

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01079

## 顶头孢霉遗传育种研究进展

胡又佳, 朱宝泉

上海医药工业研究院, 创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海 200437

**摘要:** 顶头孢霉是一类重要的工业微生物, 其发酵产物头孢菌素 C 可用来生产 7-ACA, 而后者是临床常用抗感染药物头孢类抗生素的重要中间体。头孢菌素 C 的发酵水平决定了其下游头孢类抗生素的生产水平、产品质量及价格, 因此对顶头孢霉的菌种选育工作显得尤其迫切。随着分子生物学的发展, 基因工程分子改造在遗传育种领域发挥着越来越重要的作用。文章综述了对头孢菌素 C 的生物合成以及调控的研究进展, 并将国内外对顶头孢霉进行遗传育种的结果进行了归纳总结, 提出了可以从提高头孢菌素 C 发酵水平、延伸代谢途径等不同方面对头孢菌素 C 生物合成及调控基因, 包括外源基因的导入和表达进行改造优化, 并对进一步的研究目标进行了展望, 认为可以结合比较蛋白质组和基因组改组使遗传育种所获得的工程菌尽快进入产业化。

**关键词:** 顶头孢霉; 分子育种; 菌种选育; 头孢菌素 C; 基因工程

## Research progress on strain improvement of *Acremonium chrysogenum* by genetic engineering

HU You-Jia, ZHU Bao-Quan

State Key Laboratory of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China

**Abstract:** *Acremonium chrysogenum*, cephalosporin C (CPC) producing strain, is an important industrial microorganism. CPC is used to produce 7-ACA, a major intermediate for manufacturing of many first-line anti-infectious cephalosporin-antibiotics. The fermentation level of CPC determines the production, quality and cost of its downstream products. Therefore, it is necessary to develop the strains of *A. chrysogenum*. Along with the development of molecular biology, genetic manipulation technique is becoming more and more important in the field of molecular breeding. This paper reviews the latest research progresses on CPC biosynthesis and its regulation. Genetic manipulations of *A. chrysogenum* were summarized and concluded. We suggested that strain improvement of *A. chrysogenum* by means of induction and expression of biosynthetic and regulatory genes, as well as exogenous genes, and further optimization could be applied to different aspects including CPC production enhancement and metabolic pathway elongation, etc. Future direction of this field is also proposed. We believed that incorporation of comparative proteomics and genomic shuffling with molecular breeding could lead the achievements close to industry promptly.

**Keywords:** *Acremonium chrysogenum*; molecular breeding; strain improvement; cephalosporin C; genetic engineering

收稿日期: 2011-04-18; 修回日期: 2011-07-20

基金项目: 科技部“十二五重大新药创制”项目(编号: 2011zx09203-001-06)资助

作者简介: 胡又佳, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 微生物药学。E-mail: huyj@sipi.com.cn

网络出版时间: 2011-8-24 11:11:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110824.1111.003.html>

顶头孢霉属于丝状真菌,是一类重要的工业微生物,其发酵产物头孢菌素 C(CPC)是生产头孢菌素类抗生素重要中间体 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的主要原料。

头孢菌素属于  $\beta$ -内酰胺类抗生素,但与青霉素在母核结构上不同,头孢菌素用一个二氢噻嗪环代替了青霉素的噻唑环与  $\beta$ -内酰胺环相连,正是由于这种差异,使其不易受青霉素酶的破坏,对许多青霉素耐药菌有效;此外其不良反应发生率也较青霉素和其他抗菌药物低。基于这些优点,头孢菌素类抗生素是临床上广泛使用的重要抗感染药物之一。我国从 20 世纪 60 年代开始研究开发头孢菌素类抗生素,1970 年试制成功第一个品种头孢噻吩。在过去 20 年中,头孢菌素类抗生素是国内医药市场上发展最快的品种之一,占抗感染药物销售总额的 40% 以上。

由于头孢菌素类抗生素占据了国家抗感染药物市场的重要份额,而 CPC 的产量和成本对 7-ACA 乃至头孢菌素类抗生素的市场表现起着至关重要的作用。同时,我国 CPC 的发酵水平仍然与国外先进水平有一定的差距,因此国家从“六五”、“七五”直到“十一五”都将 CPC 的发酵列为重大科技攻关项目。

随着上世纪 90 年代分子生物学的普及,也由于传统选育技术在顶头孢霉菌种选育上的局限性,分子育种逐渐成为一个对菌种进行基因改造并提高发酵水平的有力武器。本文将介绍近年来国内外在顶头孢霉遗传育种上所取得的主要进展。

## 1 CPC 的生物合成研究

国内于“八五”、“九五”攻关期间在顶头孢霉的发酵水平、发酵调控及分离纯化上取得了关键突破,实现了 CPC 的产业化。但即便如此,近年来,仍然能看到对顶头孢霉进行传统选育以提高菌种发酵水平的报道,如:通过紫外<sup>[1]</sup>或亚硝基胍(Nitrosoguanidine, NTG)<sup>[2]</sup>诱变,以及发酵工艺的优化<sup>[3]</sup>。

但不可否认的是,对菌种的选育工作已经逐渐进入了分子水平,而菌种的遗传改造首先需要对目标产物的生物合成有很清楚的了解。

顶头孢霉 CPC 生物合成机制已经研究得较为清楚,参与头孢菌素 C 生物合成的基因分为两簇:早期基因簇由 *pcbAB-pcbC* 和 *cefD1-cefD2* 组成,

*pcbAB-pcbC* 编码的蛋白负责 CPC 生物合成的前两步反应<sup>[4]</sup>, *cefD1-cefD2* 编码的蛋白负责将异青霉素 N 异构化为青霉素 N<sup>[5]</sup>;晚期基因簇由 *cefEF* 和 *cefG* 组成,所编码的蛋白负责 CPC 生物合成的最后二步反应<sup>[6]</sup>。

CPC 的生物合成途径见图 1。*pcbAB* 编码了 ACV 三肽合成酶,负责将 3 个前体氨基酸:L- $\alpha$ -氨基己二酸、L-半胱氨酸、L-缬氨酸缩合成三肽 ACV,然后在 *pcbC* 编码的异青霉素 N 合成酶的催化下环化形成异青霉素 N。异青霉素 N 再异构化形成青霉素 N,反应由两个相关基因(*cefD1-cefD2*)编码的蛋白参与。*cefEF* 基因在顶头孢霉中编码了一个独特的双功能酶—脱乙酰氧头孢菌素 C 合成酶-羟化酶,分别顺次将青霉素 N 转化成脱乙酰氧头孢菌素 C(DAOC)和脱乙酰头孢菌素 C(DAC),最后一步由 DAC 生成 CPC 则是由 *cefG* 编码的 DAC 乙酰转移酶(DAC-AT)

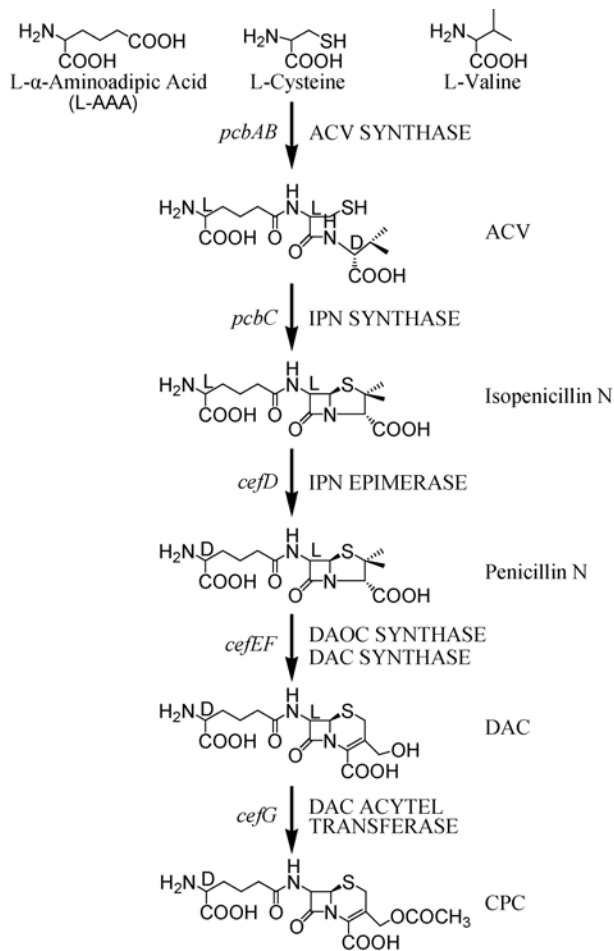


图 1 头孢菌素 C 的生物合成途径

催化的, 催化这一步骤的CefG最近已有学者发表了其晶体结构, 获得了酶与底物的结合图, 并发现 $cefG$ 编码的DAC-AT属于 $\alpha/\beta$ 水解酶家族<sup>[7]</sup>。其中,  $pcbAB$ 、 $cefEF$ 和 $cefG$ 被普遍认为是整个生物合成过程中的限速步骤<sup>[8]</sup>。

随着CPC生物合成主要途径的阐明, 近年来又不断发现了在CPC生物合成过程中起重要作用的一些调控蛋白, 如与构巢曲霉 $veA$ 基因同源的 $AcveA$ , 其调控了 $pcbAB$ 、 $pcbC$ 、 $cefD1$ 、 $cefD2$ 、 $cefEF$ 、 $cefG$ 全部 6 个主要的CPC生物合成基因的转录水平, 敲除该基因会大幅度降低CPC的产量<sup>[9]</sup>。

在CPC生物合成早期基因簇中有一个 $cefP$ 基因编码了一段跨膜蛋白, 敲除 $cefP$ 的突变株累积异青霉素N(Isopenicillin N, IPN), 而无法合成CPC<sup>[10]</sup>。实验证明, CefP蛋白是一个定位于过氧化物酶体的跨膜蛋白, 可能在CefD1-CefD2 二元复合酶在过氧化物酶体内将IPN转化为青霉素N这一步骤中发挥了调控作用。而欲补偿 $cefP$ 敲除的效应需要同时引入 $cefP$ 和 $cefR$ 基因, CefR是CefT的阻遏蛋白, 并对 $cefEF$ 的转录水平有刺激增强效应。敲除 $cefR$ 基因的突变株其 $cefEF$ 基因的转录延迟, 青霉素N的累积增加, 而导致CPC产量降低<sup>[11]</sup>。

另外, 在 $cefD1$  基因的下游还有一段 $cefM$ 基因, 敲除 $cefM$ 的突变株丧失了产CPC的能力, 累积中间产物青霉素N<sup>[12]</sup>。研究发现, CefM可能参与了青霉素N从过氧化物酶体内腔到胞浆的转运。由于CefD1-CefD2 二元复合酶将IPN转化为青霉素N是发生在过氧化物酶体, 干扰了这一步的转运使得在胞浆中合成的CPC受到抑制。

## 2 遗传育种技术方法

顶头孢霉属于丝状真菌, 由于其细胞壁的特殊性及生活史的复杂性, 其遗传操作方法相较大肠杆菌、链霉菌等难度更大, 因此, 在国内从事顶头孢霉基因工程的研究人员屈指可数。关于顶头孢霉的遗传育种技术手段, 国际上已有综述总结了从宿主改造、到转化方法、到同源重组, 再到筛选标记的研究进展<sup>[13, 14]</sup>。

我们实验室则在国内较早地介入了顶头孢霉的分子育种工作, 首先遇到的瓶颈问题就是如何高效地将外源DNA导入顶头孢霉宿主中, 常规方法是利

用聚乙二醇(PEG)介导原生质体转化将外源基因整合到顶头孢霉染色体上<sup>[15]</sup>, 但我们研究的重点在于如何更好地将成果应用于产业化, 因此, 从一开始我们就采用高产的, 或者是工业生产菌株进行针对性的研究。由于高产菌株的限制修饰系统一般来说比模式菌株更强, 因此传统的PEG介导的转化往往成功率低。

植物基因工程系统中常用的根癌农杆菌介导的转化系统已经被很多研究者用于丝状真菌的转化, 包括产黄青霉和构巢曲霉等, 我们则在国际上首次将这一方法也应用于顶头孢霉, 结果表明由根癌农杆菌介导的转化相比原生质体转化法能获得更高的转化率<sup>[16]</sup>, 而且对于顶头孢霉高产菌株同样有效。

考虑到将 $vgb$ 基因导入顶头孢霉具有相当显著的结果, 我们采用易错PCR结合DNA改组对其进行体外人工进化, 经过限氧条件下的初筛与复筛, 最终得到一个高活性的突变蛋白, 带有该突变蛋白的大肠杆菌在限氧条件下的菌体湿重较原始 $vgb$ 提高了 50%以上<sup>[17]</sup>。

从顶头孢霉染色体DNA的提取<sup>[18]</sup>, 到从顶头孢霉中获取启动子<sup>[19]</sup>, 我们通过基础方法的建立, 成功地从顶头孢霉染色体中克隆到了 $pcbAB$ - $pcbC$ 双向启动子<sup>[20]</sup>, 为我们后续的多基因导入顶头孢霉工作带来了极大的便利。

我们重点还针对CPC生物合成的最后一步, 即从DAC乙酰化成为CPC催化这一步的DAC乙酰转移酶进行了研究, 实验证明, 在体外重组表达的DAC乙酰转移酶能在乙酰辅酶A存在的情况下将DAC乙酰化生成CPC<sup>[21]</sup>。并进一步对该酶的酶学性质及动力学特性进行了研究<sup>[22]</sup>, 为如何更好地发挥其体内活性提供了理论依据。

## 3 顶头孢霉的遗传育种

在 3 个限速酶中, 由于 $pcbAB$ 基因较大, 遗传改造比较困难, 因此国际上对顶头孢霉的分子育种主要着重于CPC生物合成基因中的 $cefEF$  和 $cefG$ 。另外研究发现, 增加编码CPC外排泵基因 $cefT$ 的拷贝数也增加CPC的产量<sup>[23]</sup>。在顶头孢霉引入 $cefP$ 和 $cefR$ 使之过表达, 与上述 $cefR$ 阻断突变株不同的是, 工程菌减少了青霉素N的累积量, 同时使CPC产量也增加了近 50%<sup>[11]</sup>。

由于顶头孢霉的发酵是个极度耗氧过程, CPC 生物合成途径中的限速酶均为需氧酶, 因此, 来源于透明颤菌的血红蛋白基因 *vgb* 也引起了人们的重视, 因为据文献报道, 携带有 *vgb* 的异源表达菌株能大大提高在限氧条件下利用氧的能力, 从而改善菌株的发酵水平, 这已经在曲霉中得到证实<sup>[24]</sup>。将 *vgb* 基因导入顶头孢霉后能明显改善在发酵后期发酵液很粘稠的情况下菌丝利用氧的能力并维持更高的比生长速率与比生产速率, 这使得 CPC 的产量能提高 4~5 倍<sup>[25]</sup>, 据我们现在采用分子手段验证得出的结论, 部分国外的顶头孢霉生产菌种含有重组的 *vgb* 基因。

最早的顶头孢霉菌种改造见于 Eli Lilly 公司研究人员的报道, 他们将 *cefEF-cefG* 片段导入顶头孢霉后 CPC 的产量提高了 15%~40%, 显示了分子育种的巨大应用价值<sup>[26]</sup>。

由 RT-PCR 可发现, *cefEF* 和 *cefG* 虽然是由同一个双向启动子启动转录的头孢菌素 C 限速酶编码基因, 但在转录水平上却相差甚远, *cefG* 的转录水平要远远低于 *cefEF* 的转录水平, 造成 DAC 不能全部转化成 CPC, 在发酵产物中累积。事实上, 在 CPC 的工业生产上, CPC/DAC 的比值也是质量控制的一个标准, 因此, 将 *cefG* 单独引入顶头孢霉, 可以提高头孢菌素 C 的发酵单位 2~3 倍<sup>[27]</sup>。

另外有一项研究是将 *cefT* 基因导入顶头孢霉, 结果发现可以使 CPC 的发酵水平提高近 1 倍<sup>[28]</sup>, 推测可能是增加的 CefT 表达量使发酵产物的外排得到了加强, 更有利于降低胞内酶受终产物反馈抑制的影响从而提高最终产量。

国外学者也较早地注意到了通过对顶头孢霉进行分子水平的改造使顶头孢霉能够发酵生产 CPC 衍生的下游产品, 如通过阻断 *cefEF* 并引入来源于带小棒链霉菌的 *cefE* 基因, 可以将顶头孢霉改造为 DAOC 产生菌, 再经过两步酶催化可以获得 7-ADCA<sup>[29]</sup>。而将目前工业生产上用于 CPC 催化生成 7-ACA 的两步酶的编码基因同时转入顶头孢霉, 工程菌可以直接发酵生产 7-ACA<sup>[30]</sup>。

值得注意的, 目前文献报道的这些顶头孢霉的遗传改造均针对的是模式菌株 C10 等, 出发菌本身的发酵水平比较低, 约为 1 mg/mL 左右, 远远低于 CPC 的工业生产水平, 因此虽然以上报道在提高顶

头孢霉发酵水平以及发酵产物的改造上取得了不错的结果, 但离菌种的产业化仍相当遥远。

对于菌种的遗传改造来说, 除了外源基因的导入, 内源基因的阻断或沉默也是一个常用手段, 近年来新兴的 RNAi 技术可以作为同源重组的一种替代方法实现目的基因的表达沉默。顶头孢霉中的 RNAi 现象由 Janus 等<sup>[31]</sup>首次报道, 最近, Ullan 等<sup>[32]</sup>用 RNAi 技术沉默产黄青霉中的 *pcbC* 基因和顶头孢霉中的 *cefEF* 基因, 这些实验表明在丝状真菌顶头孢霉体内实现 RNA 干扰具有很大的可行性。

另有一项研究则从其他方面拓展了顶头孢霉遗传育种的应用领域。CefD1-cefD2 阻断突变株由于缺失了 CefD1-CefD2 二元复合酶, 无法利用其自身的差向异构系统将 IPN 转化为青霉素 N, 使得 IPN 大量累积, 该突变株 TD189 的 IPN 累积量超过了 650  $\mu\text{g/mL}$ , 几乎是出发菌株 C10 全部的 CPC 发酵量。而有了这一突变株, 研究人员可以将以前由于极度不稳定而从未能纯化的 IPN 经过几步层析获得了纯品, 并研究了其在各种条件下的稳定性和半衰期, 为进一步的研究奠定了基础<sup>[33]</sup>。

而我们则关注于如何将成果应用于产业化, 因此, 我们针对高产菌株进行了遗传育种的研究, 将克隆到的 *cefG/cefEF/cefT/vgb* 以不同的组合分别引入顶头孢霉中构建了不同的工程菌, 结果发现, 对于 CPC 高产菌株来说, 引入额外拷贝的 *cefG* 基因对于 CPC 的发酵水平仍具有明显的提高, 不同的转化子有不同的提高幅度, 其中提高幅度最高的达 100% 以上。相比较而言, *vgb* 基因则没有那么明显的效果, 但与仅仅引入一个拷贝的 *cefG* 工程菌相比, 再额外引入一个拷贝的 *vgb* 基因可以使 CPC 的发酵水平进一步提高 30% 左右。同时我们也发现, 引入 *cefEF* 和 *cefT* 对于 CPC 高产菌株来说几乎没有什么作用, 这一方面说明了模式菌株与高产菌株间的区别, 同时也可能是由于高产菌株已经经过了几轮的诱变育种, 内源性的 *cefEF* 和 *cefT* 基因可能已经达到了相当高的活性<sup>[34]</sup>。

我们还通过构建了一个含可形成 *cefG* 双链 RNA 转录单元的 RNAi 载体, 并将其导入 CPC 高产菌株中。定量 PCR 分析转化子 *cefG* 的转录水平, 检测到其中两个转化子的 RNA 转录水平在发酵第四天较出发菌株降低了 80% 以上。HPLC 分析它们的 CPC 发酵水



平较出发菌株分别降低 34.6%和 28.8%<sup>[35]</sup>。这一研究结果不仅证明了RNAi应用于顶头孢霉工业生产菌株的可行性, 而且为在顶头孢霉中重构宿主菌的代谢途径, 为其代谢产生新的化合物打下了基础。

## 4 顶头孢霉遗传育种的产业化研究

对顶头孢霉高产菌株分子改造的成功使得我们可以将这一经验应用于 CPC 工业生产菌株, 虽然发酵水平不能成倍提高, 但引入 *cefG* 和 *vgb* 后得到的工程菌平均发酵单位也能提高约 20%, 显示了强大的产业化潜力。

顶头孢霉的发酵产物CPC是生产 7-ACA的原料, 目前常用的 7-ACA生产工艺是将CPC通过化学半合成来生产 7-ACA, 由于相比化学法具有更好的环境保护, 体现了生产工艺的先进性。国内外都已有用两步酶法从CPC转化成 7-ACA的报道及产业化应用<sup>[36]</sup>。目前国际上研究的热点是通过一步酶法转化从CPC来生产 7-ACA, 尽管这一工艺比二步酶法更简便, 但由于尚未解决CPC酰基转移酶对底物CPC的特异性这一关键问题<sup>[37]</sup>, 因此尚未能应用于产业化。

无论是二步酶法还是一步酶法, 都需要发酵获得 CPC 后再通过体外酶催化反应来生产 7-ACA。我们则设想能否将 CPC 酰基转移酶基因引入顶头孢霉从而使经改造的顶头孢霉自身就具备发酵生产 7-ACA 的能力, 从而进一步提升 7-ACA 生产工艺的技术含量。

我们针对顶头孢霉的密码子偏爱性设计了CPC酰基转移酶的编码基因, 将其导入顶头孢霉工业生产菌株中, 结果表明, 在*pcbC*启动子的控制下, CPC酰基转移酶能够在顶头孢霉中表达且具有生物学活性, 能够将原宿主菌发酵产生的CPC在体内直接转化成 7-ACA, 使得工程菌具备直接发酵产生 7-ACA 的能力<sup>[38]</sup>。以在大肠杆菌中表达的重组头孢菌素C酰基转移酶的酶学性质为基础, 对工程菌进行了培养基与发酵工艺的初步优化, 即可将工程菌的 7-ACA发酵水平提高 7 倍以上<sup>[39]</sup>。目前以头孢菌素C生产菌株作为对照, 我们所获得的 7-ACA工程菌已经能够将 30%的头孢菌素C在发酵过程中直接转化为 7-ACA, 通过构建更强的转录启动单元及多拷贝整合重组子, 并结合传统育种的工艺优化, 有望获

得国际领先的 7-ACA一步发酵生产工艺。

## 5 展望

基因组改组作为一个新的菌种选育遗传改造手段, 问世之初就受到工业微生物界的广泛关注<sup>[40]</sup>。这项技术已经在细菌和链霉菌中得到广泛应用, 且有相当多的代谢产物通过基因组改组获得了发酵水平的大幅度提高, 但很少见到有丝状真菌利用基因组改组技术进行菌种选育的研究, 或许是因为遗传操作手段的不成熟, 在技术相对比较成熟的斜卧青霉中我们注意到有通过基因组改组而提高了其纤维素酶产量约 40%的报道<sup>[41]</sup>, 但这仅是针对的初级代谢产物, 且相对来说, 遗传操作系统对顶头孢霉来说更加缺乏。

笔者认为, 经过初步基因改造的顶头孢霉工程菌, 其外源基因是随机整合于染色体上, 而经过初步筛选获得的工程菌已经剔除了对菌种的生长以及产物的合成不利的突变, 有益的突变株之间进行基因组改组可以有效地提高菌种选育的水平和幅度, 借助已有的方法基础, 基因组改组技术相信能在顶头孢霉的菌种选育中发挥其独特的作用, 而本实验室也正在进行相关的研究。

目前对顶头孢霉中的CPC生物合成已经研究得较透彻, 但针对其调控或初级代谢对其的影响方面的基础研究仍有缺乏, 仅有几个CPC生物合成基因及少数几个调控基因被发现和鉴定<sup>[42]</sup>。自从第一个丝状真菌构巢曲霉的全基因组被测序以来, 已陆续有近 10 个丝状真菌的全基因组测序完成<sup>[43]</sup>。最近, 上海人类基因组南方中心完成了顶头孢霉基因组的框架图<sup>[42]</sup>, 为全面了解顶头孢霉的遗传机制提供了条件。同时我们也注意到, 近年来, 比较蛋白质组除了在研究疾病的发生和发展机理研究上起到重要的作用之外, 在微生物(尤其是抗生素产生菌)的遗传育种上也能够发挥其独特的优势。由于微生物次级代谢产物的合成、从初级代谢向次级代谢的转换仍然是一个比较复杂的问题, 涉及到代谢工程及系统生物学<sup>[44]</sup>, 并非仅仅几个次级代谢生物合成基因就能达到最好的效果, 笔者认为可通过比较蛋白质组学并结合目前已有的顶头孢霉的基因组序列研究对发酵水平起直接影响作用的蛋白质, 并已经开始着手这方面的工作。

全基因组测序并不能解释生命活动的全部, 而通过比较蛋白质组研究去发现在微生物生长代谢及抗生素生产过程中起关键作用的酶及蛋白质这两年已渐有报道, 最典型的两个例子如产生最多种类抗生素的链霉菌中, 研究人员通过链霉菌模式菌株天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的蛋白质组研究, 鉴定了 345 个蛋白点, 并经过不同阶段的比较蛋白质组研究阐明了链霉菌是如何从初级代谢向次级代谢转换的机理<sup>[45]</sup>, 为链霉菌的遗传育种开辟了一个新的研究方向。另一个例子则是遗传操作相对比较成熟的产黄青霉中, 研究人员通过比较 3 株不同青霉素发酵水平的蛋白质组, 从中鉴定了 950 个蛋白点, 并发现前体的生物合成、应激响应蛋白和磷酸戊糖代谢途径中的酶的表达变化与发酵单位有着最直接的联系<sup>[46]</sup>。

以上例子也为顶头孢霉的比较蛋白质组学提供了研究方向, 顶头孢霉的遗传选育方向应为基因组改组、次级代谢生物合成表达的提高、前体代谢及能量代谢网络的完善并结合代谢工程得到的最优方案。综上所述, 在顶头孢霉的菌种选育上还有相当多的基础工作需要推进, 但也显示了相当大的潜力, 相信通过不懈的努力, 采用遗传育种手段所获得的顶头孢霉工程菌将在产业化生产上表现出非凡的价值。

#### 参考文献(References):

- [1] Ellaiah P, Adinarayana K, Chand GM, Subramanyam GS, Srinivasulu B. Strain improvement studies for cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*. *Pharmazie*, 2002, 57(7): 489–490. [DOI](#)
- [2] Ellaiah P, Kumar JP, Saisha V, Sumitra JJ, Vaishali P. Strain improvement studies on production of cephalosporin C from *Acremonium chrysogenum* ATCC 48272. *Hindustan Antibiot Bull*, 2003, 45–46(1–4): 11–15. [DOI](#)
- [3] Lee MS, Lim JS, Kim CH, Oh KK, Yang DR, Kim SW. Enhancement of cephalosporin C production by cultivation of *Cephalosporium acremonium* M25 using a mixture of inocula. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32(6): 402–406. [DOI](#)
- [4] Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E, Martín JF. Characterization of the *Cephalosporium acremonium pcbAB* gene encoding alpha-aminoacyl-tRNA synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J Bacteriol*, 1991, 173(7): 2354–2365. [DOI](#)
- [5] Martín JF, Ullán RV, Casqueiro J. Novel genes involved in cephalosporin biosynthesis: the three-component isopenicillin N epimerase system. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 88: 91–109. [DOI](#)
- [6] Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Martín JF. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J Bacteriol*, 1992, 174(9): 3056–3064. [DOI](#)
- [7] Lejon S, Ellis J, Valegard K. The last step in cephalosporin C formation revealed: crystal structures of deacetylcephalosporin C acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum* in complexes with reaction intermediates. *J Mol Biol*, 2008, 377(3): 935–944. [DOI](#)
- [8] Brakhage AA, Thön M, Spröte P, Scharf DH, Al-Abdallah Q, Wolke SM, Hortschansky P. Aspects on evolution of fungal  $\beta$ -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*, 2009, 70(15–16): 1801–1811. [DOI](#)
- [9] Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Kürnsteiner H, Kück U. A homologue of the *Aspergillus velvet* gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(10): 3412–3422. [DOI](#)
- [10] Ullán RV, Teixeira F, Guerra SM, Vaca I, Martín JF. Characterization of a novel peroxisome membrane protein essential for conversion of isopenicillin N into cephalosporin C. *Biochem J*, 2010, 432(2): 227–236. [DOI](#)
- [11] Teixeira F, Ullán RV, Fernández-Lafuente R, Martín JF. CefR modulates transporters of  $\beta$ -lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*. *Metab Eng*, 2011, doi:10.1016/j.ymben.2011.06.004. [DOI](#)
- [12] Teixeira F, Ullán RV, Guerra SM, García-Estrada C, Vaca I, Martín JF. The transporter CefM involved in translocation of biosynthetic intermediates is essential for cephalosporin production. *Biochem J*, 2009, 418(1): 113–124. [DOI](#)
- [13] Kück U, Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(1): 51–62. [DOI](#)
- [14] Meyer V. Genetic engineering of filamentous fungi—progress, obstacles and future trends. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(2): 177–185. [DOI](#)
- [15] Skatrud PL, Queener SW, Carr LG, Fisher DL. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr Genet*, 1987, 12(5): 337–348. [DOI](#)

- [16] Xu W, Zhu CB, Zhu BQ. An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous genes into *Cephalosporium acremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Microbiol Biotechnol*, 2005, 15(4): 683–688. [DOI](#)
- [17] 袁宁, 胡又佳, 朱春宝 朱宝泉. 透明颤菌血红蛋白的DNA改组研究. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(11): 14–19. [DOI](#)
- [18] 徐威, 朱春宝, 朱宝泉 姚新生. 丝状真菌顶头孢霉染色体DNA的提取. *沈阳药科大学学报*, 2004, 21(3): 226–229. [DOI](#)
- [19] 张丕燕, 朱春宝, 朱宝泉 赵文杰. 一个从顶头孢霉中筛选具有启动子功能的DNA片段的简便方法. *微生物学通报*, 2004, 31(3): 97–100. [DOI](#)
- [20] 张丕燕, 朱春宝 朱宝泉. 顶头孢霉*pcbAB-pcbC*双向启动子区域的克隆与应用. *微生物学报*, 2004, 44(2): 255–257. [DOI](#)
- [21] 陈丹, 袁宁, 胡又佳, 朱春宝 赵文杰, 朱宝泉. 顶头孢霉乙酰转移酶基因的克隆、表达和活性研究. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(7): 395–399. [DOI](#)
- [22] 陈丹, 胡又佳, 朱春宝 朱宝泉. 顶头孢霉乙酰转移酶的可溶性表达优化和酶动力学. *中国医药工业杂志*, 2007, 38(9): 625–628. [DOI](#)
- [23] Nijland JG, Kovalchuk A, van den Berg MA, Bovenberg RAL, Driessen AJM. Expression of the transporter encoded by the *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* increases cephalosporin production in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol*, 2008, 45(10): 1415–1421. [DOI](#)
- [24] Lin YH, Li YF, Huang MC, Tsai YC. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Aspergillus terreus* to alleviate the effect of a short break in aeration during culture. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(13): 1067–1072. [DOI](#)
- [25] DeModena JA, Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Fachini RA, Galazzo JL, Hughes DE, Martín JF. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. *Bio/Technology*, 1993, 11(8): 926–929. [DOI](#)
- [26] Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, Cantwell CA, Fisher DL, Chapman JL, Queener SW. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology*, 1989, 7(5): 477–485. [DOI](#)
- [27] Gutiérrez S, Velasco J, Marcos AT, Fernández FJ, Fierro F, Barredo JL, Díez B, Martín JF. Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(5): 606–614. [DOI](#)
- [28] Ullán RV, Liu G, Casqueiro J, Gutiérrez S, Bañuelos O, Martín JF. The *cefT* gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267(5): 673–683. [DOI](#)
- [29] Velasco J, Luis Adrio J, Ángel Moreno M, Díez B, Soler G, Barredo JL. Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(8): 857–861. [DOI](#)
- [30] Isogai T, Fukagawa M, Aramori I, Iwami M, Kojo H, Ono T, Ueda Y, Kohsaka M, Imanaka H. Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology (N Y)*, 1991, 9(2): 188–191. [DOI](#)
- [31] Janus D, Hoff B, Hofmann E, Kück U. An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(3): 962–970. [DOI](#)
- [32] Ullán RV, Godio RP, Teixeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltrer R, Kosalkova K, Martín JF. RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(2): 209–218. [DOI](#)
- [33] Vaca I, Casqueiro J, Ullán RV, Rumbero Á, Chávez R, Martín JF. A preparative method for the purification of isopenicillin N from genetically blocked *Acremonium chrysogenum* strain TD189: studies on the degradation kinetics and storage conditions. *J Antibiot*, 2011, 64(6): 447–451. [DOI](#)
- [34] Liu Y, Gong GH, Xie LP, Yuan N, Zhu CB, Zhu BQ, Hu YJ. Improvement of cephalosporin C production by recombinant DNA integration in *Acremonium chrysogenum*. *Mol Biotechnol*, 2010, 44(2): 101–109. [DOI](#)
- [35] 龚桂花, 刘艳, 胡又佳, 朱春宝 朱宝泉. RNAi技术降低头孢菌素C工业生产菌株中*cefG*基因的转录. *生物技术通报*, 2010, (10): 193–197. [DOI](#)
- [36] Conlon HD, Baqai J, Baker K, Shen YQ, Wong BL, Noiles R, Rausch CW. Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 46(6): 510–513. [DOI](#)
- [37] Sonawane VC. Enzymatic modifications of cephalosporins by cephalosporin acylase and other enzymes. *Crit Rev Biotechnol*, 2006, 26(2): 95–120. [DOI](#)
- [38] 刘艳, 龚桂花, 胡又佳, 朱春宝 朱宝泉. 头孢菌素C酰基转移酶在顶头孢霉中的表达. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(12): 902–906. [DOI](#)
- [39] Liu Y, Gong GH, Zhu CB, Zhu BQ, Hu YJ. Environmentally safe production of 7-ACA by recombinant *Acremonium chrysogenum*. *Curr Microbiol*, 2010, 61(6): 609–614. [DOI](#)
- [40] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WPC, del Cardayre SB. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 2002, 415(6872): 644–646. [DOI](#)
- [41] Cheng Y, Song X, Qin Y, Qu Y. Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(6): 1837–1846. [DOI](#)



- [42] Schmitt EK, Hoff B, Kück U. Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004, 88: 1–43. [DOI](#)
- [43] Jones MG. The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? *Microbiology*, 2007, 153(Pt 1): 1–6. [DOI](#)
- [44] Thykaer J, Nielsen J. Metabolic engineering of  $\beta$ -lactam production. *Metab Eng*, 2003, 5(1): 56–69. [DOI](#)
- [45] Manteca A, Sanchez J, Jung HR, Schwämmle V, Jensen ON. Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(7): 1423–1436. [DOI](#)
- [46] Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(6): 1182–1198. [DOI](#)

## •读者来信•

### 关于细菌 spore 的中文名称, 建议统一使用“芽胞”

《遗传》编辑部:

近来在审稿过程中遇到了“spore”的中文名称问题, 我曾经建议细菌中的“spore”中文名称使用“芽胞”而不是“芽孢”, 具体建议如下, 供《遗传》杂志参考。

A. 在全国科学技术名词审定委员会、微生物学名词审定委员会编辑出版的《微生物学名词》(1988, 科学出版社)中, 关于细菌 spore 这一名词的中文名称, 使用的是“芽胞”。理由是, “孢”指真菌和放线菌中的“孢子”, 是指繁殖体; 而细菌中的“芽胞”是指分化体, 不是繁殖体, 二者有本质的区别, 其差异是有科学意义的。就像中文当中有一词多意的现象一样, spore 也可一词多意。

B. 许多教材和书籍在依据《微生物学名词》使用“芽胞”。尽管“芽胞”使用面还不够大, 但已经有一些教材在使用, 特别是一些与医学相关的出版社出版的教材, 并且“芽胞”的使用呈现越来越广的趋势。如微生物学(中国医药出版社, 2001), 微生物学与免疫学(人民卫生出版社, 2000), 微生物学与微生物学实验(人民卫生出版社, 1991), 细胞微生物学(第二军医大学出版社, 2004), 普通微生物学(中国农业大学, 1992), 当代疫苗学(高等教育出版社, 2001), 微生物学(中国医药科技出版社, 2004), 协和听课笔记: 微生物学(人民军医出版社, 2007), 微生物学实验(高等教育出版社 2007)。综合性大学的规划教材《微生物学》已经使用“芽胞”。教材的影响力远超过国家规范的影响力, 该书的取向和选择将对上述规范的实施具有非常重要的作用。武汉大学沈萍教授编写的《微生物学》在以前的版本中一直使用“芽孢”, 经过本人与沈萍教授交流, 沈教授已经在最新版的《微生物学》教材中使用“芽胞”(沈萍和陈向东主编, 高等教育出版社, 2009. 8, 普通高等教育“十一五”国家级规划教材)。此外, 还有许多专业书籍在使用“芽胞”, 近期的有, 微生物实验技术与临床(郑州大学出版社, 2010), 中国海洋微生物菌种目录(化学工业出版社, 2010), 中国高等学校菌种目录(化学工业出版社, 2009), 微生物蛋白质组学(化学工业出版社, 2009)。

C. 在网上搜索的电子教案或教学资料中, 找到许多使用“芽胞”的例子, 如上海交通大学、吉林大学、哈尔滨医科大学、第二军医大学、天津医科大学、中国医科大学、塔里木大学、山东大学、华东理工大学、江南大学、南昌大学、南开大学、西安交通大学、郑州大学等。

D. 在因特网如 google([www.google.com](http://www.google.com))和百度([www.baidu.com](http://www.baidu.com))上输入“芽胞”进行搜索, 可发现海量的使用“芽胞”例子。

E. 部分学术期刊在使用“芽胞”。华中农业大学自看到《微生物学名词》后, 于 1991 年开始使用“芽胞”, 并且投递给《微生物学报》、《生物工程学报》和《农业生物技术学报》等期刊的论文也被接受使用“芽胞”(尽管这些学报都同时还使用“芽孢”)。《微生物学报》在网站于 2010-12-28 重申“《微生物学报》规范微生物学名词的使用”, 要严格按照全国科学技术名词审定委员会审定、公布的名词进行使用, 并且近日已经将本信件相关的内容挂在网站上。

F. 2006 年 4 月成立了以中国科学院微生物研究所程光胜为主任的新一届微生物学名词审定委员会, 该委员会在 2006 年 10 月的工作会议上决定维持 1988 年版《微生物学名词》(1988, 科学出版社)中关于芽胞的用词方式。

此信于 2009 年就撰写好了, 值此《遗传》杂志出版微生物遗传学专辑之时, 做了一些修订和更新, 供编辑部和读者参考, 如有不当之处还望批评指正。



华中农业大学生命科学技术学院教授 孙明博士  
2011 年 9 月 20 日