生长和初级代谢的营养生长对抗生素生物合成的启动(如基因转录)是紧密相关。因此,初级代谢途径的变化对次级代谢产物(抗生素等)的形成和产量的高低可能有至关重要的作用。本文以龟裂链霉菌(*Streptomyces*

基金项目: 国家基础科学项目(2007CB714303); 校优秀青年教师科研基金; 上海市重点学科建设项目(B505)

*通讯作者。Tel: +86-21-64253021; E-mail: guo_mj@ecust.edu.cn

作者简介: 刘志勇(1982-), 男, 上海人, 硕士研究生, 从事生物化工研究。E-mail: L_Z_Y2004@163.com

收稿日期: 2007-05-08; 修回日期: 2007-10-15

rimosus M4018)为对象,通过单交换方式阻断磷酸戊糖途径中编码 6-磷酸葡萄糖基因之一 *zwf2*,考察其对土霉素(Oxytetracycline, OTC)生物合成的作用,为土霉素发酵调控策略提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*Eserichia coli*) DH5 α 和双功能温敏型穿梭质粒 pKC1139(本实验室保存), pGMT-T 载体(上海捷瑞生物有限公司), 大肠杆菌(*E.coli*)GM2929 和龟裂链霉菌(*S. rimosus* M4018)由英国 Strathclyde 大学 Iain S Hunter 教授赠送。

1.1.2 培养基:大肠杆菌培养基为 LB 培养基, 龟裂链霉菌平板培养基为 TSB(Tryptone soya broth)^[9]; 龟裂链霉菌种子培养基和发酵培养基按文献[9]。

1.1.3 主要试剂和仪器:限制性内切酶、连接酶, Taq 酶系 TaKaRa 产品; DNA 回收试剂盒购自北京天为时代有限公司; 溶菌酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 测定酶活的各种药品以及抗生素 Apramycin(Am)和土霉素标品购自上海 Sigma-aldrich 有限公司; 点杂交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit)购自上海 Roche 有限公司; 链霉菌电转缓冲液等按 Hopwood 等^[9]方法配制; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 *zwf2* 基因片断的获得

1.2.1 链霉菌总 DNA 提取:从 TSB 平板上挑取单菌落接种到含 25mL TSB 培养基的 250mL 三角瓶中, 30 和 220r/min 培养 16~18h, 然后 12000 \times g 离心 10min 收集菌丝体, 再按文献[6]进行基因组提取。

1.2.2 PCR 扩增:根据 *zwf2*(ScoDB, accession no. AL096839)中基因序列, 分别以其 5 和 3 端 100bp 核苷酸开始设计正、反引物序列, 分别引入 *Eco* R 和 *Hind* 酶切位点: 正向序列 5 -AAAGAATTC GTCACCGCGATCTGTCCCGCAAG-3 (下划线, 黑体字为 *Eco* RI 位点); 反向序列为 5 -TTT AAGCTTCGCGAGCAGCTGGAGCAGGTGGTTC-3 (下划线, 黑体字为 *Hind* 位点)(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 反应的总体系为 25 μ L, 以 1 μ L 的龟裂链霉菌总 DNA 为模板进行反应。反应条件为: 97 7min; 95 1min, 57 1min, 72 10 min, 30 个循环。PCR 产物用凝胶回收(即为 *zwf2* 基因片断, 命名为 *zwf2*), 再将回收的 PCR 产物连接到 pGMT-T 载体上。16 连接过夜后转化 *E. coli* DH5 α 。挑选阳性克隆子进行 DNA 测序分析。测序正确的克隆菌落, 提取质粒, 用 *Eco* RI, *Hind*

双酶切, 用凝胶回收试剂盒回收带 *Eco* RI 和 *Hind* 酶切位点 *zwf2* 基因片断(*zwf2*)。

1.3 转化

1.3.1 单交换质粒 pKC1139-*zwf2* 构建和去甲基化:用 *Eco* RI 和 *Hind* 双酶切双功能温敏型穿梭质粒 pKC1139(6.5kb), 然后与 *zwf2* 基因进行连接, 转化 *E. coli* DH5。挑取抗性菌落按碱法提取质粒进行酶切鉴定。鉴定正确后, 把重组质粒转化 *E. coli* GM2929 并在含 Apramycin 抗生素平板上过夜培养。从阳性菌落中提取去甲基化的重组质粒, 保存于 -20 冰箱。

1.3.2 链霉菌转化方法:按文献[9]制备感受态龟裂链霉菌, 将 10 μ L 去甲基化的 pKC1139-*zwf2* 重组质粒, 在(电压 2 KV, 电容 25 μ F, 电阻 400 Ohm)条件下电转至链霉菌中, 并涂布于含 Apramycin 抗生素的 TSA 平板上 34 培养 3~5d, 筛选转化子。

1.3.3 转化子 PCR 鉴定:由于龟裂链霉菌 M4018 不含 apramycin 抗性基因, 而重组质粒是以整合的方式插入到基因组中, 因此以 Apramycin 抗性基因设计正向引物 5 -TGCAATACGAATGGCGAAA-AG-3 和反向引物 5 -TCGGCCCAGTTGACCCA-GGG-3。PCR 反应总体系为 25 μ L, 以 1 μ L 的总 DNA 为模板。反应条件为: 97 7min 后; 95 1min, 55 1min, 72 1min, 30 个循环。

1.3.4 点杂交方法鉴定:按照点杂交试剂盒的说明书, 进行操作。

1.4 PCR 鉴定转化子的整合方式

由于 pKC1139-*zwf2* 上只含 *zwf2* 基因片断, 分别缺少 5 和 3 端 100bp, 以基因组上 *zwf2* 5 端核苷酸序列设计正向引物 5 -GCGGACGACATGCTGG-AACGAGA-3, 以 Apramycin 抗性基因(*acc*)3 端设计反向引物 5 -TCGGCCCAGTTGACCCAGGG-3, PCR 产物则包括了 *zwf2* 和 *aac* 以及质粒中的 *zwf2* 核苷酸序列。PCR 反应总体系为 25 μ L, 以 1 μ L 的突变株总 DNA 为模板。反应条件为: 97 预变性 7min 后开始 30 个循环, 即 95 1min, 55 1.5min, 72 2min, 再 72 10min。

1.5 龟裂链霉菌发酵方法

分别将生长于 TSB 斜面的重组孢子接种于含 20mL 种子培养基的三角瓶内 30、220r/min 培养 24h, 再按 10%接种量接至 3 个含 50mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶内 30、220r/min 进行发酵培养 8d。每 24h 取样分析。

1.6 6-P-葡萄糖脱氢酶酶活测定

按文献[10]进行。酶活单位的定义: 在 37 $^{\circ}$ C, pH

为 7.0 的条件下, 每分钟 0.01mg NADPH 生成所需要的酶量, 为 1 单位(U)。

1.7 土霉素(Oxytetracycline)测定

取 5ml 发酵液, 在每 1ml 发酵液中加入 5ml pH 为 1.8 的 HCl,混合后用滤纸过滤,滤液存于 4℃ 保存, 再按文献[11]进行 HPLC 分析。

1.8 考马斯亮蓝法测试样中微量蛋白
Broadford 方法按文献[15]进行。

2 结果和分析

2.1 重组质粒 pKC1139-*zwf2*' 构建

以龟裂链霉菌基因组为模板, 得到的 PCR 产物(*zwf2*)经核苷酸序列分析为 1350bp,与基因数据库报道基本一致(原基因大小为 1560bp)。将 PCR 扩增纯化产物与用 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切 pKC1139 片段连接构建为 7832bp 的重组质粒 pKC1139-*zwf2* 如图 1。

2.2 重组 pKC1139-*zwf2*' 质粒酶切鉴定

由于 *zwf2* 核苷酸序列中在 750bp 处有 *Nco* 单一性限制酶切位点和两端分别为 *EcoR* 和 *Hind* 酶切位点(图 1), 因此用 *Nco*、*EcoR* 和 *Hind* 三酶进行重组质粒的双酶切分析(图略)。

在 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切 pKC1139-*zwf2* 得到一条目的大小条带, 与预想大小是完全吻合。另外, 分别用 *Nco* /*EcoR* 和 *Hind* /*Nco* 双酶切, 分别出现了 650bp 和 750bp 大小的两条带, 与理论值完全一致。因此, 构建的 pKC1139-*zwf2* 质粒经酶切验证是正确的。

2.3 重组转化子筛选鉴定

通过 *E.coli* 2929 去甲基化的 pKC1139-*zwf2* 质粒电击转化到感受态龟裂链霉菌。由于 pKC1139-*zwf2* 拥有温敏复制启动子, 当培养温度超过 34 时, 该游离质粒不能自我复制。因此, 转化后直

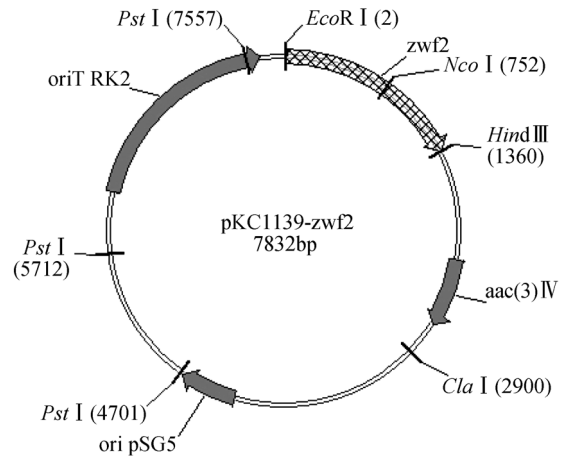


图 1 pKC1139-*zwf2* 质粒图谱
Fig. 1 Map of recombinant pKC1139-*zwf2* plasmid.

接在 34 含 Apramycin 的 TSB 平板上培养, 生长的菌落则可能为重组质粒 pKC1139-*zwf2* 整合于 M4018 染色体上的重组菌株。为了验证 pKC1139-*zwf2* 是否整合在染色体上, 考虑龟裂链霉菌 M4018 无 Apramycin 抗性基因, 而阳性转化子则因从质粒 pKC1139-*zwf2* 单交换中获得抗性基因, 因此按 Apramycin 抗性基设计引物进行 PCR 鉴定。因 Apramycin 抗性基因大小为 750bp 左右, 经过 PCR 验证的转化子含 750bp 的 Apramycin 抗性基因。为此, 以 PCR 鉴定为阳性转化子进一步做点杂交分析鉴定。

以 Apramycin 抗性基因的片段作为探针, 点杂交印迹分析: PCR 鉴定为阳性转化子总 DNA 能与 Apramycin 抗性基因的片段探针杂交而形成深色的杂交点, 而以龟裂链霉菌 M4018 为阴性对照未出现杂交点。因此, 以上 PCR 鉴定和点杂交分析说明 pKC1139-*zwf2* 质粒通过重组整合在 M4018 的基因组中。

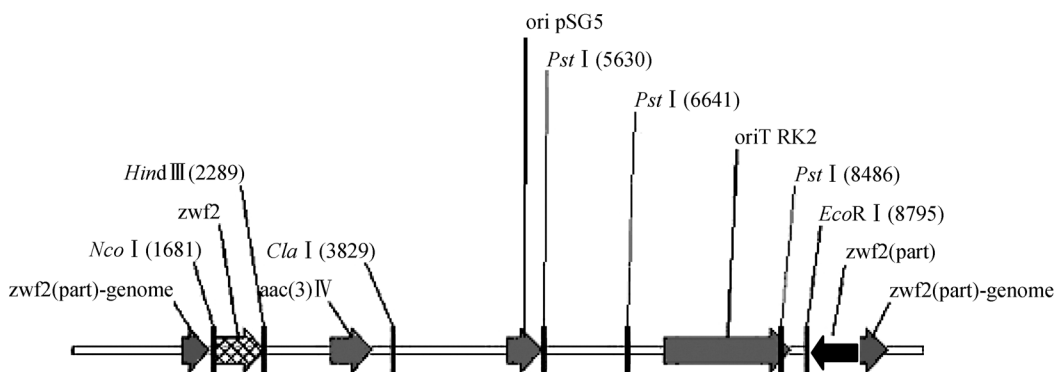


图 2 pKC1139-*zwf2* 交换到链霉菌染色体上示意图
Fig. 2 Sketch map of pKC1139-*zwf2* location in chromosome of *S. rimosus* M4018 after single crossover.

与此同时,为了验证阳性重组子中的质粒的整合方式,即 *zwf2* 基因是否阻断,按 1.2.7 方法进行 PCR 鉴定,由于 *zwf2* 缺少 *zwf2* 完整基因 5 端 100bp,PCR 理论产物大小为 3.3kb 左右。进一步以 PCR 产物为模板, *acc* 基因设计的正反向引物 PCR 扩增出 750bp 的 *acc* 基因,而在原始菌(阴性对照)中无法扩增到相应的条带,以 pKC1139-*zwf2* 质粒为模板(对照)也只能扩增出 *acc* 基因。因此,既然点杂交分析验证到重组质粒 pKC1139-*zwf2* 整合到 M4018 染色体 *zwf2* 基因中,而 PCR 验证转化子的整合分析则表明在 *zwf2* 基因中插入了 *aac* 抗性基因。图 2 为质粒 pKC1139-*zwf2* 交换在染色体上基因分析结果, *zwf2* 阻断的阳性突变子命名为 M4018-*zwf2*。

2.4 重组子与原始菌中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶酶活测定结果

图 3 为 6-磷酸葡萄糖脱氢酶比酶活测定结果。当细胞处在指数生长期时(第 4 天),葡萄糖 6-磷酸脱氢酶的比酶活明显高于发酵末期的第 8 天,与文献报道的链霉菌 G6PDH 酶活在指数生长期是最高的^[12]相吻合。由于 *zwf2* 是编码 6-磷酸葡萄糖脱氢酶基因之一,当 *zwf2* 突变后 6-磷酸葡萄糖脱氢酶酶活可能减少。但是不论在发酵第 4 天还是第 8 天时, M4018-*zwf2* 菌株的 G6PDH 酶活是原始菌株(*S. rimosus* M4018)酶活的一半左右,说明 *zwf2* 的阻断使重组子(M4018-*zwf2*)中 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的比酶活减弱了,这与理论分析相一致。

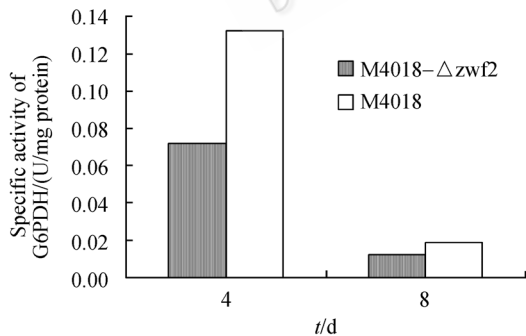


图 3 原始株和突变株葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶活比较
Fig. 3 Specific activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase of M4018 and M4018-*zwf2* assayed on the 4th day and 8th day, respectively.

2.5 重组子与原始菌土霉素生物合成水平比较

以原始菌 M4018 为对照,重组子摇瓶发酵 8d。原始菌和 M4018-*zwf2* 菌的生长情况基本一致:菌体生长到第 5d 进入了生长稳定期, M4018-*zwf2* 细胞干重比原始菌的干重要稍微小,但无显著差异。两菌株在结束指数生长期后(第 5d)土霉素生物

合成开始,土霉素生物合成水平迅速增大,但在发酵后期(从第 6d 开始)土霉素合成水平差异明显,即原始菌 M4018 土霉素合成能力减小,而重组菌 M4018-*zwf2* 土霉素发酵水平比原始菌提高了 27%,此结果与 Buttle 等^[6](2002)对变铅链霉菌(*S. lividins*)通过框内缺失 *zwf1*、*zwf2* 基因来研究放线紫红素生物合成的结果相类似。土霉素 HPLC 测定结果表明突变株和原始菌株与土霉素标准品均在保留时间 20min 左右有明显的土霉素单一峰(图未列),说明 *zwf2* 突变对土霉素产生了直接的影响。

此外,经计算在发酵第 8d 时 M4018-*zwf2* 单位干菌体的土霉素(OTC/DCW)合成能力为 $9.67 \pm 0.21\text{mg/g}$ (OTC/DCW 平均值)较原始菌的 OTC/DCW $7.36 \pm 0.15\text{mg/g}$ 提高了 31%,说明对 M4018-*zwf2* 的单位菌体具有更高的土霉素合成能力。

3 讨论

通过对 *zwf2* 基因的阻断初步研究了 G6PDH 酶活强弱对于土霉素生物合成的影响,但是 *zwf2* 只是编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因之一,另外一个编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因是 *zwf1* 基因^[6]。因葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是磷酸己糖旁途径中最重要酶之一,是细胞合成还原力 NADPH 的关键酶。本试验结果发现 *zwf2* 失活没有影响到菌体细胞的生长(数据未列),但促进了土霉素浓度的增加,突变株 M4018-*zwf2* 单位菌体土霉素生物合成水平比原始菌提高了 31%。根据 Butler 等^[6]研究变铅链霉菌菌 *zwf1* 和 *zwf2* 基因对放线紫红素合成影响分析,因此推测突变株土霉素合成能力的提高可能与还原力 NADPH 合成有关,但本文在发酵过程中未测定细胞内 NADPH 的浓度来加以证明。

由于葡萄糖在经过磷酸戊糖途径后产生 CO_2 而损失碳源,因此虽然 *zwf2* 编码的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶能够提供大量的 NADPH,但这是以牺牲碳源为代价换来的。对于土霉素生物合成,其合成最后二步需要大量的 NADPH 和氧^[13]。酿酒酵母中的 NADPH 主要用于合成代谢,而 NADH 主要用于分解代谢^[14],它们无法偶联在一起,而在链霉菌中这种情况也是可能存在的,所以虽然起着合成作用的 NADPH 对于抗生素的合成起着重要的作用,但是仍然需要在还原力 NADPH 和碳骨架之间找到一个最佳平衡。另外,细菌繁殖越旺盛,磷酸己糖旁路越活跃^[15],细菌繁殖越旺盛产得 ATP 也越多,而 ATP 的产生需通过电子传递链耗氧来形成,当 *zwf2* 缺失的突变子 NADPH 形成减少时,同样消耗较少量的 ATP,从而有更多氧参与土霉素形成,这可能也是突

变菌土霉素生物合成能力比原始菌更高的原因之一。

由于本试验未尝试比较 *zwf1* 敲除对土霉素生物合成的影响, 如果将形成 NADPH 辅酶的相关基因进行系统研究, 既合理调控碳源代谢, 也调控辅酶代谢流的变化, 可能对土霉素的生物合成调控更合理, 这方面需要进一步进行研究。

参 考 文 献

- [1] Ikeda H, Ishikawa J, Omura S, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21: 526–531.
- [2] Bentley SD, Chater KF, Challis GL, *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417: 141–147.
- [3] Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, *et al.* Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol*. 2007, 25(4): 447–53.
- [4] Hodgson DA. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microbiol Physiol*, 2000, 42: 47–238.
- [5] Hesketh AR, Chandra G, Chater KF, *et al.* Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 2002, 46: 917–932.
- [6] Butler MJ, Bruheim P, Bibb MJ. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68: 4731–4739.
- [7] Avignone RC, Bibb MJ, *et al.* Carbon flux distribution in antibiotic-producing chemostate cultures of *Streptomyces lividans*. *Metabolic Engineering* 2002, 4(2): 138–50
- [8] Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(2): 208–220
- [9] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, *et al.* Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual[M]. 2nded. Norwich: John Innes Foundation Press, 2000.
- [10] 周新, 涂植光. 临床生物化学和生物化学检验. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [11] 张莉, 刘红云, 郑举. 高效液相色谱法测定土霉素片含量. 试验研究 (Sichuan Animal & Veterinary Science) 2005, 12(4): 33–35.
- [12] Yong-Gu Ryu, Michael J, Butler, Keith F, *et al.* Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environment Microbiology*, 2006, 1: 7312–7316.
- [13] Hunter IS. Microbial Secondary Metabolites: Biosyntheses, Genetics and Regulation. 1sted. Beilin: Springle Press, 2002.
- [14] 侯进, 沈煜, 鲍晓明. 酿酒酵母木糖代谢中辅酶工程的研究进展. 中国工程生物杂志 (China Biotechnology), 2006, 26(2): 89–94
- [15] 欧伶, 俞建瑛, 金新根. 应用生物化学. 第一版. 北京: 中国化学工业出版社, 2001.

Disruption of *zwf2* gene to improve oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M4018

Zhiyong Liu, Meijin Guo^{*}, Jiangchao Qian, Yingping Zhuang, Siliang Zhang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Genes of *zwf1* and *zwf2* encode two isozymes of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) of *Streptomyces*, respectively. G6PDH is the first enzyme in the oxidative pentose phosphate pathway (PPP) and the key enzyme for NADPH generation. Based on thermal sensitive plasmid pKC1139, a recombinant plasmid pKC1139-*zwf2* was constructed and verified with restriction enzyme digestion. The plasmid pKC1139-*zwf2* was electropolated into competent *Streptomyces rimosus* M4018 cells after it was demethylated by *E. coli* GM2929. Transformants grown on Tryptone Soya Agar (TSA) plate containing 500ug/mL apramycin were selected, and identified using dot hybridization analysis and PCR amplification with apramycin resistant gene as primers. A positive clone was then selected and designated M4018-*zwf2*. With parent strain *S. rimosus* M4018 as control, mutant M4018-*zwf2* was cultured in shaking flask. Specific activity of G6PDH of M4018-*zwf2* was only half of that of parent strain whereas yield of oxytetracycline (OTC) of mutant was 27% higher. to the mutant had a similar biomass profile to that of the control biosynthesis started when the growth entered stationary phase on the 4th day. However, specific oxytetracycline production of mutant was 31% higher than that of the parent strain, indicating that *zwf2* disruption could enhance oxytetracycline biosynthesis in *S. rimosus* M4018-*zwf2*.

Keywords: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; *zwf2*; *S. rimosus* M4018; Oxytetracycline biosynthesis