

遗传育种与生物合成

文章编号: 1001-8689(2021)09-0854-05

子囊霉素工程菌的构建及初步发酵工艺优化

王志娟^{1,2} 黄鹤^{1,2} 田勋^{1,2} 马宁^{1,2} 胡海峰^{1,2,*}

(1 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 上海 200040; 2 国药集团健康产业研究院有限公司, 上海 200437)

摘要: 基于子囊霉素的生物合成途径和机制, 根据生物合成基因簇序列设计引物, 应用PCR扩增游动放线菌(*Antinoplanes* sp.)N902-109赖氨酸合成途径关键基因——天冬氨酸激酶/天冬氨酸半醛脱氢酶/磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*lysC/asd/ppc*)基因, 整合至子囊霉素产生菌株吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)中, 成功构建了过表达*lysC/asd/ppc*基因的重组工程菌, 命名为AS-07。将AS-07工程菌进行摇瓶发酵研究, 结果表明, 与野生菌相比, 子囊霉素的产量提高了25%。通过初步优化摇瓶发酵工艺, AS-07工程菌与野生菌相比, 子囊霉素的产量提高了85%。

关键词: 子囊霉素; 天冬氨酸激酶/天冬氨酸半醛脱氢酶/磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*lys/asd/ppc*)基因; 基因工程菌; 发酵工艺优化
中图分类号: R978.1⁺5, TQ465 **文献标志码:** A

Construction of engineering strain of ascomycin and optimization of fermentation process

Wang Zhi-juan^{1,2}, Huang He^{1,2}, Tian Xun^{1,2}, Ma Ning^{1,2}, and Hu Hai-feng^{1,2}

(1 Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040;

2 Sinopharm Health Industry Institute Co., Ltd., Shanghai 200437)

Abstract Based on the biosynthetic pathway and mechanism of ascomycin, primers were designed according to the sequence of the biosynthetic gene cluster, using PCR amplification of *Antinoplanes* (*Antinoplanes* sp.) N902-109 keygenes of lysine synthesis pathway-aspartate kinase/aspartate semialdehyde dehydrogenase/phosphoenolpyruvate carboxylase (*lysC/asd/ppc*) genes, integration into the ascomycin producing strain *Streptomyces hygroscopicus*, a recombinant engineered strain overexpressing the *lysC/asd/ppc* genes were successfully constructed and named AS-07. The AS-07 engineered bacteria was subjected to shake flask fermentation research, and the results showed that compared with wild bacteria, the production of ascomycin was increased by 25%. Through preliminary optimization of the shake flask fermentation process, the production of ascomycin in AS-07 engineering bacteria was increased by 85% compared with wild bacteria.

Key Words Ascomycin; *LysC/asd/ppc*; Genetically engineered bacteria; Optimization of fermentation process

子囊霉素(FK520)是一种从吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)中分离得到的具有免疫抑制活性的大环内酯类抗生素。FK520除了具有免疫抑制特性外, 还具有抗疟疾、抗痉挛、神经保护再生等活性^[1]。FK520一般通过吸水链霉菌生产^[2], 并

通过发酵工艺优化^[3-4]和传统菌种诱变^[5]提高FK520产量, 但生产费用高, 发酵水平低。

FK520是具有23元大环的大环内酯类抗生素, Wu等^[6]首次克隆并分析了*Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*(ATCC 14891)的FK520生物合成基

收稿日期: 2020-11-24

作者简介: 王志娟, 女, 生于1994年, 在读硕士研究生, 研究方向为微生物药物, E-mail: wzjshwg@163.com

*通讯作者, E-mail: haifenghu88@163.com.

因簇，FK520生物合成过程被基本阐明。

FK520的合成是一个典型的PKS系统，首先由PKS/NRPS杂合单元中的聚酮合酶催化形成大环内酯前体，经过一系列的酮基还原、酰基转移、脱氢、脱水等反应，延伸10个单位。经过β-酮反应后，每一个延伸单位可以与丙二酰-CoA结合，再依次连接下一个延伸单位，以上反应由*fkbA*、*fkbB*、*fkbC*这3个典型的PKS所编码^[7]。*fkbP*基因编码的蛋白*fkbP*能够与聚酮合酶-合成链复合物相结合，催化合成中间体与来自L-哌啶酸的N原子相缩合^[8-9]，在FK520大环结构中引入特征性的N原子。再经过一系列的反应实现C链的进一步延伸，形成子囊霉素的合成前体；随后经过羟基化修饰、氧化、羟基的甲基化反应，再经过成环过程，最终合成子囊霉素的完整结构。在上述反应中L-哌啶酸由L-赖氨酸直接转变而来^[8-9]。西罗莫司与子囊霉素的分子结构和生物合成机制相似。来源于西罗莫司合成菌游动放线菌N902-109的*lysC/asd/ppc*基因——天冬氨酸激酶/天冬氨酸半醛脱氢酶/磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*lysC/asd/ppc*)基因，其中*lysC/asd*基因为赖氨酸合成途径关键基因，*ppc*基因则增强了TCA(三羧酸循环)循环的碳代谢流，有助于天冬氨酸的积累，3个基因共同作用提高了赖氨酸的合成效率，进而促进FK520的合成。因此，本研究拟构建表达*lysC/asd/ppc*基因的工程菌，并对其发酵工艺进行初步优化，从而提高生产效率，降低生产成本。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

MiniAmp PCR仪(赛默飞世尔科技)；515型高效液相色谱仪(美国Waters公司)；EPS300型电泳仪(上海天能科技有限公司)。

质粒及质粒来源见表1；氨苄西林(Amp)、安普霉素(Apr)、卡那霉素(Kan)和氯霉素(Cm)(上海源聚生物科技有限公司)；DNA聚合酶、DNA连接酶、限制性内切酶(美国Thermo Scientific公司)；FK520标准品(美国Sigma公司)；其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株、质粒以及引物

本试验所涉及到的菌株见表2，质粒见表1，引物见表3。

1.3 培养基

MS培养基/(g/L)：黄豆饼粉20，甘露醇20，琼脂粉20。

表1 本研究所使用的质粒

质粒	特征	来源
pIJermE	<i>aac</i> (3)IV, ΦC31 _{int} , <i>oriT</i> _{RK2} , <i>erm</i> [*] <i>Ep</i>	本实验室
pSET-152	<i>aac</i> (3)IV, ΦC31 _{int} , <i>oriT</i> _{RK2}	本实验室
pSETL2	<i>aac</i> (3)IV, ΦC31 _{int} , <i>oriT</i> _{RK2} , <i>erm</i> [*] <i>Ep-lysC/asd/ppc</i>	本实验室

ΦC31_{int}：噬菌体ΦC31位点整合酶；*aac*(3)IV：氨基糖苷-3-N-乙酰转移酶(aminoglycoside 3-N-acetyltransferase)安普霉素抗性基因；*oriT*_{RK2}：接合转移的顺式作用元件；*erm*^{*}*E*：突变型红霉素启动子

表2 本研究所使用的菌株

菌株	相关描述	来源
<i>E. coli</i> DH5α	用于质粒构建和克隆	康为世纪公司
<i>E. coli</i> ET12567	用于接合转移，用于穿梭质粒	TaKaRa公司
N902-109	模板菌株	本试验室保藏
AS-00	本试验室诱变得到的高产菌	本试验室保藏
AS-07	整合有 <i>lysC/asd/ppc</i> 的工程菌	本研究
AS-11	整合有pSET-152质粒的菌株	本研究

表3 本研究所用引物序列

引物	序列(5'→3')
AclysCf	ACATATGGCCCTGGTGGTGCAGA
Acasdr	AGAATTCGAGTCACCTTGCTGAG
AcppCf	AGAATTCGATACGATCGCGAGGT
AcppCr	ATCTAGAATCGCTGCGCGGGCA

平板1培养基(g/L)：可溶性淀粉10，酵母提取物4，MgSO₄·7H₂O 0.5，K₂HPO₄·3H₂O 0.5，琼脂20，pH 7.0。

LB培养基(g/L)：胰蛋白胨10，酵母提取物5，氯化钠10。

种子2培养基(g/L)：干酵母5，玉米浆干粉5，甘油5，可溶性淀粉15，葡萄糖10，花生粕5，碳酸钾2，pH 7.0。

初始发酵培养基(g/L)：酵母提取物10，糊精50，玉米浆干粉5，大豆蛋白胨10，豆油10，磷酸镁10，MgSO₄·7H₂O 0.2，K₂HPO₄·3H₂O 0.8，消泡剂5，CaCO₃ 5，pH 7.0。

2×预孢子萌发培养基/(g/L)：酵母提取物10，酪蛋白10，无水CaCl₂ 1.1，pH 7.0。

2 方法与结果

2.1 培养方法

菌株在MS培养基上28℃培养7d后，刮取1.5cm×1.5cm大小的斜面，将其接种到装有30mL种子1培养基的250mL摇瓶中，28℃、250r/min摇床培养3d。吸取3mL种子液接种到装有30mL发酵培养基的250mL

摇瓶中，28℃、250r/min摇床培养9d。

2.2 含量测定方法

取整瓶发酵液，加入等体积的95%乙醇，浸泡1h，取1.5mL，12000r/min离心10min，取上清液用0.22mm有机膜过滤后采用HPLC法测定。

色谱柱C₁₈柱(4.6mm×150mm，5mm)；流动相甲醇:水(80:20)；流速1mL/min；柱温50℃；检测波长210nm；进样量10mL。

2.3 工程菌的构建

2.3.1 质粒pSETL2的构建

以动游放线菌N902-109基因组为模板，*lysC*基因与*asd*基因为相邻的两个基因，在体外扩增时用AclysCf/Acasdr引物扩增得到一段连续的基因片段——*lysC/asd*片段。用AcppCf/AcppCr，AclysCf/Acasdr分别扩增，得到2.8和2.3kb的片段，将获得的片段分别连接到T载体。用EcoRI/XbaI，NdeI/EcoRI分别酶切相应T克隆质粒，获得*ppc*，*lysC/asd*插入片段(图1)。用NdeI/XbaI酶切pIJermE质粒，获得红霉素启动子。将酶切获得的红霉素启动子片段、*ppc*、*lysC/asd*片段与用XbaI酶切pSET152质粒连接，获得pSETL2质粒(图1)。

2.3.2 AS-07工程菌的构建

参考链霉菌接合转移方法^[10]。取甘油管保藏的FK520产生菌AS-00，涂布MS固体培养基，28℃培养7d。刮取表面菌体到带有玻璃珠的大试管内，加入适量无菌水，在涡旋震荡上打碎菌体，将打碎的菌体用带有棉花的无菌注射器过滤，将所得的滤液经6000r/min离心10min，收集菌体，将得到的菌体加入约0.5mL无菌水重悬，制成孢子悬液。于接合转移开始前用加入0.5~1mL的2X孢子预萌发培养基，28℃摇床培养2h，50℃热击10min，冷却至室温待用。

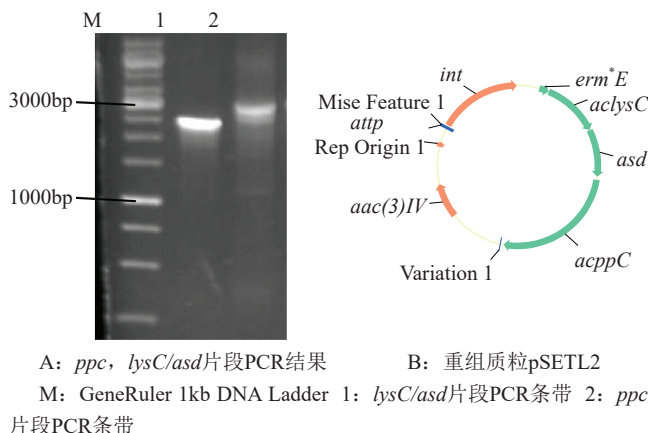


图1 重组质粒pSETL2的构建
Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pSETL2

将重组质粒pSETL2转化至ET12567/pUZ8002感受态细胞，过夜培养后挑取单菌落接种至带有卡那霉素(50mg/mL)、安普霉素(50mg/mL)和氯霉素(25mg/mL)的4mL液体LB培养基中，过夜培养。次日，以1%~2%接种量转接到20mL含有相同浓度的3种抗生素的体LB培养基中，37℃摇床培养，待 $A_{600}=0.4\sim0.6$ 时6000r/min离心5~8min，收集大肠埃希菌ET12567，用新鲜的LB培养基洗涤2~3次，洗去抗生素，重悬于无菌水中，作为大肠埃希菌菌液。

将制备好的孢子悬液与大肠埃希菌菌液各取50~100mL充分混合，涂布2~3块MS平板(含20mmol/L氯化镁)。28℃培养20~22h后，将无菌水0.9mL、安普霉素(50mg/mL)15mL和萘啶酮酸(50mg/mL，溶于0.3mol/L氢氧化钠溶液中)15mL的混合溶液均匀覆盖每块接合转移平板。放置于28℃继续培养4~10d至长出单克隆，即得到AS-07工程菌。

2.3.3 AS-11工程菌的构建

按“2.3.2”项下方法构建整合有pSET152质粒的AS-11工程菌，排除载体对AS-07菌株发酵的影响。

2.3.4 工程菌的验证

将获得的AS-07、AS-11菌株接种至含有50mg/mL安普霉素的平板1固体培养基，28℃培养5~7d，均生长状况良好。将AS-07菌株进行PCR验证(图2)，PCR产物经DNA测序分析，确认为*ppc/lysC/asd*基因。结果表明通过接合转移的方法成功将*ppc/lysC/asd*基因整合至子囊霉素产生菌株吸水链霉菌基因组中。

2.4 菌株发酵

按照“2.1”项下的方法进行发酵试验，使用MS平板培养基、种子1培养基、初始发酵培养基，结果见图3。可见，AS-11菌株的FK520发酵单位与初始菌株AS-00相差无几，AS-07的FK520发酵单位相对

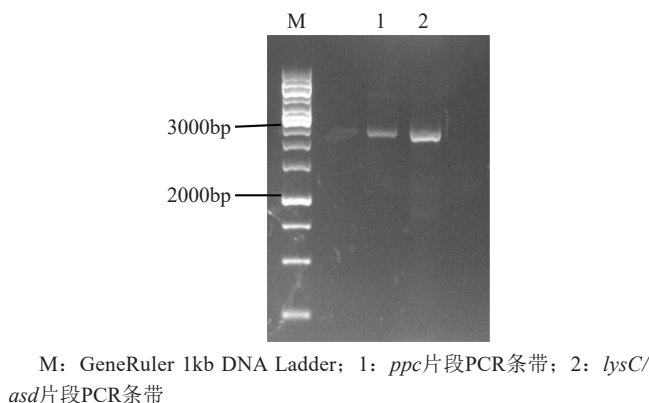


图2 AS-07菌株PCR验证结果
Fig. 2 PCR results of AS-07 strain

初始菌株AS-00提高25%。

2.5 发酵条件初步优化

按照“2.1”项下的方法进行发酵试验，使用MS平板培养基、种子1培养基、初始发酵培养基，优化AS-07菌株发酵条件。

2.5.1 AS-07菌株传代稳定性考察

遗传性状稳定的菌株对发酵生产尤为重要，将AS-07菌株的F1~F5代进行发酵，结果见图4。可见，AS-07菌株具有较好的遗传稳定性。

2.5.2 平板培养基及种子培养基的影响

种子的质量对发酵起着十分关键的作用。影响种子质量的主要因素有菌株在斜面培养基上的生长状况及种子培养基营养成分等。本试验考察不同平板培养基及种子培养基对AS-07产FK520的影响。

(1)平板培养基的影响 分别采用MS、平板1、YS-2、ISP4培养基进行试验，结果见图5。可见当以平板1为平板培养基，相对效价最高，为110%。

(2)种子培养基的影响 分别采用种子1、种子2、种子3培养基，相同的平板培养基进行试验，结果见图6。可见当以种子2为种子培养基，相对效价最高，为115%。

2.5.3 发酵周期的影响

次级代谢产物通常在微生物的生长稳定期产

生，发酵时间过久，会导致有毒代谢产物的积累，抑制菌体生长，使发酵单位下降；发酵时间过短，则导致菌体无法发挥生物合成潜力，产量降低。因此，发酵周期对发酵产量有较大的影响，结果见图7。可见当发酵周期为8d时，相对效价最高。

2.5.4 前体的影响

在发酵培养基中添加一定量的前体物质，可以有利于AS-07菌株合成子囊霉素。FK520与FK506结构相似^[1]，因此向FK520发酵培养基中添加类似的前体物质，提高子囊霉素的产量。本试验考察不同前体物质对AS-07菌株产子囊霉素的影响，前体浓度均为0.15%，结果见图8。

可见，以2-哌啶甲酸为前体时，AS-07菌株的子囊霉素产量最高。

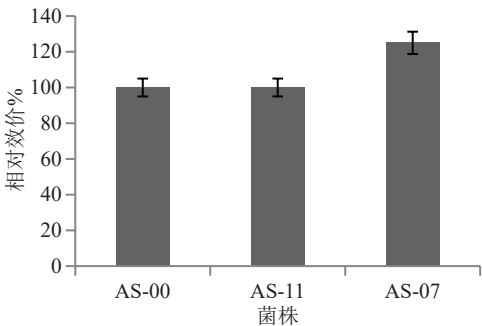


图3 菌株发酵效价
Fig. 3 Fermentation potency of the strain

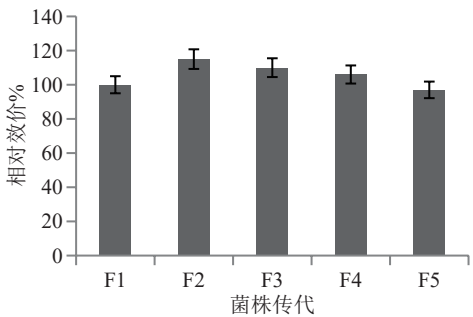


图4 AS-07菌株传代稳定性考察
Fig. 4 Stability of different generation of AS-07

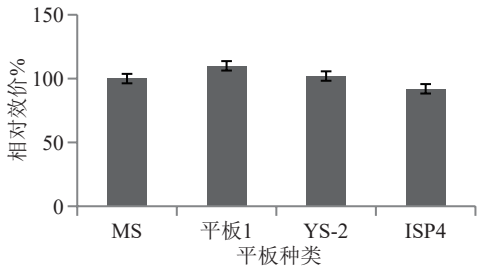


图5 平板种类对AS-07菌株合成FK520的影响
Fig. 5 Effect of plate pypes on the synthesis of FK520 by strain AS-07

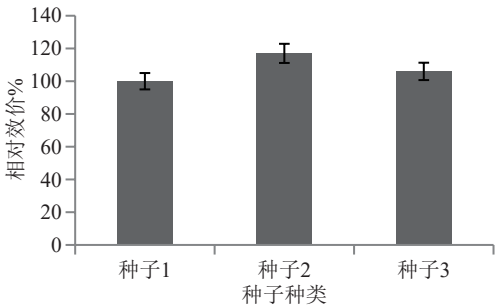


图6 种子种类对AS-07菌株合成FK520的影响
Fig. 6 Effect of seed species on the synthesis of FK520 by strain AS-07

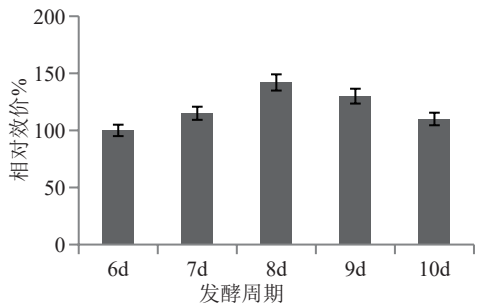


图7 发酵周期对AS-07菌株合成FK520的影响
Fig. 7 Effect of fermentation cycle on the synthesis of FK520 by strain AS-07

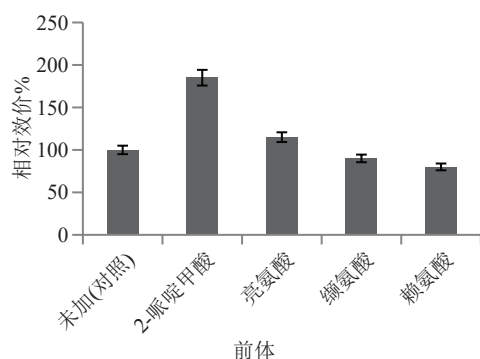


图8 添加前体对AS-07菌株合成FK520的影响
Fig. 8 Effect of precursor addition on synthesis FK520 of AS-07 strain

3 讨论

许多研究主要通过传统的诱变育种来获得FK520高产菌株,但该方法存在正向变异少、诱变方向和性质不能控制、工作量大等缺点。通过基因工程可以定向并且理性的对菌株进行改造。本试验在FK520产生菌内过表达 $lysC/asd/ppc$ 基因,获得工程菌AS-07,其摇瓶产量高于野生型菌株。将AS-07菌株进行初步的发酵工艺优化,将FK520的产量提高了85%。后期一方面继续构建其他具有较高潜力的工程菌,另一方面可以进一步优化发酵工艺,可以尝试在发酵罐中进行发酵研究,强化发酵过程中营养物质、菌量的变化情况、溶氧、pH等参数的检测,以更好的调控和优化发酵过程,FK520的产量有望取得更大的突破。

参考文献

[1] Sierra P G, Sierra M G. Ascomycin and FK506: Pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants[J]. *CNS Neurosci Therap*, 2008, 14: 36-46.

[2] 杨文革, 陈林, 雷子瑜, 等. 发酵法生产子囊霉素的研究进展[J]. *化工进展*, 2010, 29(7): 1309-1313.

[3] 任林英, 张祝兰, 王德森, 等. UV+ARTP复合诱变筛选子囊霉素高产菌株[J]. *中国医药工业杂志*, 2018, 49(2): 181-185.

[4] Xin X, Qi H, Wen J, *et al.* Reduction of foaming and enhancement of ascomycin production in rational *Streptomyces hygroscopicus* fermentation[J]. *Chin J Chem Eng*, 2015, 23(7): 1178-1182.

[5] 王德森, 张祝兰, 任林英, 等. 吸水链霉菌FIM-38-24产子囊霉素的发酵条件优化[J]. *海峡药学*, 2017, 29(9): 25-28.

[6] Wu K, Chung L, Pevill W P, *et al.* The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units[J]. *Gene*, 2000, 251: 81-90.

[7] Sang J M, Young J Y, Yeon H B. Roles of *fkbn* in positive regulation and *tcs7* in negative regulation of FK506 biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain KCTC 11604BP[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78: 2249-2255.

[8] Motamedi H, Cai S J, Shafiee A, *et al.* Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 244(1): 74-80.

[9] Reynolds K A, Wallace K K, Handa S, *et al.* Biosynthesis of the shikimate-derived starter unit of the immunosuppressant ascomycin: stereochemistry of the 1,4-conjugate elimination. [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1997, 50(8): 701-703.

[10] Mazodier P, Petter R, Thompson C. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(6): 3583-3585.

[11] Turło J, Gajzlerska W, Klimaszewska M, *et al.* Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 51(6-7): 388-395.