



研究报告

链霉菌 CB02959 中四霉素及四烯菌素的鉴定及培养基优化

张燕珂¹ 周迎² 薛露³ 段燕文^{1,4,5} 朱湘成^{*1,4} 颜晓晖^{*1,3}

1 中南大学湘雅国际转化医学联合研究院 湖南 长沙 410013

2 天津中医药大学国际教育学院 天津 301617

3 天津中医药大学组分中药国家重点实验室 天津 301617

4 组合生物合成与天然产物药物湖南省工程研究中心 湖南 长沙 410011

5 新药组合生物合成国家地方联合工程研究中心 湖南 长沙 410011

摘要:【背景】四霉素(Tetramycin)和四烯菌素(Tetrin)是具有广谱抗真菌活性的四烯大环内酯类抗生素。链霉菌 CB02959 是一株雷纳霉素(Leinamycin)类化合物的潜在产生菌株,利用 antiSMASH 分析其基因组发现该菌株含有一个纳他霉素(Natamycin)类四烯大环内酯化合物的生物合成基因簇。【目的】对 *Streptomyces* sp. CB02959 中次级代谢产物进行研究,确定其是否可以产生四烯大环内酯化合物,对其发酵产物进行分离和结构鉴定,并进行初步的发酵优化以提高产量。【方法】基于生物信息学预测和高分辨质谱数据,推测 CB02959 中多烯化合物的结构;在不同发酵培养基中培养 CB02959,确定适合大规模发酵的培养基;敲除 *tetrA* 基因以确定目标基因簇和四烯大环内酯化合物产生的相关性;分离和鉴定 CB02959 产生的主要代谢物的结构;通过改变培养基中葡萄糖、麦芽提取物和胰蛋白胨的含量,提高四烯大环内酯化合物的产量。【结果】通过对 CB02959 中纳他霉素类化合物生物合成基因簇的分析及 16S rRNA 基因序列的进化树分析,推测 CB02959 可能是一株新的四霉素和四烯菌素产生菌;在 YEME 发酵培养基中对 CB02959 进行大规模发酵,分离得到 4 个化合物,鉴定为四霉素 A (1)、四霉素 B (2)、四烯菌素 A (3)、四烯菌素 B (4);最后通过培养基的初步优化,将化合物 1–4 的产量分别提高至 208.1、100.0、1 315.6、109.9 mg/L。【结论】通过基因组挖掘策略发现了一株新的四霉素和四烯菌素产生菌链霉菌 CB02959,并通过培养基优化提升了其四烯大环内酯化合物的产量,此发现为这类抗真菌天然产物的后续开发奠定了基础。

关键词: 链霉菌 CB02959, 基因组挖掘, 四霉素, 四烯菌素, 培养基优化

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81872779); Graduate Research Innovation Project of Central South University (2020zztS838)

***Corresponding authors:** E-mail: ZHU Xiangcheng: seanzhu@csu.edu.cn; YAN Xiaohui: yanxh@tjutcm.edu.cn

Received: 30-01-2021; **Accepted:** 25-03-2021; **Published online:** 30-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81872779); 中南大学研究生科研创新项目(2020zztS838)

***通信作者:** E-mail: 朱湘成: seanzhu@csu.edu.cn; 颜晓晖: yanxh@tjutcm.edu.cn

收稿日期: 2021-01-30; **接受日期:** 2021-03-25; **网络首发日期:** 2021-03-30

Identification and medium optimization of tetramycins and tetrins from *Streptomyces* sp. CB02959

ZHANG Yanke¹ ZHOU Ying² XUE Lu³ DUAN Yanwen^{1,4,5} ZHU Xiangcheng^{*1,4}
YAN Xiaohui^{*1,3}

1 Xiangya International Academy of Translational Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

2 International Education College, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3 State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4 Hunan Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis and Natural Product Drug Discover, Changsha, Hunan 410011, China

5 National Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis for Drug Discovery, Changsha, Hunan 410011, China

Abstract: [Background] Tetramycin and tetrin are tetraene macrolides with broad-spectrum antifungal activity. *Streptomyces* sp. CB02959 was initially screened as a potential producer of leinamycin-like compounds. We noticed the existence of a putative natamycin biosynthetic gene cluster in CB02959 using antiSMASH analysis. [Objective] In this study, we aim to characterize the secondary metabolites from *Streptomyces* sp. CB02959, determine whether CB02959 is a tetraene macrolide-producing strain. We also aim to characterize the major products from CB02959 and improve their titers by media optimization. [Methods] Guided by bioinformatic analysis and high-resolution mass spectrum data, we predicted the structures of the compounds to be isolated. *Streptomyces* sp. CB02959 was then cultivated in different media to determine the right medium for large-scale fermentation. The *tetA* gene, which encodes the first polyketide synthase of the polyketide assembly line, was disrupted to correlate the target gene cluster with the production of tetraene macrolides. The structures of major metabolites from CB02959 were elucidated based on extensive spectra analysis. The concentration of glucose, malt extract and tryptone were adjusted to improve the titers of the produced tetraenes. [Results] Based on the analysis of the predicted natamycin biosynthetic gene cluster in CB02959 and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, CB02959 was proposed as a new tetramycin and tetrin-producing strain. After the large-scale fermentation in YEME medium, we isolated four metabolites from CB02959, which were determined as tetramycin A (1), tetramycin B (2), tetrin A (3), and tetrin B (4). We increased the titers of compounds 1–4 to 208.1, 100.0, 1 315.6, 109.9 mg/L via preliminary optimization of the fermentation medium. [Conclusion] In this study, we identified *Streptomyces* sp. CB02959 as a new producer for tetramycins and tetrins using the genome mining strategy, the titers of the produced tetraenes were improved by medium optimization. Our findings lay a foundation for the further development of these potent antifungal agents.

Keywords: *Streptomyces* sp. CB02959, genome mining, tetramycin, tetrin, medium optimization

多烯大环内酯类抗生素是一类高效广谱的抗真菌药物,其主要结构特征是含有一个由 25–37 个碳原子组成的内酯环骨架和环上的 3–7 个共轭双键。通常根据内酯环结构中共轭双键的数目不同将多烯大环内酯化合物分为三、四、五、六、七烯五大类^[1]。两性霉素 B (Amphotericin B)、制霉菌素 A1 (Nystatin A1)、杀念菌素/抗生素 FR-008

(Candididin)、纳他霉素/匹马霉素 (Natamycin/Pimaricin)、四霉素 (Tetramycin)、金褐霉素 (Aureofuscin)是目前研究较多的多烯大环内酯抗生素。它们能够结合真菌细胞膜上的麦角甾醇,形成抗生素甾醇复合物,改变真菌细胞膜的通透性,导致真菌细胞生长受到抑制或细胞死亡^[2]。四烯大环内酯是一类重要的多烯大环内酯,其成员包括制

霉菌素、Rimocidin、Etruscomycin、纳他霉素、四霉素、四烯菌素(Tetrin)、Tetrafungin、YS-822A、CE-108、NPP (Nystatin-Like *Pseudonocardia* Polyene) 等^[3]。由于其良好的抗真菌活性, 四烯大环内酯抗生素在医药、食品和农业领域得到了广泛使用。如纳他霉素常用于治疗各种真菌感染, 包括口腔、肠道、外阴阴道念珠菌病, 以及真菌性睑球炎、结膜炎、巩膜炎和眼内炎等^[4-5]; 在食品行业, 纳他霉素作为食品、饮料的防腐剂和抗菌添加剂在 30 多个国家被广泛使用^[6]。四霉素对包括灰霉病菌和稻瘟病菌在内的许多植物病原体表现出优异的抑制活性^[7-8], 而且具有对人畜安全、环境影响较小等优点, 在我国被用于治疗水稻和水果等农作物病害^[9]。此外, 四霉素对多种导致食物变质的真菌具有与纳他霉素相当的抑制活性^[10], 有望开发成新的食品防腐剂。

四霉素和四烯菌素在结构上高度相似, 具有四烯大环内酯特征性的 4 个共轭双键、环外羧基和海藻糖胺结构, 区别在于四霉素中 C-24 位被乙基取代, 而在四烯菌素中则是甲基(图 1)。四霉素主要由四霉素 A (1) 和四霉素 B (2) 组成, 最初从

Streptomyces noursei var. *jenensis* JA3789 中分离得到^[11]。四烯菌素 A (3) 于 1960 年首次从 *Streptomyces* sp. No. 155-2 中分离, 其结构于 1971 年被解析^[12], 随后又在其他链霉菌中发现了四烯菌素 B (4) 和 C。目前发现的可以产四霉素和四烯菌素类化合物的菌株都属于链霉菌, 其中 *Streptomyces* sp. GK9244^[13]、*Streptomyces albulus* NBRC14147^[14]、*Streptomyces diastatochromogenes* 1628^[15]、*Streptomyces hygroscopicus* BS-112^[16] 可以同时产生四霉素和四烯菌素, 而 *Streptomyces albulus* ZC-G-5^[10]、*Streptomyces ahygroscopicus* subsp. *wuzhouensis*^[9]、*Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis* CGMCC 4.1123^[17]、*Streptomyces ahygroscopicus* H42^[18] 只产生四霉素。

Streptomyces sp. CB02959 为本研究院自有的放线菌, 在通过基因组挖掘筛选潜在 Leinamycin 生产菌株时被发现, 并进行了全基因组测序^[19]。利用 antiSMASH 分析 CB02959 基因组发现其含有一个 Leinamycin 类化合物的生物合成基因簇, 以及一个纳他霉素、四霉素类化合物的生物合成基因簇。随后采用不同培养基对 CB02959 菌株进行发

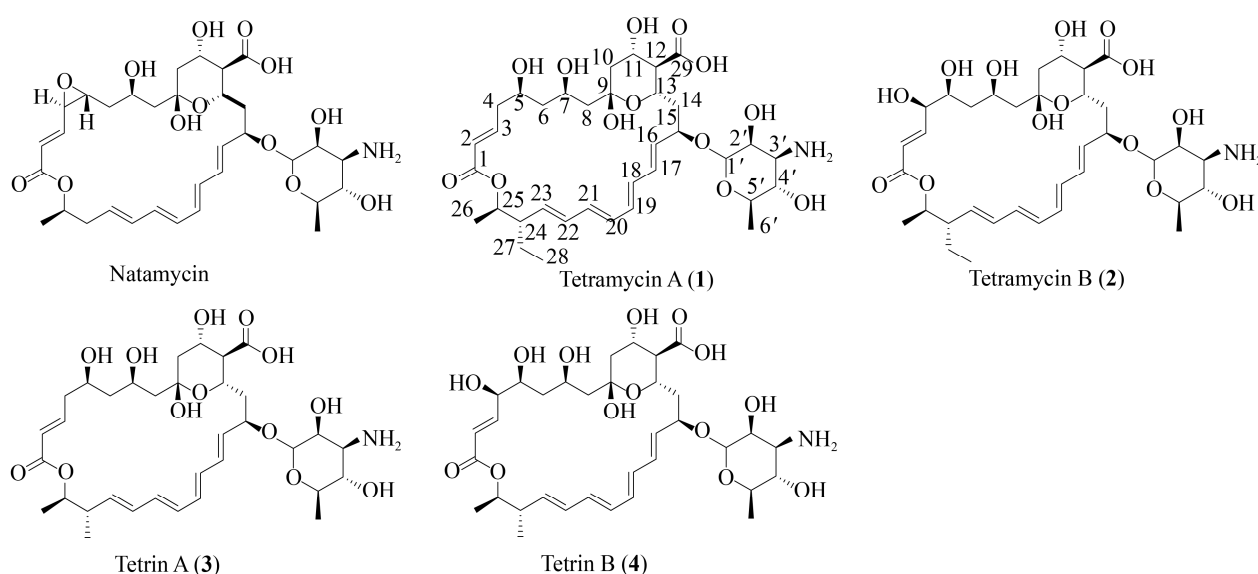


图 1 纳他霉素、四霉素和四烯菌素的结构

Figure 1 Chemical structures of Natamycin, Tetramycins and Tetrins

醇,在发酵液中未检测到 Leinamycin 类化合物,但发现了具有四烯大环内酯类化合物的特征吸收峰(291 ± 2 、 302 ± 2 、 320 ± 2 nm),提示其可能产生四烯大环内酯类化合物。在本研究中,我们通过生物信息学分析、大规模发酵、化合物提取分离、结构鉴定等工作,确认了链霉菌 CB02959 为一株新的四霉素和四烯菌素产生菌,并初步进行了其发酵优化和产量提升。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

CB02959 菌株分离自浙江省舟山市普陀山土壤,存放于本实验室 -80°C 冰箱。其 16S rRNA 基因序列被测序并保存在 NCBI 数据库中(GenBank 登录号为 MF455322.1),根据 16S rRNA 基因序列比对和菌株形态观察确定 CB02959 为链霉菌(*Streptomyces* sp. CB02959),基因组数据保存在 NCBI 基因组数据库中(NZ_NNBP000000000.1)。质粒 pET-28a 和 pOJ260 均为本实验室保存。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

MS 培养基(g/L):大豆粉 20.0,甘露醇 20.0, MgCl_2 4.0,琼脂粉 20.0。SteadyPure 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,湖南艾科瑞生物工程有限公司;高纯度质粒 DNA 小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、DL2000 DNA Marker、250 bp DNA Ladder、金牌 Mix (green)、Trelief™ 5 α Chemically Competent Cell、Trelief™ SoSoo Cloning Kit Ver.2,北京擎科生物技术有限公司。恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;高效液相色谱、中压制备色谱、半制备高效液相色谱,沃特世科技(上海)有限公司;核磁共振波谱仪,布鲁克拜厄斯宾有限公司;PCR 扩增仪,耶拿分析仪器股份公司;凝胶成像仪,Bio-Rad 公司。

1.3 16S rRNA 基因序列比对

链霉菌 CB02959 菌株的部分 16S rRNA 基因序列长 1 397 bp,登录在 NCBI 网站的 GenBank 核苷酸数据库中。使用 NCBI 的 BLAST 搜索程序,

将该序列与已报道的纳他霉素和四霉素生产菌株的 16S rRNA 基因序列进行了比较。基于 16S rRNA 基因序列,使用 MEGA-X 程序构建系统发育树。

1.4 发酵条件

1.4.1 发酵培养基

G1 培养基和 ISP4 培养基的配制见参考文献[20],ISP2 培养基的配制见参考文献[21],R2A 培养基的配制见参考文献[22]。YEME 培养基(g/L):酵母提取物 3.0,麦芽提取物 3.0,胰蛋白胨 5.0,葡萄糖 10.0, pH 7.2。

1.4.2 菌株发酵

从 -80°C 取出保存的菌株甘油管,放置至室温,将含有菌丝的 20%甘油(体积分数)用接种环均匀涂布在 G1、R2A、ISP2、ISP4 固体培养基上,于 30°C 培养箱培养 7 d 获得纯菌落。250 mL 锥形瓶中装入 50 mL 的 TSB 液体培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 25 min,接种适量复苏好的菌落, 30°C 、220 r/min 振荡培养 2 d 获得种子液。250 mL 锥形瓶中装入 50 mL 的 G1、R2A、ISP2、ISP4、YEME 液体培养基, 0.68×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 25 min 后,每瓶接 5 mL 种子液, 30°C 、220 r/min 振荡培养 7 d,根据代谢谱图丰富度和产量高低选择合适的培养基进行规模化发酵。规模化发酵使用 2 000 mL 锥形瓶中装入 500 mL 液体培养基, 0.68×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 25 min 后,每瓶接 50 mL 种子液,发酵 27 L,220 r/min 振荡培养 7 d。

1.5 CB02959 中 *tetrA* 基因敲除

1.5.1 CB02959 基因组 DNA 的提取

将链霉菌 CB02959 孢子接种于液体 TSB 培养基中,在 30°C 、220 r/min 振荡培养 24 h,待液体培养基长出菌丝后, 4°C 、4 000 r/min 离心 15 min 后去上清收集菌丝体,按照试剂盒提取方法提取基因组 DNA。

1.5.2 敲除 *tetrA* 基因的质粒构建

根据 CB02959 的基因组序列,设计敲除基因 *tetrA* 上、下游引物,引物序列见表 1。以 CB02959 菌株的基因组 DNA 为模板来扩增位于 *tetrA* 上游

表 1 敲除 *tetrA* 基因所使用的引物序列

Table 1 Primer sequences for inactivation and verification of *tetrA* gene replacement

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	功能 Function	产物长度 Length (bp)
<i>tetrA</i> -CKF	GGGCTTCTTCGGTCTGTCCG	Verification of <i>tetrA</i> replacement	1 550
<i>tetrA</i> -CKR	AGGGCACGTCCACGTGC		
<i>tetrA</i> -upF	CATTCCACAGCGGACAGACCGAAGAAGCCC	Amplification of <i>tetrA</i> upstream	1 930
<i>tetrA</i> -upR	GCGGCCGCGGATCCTCTAGAAACAGCTGGGAGTTGCAGACC	homologous arm	
<i>tetrA</i> -dnF	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTCGCCCCAACTCCTTGAACGTG	Amplification of <i>tetrA</i>	1 822
<i>tetrA</i> -dnR	GTTCCTTCTGACACGGCGTGCTGCCCAG	downstream homologous arm	
<i>tetrA</i> -KN-F	GCACGCCGTGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCCGA	<i>tetrA</i> -KN	1 510
<i>tetrA</i> -KN-R	GGTCTGTCCGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGT		

和下游的同源左臂和右臂;以含有卡那霉素抗性基因的 pET-28a 为模板来扩增卡那霉素抗性基因。PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 1 μ L, 金牌 Mix (green) 45 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 扩增的目的片段连接到 pOJ260 线性质粒上, 得到重组质粒 pOJ260-*AtetrA*。

1.5.3 质粒转化及其验证

将带有目的片段的质粒转化至大肠杆菌 DH5 α , 具体方法参考《现代分子生物学实验技术》^[23]。将混合液体涂布到含 50 μ g/mL 阿普拉霉素的 LB 平板用于筛选转化子, 37 $^{\circ}$ C 培养 12–16 h, 用牙签挑取转化子接种到含有阿普拉霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12–16 h, 然后进行菌液 PCR 验证。PCR 反应体系(25 μ L): *tetrA* 上游同源臂的上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 菌液 1 μ L, 金牌 Mix (green) 22 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 2 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。验证目的片段插入之后, 质粒进行测序。

1.5.4 结合转移

将重组质粒 pOJ260-*AtetrA* 利用结合转移方法导入 *Streptomyces* sp. CB02959, 涂布至 MS 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 14–20 h, 用适量的无菌水清洗平板 2–3 次, 然后分别取 20 μ L 卡那霉素(30 mg/mL)、15 μ L 萘啶酮酸(40 mg/mL)和 1 mL 无菌水于 2 mL

EP 管中, 混合均匀后对 MS 平板进行覆盖, 28 $^{\circ}$ C 培养 4–5 d。筛选出的接合子扩种培养。得到突变株后提取基因组 DNA, 通过 PCR 验证突变株中 *tetrA* 是否成功被替换。

1.6 化合物纯化

链霉菌 CB02959 发酵 7 d 之后加 1%的大孔吸附树脂 XAD-16 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 12 h, 过滤收集树脂, 用甲醇浸泡超声提取, 减压浓缩得粗提物 38 g。对浸膏进行硅胶柱层析, 采用石油醚/乙酸乙酯、乙酸乙酯/甲醇梯度洗脱, 共得到 8 个组分(Fr.A–H), 其中乙酸乙酯/甲醇为 7:3、5:5 (体积比)洗脱下的 Fr.F、G 含有目标化合物, 取部分 Fr.G 经中压制备液相色谱(流速为 15.0 mL/min, 波长 254、305 nm), 甲醇/水系统梯度洗脱, 洗脱体系: 0–30 min 10%–50%甲醇, 30–60 min 50%甲醇, 60–90 min 50%–70%甲醇, 90–110 min 70%甲醇, 110–130 min 70%–90%甲醇, 130–140 min 90%甲醇, 140–150 min 90%–10%甲醇, 150–160 min 10%甲醇; 分离得到 4 个组分(Fr.G1–4), 在甲醇/水为 5:5–7:3 (体积比)变化过程洗脱下来的 3 个组分含有目标化合物: 其中 Fr.G2 含有化合物 4, Fr.G3 含有化合物 2 和 3, Fr.G4 含有化合物 1, 将 3 个组分用相同的制备方法分别经半制备液相色谱仪纯化(流速为 3.0 mL/min, 波长 254、305 nm), 流动相用乙腈/水洗脱, 制备过程流动相变化: 0–15 min 30%–40%乙腈, 15–20 min 40%乙腈, 20–22 min 40%–30%乙腈, 22–25 min 30%乙腈; 分别在

第 19.7、12.5、14.8、10.2 min 得到化合物 1-4。

1.7 化合物 1-4 的浓度测定标准曲线绘制

在 YEME 基础培养基中, 添加不同含量的葡萄糖、麦芽提取物和胰蛋白胨, 研究其含量对化合物 1-4 产量的影响; 将分离纯化好的化合物配制为 1 mg/mL 母液, 采用等量稀释法配制不同浓度梯度, 得到化合物的浓度(x , mg/L)与峰面积(y)的标准曲线: 四霉素 A (1): $y=1\ 902\ 600x+10\ 248$; 四霉素 B (2): $y=3\ 632\ 400x+59\ 456$; 四烯菌素 A (3): $y=1\ 352\ 300x+36\ 340$; 四烯菌素 B (4): $y=6\ 359\ 300x-46\ 210$ 。

2 结果与分析

2.1 CB02959 中四霉素基因簇分析

利用 antiSMASH 对 CB02959 基因组进行分析, 表明其含有 42 个次生代谢产物的生物合成基因簇; 除了位于 Scaffold 8 上已报道的 Leinamycin 类化合物的生物合成基因簇外^[19], 在 Scaffold 2 和 Scaffold 9 上还分别存在一个与 Oxazolomycin B^[24] 和 Natamycin 生物合成基因簇高度相似的基因簇, 表明 *Streptomyces* sp. CB02959 是这 2 类化合物的潜在生产菌株。随后对 Scaffold 9 上预测为纳他霉素基因簇的 DNA 序列进行了 ORF 预测和 BLASTp 分析, 发现这个基因簇中编码的蛋白序列与 *Streptomyces ahysgroscopus* subsp. *wuzhouensis* 及 *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis* 中四霉素生物合成基因簇的蛋白具有高度的相似性 (相似度>70%), 与 *Streptomyces gilvosporeus* 及 *Streptomyces natalensis* 中的纳他霉素生物合成基因簇也具有较高的相似性, 但明显低于与四霉素生物合成基因簇的相似度 (图 2, 表 2), 因此可以推断 CB02959 中 Scaffold 9 上基因簇合成的多烯化合物为四霉素类大环内酯。

基于 16S rRNA 基因序列, 对 CB02959 和其他已报道、可检索到 16S rRNA 基因序列的四霉素和纳他霉素产生菌进行了进化树分析 (图 3)。通过进化树可以发现, 4 株四霉素产生菌和 4 株纳他霉素产生菌位于不同的分支上, 而 CB02959

与已知的四霉素产生菌如 *Streptomyces* sp. BS-112、*S. albulus* ZC-G-5、*S. albogriseus* 及 *S. ahysgroscopus* subsp. *wuzhouensis* 具有更近的亲缘关系。在这 5 株菌中, *Streptomyces* sp. BS-112 与 *S. albulus* ZC-G-5 位于一个分支, *S. albogriseus* 及 *S. ahysgroscopus* subsp. *wuzhouensis* 位于另外一个分支, 而 CB02959 单独形成一个分支, 表明 *Streptomyces* sp. CB02959 可能是一株新的四霉素类化合物的产生菌。

2.2 CB02959 小规模发酵分析

基于前面的生物信息学预测结果, 选择 5 种不同的培养基 (R2A、高氏一号、ISP4、ISP2 和 YEME) 对 CB02959 进行小摇瓶发酵, 以确定其是否可以生产四霉素。HPLC 结果显示 CB02959 在 5 种培养基中都可以产生一类具有四烯大环内酯化合物特征紫外吸收峰的化合物 (292.5、304.2、319.7 nm), 其中 YEME 中这类化合物的产量显著高于其他 4 种培养基 (图 4)。利用 ESI-HR-MS 对 305 nm 波长下发酵液中 4 个主峰 (按化合物相似度命名为化合物 1-4) 进行分析, 检测出的分子量及推测的分子式分别为: 化合物 1 (696.359 4, $[M+H]^+$) $C_{35}H_{53}NO_{13}$, 化合物 2 (712.355 3, $[M+H]^+$) $C_{35}H_{53}NO_{14}$, 化合物 3 (682.344 4, $[M+H]^+$) $C_{34}H_{51}NO_{13}$, 化合物 4 (697.827 2, $[M+H]^+$) $C_{34}H_{51}NO_{14}$ 。这 4 个化合物的分子式与 *S. hygroscopicus* BS-112^[16] 中报道的四霉素 A、B 及四烯菌素 A、B 完全一致, 提示 CB02959 可能是一株可同时产生四霉素和四烯菌素的新的链霉菌。

2.3 基因敲除

为了验证上述 4 个化合物是否是由推测的四霉素基因簇所合成的, 利用卡那霉素抗性基因替换了 CB02959 中负责聚酮链起始合成的 *tetA* 基因, 获得了突变株 CB02959 $\Delta tetA$ (图 5A)。利用 PCR 对 CB02959 野生型及突变株进行验证, 结果表明突变株中 *tetA* 基因已被成功替换 (图 5B)。随后在 YEME 发酵培养基中对野生型及突变株进行

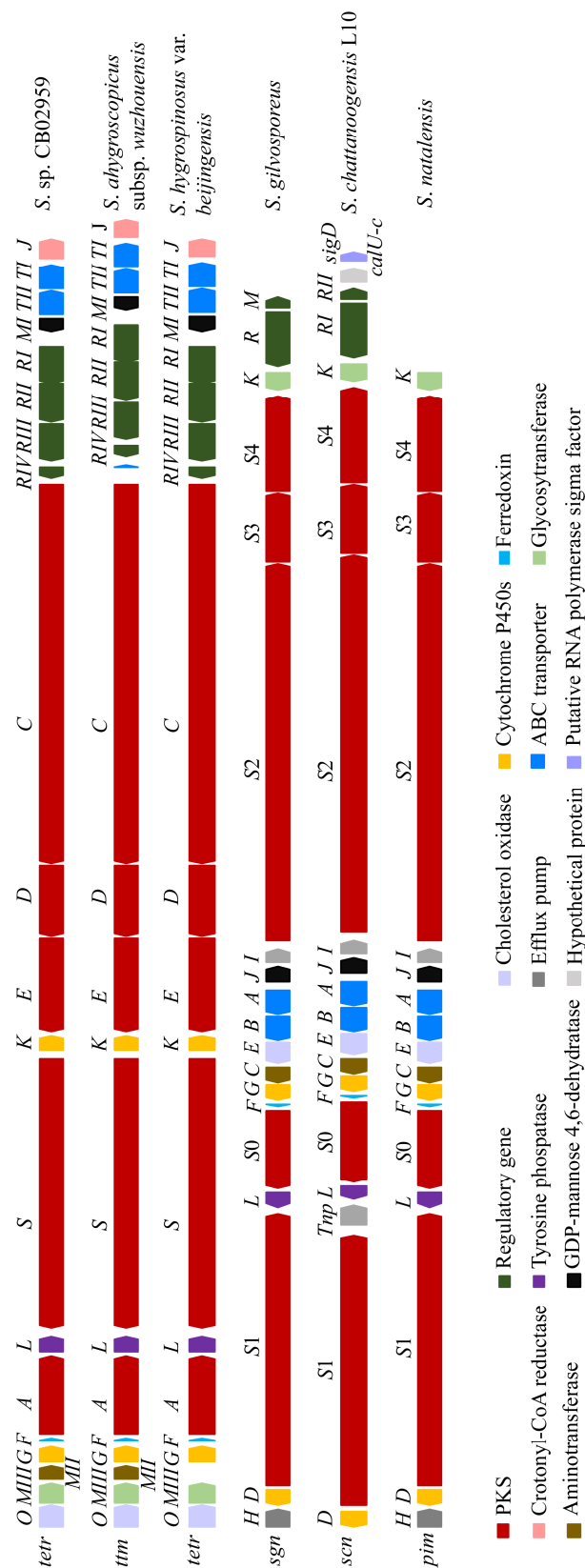


图 2 *Streptomyces* sp. CB02959 中四霉素基因簇与已报道四霉素及纳他霉素基因簇比较
Figure 2 Comparison of the tetramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. CB02959 with gene clusters from selected tetramycin and natamycin producers

表 2 链霉菌 CB02959 中四霉素/四烯菌素生物合成基因簇的标注

Table 2 Annotation of the putative tetramycin and tetrin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. CB02959

Gene	Size (aa)	Putative Function	Natamycin (identity (%)/coverage (%))		Tetramycin (identity (%)/coverage (%))	
			<i>S. gilvosporeus</i>	<i>S. natalensis</i>	<i>S. ahngroscopicus</i> subsp. <i>wuzhouensis</i>	<i>S. hygrospinosus</i> var. <i>beijingensis</i>
<i>tetrO</i>	553	Cholesterol oxidase	SgnE (88/98)	PimE (88/98)	TtmE (90/100)	TetrO (90/100)
<i>tetrMIII</i>	462	Glucosyltransferase	SgnK (77/99)	PimK (77/99)	TtmK (99/100)	TetrMIII (99/100)
<i>tetrMII</i>	352	Aminotransferase	SgnC (85/99)	PimC (85/99)	TtmC (99/100)	—
<i>tetrG</i>	391	Cytochrome P450 monooxygenase	SgnG (81/99)	PimG (81/99)	TtmG (99/100)	TetrG (99/100)
<i>tetrF</i>	63	Ferredoxin	SgnF (70/100)	PimF (70/100)	TtmF (98/100)	TetrF (98/100)
<i>tetrA</i>	1 736	Modular polyketide synthase	SgnS0 (79/99)	PimS0 (78/99)	TtmS0 (98/100)	TetrA (98/99)
<i>tetrL</i>	365	Tyrosine phosphatase	SgnL (62/70)	—	TtmL (97/100)	TetrL (97/100)
<i>tetrB</i>	6 784	Type I polyketide synthase	SgnS1 (78/100)	PimS1 (78/100)	TtmS1 (99/100)	TetrB (99/100)
<i>tetrK</i>	396	Cytochrome P450 monooxygenase	SgnD (68/100)	PimD (68/100)	TtmD (99/100)	TetrK (99/100)
<i>tetrE</i>	2 342	Type I polyketide synthase	SgnS4 (76/86)	PimS4 (76/86)	TtmS4 (99/100)	TetrE (99/100)
<i>tetrD</i>	1 793	Type I polyketide synthase	SgnS3 (70/100)	PimS3 (70/100)	TtmS3 (99/100)	TetrD (99/100)
<i>tetrC</i>	9 504	Type I polyketide synthase	SgnS2 (85/99)	PimS2 (85/99)	TtmS2 (97/100)	TetrC (97/99)
<i>tetrRIV</i>	244	LuxR family transcriptional regulator	SgnM (60/84)	—	TtmRVI (90/84)	TetrRIV (90/84)
<i>tetrRIII</i>	922	LAL transcriptional regulator	—	—	TtmRIII (80/98)	TetrRIII (80/98)
<i>tetrRII</i>	964	LuxR family transcriptional regulator	—	—	TtmRII (71/99)	TetrRII (71/99)
<i>tetrRI</i>	923	LuxR family transcriptional regulator	—	—	TtmRI (81/100)	TetrRI (81/100)
<i>tetrMI</i>	343	GDP-mannose 4,6-dehydratase	SgnJ (96/100)	PimJ (96/100)	TtmJ (94/100)	TetrMI (94/100)
<i>tetrTII</i>	602	ABC transporter ATP-binding protein	SgnA (84/100)	PimA (84/100)	TtmA (85/98)	TetrTII (85/98)
<i>tetrTI</i>	608	ABC transporter ATP-binding protein	SgnB (86/99)	PimB (86/99)	TtmB (89/98)	TetrTI (89/98)
<i>tetrJ</i>	449	Crotonyl-CoA reductase	—	—	TtmP (94/100)	TetrJ (94/100)

注：—：没有对应的蛋白

Note: —: No corresponding protein

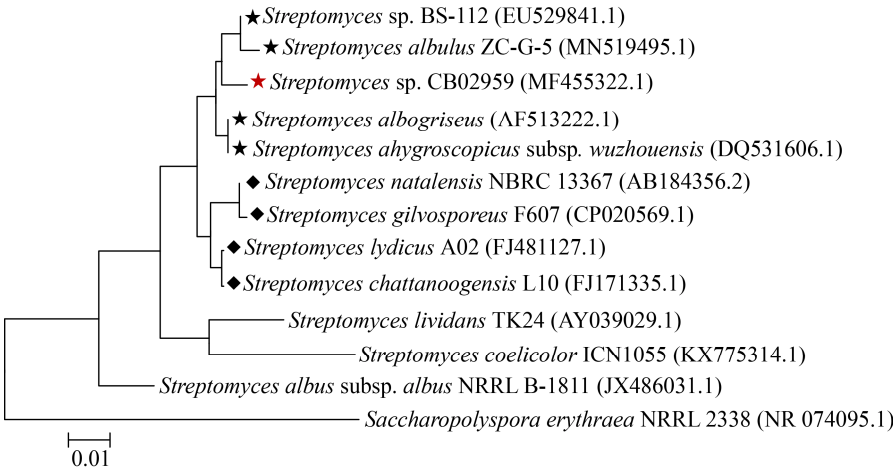


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的纳他霉素和四霉素产生菌株的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic analysis of natamycin and tetramycin-producing strains based on 16S rRNA gene sequence

注：进化树括号中的序号代表相应菌株在 NCBI 上的核酸序列登录号；标尺代表进化距离；五角星为四霉素产生菌，菱形为纳他霉素产生菌

Note: The numbers in the bracket denote the GenBank accession number. The scale denotes evolutionary distance. Stars denote tetramycin producers, diamond denotes natamycin producers

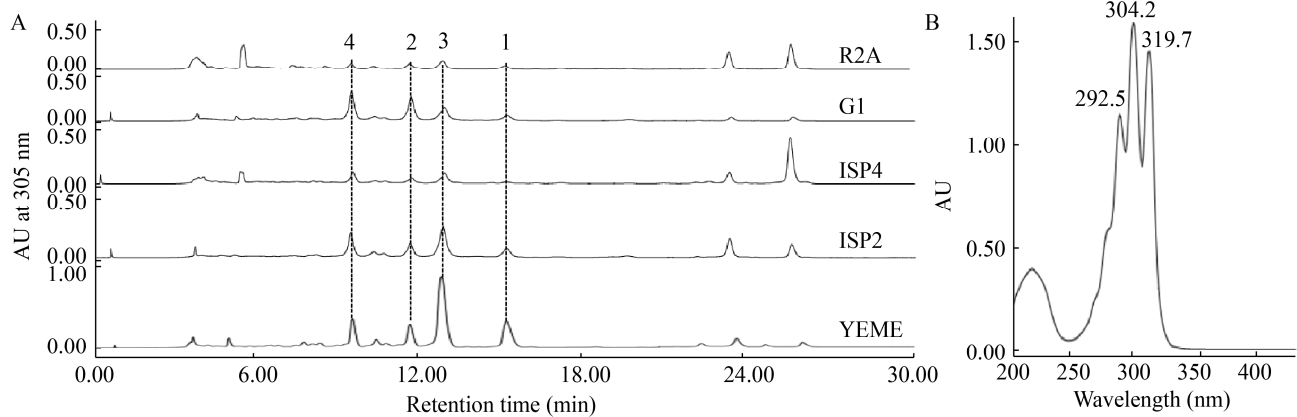


图 4 CB02959 在不同发酵培养基中的 HPLC 图谱(A)以及化合物 1-4 的紫外吸收谱图(B)

Figure 4 HPLC profiles of CB02959 in different fermentation media (A) and the UV-vis spectrum (B) for compound 1-4

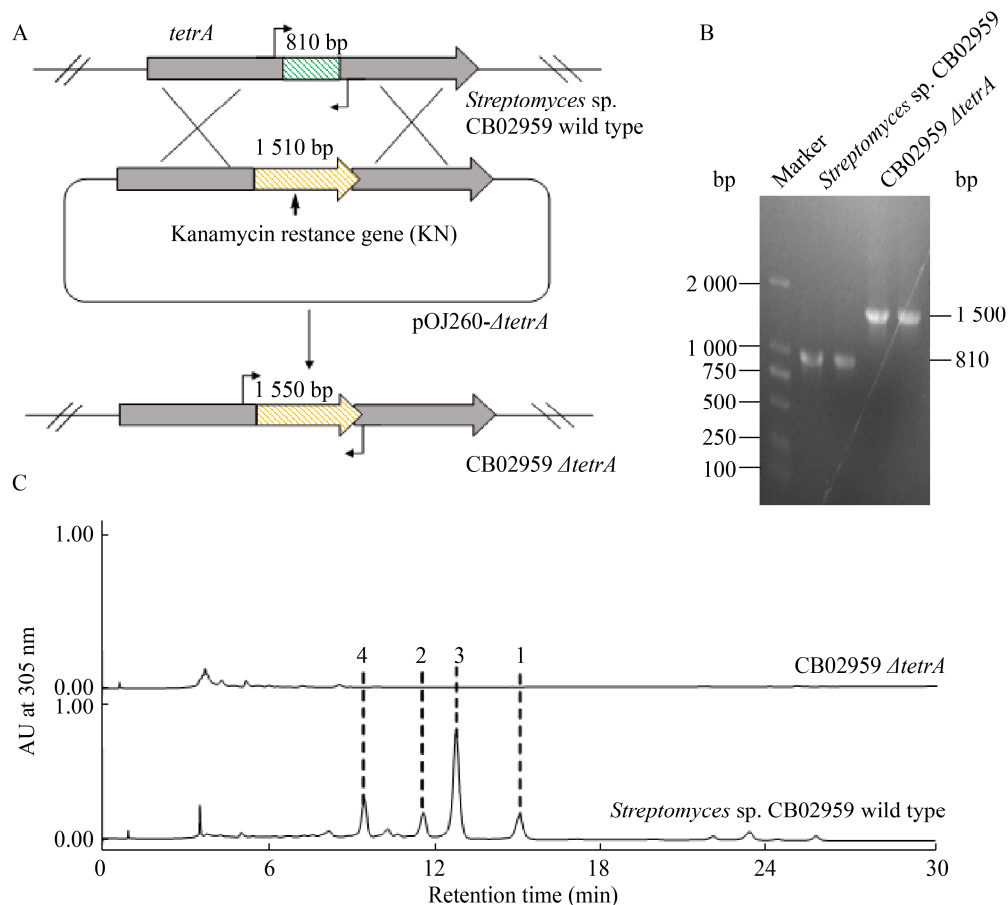


图 5 CB02959 $\Delta tetA$ 突变株的构建及发酵验证

Figure 5 Generation and fermentation verification of CB02959 $\Delta tetA$ mutant

注: A: 卡那霉素抗性基因(KN)替换 *tetA* 基因中部分片段突变株构建示意图; B: 突变株 PCR 验证; C: CB02959 $\Delta tetA$ 突变株的发酵液 HPLC 图谱

Note: A: Scheme for the generation of $\Delta tetA$ -disruption mutant of CB02959 by replacement with kanamycin resistance gene; B: PCR verification of the CB02959 $\Delta tetA$ mutant strain; C: HPLC profile of the fermentation broth for CB02959 $\Delta tetA$ mutant strain

了发酵, 替换 *tetrA* 基因的 CB02959 突变株中化合物 **1-4** 的峰消失了, 说明所推测的四霉素基因簇确实负责这 4 个化合物的生物合成(图 5C)。

2.4 化合物的理化性质和结构鉴定

基于前面所述的结果, 我们在 YEME 培养基中进行了 CB02959 的大规模发酵(27 L), 并利用硅胶柱层析、半制备液相、葡聚糖凝胶柱层析等方法从一小部分浸膏中纯化了这 4 个化合物, 根据 ESI-HR-MS、¹HNMR、¹³CNMR 数据, 确定了化合物 **1-4** 的结构(图 1)。

化合物 **1** (10.0 mg): 淡黄色粉末, ESI-MS 的分子离子峰为 $[M+H]^+$ 696.359 4 和 $[M+Na]^+$ 718.340 6, 分子量较于化合物 **2** 少 16 Da, 可以确定化合物 **1** 的分子式为 $C_{35}H_{53}NO_{13}$ 。根据 ESI-MS、¹HNMR 和 ¹³CNMR 分析, 以及与文献数据进行比较, 化合物 **1** 被确定为四霉素 A^[13]。¹HNMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 6.64 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 6.35 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 6.25 (m, 1H), 6.02 (m, 1H), 6.00 (m, 1H), 5.76 (d, 1H), 5.49 (dd, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.89 (br, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.28 (br, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.00 (dt, 1H), 3.76 (br, 1H), 3.70 (tt, 1H,), 3.51 (m, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.18 (dd, 1H), 2.85 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 2.25 (m, 2H), 2.16 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.79 (dd, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.41 (m, 2H), 1.30 (m, 2H), 1.24 (d, 3H), 1.17 (m, 1H), 1.05 (d, 3H), 0.85 (t, 3H); ¹³CNMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C : 177.3 (qC, C-29), 164.9 (qC, C-1), 146.6 (CH, C-3), 136.6 (CH, C-17), 136.4 (CH, C-22), 133.7 (CH, C-18), 133.4 (CH, C-19), 132.0 (CH, C-21), 131.7 (CH, C-20), 131.6 (CH, C-23), 129.0 (CH, C-16), 124.3 (CH, C-2), 97.5 (qC, C-9), 96.0 (CH, C-1'), 74.8 (CH, C-15), 73.1 (CH, C-5'), 72.0 (CH, C-25), 71.1 (CH, C-5), 70.5 (CH, C-4'), 69.1 (CH, C-13), 68.5 (CH, C-7), 66.0 (CH, C-11), 65.7 (CH, C-2'), 59.4 (CH, C-12),

56.7 (CH, C-3'), 48.1 (CH, C-24), 47.1 (CH₂, C-14), 45.0 (CH₂, C-8), 44.3 (CH₂, C-6), 41.8 (CH₂, C-4), 36.5 (CH₂, C-10), 23.9 (CH₂, C-27), 18.4 (CH₃, C-6'), 14.3 (CH₃, C-26), 12.8 (CH₃, C-28)。

化合物 **2** (5.0 mg): 淡黄色粉末, ESI-MS 的分子离子峰为 $[M+H]^+$ 712.355 3 和 $[M+Na]^+$ 734.336 8。根据 ESI-MS、¹HNMR 和 ¹³CNMR 分析, 可以确定化合物 **2** 的分子式为 $C_{35}H_{53}NO_{14}$ 。根据上述分析并与文献数据进行比较, 化合物 **2** 被确定为四霉素 B^[13]。¹HNMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H : 6.69 (m, 1H), 6.38 (m, 1H), 6.36 (m, 1H), 6.27 (m, 1H), 6.25 (m, 1H), 6.00 (m, 1H), 5.99 (m, 1H), 5.76 (d, 1H), 5.49 (dd, 1H), 5.28 (m, 1H), 4.90 (br, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.26 (br, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.01 (dt, 1H), 3.78 (br, 1H), 3.66 (tt, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.19 (dd, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.79 (dd, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.40 (m, 2H), 1.33 (m, 2H), 1.24 (d, 3H), 1.17 (m, 1H), 1.07 (d, 3H), 0.85 (t, 3H); ¹³CNMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C : 177.5 (qC, C-29), 165.2 (qC, C-1), 149.6 (CH, C-3), 136.8 (CH, C-17), 136.2 (CH, C-22), 134 (CH, C-18), 133.5 (CH, C-19), 131.7 (CH, C-21), 131.5 (CH, C-20), 131.5 (CH, C-23), 128.8 (CH, C-16), 121.7 (CH, C-2), 97.6 (qC, C-9), 96.1 (CH, C-1'), 74.6 (CH, C-15), 73.4 (CH, C-4), 73.3 (CH, C-5), 73.2 (CH, C-5'), 72.1 (CH, C-25), 68.7 (CH, C-13), 68.7 (CH, C-4'), 68.4 (CH, C-7), 66.0 (CH, C-11), 65.6 (CH, C-2'), 59.1 (CH, C-12), 56.8 (CH, C-3'), 48.0 (CH, C-24), 47.0 (CH₂, C-14), 45.1 (CH₂, C-8), 40.9 (CH₂, C-6), 36.5 (CH₂, C-10), 23.9 (CH₂, C-27), 18.5 (CH₃, C-6'), 14.3 (CH₃, C-26), 12.8 (CH₃, C-28)。

化合物 **3** (7.7 mg): 淡黄色粉末, ESI-MS 的分子离子峰为 $[M+H]^+$ 682.344 4 和 $[M+Na]^+$ 704.342 5,

^{13}C NMR 的 C 个数与化合物 4 相同,因此根据分子量,化合物 3 可能比 4 少 1 个氧原子,根据 ESI-MS、 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 分析,可以确定化合物 3 的分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_{13}$ 。根据上述分析与文献数据进行比较,化合物 3 被确定为四烯菌素 A^[25]。

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 6.65 (m, 1H), 6.35 (m, 1H), 6.34 (m, 1H), 6.28 (m, 1H), 6.26 (m, 1H), 6.00 (m, 1H), 5.98 (m, 1H), 5.77 (d, 1H), 5.53 (dd, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.51 (br, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.28 (br, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.00 (dt, 1H), 3.79 (br, 1H), 3.71 (tt, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 3.17 (dd, 1H), 2.92 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.25 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.79 (dd, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.42 (m, 2H), 1.37 (m, 3H), 1.18 (m, 1H), 1.07 (d, 3H), 0.99 (t, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 177.9 (qC, C-28), 165.0 (qC, C-1), 146.7 (CH, C-3), 136.7 (CH, C-17), 134.9 (CH, C-22), 133.8 (CH, C-18), 133.6 (CH, C-19), 132.7 (CH, C-23), 131.9 (CH, C-20), 131.5 (CH, C-21), 128.9 (CH, C-16), 124.2 (CH, C-2), 97.6 (qC, C-9), 95.8 (CH, C-1'), 74.7 (CH, C-15), 73.0 (CH, C-5'), 72.8 (CH, C-25), 70.9 (CH, C-5), 70.2 (CH, C-4'), 69.0 (CH, C-13), 68.3 (CH, C-7), 66.1 (CH, C-11), 65.7 (CH, C-2'), 59.7 (CH, C-12), 56.7 (CH, C-3'), 47.0 (CH_2 , C-14), 44.9 (CH_2 , C-8), 44.3 (CH_2 , C-6), 41.8 (CH_2 , C-4), 40.6 (CH, C-24), 36.3 (CH_2 , C-10), 18.4 (CH_3 , C-6'), 16.2 (CH_3 , C-27), 14.1 (CH_3 , C-26)。

化合物 4 (7.6 mg): 白色无定形粉末,可溶于甲醇,根据 ESI-MS 给出的分子离子峰 m/z 697.827 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 确定其分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$ 。根据 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 分析,并与文献数据进行比较,化合物 4 被确定为四烯菌素 B^[12]。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 6.81 (m, 1H), 6.70 (m, 1H), 6.34 (m, 1H), 6.25 (m, 1H), 6.21 (m, 1H),

6.01 (m, 1H), 5.94 (m, 1H), 5.81 (d, 1H), 5.53 (dd, 1H), 5.24 (m, 1H), 4.86 (br, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.38 (br, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.02 (dt, 1H), 3.80 (br, 1H), 3.65 (tt, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.13 (dd, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.55 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.79 (dd, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.43 (m, 2H), 1.39 (m, 3H), 1.18 (m, 1H), 1.09 (d, 3H), 1.00 (t, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 178.1 (qC, C-28), 165.3 (qC, C-1), 149.6 (CH, C-3), 136.7 (CH, C-17), 134.6 (CH, C-22), 134.0 (CH, C-18), 133.6 (CH, C-19), 132.6 (CH, C-23), 131.6 (CH, C-20), 131.4 (CH, C-21), 128.7 (CH, C-16), 121.7 (CH, C-2), 97.6 (CH, C-9), 96.0 (CH, C-1'), 74.6 (CH, C-15), 73.4 (CH, C-4), 73.1 (CH, C-5), 73.0 (CH, C-5'), 72.9 (CH, C-25), 70.5 (CH, C-4'), 68.5 (CH, C-13), 68.2 (CH, C-7), 66.1 (CH, C-11), 65.6 (CH, C-2'), 59.2 (CH, C-12), 56.7 (CH, C-3'), 46.9 (CH_2 , C-14), 45.0 (CH_2 , C-8), 40.9 (CH_2 , C-6), 40.5 (CH, C-24), 36.5 (CH_2 , C-10), 18.4 (CH_3 , C-6'), 16.2 (CH_3 , C-27), 14.2 (CH_3 , C-26)。

2.5 化合物 1-4 的初步发酵优化

在确定了化合物 1-4 分别为四霉素 A、四霉素 B、四烯菌素 A 和四烯菌素 B 后,绘制在 305 nm 波长下峰面积与浓度的标准曲线,以确定其产量。在 YEME 原始培养基(Original Medium, OR)中,化合物 1-4 的产量分别为 134.8 ± 3.4 、 56.8 ± 1.5 、 807.5 ± 2.4 、 58.7 ± 0.9 mg/L。在培养基筛选初期,YEME 培养基中化合物产量最高,与其他 4 种培养基营养成分相比,YEME 培养基中的葡萄糖、麦芽提取物、胰蛋白胨可能对产量有影响。随后在 YEME 培养基的基础上初步研究了不同葡萄糖、麦芽提取物、胰蛋白胨的含量对这 4 个化合物产量的影响。葡萄糖浓度在 0-15 g/L 时,化合物的产量与葡萄糖浓度呈正相关,当葡萄糖浓度

为 15 g/L 时, 四烯菌素 A 产量最高, 继续提高葡萄糖浓度后四烯菌素 A 的产量下降; 在葡萄糖浓度从 15 g/L 增加到 20 g/L 时, 四烯菌素 B、四霉素 A、四霉素 B 的产量继续提高, 但差别不明显。麦芽提取物的浓度对这 4 个化合物产量的影响不如葡萄糖显著, 它们的产量在麦芽提取物浓度为 3–5 g/L 时差别不大。不添加胰蛋白胍时 4 个化合物产量的明显下降, 因此胰蛋白胍是必需的营养成分, 但胰蛋白胍浓度在 3–7 g/L 时 4 个化合物的

产量均没有显著差别。在上述结果的基础上, 将 YEME 原始培养基中的葡萄糖浓度调整为 15 g/L, 麦芽提取物和胰蛋白胍的浓度保持原始培养基的浓度即 3 g/L 和 5 g/L, 得到 YEME 的初步优化培养基 (Optimize Medium, OP)。在 OP 培养基中发酵 CB02959 后, 四霉素 A、四霉素 B、四烯菌素 A 和四烯菌素 B 产量分别为 208.1 ± 6.1 、 100.0 ± 0.2 、 1315.6 ± 4.3 和 109.9 ± 0.9 mg/L, 比原始培养基中的产量分别提高了 1.5、1.8、1.6 和 1.9 倍 (图 6)。

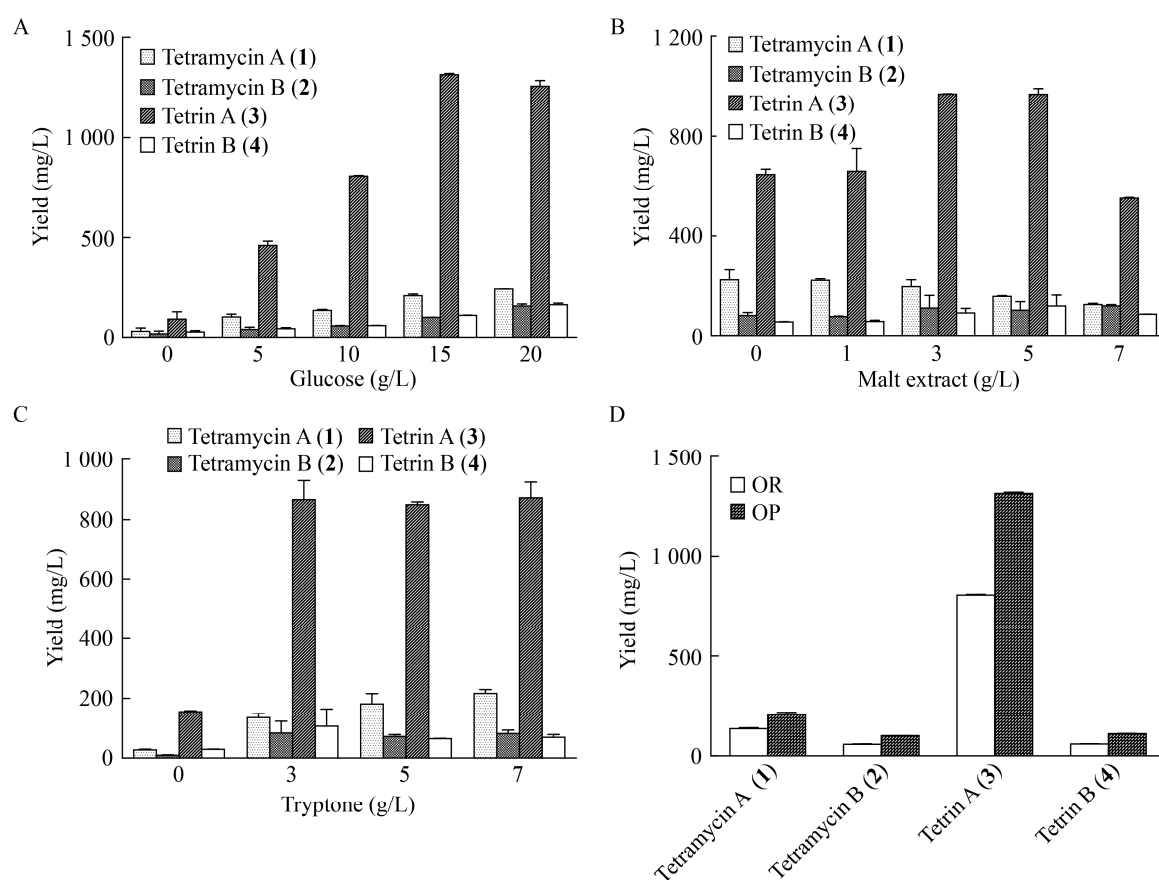


图 6 CB02959 中化合物 1–4 产量的初步发酵优化

Figure 6 Preliminary fermentation optimization of compounds 1–4 from CB02959

注: A: YEME 培养基中不同浓度葡萄糖对化合物 1–4 产量的影响; B: YEME 培养基中不同浓度麦芽提取物对化合物 1–4 产量的影响; C: YEME 培养基中不同浓度胰蛋白胍对化合物 1–4 产量的影响; D: 优化培养基(OP)与原始培养基(OR)中化合物 1–4 产量的比较

Note: A: Effects of glucose concentration on the titers of compounds 1–4; B: Effects of malt extract concentration on the titers of compounds 1–4; C: Effects of tryptone concentration on the titers of compounds 1–4; D: Comparison of the titers of compounds 1–4 in the optimized medium (OP) and the original YEME medium (OR)

3 讨论与结论

Streptomyces sp. CB02959 是一株分离自浙江省舟山市普陀山土壤的链霉菌, 保藏于本研究院的放线菌菌种库中。在进行雷纳霉素(Leinamycin)生产菌株的高通量基因组挖掘时, CB02959 被发现含有雷纳霉素生物合成基因簇, 并通过全基因组测序得到了验证。通过 antiSMASH 分析发现 CB02959 中包含 42 个次级代谢产物合成基因簇, 包括一个与 Oxazolomycin B 基因簇相似度很高的基因簇和一个与 *Streptomyces* sp. BS-112、*S. albulus* ZC-G-5、*S. albogriseus* 及 *S. ahngroscopcus* subsp. *wuzhouensis* 中四霉素生物合成基因簇高度相似的基因簇。通过对 CB02959 四霉素生物合成基因簇(*tetr*)的分析及小规模发酵, 我们初步确认了它是一株新的四霉素和四烯菌素产生菌。通过基于 16S rRNA 基因序列的进化树分析, 我们发现 CB02959 在进化树上与其他四霉素产生菌株处于不同的分支, 但其四霉素/四烯菌素生物合成基因簇与已报道的四霉素生物合成基因簇在基因排布和序列上都高度相似, 因此推测这些菌株中的四霉素/四烯菌素生物合成基因簇可能是通过菌株之间的基因水平转移获取的。

四霉素和四烯菌素在医药和农业领域有着良好的应用前景, 已有不少通过菌种改良或发酵优化提高它们产量的报道。如在发酵培养基中添加 8% (体积分数)甘油可使 *S. albulus* ZC-G-5 中四霉素 A 产量从 225 mg/L 提高至 960.0 mg/L^[10]; 在 *S. diastatochromogenes* 1628 中利用核糖体工程得到突变株 G5-59 可使四霉素 A、四霉素 P、四烯菌素 B 产量分别提升至 1.7、2.8、1.5 g/L^[15]。通过过表达调控基因 *ttmRIV* 可使 *S. ahngrospinosus* CGMCC 4.7082 中四霉素 A 产量提高 3.3 倍^[18]。在本研究中, *Streptomyces* sp. CB02959 野生型中四烯菌素 A 在 YEME 培养基中的产量达到 0.8 g/L, 通过调整葡萄糖的浓度初步将四烯菌素 A 的产量提升至 1.3 g/L, 其他 3 种化合物在优化培养基中

的产量也提高了 1.5–1.9 倍。鉴于 CB02959 中 TetrRI、TetrRII、TetrRIII 及 TetrRIV 等转录调控蛋白与 *S. ahngrospinosus* 中同源蛋白的高度相似性, 相信在 CB02959 中对这些调控元件进行敲除、过表达等基因操作将会进一步提高四霉素和四烯菌素的产量。

REFERENCES

- [1] Aparicio JF, Caffrey P, Gil JA, Zotchev SB. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(3): 179-188
- [2] Qi Z, Bai LQ. Structural modifications and yield improvements of polyene macrolide antibiotics[J]. Chinese Science Bulletin, 2017, 62(31): 3533-3547 (in Chinese)
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
- [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[A]// Antimicrobial Compounds[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 177-214
- [4] Cevher E, Şensoy D, Zloh M, Mülazımoğlu L. Preparation and characterisation of natamycin: γ -cyclodextrin inclusion complex and its evaluation in vaginal mucoadhesive formulations[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97(10): 4319-4335
- [5] Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2003, 16(4): 730-797
- [6] Pipek P, Rohlík BA, Lojková A, Staruch L. Suppression of mould growth on dry sausages[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2010, 28(No. 4): 258-263
- [7] Chen LL, Guo BB, Li BX, Mu W, Liu F. Toxicity and control efficacy of tetramycin against *Passalora fulva*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2017, 19(3): 324-330 (in Chinese)
陈乐乐, 郭贝贝, 李北兴, 慕卫, 刘峰. 四霉素对番茄叶霉病菌的毒力效应及田间防治效果[J]. 农药学报, 2017, 19(3): 324-330
- [8] Song YY, He LM, Chen LL, Ren YP, Lu HB, Geng S, Mu W, Liu F. Baseline sensitivity and control efficacy of antibiosis fungicide tetramycin against *Botrytis cinerea*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 146(2): 337-347
- [9] Ma DC, Zhu JM, He LM, Cui KD, Mu W, Liu F. Baseline sensitivity and control efficacy of tetramycin against *Phytophthora capsici* isolates in China[J]. Plant Disease, 2018, 102(5): 863-868
- [10] He YL, Ding Y, Wu QP, Chen MT, Zhao SE, Zhang JM,

- Wei XH, Zhang YX, Bai JL, Mo SP. Identification of the potential biological preservative tetramycin A-producing strain and enhancing its production[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2925
- [11] Dornberger K, Fügner R, Bradler G, Thrum H. Tetramycin, a new polyene antibiotic[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1971, 24(3): 172-177
- [12] Rinehart KL, Tucker WP, Pandey RC. I Polyene antibiotics. III. Structure of tetrin B[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93(15): 3747-3751
- [13] Ryu G, Choi WC, Hwang S, Yeo WH, Lee CS, Kim SK. Tetrin C, a new glycosylated polyene macrolide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. GK9244[J]. *Journal of Natural Products*, 1999, 62(6): 917-919
- [14] Yamanaka K, Hamano Y, Oikawa T. Enhancement of metabolic flux toward ϵ -poly-L-lysine biosynthesis by targeted inactivation of concomitant polyene macrolide biosynthesis in *Streptomyces albulus*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(5): 558-564
- [15] Fan JX, Song Y, Tang G, Ochi K, Shentu XP, Yu XP. Substantial improvement of tetraene macrolide production in *Streptomyces diastatochromogenes* by cumulative drug resistance mutations[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232927
- [16] Zhang N, Song Z, Xie YH, Cui P, Jiang HX, Yang T, Ju RC, Zhao YH, Li JY, Liu XL. Identification and characterization of antifungal active substances of *Streptomyces hygroscopicus* BS-112[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(8): 1443-1452
- [17] Cao B, Yao F, Zheng XQ, Cui DB, Shao YC, Zhu CX, Deng ZX, You DL. Genome mining of the biosynthetic gene cluster of the polyene macrolide antibiotic tetramycin and characterization of a P450 monooxygenase involved in the hydroxylation of the tetramycin B polyol segment[J]. *Chembiochem*, 2012, 13(15): 2234-2242
- [18] Cui H, Ni XP, Shao W, Su J, Su JQ, Ren J, Xia HZ. Functional manipulations of the tetramycin positive regulatory gene *ttmRIV* to enhance the production of tetramycin A and nystatin A1 in *Streptomyces* *ahygroscopicus*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(9): 1273-1282
- [19] Pan GH, Xu ZR, Guo ZK, Hindra, Ma M, Yang D, Zhou H, Gansemans Y, Zhu XC, Huang Y, et al. 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
- [20] Choi SU, Lee CK, Hwang YI, Kinoshita H, Nihira T. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B₁ producer[J]. *Archives of Microbiology*, 2004, 181(4): 294-298
- [21] Liu L, Li SN, Sun RZ, Qin XJ, Ju JH, Zhang CS, Duan YW, Huang Y. Activation and characterization of bohemamine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. CB02009[J]. *Organic Letters*, 2020, 22(12): 4614-4619
- [22] Kong WP, Huang CS, Shi J, Li Y, Jiang XX, Duan QW, Huang Y, Duan YW, Zhu XC. Recycling of Chinese herb residues by endophytic and probiotic fungus *Aspergillus cristatus* CB10002 for the production of medicinal valuable anthraquinones[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 102
- [23] Lu SD. Modern Molecular Biology Experimental Technology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1993 (in Chinese)
- 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993
- [24] Zhao CH, Ju JH, Christenson SD, Smith WC, Song DF, Zhou XF, Shen B, Deng ZX. Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning the oxazolomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* JA3453[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(11): 4142-4147
- [25] Rinehart KL, Pandey RC, German VF, Nishikawa Y. Polyene antibiotics. II. Structure of tetrin A[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93(15): 3738-3747