

# 莫能菌素高产菌的航天诱变与基因工程复合选育

黄子瑄<sup>1,2</sup> 张善飞<sup>1,2</sup> 刘旻炜<sup>1,2</sup> 孙付保<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**莫能菌素(monensin)是肉桂地链霉菌(*Streptomyces cinnamonensis*, *S. cinnamonensis*)发酵产生的聚醚类抗生素,因其不易产生耐药性、绿色安全等优势在农业、畜牧业等领域广泛应用。作者对肉桂地链霉菌 2110 的航天诱变和基因工程育种开展系统研究,以期提高其产莫能菌素的发酵性能。通过抗性平板结合微孔板培养体系筛选航天诱变的突变体,最终获得一株遗传稳定性良好的高产突变菌 *S. cinnamonensis* G43,发酵罐效价比原始菌 2110 提高 16.5%。将突变菌进行莫能菌素合成调控基因的单独/双串联过表达,通过整合过表达调控基因 *monRI*、*dasR* 得到工程菌 G43-*dasR-monRI*,该菌在 5 L 发酵罐中的效价达 11.3 kU/mL,较原始菌 2110 提高 33.1%。结果表明,航天诱变与基因工程育种相结合能有效用于莫能菌素高产菌的选育,可为其他聚醚类抗生素生产菌的菌种改良提供借鉴。

**关键词:**莫能菌素;航天诱变;途径特异性调控;基因整合;过表达;肉桂地链霉菌

## Cascading Strain Breeding of High Monensin Producing Strain with Space Mutation and Genetic Engineering

HUANG Zixuan<sup>1,2</sup> ZHANG Shanfei<sup>1,2</sup> LIU Minwei<sup>1,2</sup> SUN Fubao<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Monensin is a kind of polyether antibiotic produced by *Streptomyces cinnamonensis* (*S. cinnamonensis*), which is widely used in fields such as agriculture and animal husbandry with the advantages of low tendency to resistance and environmentally friendly properties. The author systematically investigated the fermentation performance improvement of *S. cinnamonensis* strain 2110 by combination of space mutation and genetic engineering breeding. High-yielding mutants from space mutation were selected through resistance screening combined with a microplate culture system. Results showed that a highly monensin producing mutant *S. cinnamonensis* G43 (G43) was obtained with a relatively good genetic stability, in which its monensin titer increased by 16.5% as compared to the parental strain. Subsequently, independent and tandem overexpression of monensin synthesis regulatory genes were conducted around the mutant strain. With successful integration of regulatory genes *monRI* and *dasR*, the engineering strain G43-*dasR-monRI* was finally obtained, and its monensin titer reached 11.3 kU/mL in a 5 L bio-fermenter, representing a 33.1% increase compared to the parental strain 2110. The results demonstrated that the combination of space mutation and genetic engineering breeding can be effectively applied to select high-yield strains for monensin production and may provide a reference for strain improvement of other polyether antibiotic-producing microorganisms.

**Keywords:** monensin; space mutation; pathway-specific regulation; genetic integration; overexpression; *Streptomyces cinnamonensis*

基金项目:国家自然科学基金面上项目(22278189)。

通信作者:孙付保(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事绿色低碳生物制造和生化技术迭代进化研究。E-mail: fubaosun@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-03-20 修回日期:2024-04-20

莫能菌素是一种由肉桂地链霉菌发酵产生的聚醚类脂溶性抗生素,其主要成分为莫能菌素A和B。莫能菌素具有广谱抗球虫活性,通过干扰球虫细胞内钠、钾离子正常交换引起渗透压失衡从而破坏细胞,因此不易产生耐药性。此外,莫能菌素还可提高猪、牛、羊等家畜的营养吸收和饲料利用效率<sup>[1]</sup>。因此,莫能菌素在农业、畜牧养殖等领域具有广泛应用前景,开展肉桂地链霉菌株选育及莫能菌素发酵性能的研究具有重要意义。

在菌株选育方面,多种诱变技术已成功应用于莫能菌素生产菌株。李子勇等<sup>[2]</sup>利用紫外-氯化锂复合诱变处理结合抑菌圈法提高初筛效率,最后获得3株遗传稳定性良好的高产突变菌,摇瓶效价提高30%以上。任勇等<sup>[3]</sup>将紫外-NTG复合诱变与抗性筛选和原生质体融合技术结合,突变株摇瓶效价提高了近30%。值得注意的是,航天诱变是一种新型诱变育种技术,融合了传统诱变方法与现代航天技术,该技术利用多种极端条件,如超低温、强宇宙射线以及空间环境中的真空失重状态等,以诱发菌株产生遗传变异<sup>[4]</sup>。荆士华等<sup>[5]</sup>通过神舟七号飞船搭载维生素C一步发酵生产菌——生黑醋杆菌,经多轮筛选获得发酵周期缩短10%且产率提高近10%的突变菌G454,提高了维生素C的生产效率。王清清等<sup>[6]</sup>通过航天诱变技术筛选出2株遗传稳定性良好的乳酸菌L1-51和L21-48,其 $\gamma$ -氨基丁酸产量分别是出发菌的2.2倍和1.1倍。郭伟群<sup>[7]</sup>通过航天诱变方式筛选获得遗传性状稳定的多杀菌素高产菌,产量达573.8 U/mL,是出发菌产量的2倍以上。可见,航天诱变作为一种新型的菌种选育技术,具有突变效率高且性状稳定的优势<sup>[8]</sup>。随着航天技术的成熟,航天诱变将成为微生物菌种选育的新方向。但截至目前,鲜少有关航天诱变技术应用于肉桂地链霉菌菌种选育的报道。

近年来,随着现代生物技术的发展,通过调控基因提升肉桂地链霉菌的发酵性能是获得莫能菌素高产菌的一种可靠手段<sup>[9]</sup>。Tang等<sup>[10]</sup>发现肉桂地链霉菌缺失*monRI*基因会导致莫能菌素生产能力完全丧失,当回补*monRI*基因时,莫能菌素产量恢复,而进一步过表达*monRI*基因后莫能菌素产量比原始菌提高近50%。上述结果均表明*monRI*基因发挥正调控作用。汤正坤<sup>[11]</sup>从转录层面分析了3个调控基因*monRI*、*monRII*和*monH*之间的交叉互补

效应,进一步通过串联过表达发现这些调控基因之间存在协同作用。此外,张玥<sup>[12]</sup>通过对全局调控基因*dasR*进行过表达、反义抑制和敲除,系统研究了其全局调控机理并证明*dasR*具有正向调控作用。在此基础上,通过组合过表达全局调控基因与途径特异性调控基因,莫能菌素产量提高了1.2倍。研究表明,利用基因工程手段对途径特异性和全局调控基因进行抑制或过表达<sup>[13-14]</sup>是强化肉桂地链霉菌次级代谢产物合成的有效手段,对于莫能菌素高产菌的遗传改造也具有适用性。

围绕提高肉桂地链霉菌生产莫能菌素的发酵性能,作者对微生物的航天诱变和基因工程育种开展了系统研究。首先将*S. cinnamonensis* 2110搭载到神舟十四号飞船进行太空诱变处理;在返回地面后对航天诱变菌株进行活化,结合抗性初筛、深孔板复筛、摇瓶二次复筛,以期获得一株遗传性能良好的高产突变菌。为进一步提高突变菌的莫能菌素生产能力,作者将途径特异性调控基因*monRI*和全局调控基因*dasR*在突变菌上双串联过表达,并进行工程菌株的摇瓶和罐上发酵验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

所用菌株和质粒信息见表1。目的基因及质粒骨架扩增引物见表2。

#### 1.1.2 培养基

肉桂地链霉菌的高氏培养基、种子培养基和发酵培养基参照文献<sup>[15]</sup>配制。LB培养基和2×YT培养基参照文献<sup>[16]</sup>配制。SM培养基和MS固体培养基参照文献<sup>[17]</sup>配制。

#### 1.1.3 试剂和仪器

豆油:益海嘉里金龙鱼粮油股份有限公司;莫能菌素标准品:北京谱析标准技术有限公司;SanPrep柱式质粒小量抽提试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、硫酸链霉素、乙酸钠:生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Super Pfx MasterMix、One Step Seamless Cloning Mix:康为世纪生物科技股份有限公司;DNA Marker、10×上样缓冲液:宝日医生物技术(北京)有限公司。

生物传感分析仪:SBA-40E型,山东省科学院生

物研究院;超微量分光光度计: SpectraMax® 190 型, 美谷分子仪器(上海)有限公司;基因扩增仪: RePure·D(B)型,杭州柏恒科技有限公司。

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

| 菌株/质粒                          | 描述  | 来源        |
|--------------------------------|---|-----------|
| ET12567(pUZ8002)               | 用于接合转移                                    | 作者所在实验室保藏 |
| <i>S. cinnamonensis</i> 2110   | 莫能菌素高产菌                                   | 作者所在实验室保藏 |
| 菌株 <i>S. cinnamonensis</i> G43 | 莫能菌素航天诱变高产菌                               | 本研究构建     |
| G43- <i>monRI</i>              | <i>monRI</i> 过表达菌株                        | 本研究构建     |
| G43- <i>dasR</i>               | <i>dasR</i> 过表达菌株                         | 本研究构建     |
| G43- <i>dasR-monRI</i>         | <i>dasR</i> 与 <i>monRI</i> 双串联过表达菌株       | 本研究构建     |
| pIB139                         | oriT、P <sub>emE</sub> 、整合型、 <i>aprI</i>   | 作者所在实验室保藏 |
| 质粒 pIB139- <i>monRI</i>        | 携带 <i>monRI</i> 的 pIB139 质粒               | 本研究构建     |
| pIB139- <i>dasR</i>            | 携带 <i>dasR</i> 的 pIB139 质粒                | 本研究构建     |
| pIB139- <i>dasR-monRI</i>      | 携带 <i>dasR</i> 和 <i>monRI</i> 的 pIB139 质粒 | 本研究构建     |

表 2 引物序列  
Table 2 Primer sequences

| 引物         | 序列(5'-3')                                      |
|------------|--|
| pIB139-F   | TTGGGGATCCTCTAGAGGATCCGC                       |
| pIB139-R   | CATATGTGGATCCTACCAACCGG                        |
| monRI-F    | GTTGGTAGGATCCACATATGGTGAGATACGAAA<br>TGCTGGGCC |
| monRI-R    | ATCCTCTAGAGGATCCCAATCAGCGACCGGAC<br>AGGGC      |
| dasR-F     | GTTGGTAGGATCCACATATGATGGGCACTGAGG<br>CCGGCAG   |
| dasR-R     | GATCCTCTAGAGGATCCCAATCAGTCCGTGGG<br>TCTCTTGAG  |
| Mon-D-F    | GACTGATAAGGAGGGTGAGATACGAAATGC                 |
| Mon-D-R    | ATCCTCTAGAGGATCCCAATCAGCGACCGGAC<br>AGGGC      |
| DasR-mon-F | GTTGGTAGGATCCACATATGATGGGCACTGAGG<br>CCGGC     |
| DasR-mon-R | TCTCACCTCCTTATCAGTCCGTGGGTCTCTTGA<br>GG        |
| APR-F      | GTGCAATACGAATGGCGAAA                           |
| APR-R      | TCAGCCAATCGACTGGCGAG                           |

## 1.2 方法

### 1.2.1 筛选因子最小抑制质量浓度(MIC)的确定

将原始菌在高氏平板上培养 7 d 后制成的孢

子悬液进行适当稀释,均匀涂布在含有不同质量浓度(16、18、20、21、22 μg/mL)硫酸链霉素和不同质量浓度(1.0、2.0、3.0、3.5、4.0 mg/mL)乙酸钠的抗性平板上,于 30 °C 倒置培养 7 d 后观察菌体的生长情况。当平板中没有菌体生长时所对应的浓度即为该筛选因子对该菌株的 MIC。

### 1.2.2 肉桂地链霉菌的航天诱变与菌株活化

用质量分数 10% 的脱脂奶粉将斜面培养的原始菌 2110 洗脱下来,制成冻干菌块存放于无菌搭载小管中,并在 4 °C 条件下保存直至搭载。神舟十四号飞船于 2022 年 6 月 5 日发射,进行太空诱变处理,并于 2022 年 12 月 4 日返回地面。在整个飞行任务执行期间,样品存放于飞船返回舱,返回地面后取出菌种进行活化工作。刮取经太空诱变的冻干菌块置于装有 10 mL 无菌水并带有 2 mm 玻璃珠的锥形瓶中,200 r/min 振荡 15 min,过滤,适当稀释后涂布于高氏培养基,置于 30 °C 培养箱恒温培养一周。

### 1.2.3 莫能菌素高产菌的筛选

抗性平板初筛:经过活化的单菌落制成孢子悬液,适当稀释后涂布于分别含有硫酸链霉素和乙酸钠的抗性平板上,于 30 °C 恒温培养 7 d,选择生长状况良好的单菌落进行下一步复筛。24 深孔板复筛:将单菌落上所有孢子刮下,分别接种到深孔板种子培养基中,于 30 °C 培养 24 h,按体积分数 10% 接种至深孔板发酵培养基中,在 30 °C 培养 10 d 进行复筛。另外,刮孢子时用过的接种环涂布于对应孔位的孔板固体斜面培养基上,30 °C 培养至斜面长满孢子,4 °C 冰箱保藏备用。用 1 mL 无菌水将复筛得到的正突变菌对应的固体斜面培养基上的孢子洗下,用于后续摇瓶发酵验证,余下 100 μL 均匀涂布于大试管斜面上,30 °C 培养 10 d 后用体积分数 20% 的无菌甘油溶液全部洗下,分装后置于 -80 °C 冰箱保藏。

### 1.2.4 肉桂地链霉菌的发酵

摇瓶体系:从孢子悬液中吸取 1 mL 或从高氏平板上挑取单菌落接种于种子培养基(500 mL 锥形瓶中装液 100 mL),于 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h。按体积分数 10% 接种至发酵培养基(500 mL 锥形瓶中装液 50 mL),于 30 °C、200 r/min 条件下发酵 10 d。发酵罐体系:5 L 发酵罐中装液 3 L,通气量 3 L/min,温度 33 °C,转速 500 r/min,接

种体积分数 10%,溶氧率(DO)控制在 30%以上<sup>[18]</sup>。

### 1.2.5 过表达质粒的构建

在 NCBI 上查找莫能菌素生物合成途径特异性调控基因 *monRI*(GenBank:KX263301.1)和全局调控基因 *dasR*(GenBank:KX247856.1)的序列,将目的基因分别插入质粒 pIB139 并设计带有同源臂的引物(见表 2),分别以质粒 pIB139 和肉桂地链霉菌基因组为模板进行 PCR 扩增,得到质粒骨架以及各目的基因。产物回收后按照无缝克隆试剂盒说明书操作,构建出各重组质粒。其中,使用的质粒 pIB139 参照文献<sup>[15]</sup>,该质粒由质粒 pSET152 改造而来,包含强组成型启动子 *ermEp\**、*phiC31* 整合酶基因、*attP* 整合位点以及安普霉素抗性基因,因此质粒 pIB139 能高效整合至肉桂地链霉菌的基因组。

### 1.2.6 过表达菌株的构建

将重组质粒转化到 ET12567 感受态细胞获得重组子,测序正确后采用接合转移将各重组子分别转入肉桂地链霉菌<sup>[19-20]</sup>,挑取接合子进行安普霉素抗性基因验证,条带符合预期的进行测序验证。对于测序结果验证无误的工程菌株,在不含抗生素的高氏平板上进行松弛培养,从中选取长势优良的菌株进行保藏,以备后续使用。

### 1.2.7 检测方法

生物量测定:采用干质量法,取一定体积发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后用去离

子水重悬并离心 2 次,弃上清液后得到的湿菌体于 105 °C 烘至质量恒定,得到菌体干质量。葡萄糖质量浓度测定:发酵上清液稀释一定倍数后,使用生物传感分析仪进行测定。莫能菌素效价测定:采用香草醛显色法<sup>[21]</sup>测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 肉桂地链霉菌的航天诱变筛选结果

#### 2.1.1 抗性平板初筛与深孔板复筛

链霉素抗性筛选方法具有广谱性,链霉菌经次级代谢产生抗生素的能力与其自身对链霉素的抗性之间存在密切关联。乙酸钠作为合成莫能菌素的前体物质,其浓度对抗生素合成具有反馈调节作用<sup>[22]</sup>。因此,分别选取硫酸链霉素和乙酸钠作为初筛步骤的抗性筛选因子,探究其最适添加质量浓度,结果如图 1(a)所示。当硫酸链霉素、乙酸钠质量浓度分别提高到 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4.0  $\text{mg}/\text{mL}$  时,菌体生长均受到强烈抑制,平板上没有菌落生长,因此确定硫酸链霉素、乙酸钠的添加质量浓度分别为 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 4.0  $\text{mg}/\text{mL}$ 。按照 1.2.2 的方法活化航天诱变菌株后将其涂布于分别含有硫酸链霉素、乙酸钠的平板上进行抗性初筛,接着挑取在 2 种初筛平板上生长状况良好的单菌落,分别接入深孔板中培养 10 d,共筛选出 212 株菌,其中效价与原始菌相差 10% 以上的正突变菌共 13 株,占 6.1%;负突变菌占 64.2%,见图 1(b)。

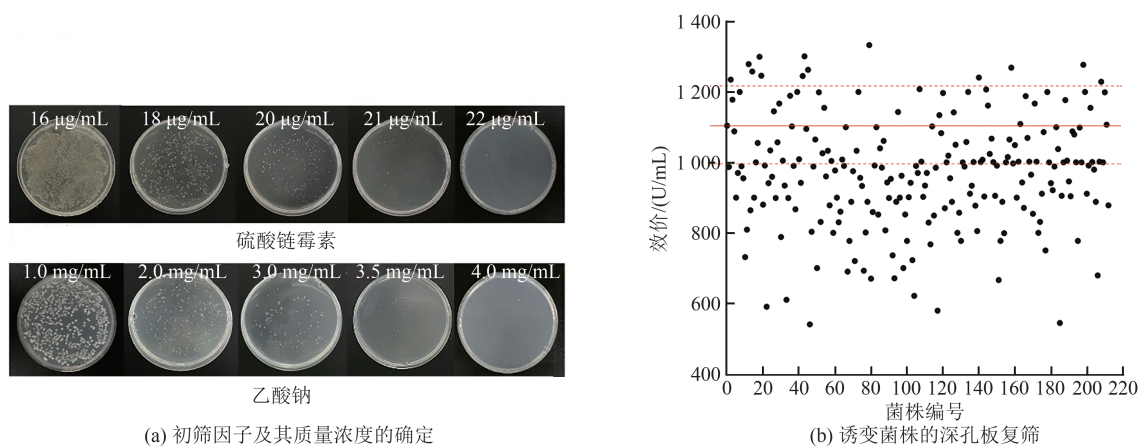


图 1 航天诱变菌株的抗性平板初筛与深孔板复筛

Fig. 1 Preliminary screening on resistance plates and rescreening with deep-well plates of space-mutated strains

#### 2.1.2 摇瓶二次复筛与遗传稳定性评估

对上述 13 株正突变菌进行摇瓶二次复筛,结果如图 2(a)所示。绝大部分突变菌在摇瓶中的生

长情况比原始菌 2110 好,效价高于原始菌 (7.2  $\text{kU}/\text{mL}$ )。其中突变菌 G43 在发酵第 10 天时的生物量和效价分别达到 43.1  $\text{g}/\text{L}$  和 8.2  $\text{kU}/\text{mL}$ ,与

原始菌 2110 相比分别提高 7.8% 和 13.9%。因此，选择突变菌 G43 进行后续研究。由于链霉菌普遍存在遗传不稳定的特性，会导致菌种退化、产量不稳定等现象<sup>[23]</sup>，因而接着对 G43 进行 5 次连续传代

培养以检测其遗传稳定性，结果见图 2(b)，发酵传至第 5 代时突变菌 G43 仍保持较好的生长态势，其效价维持在 8 kU/mL 左右。可见突变菌 G43 遗传稳定性良好，具有后续应用潜力。

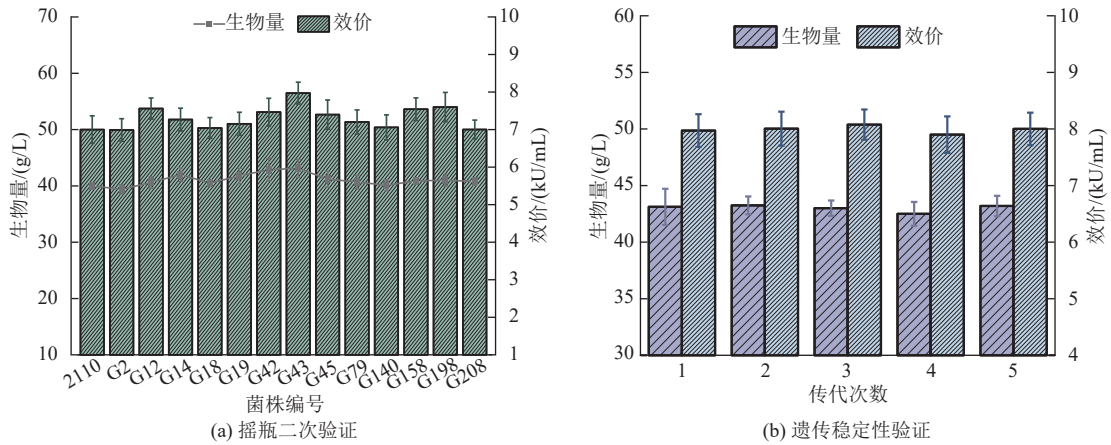


图 2 莫能菌素高产菌的二次复筛与遗传稳定性评估

Fig. 2 Secondary rescreening and genetic stability assessment of high-yield monensin strains

### 2.1.3 突变菌的发酵培养

在摇瓶与发酵罐中对突变菌 G43 进行发酵性能的系统评估，结果如图 3 所示。突变菌与原始菌的菌体生长、产物积累趋势基本一致。在摇瓶水平上，发酵第 4 天进入生长稳定期后开始快速合成莫能菌素，在发酵第 10 天时突变菌 G43 的效价达最高水平

(8.2 kU/mL)。在 5 L 发酵罐中进行培养，发酵第 6 天时突变菌 G43 的生物量与效价分别达 50 g/L 和 9.9 kU/mL，与原始菌相比分别提高 6.4% 和 16.5%。上述结果表明，突变菌 G43 的生长与产莫能菌素能力显著高于原始菌，展现出优良的发酵性能，表明航天诱变应用于莫能菌素高产菌株选育具有可行性。

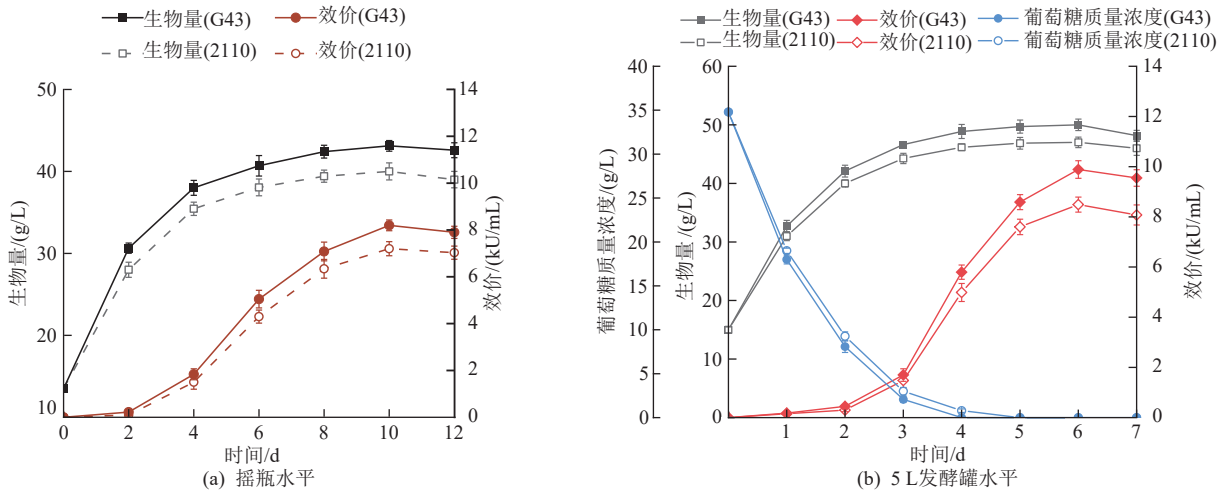


图 3 突变菌 G43 与原始菌 2110 的发酵情况对比

Fig. 3 Comparison of fermentation performance between mutant G43 and parental strain 2110

## 2.2 基因工程菌株改造

### 2.2.1 基因工程菌株构建

研究表明<sup>[12]</sup>，MonRI 是位于莫能菌素生物合成基因簇内的途径特异性调控因子，作用于特定

代谢途径，影响簇内基因表达；DasR 是簇外调控形态分化和次级代谢的全局性调控因子，多靶点作用于生物合成基因簇，两者对于莫能菌素的生物合成起正向促进作用。因此，作者尝

试在突变菌 G43 中整合 *monRI* 与 *dasR* 基因并进行过表达,以期进一步提高莫能菌素合成能力。按照 1.2.6 方法构建过表达菌株后进行测序比对,结果表明,表达的两个调控基因序列与 GenBank 序列无异,成功构建工程菌 G43-*monRI*、G43-*dasR* 和 G43-*dasR-monRI*。

### 2.2.2 基因工程菌株摇瓶发酵性能评估

将上述成功构建的工程菌株进行发酵性能评估,结果如图 4 所示。工程菌 G43-*monRI* 的生长代谢趋势与突变菌 G43 一致,发酵第 10 天时 G43-*monRI* 效价达最高水平,为 8.6 kU/mL,与突变菌 G43 相比提高不明显。工程菌 G43-*dasR* 的菌体生长、产物积累趋势也与突变菌 G43 一致,但生长速度更快;在发酵第 10 天时,工程菌 G43-*dasR* 的生物量和效价分别达到 46.0 g/L 和 9.2 kU/mL,与突

变菌 G43 相比分别增加 6.7% 和 12.2%。这些数据表明,可通过强化 G43 调控基因的表达量提高莫能菌素产量,且过表达全局调控基因 *dasR* 的效果更为显著。为验证途径特异性调控基因 *monRI* 对突变菌 G43 的适用性,对 *monRI* 和 *dasR* 基因进行双串联过表达,摇瓶发酵结果如图 4(c) 所示。发酵 2 d 后工程菌 G43-*dasR-monRI* 的生长速率明显高于突变菌 G43,第 10 天时生物量和效价分别达 47.5 g/L 和 9.5 kU/mL,两者较突变菌 G43 分别提高了 10.1% 和 15.8%。结果表明,在突变菌 G43 中过表达途径特异性调控基因 *monRI* 是有效的,全局与途径特异性正调控基因可协同促进莫能菌素的生物合成;双串联过表达工程菌 G43-*dasR-monRI* 的莫能菌素发酵性能突出。

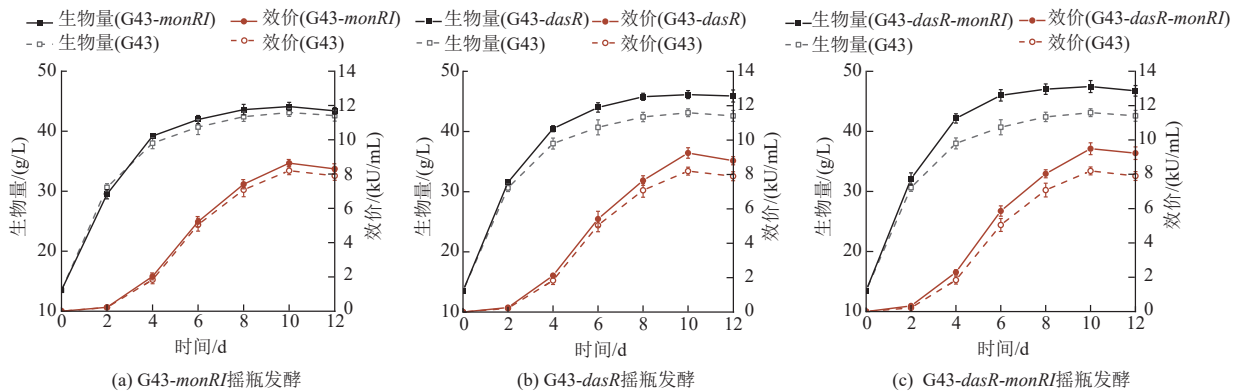


图 4 突变菌与各工程菌的摇瓶发酵情况

Fig. 4 Shake flask fermentation of mutant bacteria and engineering bacteria

### 2.2.3 基因工程菌株罐上发酵性能评估

在 5 L 发酵罐中进一步评估 3 株工程菌 G43-*monRI*、G43-*dasR* 和 G43-*dasR-monRI* 的莫能菌素发酵水平,见图 5。肉桂地链霉菌属于极度好氧菌,导致发酵早期罐体中 DO 大幅度下降,所以整个发酵过程需要通过改变转速和空气流量来控制 DO 在 30% 以上;其 pH 整体走势也较为一致,均呈现先轻微上升(发酵前期)再逐步下降(发酵中期)而后明显上升(发酵中后期)的趋势。发酵过程中定期取样检测底物消耗、菌体生长以及产物积累等指标,3 株工程菌在发酵第 3 天基本进入生长稳定期,此时菌株开始快速合成莫能菌素,在第 6 天时效价达最高水平。

在底物消耗与菌体生长方面,与摇瓶中的发酵

情况类似,工程菌 G43-*monRI* 与突变菌 G43 相比无明显差异,但工程菌 G43-*dasR* 的生物量比 G43 提高了 7.3%。双串联过表达工程菌 G43-*dasR-monRI* 与突变菌 G43 和单基因过表达工程菌相比,在发酵 1 d 后糖消耗速率明显加快,对底物消耗能力明显提升,菌体生长速率也明显提高,在第 6 天时生物量达 55.3 g/L,相比突变菌 G43 提高 10.6%。表明途径特异性调控基因 *monRI* 对菌体生长阶段影响较小<sup>[10]</sup>,推测其在次级代谢阶段对莫能菌素合成有促进作用。全局性调控因子 *DasR* 是调控链霉菌气生菌丝生长起始阶段的重要调节因子,因而对初级代谢影响较为明显<sup>[12]</sup>。

发酵第 6 天时,工程菌 G43-*monRI* 与 G43-*dasR* 的效价分别达到 10.4 kU/mL 和 11.0 kU/mL,相比突

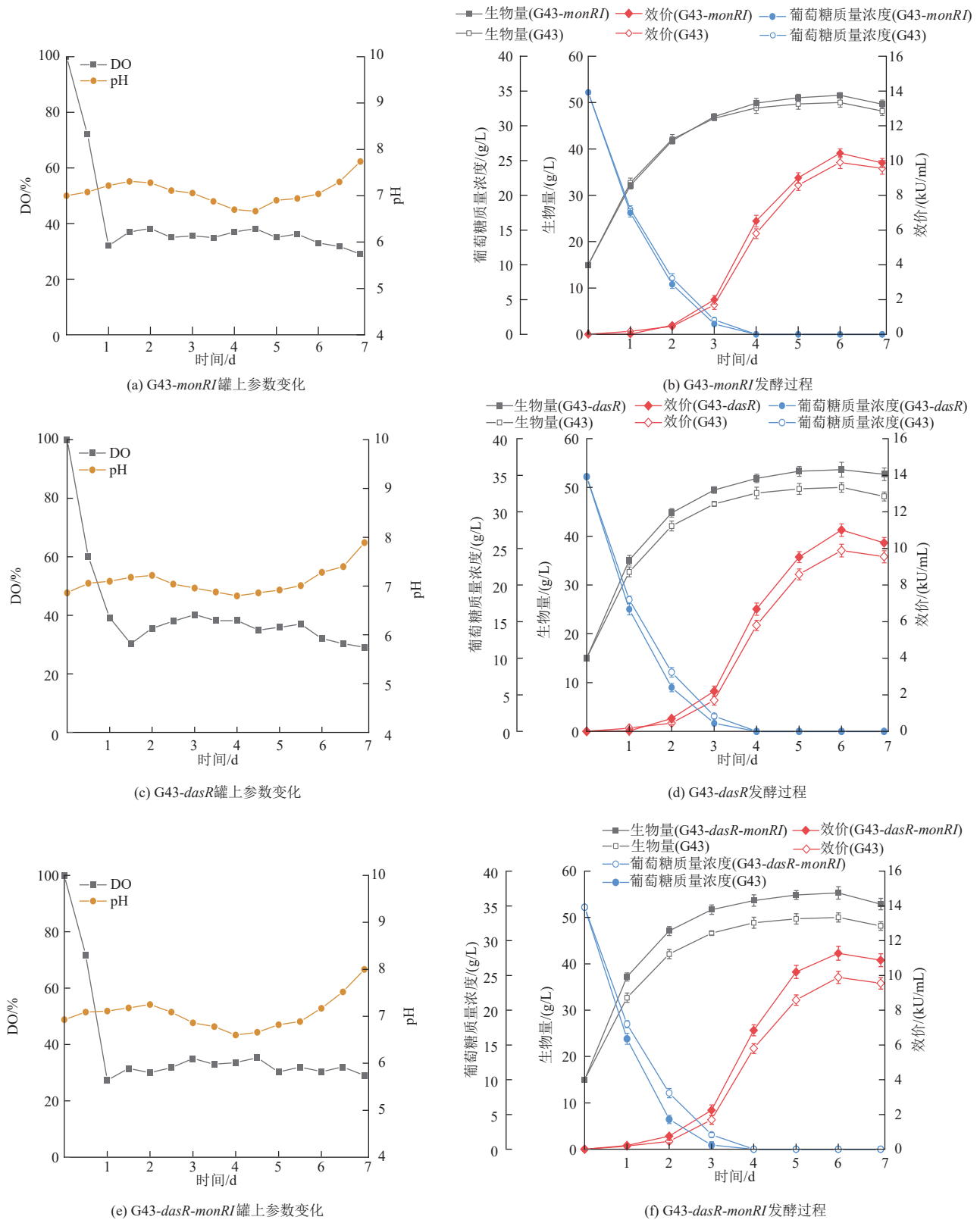


图 5 过表达工程菌的罐上发酵

Fig. 5 Fermentation in fermenters of overexpressed engineered bacteria

变菌 G43 分别提高了 5.4% 和 11.3%，说明全局正调控基因 *dasR* 对于次级代谢产物影响更大，促进

作用更为明显。在此基础上双串联过表达工程菌 G43-*dasR-monRI* 展现出更强的抗生素合成能力，

发酵第6天时效价达到11.3 kU/mL,比突变菌G43提高了14.0%。表明途径特异性调控基因*monRI*在莫能菌素合成阶段发挥了积极作用,但仍然不及全局调控基因*dasR*;双串联过表达增强了菌株的次级代谢能力,使莫能菌素发酵水平显著提升。

### 3 结论

将航天诱变应用于肉桂地链霉菌菌种选育,成功获得一株遗传性能相对稳定的高产突变菌G43,确保了工业化应用的可靠性。在该突变菌的基础上,通过同源重组实现了莫能菌素生物合成相关的途径特异性调控基因*monRI*和全局调控基因*dasR*整合过表达,最终获得发酵性能显著提升的双串联过表达工程菌G43-*dasR-monRI*。该工程菌与原始菌2110相比,显著缩短了底物消耗时间(由5 d缩短至3 d),生长情况更优(生物量提高17.6%)以及次级代谢能力更强(效价提升33.1%)。与目前已报道的莫能菌素生产菌相比,双串联过表达工程菌G43-*dasR-monRI*的菌体生长和莫能菌素产量都处于较高水平,极具工业化应用前景。后续可利用菌株的乙酸钠耐受性质,研究发酵过程中外源添加乙酸钠的影响,从而促进菌体吸收转化,进一步提高莫能菌素产量。

通过航天诱变与基因工程育种相结合,成功实现了莫能菌素高产菌的菌种选育,这对其他聚醚类抗生素生产菌的菌种改造具有一定参考意义。值得注意的是,链霉菌中的生长代谢过程及其调控网络交错复杂,目前尚未完全解析莫能菌素生物合成过程,后续可进一步挖掘莫能菌素生物合成途径的关键基因,并对其参与莫能菌素生物合成的代谢机制进行系统研究,从而更有效地增强莫能菌素生产能力。

### 参考文献

- [1] 周钰. 多醚类抗生素莫能菌素(Monensin)[J]. 抗生素, 1980, 5(5):65-70.  
ZHOU Y. Monensin, a polyether antibiotic [J]. Antibiotics, 1980, 5(5):65-70. (in Chinese)
- [2] 李子勇, 李云飞, 曾晓宁, 等. 莫能菌素高产菌株的选育[J]. 中国动物保健, 2021, 23(5):116-117, 119.  
LI Z Y, LI Y F, ZENG X N, et al. Breeding of monensin-producing strain[J]. China Animal Health, 2021, 23(5):116-117, 119. (in Chinese)
- [3] 任勇, 王义. 一种肉桂地链霉菌发酵生产莫能菌素的新型培养基和培养方法: CN103937848A[P]. 2014-07-23.
- [4] 张映, 扶教龙, 张瀚, 等. 多杀菌素生产菌诱变选育的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(10): 910-916.  
ZHANG Y, FU J L, ZHANG H, et al. Progress in mutation breeding of spinosad producing strains [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(10): 910-916. (in Chinese)
- [5] 荆士华, 安海英, 李春杰, 等. 生黑醋酸杆菌的太空诱变选育[J]. 生物技术, 2011, 21(1): 76-78.  
JING S H, AN H Y, LI C J, et al. Mutation of *Gluconobacter melanogenus* in a two-step fermentation for vitamin C production by space flight[J]. Biotechnology, 2011, 21(1): 76-78. (in Chinese)
- [6] 王清清, 张孟雨, 江雨静, 等. 产 $\gamma$ -氨基丁酸航天育种乳酸菌的筛选与发酵剂的制备[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(16): 93-100.  
WANG Q Q, ZHANG M Y, JIANG Y J, et al. Screening of space-breeding lactic acid bacteria for  $\gamma$ -aminobutyric acid production and the preparation of fermentation starter[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(16): 93-100.
- [7] 郭伟群. 多杀菌素高产菌株的选育及发酵过程多参数、多尺度优化[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [8] 杨素晶, 蹇华丽, 魏锋, 等. 航天诱变菌株JH-R23产虾青素培养条件优化[J]. 食品科技, 2021, 46(11):1-8.  
YANG S J, JIAN H L, WEI F, et al. Optimization of culture conditions for astaxanthin production by space mutation strain JH-R23[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(11):1-8. (in Chinese)
- [9] RISDIAN C, MOZEF T, WINK J. Biosynthesis of polyketides in *Streptomyces*[J]. Microorganisms, 2019, 7(5):124.
- [10] TANG Z K, LI X M, PANG A P, et al. Erratum to: characterization of three pathway-specific regulators for high production of monensin in *Streptomyces cinnamonensis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(18):7085-7089.
- [11] 汤正坤. 莫能菌素生物合成基因的转录分析[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- [12] 张玥. 全局因子DasR和Crp对莫能菌素生物合成的转录调控[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- [13] 郭松松, 孙羽, 杨怡萱, 等. 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 S S, SUN Y, YANG Y X, et al. Research progress



- on biosynthesis and metabolic regulation of salinomycin in *Streptomyces albus*[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(3):732-742. (in Chinese)
- [14] 罗健雅, 黄紫贝, 赵以恒, 等. 抗广谱耐药细菌的放线菌筛选及抗菌活性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(11):1229-1241.
- LUO J Y, HUANG Z B, ZHAO Y H, et al. Screening and antibacterial activity of *Actinomycetes* against broad-spectrum drug-resistant bacteria[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2023, 48(11):1229-1241. (in Chinese)
- [15] 李欣颖, 张善飞, 刘旻炜, 等. 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 X Y, ZHANG S F, LIU M W, et al. Heterologous integrated expression of *Vitreoscilla vgb* in highly monensin producing *Streptomyces cinnamonensis* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(10):1-9. (in Chinese)
- [16] 孔德真, 李浩, 李晓杰, 等. 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 D Z, LI H, LI X J, et al. Engineering the precursor supply pathway in *Streptomyces gilvosporeus* for overproduction of natamycin[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(12):4630-4643. (in Chinese)
- [17] DU L, LIU R H, YING L, et al. An efficient intergeneric conjugation of DNA from *Escherichia coli* to mycelia of the lincomycin-producer *Streptomyces lincolnensis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(4):4797-4806.
- [18] 胡晓龙, 秦海彬, 吴旭萍, 等. 5 L 发酵罐中棘白菌素 B 发酵工艺参数优化[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9):130-135.
- HU X L, QIN H B, WU X P, et al. Optimization of the fermentation parameters for echinocandin B production in 5 L bioreactor[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(9):130-135. (in Chinese)
- [19] 陈芬. 肉桂地链霉菌接合转移体系的构建及 *nsdA* 基因中断对莫能菌素产量的影响[D]. 武汉:华中农业大学, 2007.
- [20] 胡礼芳, 陈婧, 贾瑞敏, 等. 链霉菌 S10 遗传操作系统的优化[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(3):624-635.
- HU L F, CHEN J, JIA R M, et al. Optimization of genetic manipulation system for *Streptomyces pratensis* S10[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(3):624-635. (in Chinese)
- [21] 曾兆国, 刘波, 陈永辉, 等. 分光光度法测定莫能菌素含量[J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41(4):19-21.
- ZENG Z G, LIU B, CHEN Y H, et al. Determination of monensin in zymotic fluid by spectrophotometry [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2007, 41(4):19-21. (in Chinese)
- [22] DAS B, BHADRA R K. (p) ppGpp metabolism and antimicrobial resistance in bacterial pathogens [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:563944.
- [23] 陈伟, 陈芝, 文莹, 等. 链霉菌遗传不稳定性研究进展与展望[J]. *微生物学报*, 2009, 49(10):1271-1276.
- CHEN W, CHEN Z, WEN Y, et al. Overview and prospect on the genetic instability of *Streptomyces*: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(10):1271-1276. (in Chinese)

(责任编辑:史润东东)