

· 生物转化及应用 ·

张雪洪 博士，上海交通大学生命科学技术学院生物工程系教授、微生物代谢国家重点实验室副主任。长期从事生物工程上下游的教学和研究，主要研究方向为微生物代谢工程与合成生物学、生物物质的分离纯化、农业生物药物等。曾任上海交通大学生命科学技术学院常务副院长，任上海市化学化工学会理事、生物技术与工程专业委员会副主任。曾主持国家“863”计划和国家重点研发计划的课题、国家自然科学基金项目等，在生物工程和微生物学等领域相关期刊发表SCI文章120余篇。



微生物源农用抗生素的研发与高产策略

崔佳佳, 张雪洪

上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

崔佳佳, 张雪洪. 微生物源农用抗生素的研发与高产策略. 生物工程学报, 2021, 37(3): 1032-1041.

Cui JJ, Zhang XH. Development and high yield strategies of microbial-derived antibiotics in agriculture. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 1032-1041.

摘要: 开发高效、低毒、低残留的绿色农药是农药研发的发展趋势，其中微生物源农药抗生素占据了重要地位。随着基因组学、代谢工程和高通量筛选等技术的发展，新型微生物源农用抗生素的研究进入了新的阶段。文中简要总结了近 10 年来研发的新型微生物源农用抗生素的种类、农用抗生素产生菌株的高产育种与发酵研究策略等，为未来农用抗生素的研发提供参考。

关键词: 微生物，农用抗生素，高产菌株，育种

Development and high yield strategies of microbial-derived antibiotics in agriculture

Jiajia Cui, and Xuehong Zhang

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: The development of high-efficiency, low-toxicity, and low-residue green pesticides is the main trend of pesticide

Received: October 10, 2020; **Accepted:** January 23, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670033), National Key Research and Development Program of China (No. 2019YFA0904300).

Corresponding author: Xuehong Zhang. Tel: +86-21-34204854; E-mail: xuehzhang@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31670033), 国家重点研发计划 (No. 2019YFA0904300) 资助。

网络出版时间: 2021-02-03

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210202.1403.001.html>

research, and the microbial-derived antibiotics are one of the essential parts of green pesticides and play a significant role in agriculture. With the development of microbial genomics technology, metabolic engineering, high-throughput screening and other technologies, the research on new microbial-derived antibiotics has entered a new stage in agriculture. Here we briefly summarize the types of new microbial-derived antibiotics developed in agriculture over the past decade. We also introduce the research strategies for high-yield breeding and fermentation of antibiotic-producing strains in agriculture. This review may provide references for the future development of agricultural antibiotics.

Keywords: microorganism, agricultural antibiotics, high-producing strain, breeding

近年来随着生态保护、食品安全、绿色生产、可持续发展等理念的深入人心,化学农药的监管也越来越严格。开发高效、低毒、低残留、无污染的生物农药成为未来农药研发的发展方向。微生物源农用抗生素在生物农药中占据重要地位,它们是由微生物合成的具有生物可降解性的次级代谢产物,因其高效、安全、环境友好的特性成为了化学农药的绿色替代品,是植物病虫害防治和绿色可持续发展农业领域的研究热点。

目前微生物源农用抗生素已经广泛应用于农业害虫和植物病害的防治,为农业生产做出了重要贡献。随着微生物育种技术和发酵技术的提升,各种农用抗生素的发酵效价不断提高、发酵规模不断扩大、生产成本逐步降低,其在农业生产应用的竞争力日益增强,如井冈霉素、阿维菌素、中生菌素、南昌霉素、春雷霉素、浏阳霉素、多抗霉素、申嗪霉素、武夷霉素、宁南霉素、多杀菌素、灭瘟素等。

同时,通过筛选活性先导化合物,采用组合技术和基因工程方法,对基因簇及代谢途径进行修饰和改造、研究新型的抗生素和提高有效组分的产量;在微生物全基因组测序和功能基因研究的基础上,克隆和发掘新的具有杀虫和杀菌功能的基因,研究基因的高效表达和调控;建立生物农药大规模、高通量筛选技术平台,筛选新型农用抗生素;基于高通量筛选技术利用体外分子诱变进化技术、基因随机诱变或重组等,筛选和改造农用抗生素高产菌株;利用现代发酵工程技术、生化工程技术以及工程化系统集成加快发酵工艺优化改进,大幅度提高农用抗生素发酵技术水平。

新的农用抗生素得到持续研发、传统农用抗生素的产品质量进一步稳定、生产效率大大提高。本文简要总结了近 10 年来研发的新型微生物源农用抗生素的种类,农用抗生素产生菌株的高产育种研究策略等,为未来农用抗生素的研发提供参考。

1 近 10 年来研发的微生物源农用抗生素

微生物源农用抗生素因高效、绿色环保等特性而成为生物农药的主力品种,积极筛选和开发新型微生物源农用抗生素对于推动生物农药的发展、促进我国农业生产具有十分重要的意义。本文简要总结了近 10 年来研发的新型微生物源农用抗生素(表 1)。

1.1 吩嗪类抗生素

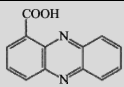
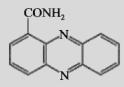
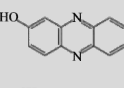
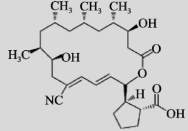
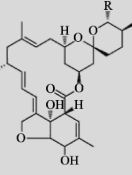
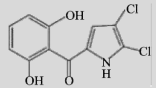
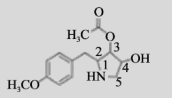
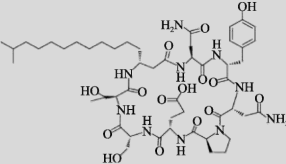
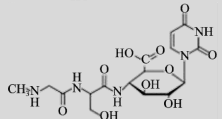
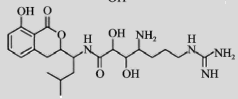
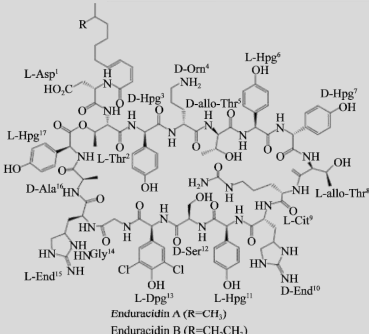
吩嗪类抗生素是一类具有含氮杂环结构的次级代谢产物,假单胞菌属和链霉菌属是天然吩嗪类抗生素的主要生产者,吩嗪类抗生素因其广谱抑菌活性受到研究人员的广泛关注^[11]。目前作为农用抗生素研究的主要有吩嗪-1-羧酸、吩嗪-1-甲酰胺、2-羟基吩嗪等。

1.1.1 吩嗪-1-羧酸 (Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)

PCA 是一种黄色的吩嗪类化合物,在 2011 年由铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* M18 产生的 PCA 被中国农业部批准为一种新型微生物源杀菌剂“申嗪霉素”,具有自主知识产权。PCA 对于水稻纹枯病、西瓜枯萎病、甜椒疫病、辣椒疫病以及黄瓜枯萎病等具有良好的防治效果,但是 PCA 的抗真菌活性受环境 pH 的影响较大^[12]。

表 1 近 10 年来研发的微生物源农用抗生素的种类

Table 1 Types of microbial-derived agricultural antibiotics developed in the past decade

Antibiotics	Strains	Structure	Biological activity	References
Phenazine-1-carboxylic acid, PCA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18		Antagonistic to fungal phytopathogens	[1]
Phenazine-1-carboxamide, PCN	<i>P. chlororaphis</i> HT66, <i>P. aeruginosa</i>		Antagonistic to fungal phytopathogens	[2]
2-hydroxyphenazines, 2-OH-PHZ	<i>P. chlororaphis</i> 30-84, <i>P. chlororaphis</i> GP72		Antagonistic to fungal phytopathogens	[2]
Borrelidin	<i>Streptomyces</i> spp.		Antagonistic to fungal phytopathogens	[3]
Milbemycins	<i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>Aureolacrimosus</i> , <i>S. bingchengensis</i>		Acaricidal, insecticidal, and anthelmintic activities	[4]
Pyoluteorin	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.		Antifungal and antibacterial activities	[5]
Anisomycin	<i>S. roseochromogenes</i> , <i>S. griseolus</i> , <i>S. hygrospicus</i> var. <i>beijingensis</i>		Antagonistic to fungal phytopathogens	[6]
Bacillomycin D	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i>		Antagonistic to fungal phytopathogens	[7]
Xinaomycin	<i>Streptomyces</i> spp.		Antibacterial, antifungal and antiviral activities	[8]
Xenocoumacin 1	<i>Xenorhabdus nematophila</i>		Antifungal activity	[9]
Enduracidins	<i>S. fungicidicus</i>		Inhibits Gram-positive bacteria	[10]

1.1.2 吩嗪-1-甲酰胺 (Phenazine-1-carboxamide, PCN)

PCN 可由绿针假单胞菌 *P. chlororaphis* 和 *P. aeruginosa* 等合成, PCN 对于尖孢镰刀菌、水稻黄单胞菌、立枯丝核菌^[13]、番茄镰刀菌以及终极腐霉等多种植物病原真菌具有显著的拮抗作用。在中性条件下, PCN 的抗真菌活性比 PCA 高得多, 因此 PCN 能够适应不断变化的环境^[14-15]。

1.1.3 2-羟基吩嗪 (2-hydroxyphenazines, 2-OH-PHZ)

2-OH-PHZ 是由 *P. chlororaphis* 30-84 和 *P. chlororaphis* GP72 等绿针假单胞菌产生的一种吩嗪衍生物, 2-OH-PHZ 具有广谱杀菌性, 能够有效防治小麦全蚀病, 对于疫霉、腐霉等植物病原真菌也具有很好的抑制作用^[16]。

1.2 聚酮类抗生素

1.2.1 疏螺体素 (Borrelidin)

疏螺体素为浅黄色晶体, 是一种大环内酯类抗生素, 分离自链霉菌属。疏螺体素对于大豆疫霉菌、瓜果腐霉、终极腐霉以及辣椒疫霉等植物病原真菌具有显著的拮抗作用, 其中疏螺体素对大豆疫霉菌具有很高的特异性抗真菌活性, 10 mg/L 的疏螺体素对大豆疫霉菌的防治效果达到了 94.72%, 其防治效果显著高于甲霜灵^[3]。

1.2.2 米尔贝霉素 (Milbemycins)

米尔贝霉素是由链霉菌产生的一类十六元大环内酯类化合物, 具有强效的抗虫和杀虫活性。由冰城链霉菌 *Streptomyces bingchengensis* 产生的米尔贝霉素 A3/A4 已被开发为防治农业螨虫的杀螨剂, 米尔贝霉素 A3/A4 的半合成衍生物米尔比霉素肟化物已经用于线虫、丝虫等害虫的防治, 其他米尔贝霉素 A3/A4 的衍生物如雷皮菌素和拉替菌素也已经广泛应用于农业领域^[17]。

1.2.3 藤黄绿脓菌素 (Pyoluteorin, Plt)

Plt 是一种最早从 *P. aeruginosa* 中分离出来的聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS)/非核糖体肽合酶 (Non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)

杂合抗生素, 对于真菌 (特别是腐霉属) 和细菌具有广谱抗菌活性, 可通过采用薄层色谱法以及飞行时间质谱法对藤黄绿脓菌素进行相应的鉴定^[18-19]。

1.2.4 茴香霉素 (Anisomycin)

茴香霉素是由玫瑰产色链霉菌 *S. roseochromogenes*、刺孢吸水链霉菌北京变种 *S. hygrospinosus* var. *beijingensis*、浅灰色链霉菌 *S. griseolus* 等产生的一种吡咯烷类抗生素, 是农抗 120 中重要的有效成分之一, 对其生物合成基因簇进行鉴定后通过发酵分离得到。茴香霉素主要用于农作物真菌病害的防治, 比如农作物白粉病、西瓜腐烂病、水稻纹枯病等^[6,20]。

1.2.5 Xenocoumacin 1 (Xcn1)

Xenocoumacin 1 (Xcn1) 是从嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* 的培养物中分离出的主要抗菌化合物, 对革兰氏阳性细菌表现出广泛的抗菌活性, 并且对于互隔交链孢霉、灰霉菌、立枯丝核菌、疫霉菌等具有很强的抑制活性, 具有成为新型生物农药的巨大潜力^[21-22]。

1.3 多肽类抗生素

1.3.1 杆菌霉素 D (Bacillomycin D)

杆菌霉素 D 是由解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* 等产生的一种环状抗真菌脂肽。杆菌霉素 D 可以有效抑制孢子萌发和菌丝体生长^[23], 对于黄曲霉、禾谷镰刀菌、炭疽菌、灰葡萄孢菌、匍枝根霉等具有很强的抑制活性^[24-25]。杆菌霉素 D 安全且易于降解, 土壤中的杆菌霉素 D 通过分解为氨基酸残基, 可以防止其积累达到有害水平^[26]。

1.3.2 恩拉霉素 (Enduracidins)

恩拉霉素最初是从杀真菌素链霉菌 *S. fungicidicus* 中分离出来的一组脂肽抗生素, 可以甲醇为溶剂并利用超声辅助进行分离提取^[27]。恩拉霉素由 17 个氨基酸组成, 根据脂肪链长度的不同分为恩拉霉素 A 和恩拉霉素 B。恩拉霉素是

一种碱性抗生素, 由于对于大多数革兰氏阳性菌具有很好的抑制活性^[10,27-28], 因此有望在农业中广泛应用。

1.4 核苷类抗生素—新奥霉素 (Xinaomycin)

新奥霉素是由中国科学院成都生物研究所用遗传改良菌株“诺尔斯链霉菌 Xi Ao-3”发酵生产的一种新型尿嘧啶核苷肽类抗生素, 对疫霉菌、炭疽病菌、棉花黄萎病菌、番茄花叶病毒以及西瓜花叶病毒具有很强的抑制活性^[29-30]。新奥霉素作为一种新型广谱生物杀菌剂存在一定的缺陷, 一是新奥霉素产品呈酸性, 不适宜与碱性药剂混合使用; 二是新奥霉素对紫外线敏感, 不宜在强日照下使用^[8]。

2 微生物源农用抗生素的高产育种新策略

不同用途的微生物源抗生素的高产育种方法基本相似, 相关方法同样应用于农用抗生素的研发。从自然界分离出来的野生型菌株所产生的抗生素含量一般很低, 无法满足商业需求。工业微生物高产菌株选育的常用手段是采用化学或物理诱变、基因工程育种等。传统的化学诱变、UV 诱变、放射诱变等仍是生物企业常用的育种手段, 近年来常压室温等离子体 (Atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 因安全、简便得到广泛应用。随着微生物基因组学的发展, 代谢工程技术及基因编辑技术的进步, 基因工程育种已成为抗生素高产菌株获得的主要途径。

2.1 新型诱变育种

近年来, ARTP 技术和重离子诱变技术被认为是有效和新型的微生物诱变育种技术。ARTP 的核心组件是 RF ARGD 等离子体发生器, 它产生的等离子体射流可以改变细胞壁和细胞质膜的结构和通透性, 导致 DNA 损伤, 包括错义突变、核苷酸缺失或核苷酸移码突变等, 与传统诱变育种方法相比, ARTP 具有突变速度快, 操作灵活度高、安全高效等特点^[30-31]。目前, ARTP 技术已经成功应用于假单胞菌属和链霉菌属等高产菌

株的选育, 使得吩嗪-1-甲酰胺、阿维菌素和米尔贝霉素 A3/A4 的产量有了较大的提升^[32-34]。

重离子诱变技术也是一种产生微生物突变体的有效方法, 相比传统的诱变方法它可以产生更高的突变率和突变谱。重离子诱变通过热和电离效应等直接造成微生物菌株的 DNA 损伤, 这些 DNA 损伤更加有利于微生物突变体的产生。如通过利用兰州重离子加速器 (Heavy ion research facility in Lanzhou, HIRFL) 对链霉菌进行诱变育种, 提高了恩拉霉素以及阿维菌素的产量^[35]。

微生物进行诱变育种后需要对大量的菌株进行测试与筛选, 传统的琼脂平板初步筛选、摇瓶发酵二次筛选和高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 验证产量的筛选过程非常耗时, 因此在育种过程中需要建立简单快速的高通量筛选方法以有效率地获得阳性菌株。在 *P. chlororaphis* GP72 中将 2-OH-PHZ 合成途径中的限制性酶 PhzO 替换为绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP), 以 GFP 作为筛选标记进行诱变育种, 通过酶标仪检测荧光强度进行高通量筛选, 在筛选出的突变株中通过 PhzO 的回替, 使 2-OH-PHZ 的产量比野生型菌株提高了 4.62 倍^[36]; 在对 *S. lomonensis* S015 进行 ARTP 技术和紫外复合诱变育种后, 建立了基于 24 孔深孔板发酵和酶标仪快速检测的高通量筛选方法^[37]。

新型诱变育种操作简单、突变率高, 可在较短时间内获得优良的突变类型, 但是诱变育种具有一定的盲目性与随机性, 一般情况下产生的有益突变体频率低, 而且后期突变菌株的筛选比较困难。

2.2 基因工程育种

2.2.1 利用代谢工程技术改造生产菌株

负调控基因的敲除、正调控基因的过表达、分支途径的改造是基因工程育种的常用方法。微生物代谢网络是一个复杂的系统, 基因组学技术、生物信息学的快速发展和基因编辑技术的建立为微生物源农用抗生素的工业化生产创造了新的发

展空间。通过系统性筛选和代谢网络分析,抑制负调控途径或因子、扩增正调控途径或因子、加强产物运输系统、增强前体途径、操纵产物反馈机制以及消除竞争性代谢途径等方法可以使微生物源农用抗生素的产量有较大的提升^[19,38]。

在 *P. chlororaphis* GP72 中敲除 4 个负调控基因 *pykF*、*rpeA*、*rsmE* 和 *lon*, 过表达 6 个基因 *ppsA*、*tktA*、*phzC*、*aroB*、*aroD* 和 *aroE* (提高莽草酸途径) 后使得 2-OH-PHZ 的产量由 4.5 mg/L 提高到 450.4 mg/L, 比原始菌株提高了 99 倍^[16]; 通过在 *P. chlororaphis* HT66 中敲除 3 个负调控基因 *lon*、*parS* 和 *prsA*, 成功构建了高产菌株 HT66LSP, 高产菌的 PCN 产量达到了 4.10 g/L, 比野生菌株提高了 8.6 倍^[39]; 在 *S. bingchenggensis* 中, 通过敲除 *cyp41* 基因和过表达 *milE* 基因使得米尔贝霉素 A3/A4 的产量提高了 53.1%^[40]。在 *P. aeruginosa* PA1201 中通过对毒力因子、PCA 生物合成途径、PCA 流出泵系统以及次级代谢途径进行组合基因工程, 获得了一株遗传稳定、低毒性的高产菌株 PA-IV, 其 PCA 产量为 9 882 mg/L, 与原始菌株相比提高了 54 倍^[41]。

随着大片段 DNA 克隆技术的发展, 在优化的宿主菌株中进行整个合成基因簇的复制或者异源表达, 有望大幅度提高抗生素的产量^[39]。目前已有许多抗生素实现了异源表达, 这也为抗生素的高产提供了有利条件。通过利用 Red/ET 同源重组技术在 *B. amyloliquefaciens* FZB42 中克隆了杆菌霉素的合成基因簇 (37.2 kb), 然后将克隆的基因簇整合到枯草芽孢杆菌的染色体上实现了杆菌霉素的异源表达^[42]; 以 *S. coelicolor* M145 的衍生物菌株 M1152 和 M1154 作为宿主, 通过在 ϕ C31 att 位点分别引入来自 *S. venezuelae* ATCC 10712 的氯霉素基因簇和 *S. ambofaciens* ATCC 23877 的杀刚果锥虫素基因簇, 使氯霉素和杀刚果锥虫素的产量提高了 20–40 倍^[43]。

2.2.2 利用底盘细胞构建高产菌株

由于缺乏高效的遗传操作技术、生长速度慢、

产量低或易受环境干扰等原因, 许多天然微生物并不是抗生素等代谢产物的理想生产对象。因此, 在微生物底盘细胞中异源表达天然产物合成途径引起了越来越多的关注。随着系统生物学和合成生物学工具在途径识别、预测和重构方面的发展, 一些模式微生物, 如大肠杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、链霉菌等, 已被确定为异源表达和大规模生产高价值天然产物的理想底盘。这些底盘细胞的优势在于生长速度较快, 其基因组和代谢网络具有很透彻的研究, 因此通过不同的合成生物学技术对其进行工程化处理, 可以实现天然产物的高效表达^[44]。

基因组的精简和优化是构建底盘细胞的重要策略, 删减非必需基因不仅可以提高基因组的产物合成稳定性, 还可以简化目标代谢网络。例如, 通过敲除 *S. avermiltis* 线性染色体 9.02 Mb 中总长度超过 1.4 Mb 的非必需基因, 构建了阿维链霉菌的“最小基因组”, 将这个最小基因组作为底盘对链霉素、头孢霉素 C 和寡霉素的外源基因簇分别进行了异源表达, 使得链霉素和头孢霉素 C 的产量明显高于原始菌株, 也使得寡霉素的产量提高了 10 倍以上^[45]。另外, 在 *P. chlororaphis* GP72 中通过采用同源重组方法从染色体上敲除 685 750 bp 的片段 (占基因组的 10.3%, 包括 5 个非必要的次级代谢基因簇和 17 个菌株特异性大片段), 构建了小基因组菌株 MDS22, 并使得 MDS22 的 2-羟基吩嗪产量提高了 3.4 倍^[46]。基因组规模的代谢重建以及调控网络分析将会提供更多信息, 为构建具有系统简单性和生物技术应用可行性的理想底盘细胞奠定基础。

2.2.3 核糖体工程技术

核糖体工程技术是利用核糖体蛋白结构上的突变对微生物次级代谢调控产生影响, 进而进行微生物育种的一项技术, 目前已成为激活与提高微生物多种重要次生代谢产物的主要技术。通过向核糖体或 RNA 聚合酶引入特定的抗生素抗性突变, 使该菌株核糖体的特定基因发生突变, 赋予目的菌株某种抗生素抗性, 从而激活次级代谢产物合成, 迅

速提高抗生素产量。相比经典的微生物育种方法,核糖体工程技术具有产量提高迅速、耗时少、基因突变位点明确且易于检测等优点,可以大幅度提高正向突变菌株的获得率^[47]。另外,核糖体工程技术还适用于那些没有明确遗传背景的菌株改造。

利用核糖体工程技术可以有效地提高抗生素的产量。在 *S. viridochromogenes* Co γ -316 中,通过基因组重排与核糖体工程相结合的技术(核糖体蛋白 S12 突变),使得阿维菌素的产量从 0.24 g/L 增加到 1.4 g/L,比原始菌株提高了 4.85 倍^[48];通过基因组重排与核糖体工程相结合对 *S. actuosus* AW7 进行改造,使得那西肽的产量增加到 1.2 g/L,比亲本菌株 AW7 高 7.0 倍^[49];通过 ARTP 和核糖体工程技术相结合的育种方法对 *S. albus* S12 进行改造,使得沙利霉素的产量达到了 34.7 g/L,比原始菌株提高了 1 倍多^[30]。

基因工程育种可以定向改造微生物,提高目标产物产量,育种周期相对较短;但是该育种方法需要对微生物的代谢网络进行透彻的研究,操作难度较诱变育种大。人们可以根据菌株的遗传背景了解程度和改造难度,选择合适的育种方法。

3 发酵优化提高菌株高产能力

微生物源农用抗生素的筛选以及高产菌株生产能力的鉴定一般都是通过发酵实现的,发酵过程会受到各种因素(如营养因素、氧气供应、温度、pH 值等)的影响,进而影响微生物次级代谢产物的合成水平。如在 *S. hygroscopicus* 5008 发酵过程中,采用碱性 pH 冲击使得井冈霉素 A 的产量提高了 27.43%^[50];在微生物发酵过程中通过添加适当的氧化剂、还原剂等调节活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平,也可以起到增加次级代谢物产量的作用。通过在 *S. hygroscopicus* 5008 的发酵培养基中添加 H_2O_2 ,并对其添加浓度和添加时间进行优化,使得井冈霉素 A 的产量获得了显著的提升^[51];在假单胞菌中通过在不同的时间添加二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)和 H_2O_2 ,

运用两步发酵策略使得 2-OH-PHZ 的产量提高了 1.6 倍,这些可为其他抗生素的发酵提供借鉴^[52]。

传统的发酵优化试验多以单因素试验和正交试验为主,研究耗时、模型指导性较差。近年来,优秀试验设计软件不断推广,大大提高了高产条件的优化研究速度。目前通过使用 Plackett-Burman (PB) 设计、Box-Behnken 实验设计(Box-Behnken design, BBD)、中心复合设计(Central composite design, CCD)、响应曲面法(Response surface method, RSM)等统计方法进行发酵参数的优化,使得次级代谢物产量提升的同时也有效地降低了发酵成本,同时还可以采用数学模型指导优化过程。通过对 PCA 高产菌株铜绿假单胞菌 M18MSU1 采用部分析因设计(Fractional factorial design, FFD)、最陡爬坡法和 CCD 进行试验设计并确定优化条件,使得 PCA 产量达到 4 771 mg/L,约是优化前的 2 倍^[53];通过采用 PB 设计和 CCD 对绿针假单胞菌 P3 Δlon 菌株进行培养基参数的优化,使得 PCN 产量提高了 3 倍左右,其 PCN 产量达到了 9 174 mg/L^[51];通过对井冈霉素 A 的发酵培养基进行优化,并采用 RSM 进行最优化选择和验证,使得井冈霉素 A 的产量比优化前提高了近 2 倍^[54]。

随着代谢组学的发展,影响抗生素合成的前体不断得到确定,添加前体或者关键代谢物也是提高抗生素产量的常用手段,在束丝放线菌 *Actinosynnema pretiosum* 发酵过程中通过添加前体异丁醇,使得安丝菌素 P-3 的产量提高了 4 倍左右^[55]; *S. nodosus* 可以产生一种多烯大环内酯类抗生素-两性霉素 B,在 24 h 时通过向发酵培养基中添加异丙醇、丙氨酸、丙酮酸和烟酰胺使得两性霉素 B 的产量提高了 28.5%^[56]。

4 总结与展望

农作物病虫害一直以来都是影响农业生产的重要因素,而化学农药的广泛应用对农业可持续发展和人类健康等产生了一系列的负面影响,高效、低毒、无残留的微生物源农用抗生素具有很

好的市场发展前景,能够促进绿色生产,提升农业生产品质。微生物源农用抗生素经过20世纪70年代开始的辉煌,在21世纪初进入发展瓶颈,但基因组学、代谢工程、合成生物学等技术的发展将推动微生物源农用抗生素的再次发展,并推进传统农药产业的结构调整和技术提升,将农业微生物产业带上一个更高的台阶。

REFERENCES

- [1] Zhang T, Zhang L, Su W, et al. The direct electrocatalysis of phenazine-1-carboxylic acid excreted by *Pseudomonas alcaliphila* under alkaline condition in microbial fuel cells. *Bioresour Technol*, 2011, 102(14): 7099-7102.
- [2] Arseneault T, Filion M. Phenazine-producing *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents of plant pathogens. In *microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*; Springer: New Delhi, 2016: 53-68.
- [3] Liu CX, Zhang J, Wang XJ, et al. Antifungal activity of borrelidin produced by a *Streptomyces* strain isolated from soybean. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(5): 1251-1257.
- [4] Kim MS, Cho WJ, Song MC, et al. Engineered biosynthesis of milbemycins in the avermectin high-producing strain *Streptomyces avermitilis*. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 9.
- [5] Chen J, Wang W, Xu Y, et al. Slow-release formulation of a new biological pesticide, pyoluteorin, with mesoporous silica. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(1): 307-311.
- [6] Zheng X, Cheng Q, Yao F, et al. Biosynthesis of the pyrrolidine protein synthesis inhibitor anisomycin involves novel gene ensemble and cryptic biosynthetic steps. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(16): 4135-4140.
- [7] Jin P, Wang H, Tan Z, et al. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pestic Biochem Physiol*, 2020, 163: 102-107.
- [8] 沈艳, 孙如意, 李蕾, 等. 新奥霉素母药对5种非靶标生物的急性毒性. *农药学学报*, 2018, 20(4): 535-539.
- [9] Shen Y, Sun RY, Li L, et al. Acute toxicity study of xinaomycin TK to five non-target organisms. *Journal of Pesticide Science*, 2018, 20(4): 535-539 (in Chinese).
- [10] Zhou T, Zeng H, Qiu D, et al. Global transcriptional responses of *Bacillus subtilis* to xenocoumacin 1. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(3): 652-662.
- [11] Xu S, Pan X, Luo J, et al. Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pestic Biochem Physiol*, 2015, 117(1): 39-46.
- [12] Zhou L, Jiang HX, Sun S, et al. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, 32(3): 50.
- [13] Jin XJ, Peng HS, Hu HB, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals potential factors associated with the enhancement of phenazine-1-carboxamide production in *Pseudomonas chlororaphis* P3. *Sci Rep*, 2016, 6(7): 27393.
- [14] Peng H, Zhang P, Bilal M, et al. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 117.
- [15] Peng H, Tan J, Bilal M, et al. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* strains using statistical experimental designs. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(9): 129.
- [16] Liu K, Hu H, Wang W, et al. Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for the enhanced production of 2-hydroxyphenazine. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 131.
- [17] He H, Ye L, Li C, et al. SbbR/SbbA, an important ArpA/AfsA-like system, regulates milbemycin production in *Streptomyces bingchenggensis*. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1064.
- [18] Vinay JU, Naik MK, Rangeshwaran R, et al. Detection of antimicrobial traits in fluorescent

- pseudomonads and molecular characterization of an antibiotic pyoluteorin. *3 Biotech*, 2016, 6(2): 1-11.
- [19] Shi H, Huang X, Wang Z, et al. Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(8): 3465-3476.
- [20] Shen J, Kong L, Li Y, et al. A LuxR family transcriptional regulator AniF promotes the production of anisomycin and its derivatives in *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis*. *Synth Syst Biotechnol*, 2019, 4(1): 40-48.
- [21] Zhang S, Fang X, Tang Q, et al. CpxR negatively regulates the production of xenocoumacin 1, a dihydroisocoumarin derivative produced by *Xenorhabdus nematophila*. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(2): e00674.
- [22] Zhou T, Yang X, Qiu D, et al. Inhibitory effects of xenocoumacin 1 on the different stages of *Phytophthora capsici* and its control effect on *Phytophthora* blight of pepper. *Bio Control*, 2017, 62(2): 151-160.
- [23] Balderas-Ruíz KA, Bustos P, et al. *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*, 2020, 10(1): 1-19.
- [24] Gu Q, Yang Y, Yuan Q, et al. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(19).
- [25] Lin F, Xue Y, Huang Z, et al. Bacillomycin D inhibits growth of *Rhizopus stolonifer* and induces defense-related mechanism in cherry tomato. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 7663-7674.
- [26] Lin F, Huang Z, et al. Effect of combined Bacillomycin D and chitosan on growth of *Rhizopus stolonifer* and *Botrytis cinerea* and cherry tomato preservation. *J Sci Food Agric*, 2020, 101(1): 229-239.
- [27] Hu Y, Yang W, Wan W, et al. Investigation on ultrasound-assisted extraction and separation of enduracidin from *streptomyces* sp. NJWGY3665. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166(4): 830-838.
- [28] Zhong TH, Zeng XM, Zhang YH, et al. Discovery, gene modification, and optimization of fermentation of an enduracidin-producing strain. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(7): 633-648.
- [29] Sun FH, Luo D, Shu D, et al. Development of an intergeneric conjugal transfer system for xinaomycins-producing *Streptomyces noursei* Xinao-4. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 12217-12230.
- [30] Zhang K, Mohsin A, Dai Y, et al. Combinatorial effect of ARTP mutagenesis and ribosome engineering on an industrial strain of *Streptomyces albus* S12 for enhanced biosynthesis of salinomycin. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 212.
- [31] Zhang X, Zhang XF, Li HP, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(12): 5387-96.
- [32] 谭剑, 熊欣, 梁万利, 等. ARTP 技术选育吩嗪-1-甲酰胺高产菌株及发酵优化. *生物技术通报*, 2016, 32(1): 174-179.
- Tan J, Xiong X, Liang WL, et al. Breeding of a phenazine-1-carboxamid-producing strain by ARTP mutation and its optimization of fermentation. *Biotechnol Info*, 2016, 32(1): 174-179 (in Chinese).
- [33] Wang LY, Huang ZL, Li G, et al. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *J Appl Microbiol*, 2010, 108(3): 851-858.
- [34] Wang HY, Zhang J, Zhang YJ, et al. Combined application of plasma mutagenesis and gene engineering leads to 5-oxomilbemycins A3/A4 as main components from *Streptomyces bingchenggensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(23): 9703-9712.
- [35] Liu L, Hu W, Li W, et al. Heavy-ion mutagenesis significantly enhances enduracidin production by *Streptomyces fungicidicus*. *Eng Life Sci*, 2019, 19(2): 112-120.
- [36] 江耀祖, 彭华松, 张雪洪. 基于 ARTP 诱变诱变和高通量筛选的绿针假单胞菌 GP72 育种方法. *微生物学通报*, 2017, 44(10): 2421-2427.
- Jiang YZ, Peng HS, Zhang XH. Breeding of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 based on ARTP mutagenesis and high throughput screening. *Microbiol China*, 2017, 44(10): 2421-2427 (in Chinese).
- [37] 金鸣, 王威, 张雪洪. 高产洛蒙真菌素洛蒙德链霉菌高通量筛选方法的建立与复合育种. *微生物*

- 学通报, 2020, 47(1): 200-209.
- Jin M, Wang W, Zhang XH. High throughput screening and combined breeding of *Streptomyces lomondensis* for high production of lomofungin. *Microbiol China*, 2020, 47(1): 200-209 (in Chinese).
- [38] Li D, Zhang J, Tian Y, et al. Enhancement of salinomycin production by ribosome engineering in *Streptomyces albus*. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(2): 276-279.
- [39] Yao R, Pan K, Peng H, et al. Engineering and systems-level analysis of *Pseudomonas chlororaphis* for production of phenazine-1-carboxamide using glycerol as the cost-effective carbon source. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11(1): 130.
- [40] Wang H, Cheng X, Liu Y, et al. Improved milbemycin production by engineering two Cytochromes P450 in *Streptomyces bingchenggensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 2935-2946.
- [41] Jin K, Zhou L, Jiang H, et al. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metab Eng*, 2015, 32: 30-38.
- [42] Liu Q, Shen Q, Bian X, et al. Simple and rapid direct cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene cluster in *Bacillus subtilis* via Red/ET recombineering. *Sci Rep*, 2016, 6: 34623.
- [43] Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Biotechnol*, 2011, 4(2): 207-215.
- [44] Xu X, Liu Y, Du G, et al. Microbial chassis development for natural product biosynthesis. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(7): 779-796.
- [45] Komatsu M, Uchiyama T, Ōmura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6): 2646-2651.
- [46] Shen X, Wang Z, Huang X, et al. Developing genome-reduced *Pseudomonas chlororaphis* strains for the production of secondary metabolites. *BMC Genomics*. 2017, 18(1): 715.
- [47] Zhu S, Duan Y, Huang Y. The application of ribosome engineering to natural product discovery and yield improvement in *Streptomyces*. *Antibiotics*, 2019, 8(3): 133.
- [48] Lv XA, Jin YY, Li YD, et al. Genome shuffling of *Streptomyces viridochromogenes* for improved production of avilamycin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(2): 641-648.
- [49] Wang Q, Zhang D, Li Y, et al. Genome shuffling and ribosome engineering of *Streptomyces actuosus* for high-yield nosiheptide production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(6): 1553-1563.
- [50] Jiang J, Sun YF, Tang X, et al. Alkaline pH shock enhanced production of validamycin A in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus*. *Bioresour Technol*, 2018, 249: 234-240.
- [51] Wei ZH, Bai L, Deng Z, et al. Enhanced production of validamycin A by H₂O₂-induced reactive oxygen species in fermentation of *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 1783-1787.
- [52] Yue SJ, Huang P, Li S, et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine from glycerol by a two-stage fermentation strategy in *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN. *J Agric Food Chem*, 2019, 68(2): 561-566.
- [53] Du X, Li Y, Zhou W, et al. Phenazine-1-carboxylic acid production in a chromosomally non-scar triple-deleted mutant *Pseudomonas aeruginosa* using statistical experimental designs to optimize yield. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(17): 7767-7778.
- [54] Fan Y, Yu Y, Jia X, et al. Cloning, expression and medium optimization of validamycin glycosyltransferase from *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* for the biotransformation of validoxylamine A to produce validamycin A using free resting cells. *Bioresour Technol*, 2013, 131: 13-20.
- [55] Jia Y, Zhong JJ. Enhanced production of ansamitocin P-3 by addition of isobutanol in fermentation of *Actinosynnema pretiosum*. *Bioresour Technol*, 2011, 102(21): 10147-10150.
- [56] Zhang B, Zhang YH, Chen Y, et al. Enhanced AmB Production in *Streptomyces nodosus* by fermentation regulation and natural combined feeding strategy. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 597.

(本文责编 陈宏宇)