

# 阿维菌素的中国“智”造

文莹<sup>1</sup>, 张立新<sup>2</sup>

1. 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

2. 华东理工大学, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

**摘要:** 阿维菌素(ivermectins)是由微生物发酵生产的高效低毒生物杀虫剂, 在粮食安全、农产品安全、畜牧业和医药健康等领域具有重大意义。其衍生物伊维菌素(ivermectins)可有效治疗河盲症, 帮助超过 2 亿非洲人免于失明。我国的阿维菌素产业利用遗传学改造手段深入挖掘微生物的潜能, 大幅度提高了底物利用率、目标产物得率和反应器产率, 打破了美国默克公司的产品垄断, 从无到有, 从弱到强, 直至独占全球市场。阿维菌素的生物“智”造不但成为实验室技术向产业成功转化的典范, 为其他微生物天然产物药物的研发提供了可借鉴的策略和方法, 而且得到广泛的国际认可。本文介绍了阿维菌素的发现、基础及应用研究的发展历程, 尤其是中国“智”造的历史沿革, 旨在为我国微生物药物的产业化发展提供参考和借鉴。

**关键词:** 阿维菌素; 伊维菌素; 遗传学改造; 产量提高

## Avermectins, intelligently made in China

Ying Wen<sup>1</sup>, Lixin Zhang<sup>2</sup>

1. State Key Laboratory of Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** Avermectins, are pesticides of fermentation products with high efficacy and low toxicity and play important roles in food and agricultural product safety, animal and human health. Ivermectins, the derivatives of avermectins, are used to treat Onchocerciasis, also known as River Blindness. Thanks to these discoveries, more than 200 million Africans are lucky to be exempted from blindness. Great efforts have been made on better understanding of the microbial production system of avermectins through genetic engineering in China. Starting from scratch, Chinese avermectin industry has experienced a comprehensive technological innovation with significantly improved yield, titer and productivity of

收稿日期: 2018-07-10; 修回日期: 2018-09-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31430002, 31320103911, 31500690, 31670052, 31600017), 国家重点研发项目(编号: 2017YFD0201207), 华东理工大学交叉团队项目(编号: 22221818014), 山东省重点研发项目(编号: ZR2017ZB0206)和泰山学者计划项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31430002, 31320103911, 31500690, 31670052, 31600017), the National Key Research And Development Program of China (No. 2017YFD0201207), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 22221818014), the Major Basic Program of the Natural science Foundation of Shandong Province (No. ZR2017ZB0206), and the Shandong Taishan Scholar Program of China for L.Z.]

作者简介: 文莹, 博士, 教授, 研究方向: 链霉菌抗生素生物合成调控及代谢工程育种。E-mail: wen@cau.edu.cn

通讯作者: 张立新, 博士, 教授, 研究方向: 微生物药物。E-mail: lxzhang@ecust.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz. 18-194

网络出版时间: 2018/9/14 12:02:46

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180914.1202.002.html>

avermectins, and became the exclusive supplier for the global market. The success of avermectin industry innovation in China not only shed lights on the intelligent yield improvement of other microbial natural product drugs, but also gained wide international recognition. We provide here an overview of the discovery and development of basic and applied research of avermectins, especially historical evolution of avermectins made in China, which will benefit industrial development of microbial drugs in China.

**Keywords:** avermectins; ivermectins; genetic engineering; yield improvement

2015 年,我国学者屠呦呦因为发现了青蒿素、爱尔兰学者坎贝尔(Campbell)和日本学者大村智(Ōmura)因为发现了阿维菌素而共同分享了当年的诺贝尔生理学或医学奖,这是继青霉素和链霉素之后,以阿维菌素为代表的微生物药物第 3 次受到诺贝尔奖的青睐。阿维菌素自 20 世纪 80 年代由美国默克(Merck)公司投放市场以来,目前已成为全球用量最大、使用技术最成熟的绿色生物农药。阿维菌素不仅在农业生产上有广泛的应用,对许多危害农作物的害虫都有活性,而且其衍生物伊维菌素还可以有效治疗严重威胁人类健康的盘尾丝虫病(又称河盲症)和淋巴丝虫病(又称象皮病)。中国众多微生物学家、药学家、发酵工程专家等从“七五”至“九五”经过连续攻关,已经实现了阿维菌素的产业化。同时,随着遗传学、代谢工程和合成生物学等新技术方法的发展和应用,我国阿维菌素产业化竞争能力不断提升,生产成本不断降低,最终打破了默克公司的垄断,使阿维菌素逐渐从“贵族农药”走向廉价的“平民使用药”,打上了中国“智”造的标签。截至 2015 年 9 月,我国已有 168 项阿维菌素相关专利获得授权,并成为世界上阿维菌素的唯一生产国,年产量超过 3500 吨<sup>[1]</sup>。我国科学家对阿维菌素的研究和改造,也成为国内抗生素领域内一个“依靠创新、后来居上、直至引领世界”产业升级的成功范例。本文重点介绍阿维菌素的发现、基础及应用研究的发展历程,尤其是中国“智”造的历史沿革,为我国微生物药物的产业化发展提供参考和借鉴。

## 1 阿维菌素的发现

阿维菌素的产生菌最早在 1974 年由日本北里研究所的大村智从静岗县的一个土壤样品中分离得

到,并寄往了美国默克公司。1975 年,默克公司的寄生虫学专家坎贝尔和他的团队经小鼠感染模型筛选,发现该菌可产生具有强烈杀虫活性的化合物。经分类鉴定,该菌属于链霉菌属的一个新种,被命名为阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)。之后,默克公司的米勒(Miller)团队从阿维链霉菌的发酵培养物中分离纯化了杀虫活性化合物—阿维菌素,为一组结构相似的十六元环大环内酯类抗生素,共包含 8 个组分:A1a、A1b、A2a、A2b、B1a、B1b、B2a 和 B2b,这些组分的区别在于 C5、C22~C23 和 C25 位所连接的基团不同(图 1)。与此同时,坎贝尔团队对含量最高、活性最强的 B1a 组分进行了详细研究,发现其对多种动物体内外寄生虫均具有很强的杀虫活性。1979 年,大村智、米勒和坎贝尔 3 个团队在学术期刊 *Antimicrob Agents Chemother* 上发表文章,分别报道了阿维菌素产生菌的分离与发酵、活性物质的色谱分离和 B1a 组分的活性研究成果<sup>[2~4]</sup>。伊维菌素是阿维菌素 B1 组分在 C22, 23 位的双氢还原产物(图 1)。在后续研究中,坎贝尔团队发现伊维菌素的毒性更低,使用更安全<sup>[5,6]</sup>。

阿维菌素和伊维菌素具有独特的作用机制,可导致线虫及节肢动物类寄生虫麻痹而死,但对哺乳动物的毒性很低,安全性很高<sup>[7~9]</sup>。作为一种绿色生物农药,阿维菌素几乎可以杀灭所有与农业虫害有关的线虫和节肢动物,而且与其他化学杀虫药无交叉抗性,不易引起耐药性,使用剂量少,效用时间长,可在日光下迅速分解,残留量低,因此对环境友好。由于阿维菌素类化合物具有广谱、高效、低毒的杀虫活性,因此它的发现标志着一类新型杀虫药物的诞生。默克公司首先将阿维菌素和伊维菌素商品化,于 1981、1985 年分别作为兽药和农药投放市场,都取得了巨大成功。人用伊维菌素也于 1987

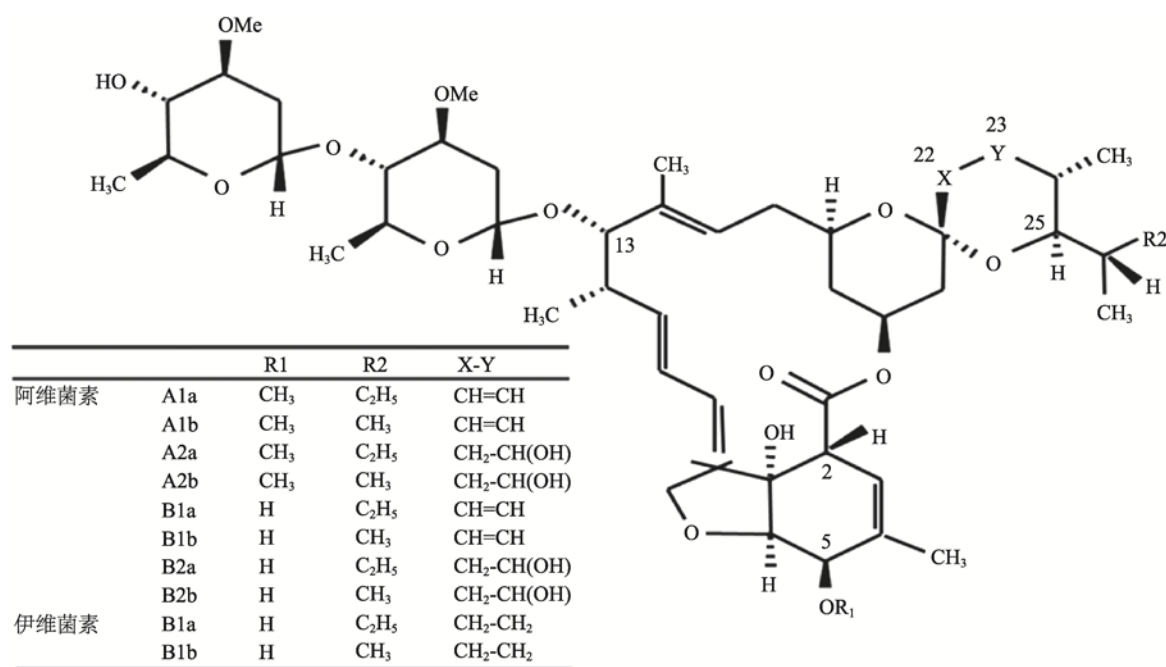


图 1 阿维菌素及伊维菌素的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of avermectins and ivermectins

年在法国上市。同年，默克公司 CEO 瓦杰洛斯 (Vagelos) 宣布与世界银行等联合组织实施伊维菌素捐赠计划，使之成为消除威胁数亿人河盲症的利器。自阿维菌素和伊维菌素上市后的 20 余年时间里，默克公司每年获利约 8 亿美元，并根据合同支付给大村智累计达 2.3 亿美元的特许权费。

过去一直认为阿维菌素类药物没有抑菌活性，但近期发现，阿维菌素及其衍生物伊维菌素等还具有抗结核分枝杆菌的活性，尤其对具有多药抗性的临床菌株有效<sup>[10]</sup>。阿维菌素 B1a 还可以和甲氧西林协同作用于抗耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌<sup>[11]</sup>。此外，伊维菌素抗病毒、抗肿瘤活性的研究也在进行中<sup>[12,13]</sup>，发现其作用机制不仅仅是之前报道的神经毒性，使该类药物的应用范围进一步拓展，将可能为人类健康做出更大的贡献。

## 2 遗传学改造揭示阿维菌素的生物合成及其调控机制

由于阿维菌素的重要应用价值，自其发现以来，已形成了一个重要的抗生素研究领域。早期研究以美国默克公司、日本北里研究所和北里大学为主，

后期中国学者逐渐加入，从跟跑到并跑再到领跑，共同推动了阿维菌素基础与应用研究的快速发展。

### 2.1 阿维菌素的复杂生物合成过程

从 20 世纪 80 年代起，大村智团队利用十几年时间基本阐明了阿维菌素的生物合成途径<sup>[14]</sup>，并于 1999 年完成了其生物合成基因簇的测序及功能分析<sup>[15]</sup>。

阿维菌素生物合成分为 3 个步骤：(1) 聚酮合酶催化 7 个乙酸盐、5 个丙酸盐和 1 个带有支链的脂肪酸起始单元首尾聚合形成聚酮链，聚酮链从聚酮合酶上释放出来通过内酯键环化形成起始糖苷配基，即 6,8a-开环-6,8a-脱氧-5-氧阿维菌素糖苷配基。阿维菌素的“a”和“b”组分由不同的起始单元合成，“a”组分的 2-甲基丁酰基(C25~C28)和“b”组分的异丁酰基(C25~C27)分别由 L-异亮氨酸和 L-缬氨酸衍生而成。(2) 起始糖苷配基经过一系列的修饰(包括氧化、环化、还原、甲基化)转化为阿维菌素糖苷配基。(3) 阿维菌素糖苷配基经糖基化修饰形成阿维菌素<sup>[16]</sup>(图 2)。

阿维菌素生物合成基因簇全长 82 kb，共编码 18 个 ORFs (图 2)。其中 4 个大的 ORF—*aveA1*、*aveA2*、*aveA3* 和 *aveA4* 的编码产物共同组成聚酮合

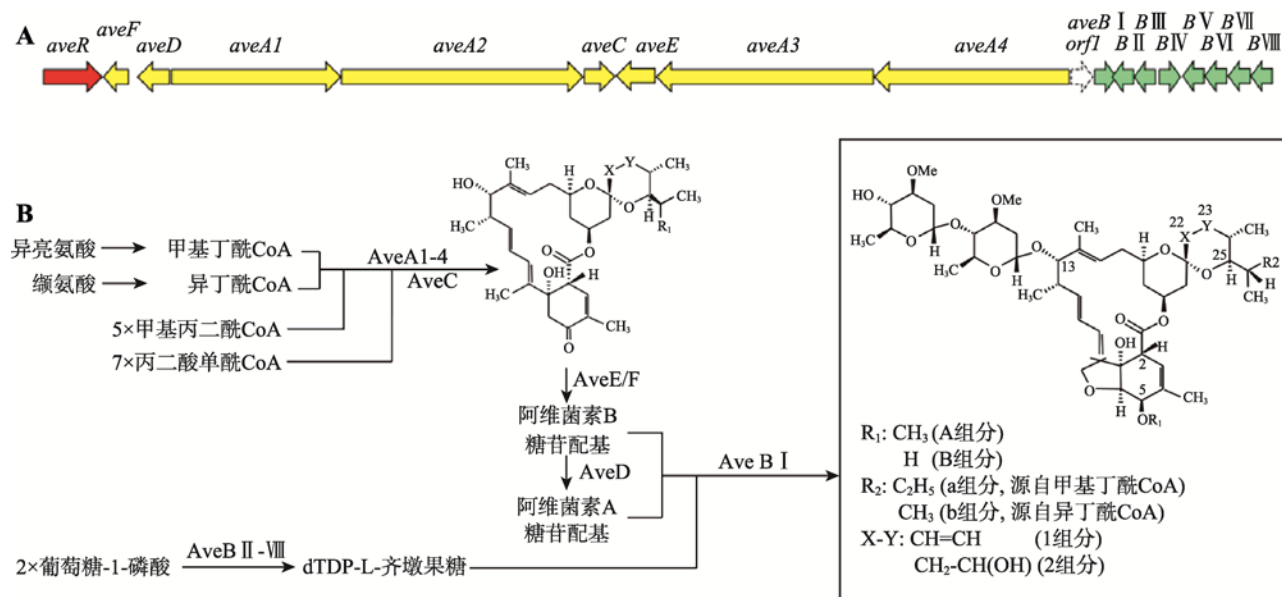


图 2 阿维菌素的生物合成

Fig. 2 Biosynthesis of avermectins

A: 阿维菌素生物合成基因簇。黄箭头: 参与阿维菌素糖苷配基合成的基因; 绿箭头: 参与糖苷配基糖基化的基因; 红箭头: 调控基因; 虚线箭头: 不参与阿维菌素合成的基因。B: 阿维菌素生物合成途径。

酶, 参与阿维菌素合成的第一个步骤, 负责阿维菌素起始糖苷配基的合成。阿维菌素“1”组分在 C22~C23 之间为含有羟基的单键, “2”组分为双键。之前研究表明 *aveC* 以某种方式决定“1”和“2”组分的比例<sup>[17,18]</sup>, 但其具体功能直到 2013 年才由中国科学院上海有机化学研究所刘文团队阐明。*aveC* 编码双功能酶 AveC, 催化 C22~C23 之间的脱水和 C17~C25 螺缩醛酮的形成, 该酶的两个活性中心独立发挥作用, 一个活性中心的改变并不影响另一个活性中心的功能<sup>[19]</sup>。脱水作用使 C22~C23 之间的单键变成双键, 因此 AveC 是决定“1”和“2”组分比例的一个关键酶, 可通过突变 *aveC* 改变“1”和“2”组分的含量<sup>[17,18]</sup>。AveC 催化之后, 由 *aveE* 编码的细胞色素 P450 羟化酶通过引入氧原子使 C6 和 C8a 间的呋喃环闭合, 再由 *aveF* 编码的 C5-酮基还原酶使 C5 位的酮基还原为羟基, 形成“B”组分的糖苷配基。紧邻 *aveF* 上游的 *aveD* 编码 C5-O-甲基转移酶, 负责将 C5 位甲基化, 形成“A”组分的糖苷配基。糖基化修饰对阿维菌素的杀虫活性至关重要, 位于基因簇右侧的 *aveB* -*aveB* 负责合成和转移齐墩果糖。首先, AveB 和 AveB 催化葡萄糖-1-

磷酸形成 TDP-4-酮-6-脱氧葡萄糖, 然后在 AveB - AveB 的作用下合成 dTDP-L-齐墩果糖, 最后由糖基转移酶 AveB 将 dTDP-L-齐墩果糖连接到阿维菌素糖苷配基的 C13 和 C4' 位上, 最终形成阿维菌素。

## 2.2 阿维菌素生物合成的精准调控

2001~2003 年, 大村智团队完成了阿维链霉菌模式菌株的全基因组测序工作<sup>[20,21]</sup>, 为深入研究阿维菌素生物合成的调控机制奠定了重要基础。与其他抗生素一样, 阿维菌素合成受到基因簇内调控因子(cluster-situated regulator, CSR)和全局调控因子多层次复杂而严谨的调控。目前有关阿维菌素生物合成调控方面的研究大多来自于中国(中国科学院微生物研究所、中国科学院上海植物生理生态研究所和中国农业大学)学者的报道。

阿维菌素生物合成基因簇内只有一个位于最左侧的 CSR 基因 *aveR* (图 2), 编码 LuxR 家族调控蛋白。AveR 不仅正调控基因簇内所有结构基因的表达, 还负调控寡霉素的合成, 其作用具有多效性<sup>[22,23]</sup>。已知持家  $\sigma$  因子  $\sigma^{\text{hrdB}}$  可识别 *aveR* 的启动子<sup>[24]</sup>; 响应磷酸盐信号的双组份调控系统 PhoR/PhoP 中的调

控蛋白 PhoP<sup>[25]</sup>、响应氧化还原信号的调控因子 Rex<sup>[26]</sup>以及 TetR 家族转录因子 AvaR1<sup>[27]</sup>和 AvaR2<sup>[28]</sup>直接负调控 *aveR* 的表达；响应氮信号的调控因子 GlnR 直接正调控 *aveR* 的表达<sup>[29]</sup>(图 3)。其他已知调控阿维菌素合成的转录因子包括：AraC 家族的 SAV742<sup>[30]</sup>直接调控基因簇内结构基因的表达；TetR 家族的 AveI<sup>[31,32]</sup>、SAV7471<sup>[33]</sup>、SAV151<sup>[34]</sup>、SAV576<sup>[35]</sup>、SAV577<sup>[36]</sup>、AveT<sup>[37]</sup>、AvaR3<sup>[38]</sup>，MarR 家族的 SAV4189<sup>[39]</sup>，ECF 家族  $\sigma$  因子  $\sigma^{6[40]}$ 、 $\sigma^{25[41]}$ 和选择性  $\sigma$  因子  $\sigma^{8[42]}$ 以不同方式间接调控阿维菌素的合成(图 3)。上述调控因子中的 AveT 以阿维菌素前体 C5-O-B1 为配体，通过响应前体浓度变化正调控阿维菌素合成，从而使胞内阿维菌素浓度维持在适当

的水平<sup>[37]</sup>。PhoP、AvaR1、AvaR2、GlnR、Rex、SAV742、AveI 和  $\sigma^8$  都属于全局调控因子，不仅调控次级代谢，还调控初级代谢、胁迫响应和(或)形态分化等生理遗传过程，有些调控因子之间还存在交互调控(图 3)。

许多链霉菌抗生素的合成都受到  $\gamma$ -丁酸内酯类信号分子(以灰色链霉菌中 A 因子为代表)的调控，这些自调控因子扮演着重要的转录开关角色，通过与受体蛋白结合开启下游基因的转录，导致抗生素合成和/或形态分化的发生。但在阿维链霉菌中没有发现  $\gamma$ -丁酸内酯类信号分子，而是发现了一种新型的丁烯酸内酯类信号分子 avenolide (*aco* 编码其关键合成酶)，它在 4 nmol/L 浓度下即可诱导阿维菌素

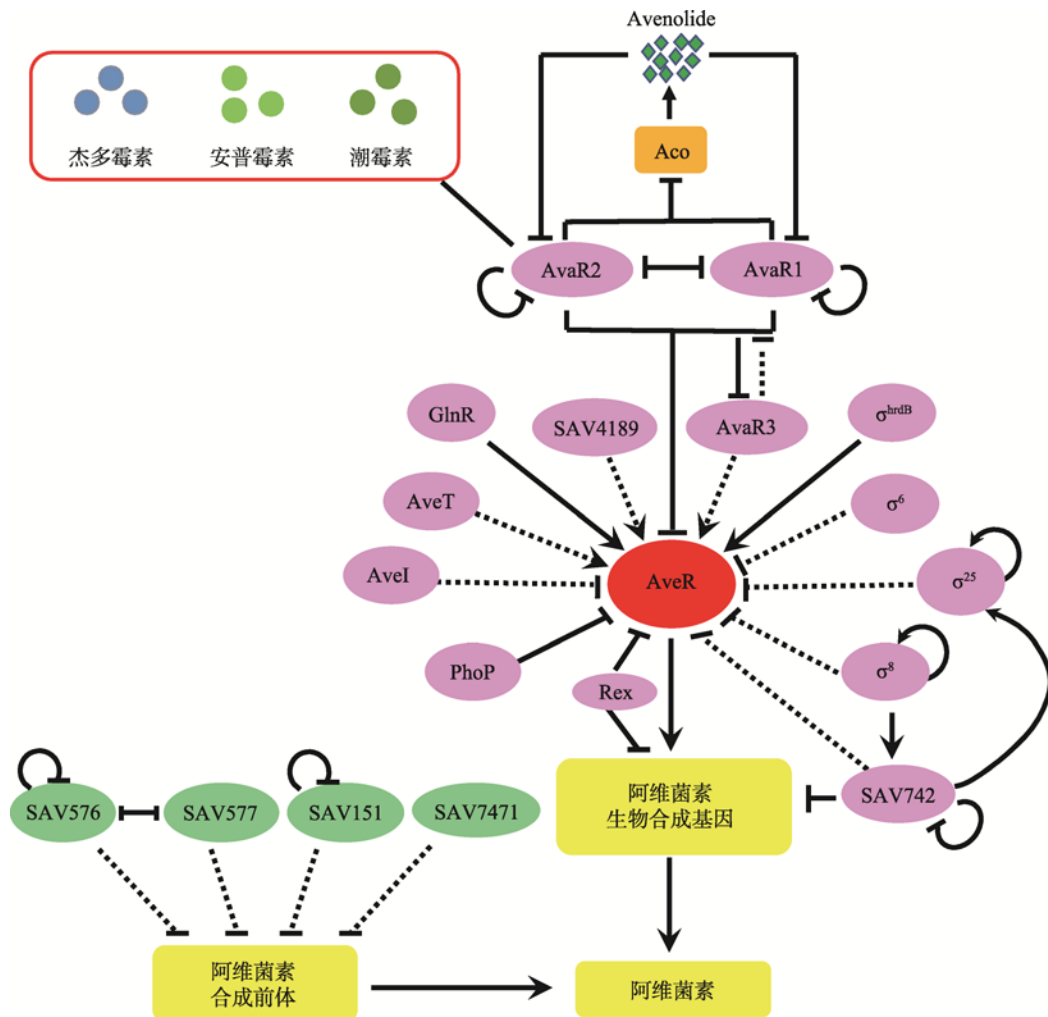


图 3 阿维菌素生物合成的调控网络

Fig. 3 Regulatory network of avermectin biosynthesis

箭头：正调控或合成产物；平末端：负调控；实线：直接作用；虚线：间接作用或未知途径。



合成<sup>[43]</sup>。阿维链霉菌中有 3 个  $\gamma$ -丁酸内酯受体同源蛋白 AvaR1、AvaR2 和 AvaR3, 其中 AvaR1 与 A 因子受体蛋白 ArpA 的同源性最高, AvaR2 与天蓝色链霉菌和委内瑞拉链霉菌中响应抗生素信号分子的假  $\gamma$ -丁酸内酯受体 ScbR2 和 JadR2 的同源性最高, AvaR3 比一般的  $\gamma$ -丁酸内酯受体多出 75 个氨基酸。研究表明, AvaR1 和 AvaR2 都可作为 avenolide 受体, 通过响应该信号分子直接负调控阿维菌素和 avenolide 合成。此外, AvaR2 还能响应其他链霉菌产生的抗生素信号分子, 调控靶基因的表达(图 3)。AvaR1 与 AvaR2 既相互竞争又协同作用于相同的靶基因, 共同调控阿维菌素和 avenolide 合成, 但它们也有各自不同的靶基因, 可交互调控不同的生理过程<sup>[27,28]</sup>。AvaR3 不仅正调控阿维菌素合成, 还影响形态分化, 但调控机制尚不清楚<sup>[38]</sup>。

综上所述, 阿维菌素的生物是各种复杂的信号传导途径和调控网络协同控制的结果。阐明阿维菌素合成的复杂调控网络, 可为理性控制阿维菌素合成、使产生菌作为细胞工厂大量生产阿维菌素奠定理论基础。

### 3 阿维菌素产生菌的理性化改造

早期由于阿维链霉菌的遗传背景不清楚, 传统诱变筛选、发酵工艺优化、过程控制和放大等在提高阿维菌素产量上发挥了重要作用<sup>[44-51]</sup>。随着阿维菌素生物合成机制的阐明、阿维链霉菌基因组测序工作的完成以及阿维菌素生物合成调控研究的不断深入, 以代谢工程、组合生物合成和合成生物学为主的现代生物技术被广泛应用到阿维链霉菌的理性改造中。我国学者在提高阿维菌素产量、合成更有效的阿维菌素衍生物、利用阿维链霉菌作为“超级”宿主异源表达多种次级代谢产物基因簇、激活隐性次级代谢产物基因簇等方面做了大量深入细致的工作。

#### 3.1 利用代谢工程提高菌株高产性能

阿维菌素发酵生产的最佳碳源是淀粉, 它先在淀粉酶作用下转变为麦芽糖和麦芽糊精再被菌体利用, 过表达麦芽糖转运系统 *malEFG* 可促进淀粉的

利用, 从而提高阿维菌素产量<sup>[52]</sup>。核糖体循环因子参与催化翻译终止后核糖体复合物的解离, 使核糖体进入下一轮的循环, 过表达核糖体循环因子基因 *frr* 可提高核糖体的利用效率, 从而促进菌体生长和阿维菌素合成<sup>[53]</sup>。*avtAB* 位于阿维菌素合成基因簇上游, 编码阿维菌素的外排泵, 过表达 *avtAB* 可减少阿维菌素的反馈抑制从而提高其产量<sup>[54]</sup>。*metK* 是 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)合成酶基因, 过表达 *metK* 可提高 SAM 的浓度和阿维菌素产量<sup>[55]</sup>。通过比较代谢组学分析添加 SAM 导致高产的原因, 揭示了阿维菌素合成的关键前体代谢物, 合理添加这些代谢物可显著提高产量<sup>[56]</sup>。

中国科学院微生物研究所张立新团队发现阿维菌素高产菌株中基因簇内正调控基因 *aveR* 的表达水平显著提高, 由于体外转录实验证实  $\sigma^{hrdB}$  可识别 *aveR* 的启动子, 因此利用体外定向进化构建了 *hrdB* 基因的突变库, 进一步通过高通量筛选获得了高产重组菌株 A56, 在 180 L 发酵罐上阿维菌素 B1a 产量提高了 53%, 达到 6382  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[24]</sup>。该研究是一个从基础研究走向实际应用, 并实现对高产关键基因精确定位的典型范例。

TetR 家族调控因子 AveT 正调控阿维菌素合成, 其重要的靶基因 *aveM* 编码一个未知外排泵, 对阿维菌素合成具有抑制作用, 过表达 *aveT* 或缺失 *aveM* 都能显著提高野生型菌株和工业生产菌株中阿维菌素产量<sup>[37]</sup>。MarR 家族调控因子 SAV4189 的靶基因 *sav\_4190* 也编码未知的外排泵, 过表达 *sav\_4189* 或缺失 *sav\_4190* 均可显著提高阿维菌素产量<sup>[39]</sup>。这两个研究案例提示未来应关注这些未知功能的外排泵, 对其进行遗传操作是提高阿维菌素产量的有效途径。

#### 3.2 通过组合生物合成产生阿维菌素衍生物

作为第 2 代阿维菌素类药物的伊维菌素, 由于使用更安全而主要用于兽药和医药上, 目前其生产主要采用化学法从阿维菌素 B1 还原而来, 该过程需要昂贵的氯化铈做催化剂。英国剑桥大学 Leadlay 团队首先尝试了通过组合生物合成技术, 用雷帕霉素 PKS 模块 13 上的 DH-ER-KR(脱水酶-烯基还原酶-酮基还原酶)结构域取代野生型阿维链霉菌中阿

维菌素 PKS 模块 2 上的 DH-KR 结构域(*aveDH2-KR2*), 获得的重组菌株具有直接合成伊维菌素的能力<sup>[57]</sup>。中国农业大学李季伦团队先构建了不产有毒成分寡霉素而仅产阿维菌素 B 组分的工程菌 Olm73-12<sup>[58]</sup>, 以此为出发菌株, 将 *aveDH2-KR2* 分别来自苦霉素 PKS 模块 4 和寡霉素 PKS 模块 3 上的 DH-ER-KR 所置换, 得到了不产寡霉素而产伊维菌素的工程菌<sup>[59,60]</sup>。然而上述工程菌伊维菌素的产量极低, 无法用于工业生产。米尔贝霉素是与阿维菌素结构类似的杀虫药物, 其 C22~C23 之间为饱和键, 与伊维菌素相同。2015 年, 东北农业大学向文胜团队在阿维菌素高产菌株中用来自冰城链霉菌米尔贝霉素 PKS 模块 2 的 DH-ER-KR 替换 *aveDH2-KR2*, 获得的工程菌伊维菌素 B1a 产量达到 3450  $\mu\text{g/mL}$ , 可用于工业化生产<sup>[61]</sup>。

多拉菌素是 20 世纪 90 年代由美国辉瑞(Pfizer)公司研发的阿维菌素第 3 代衍生物, 比伊维菌素的杀虫效果更好, 其结构为阿维菌素 B1 的 C25 位被环己烷基所取代<sup>[62]</sup>。Cropp 等<sup>[62]</sup>将山丘链霉菌中的环己酰 CoA (CHC-CoA)合成基因转入阿维菌素的前体合成阻断突变株(支链  $\alpha$ -酮酸脱氢酶缺陷, 不能合成起始单元 2-甲基丁酸和异丁酸)中, 使突变株获得了合成多拉菌素的能力, 同时还产生无效的 CHC-B2 组分。辉瑞公司研究人员通过对 *aveC* 基因进行突变, 获得了多拉菌素的比例提高了 23 倍的突变株<sup>[18]</sup>。中国科学院上海有机化学研究所唐功利团队则采取另一个策略, 将阿维菌素 PKS 的起始模块替换为可加载环己烷羧酸(CHC)的磷内酯霉素 PKS 起始模块, 同时转入 CHC-CoA 合成基因, 构建了产多拉菌素的工程菌<sup>[63]</sup>。刘文团队从阿维链霉菌的  $\Delta\text{aveCDE}$  突变株中分离到 3 个新的阿维菌素衍生物, 体外实验发现它们具有抗肿瘤细胞活性<sup>[64]</sup>。

2015 年, 张立新团队和中国科学院过程工程研究所郑舰艇团队合作, 解析了阿维菌素 PKS 起始模块中酰基转移酶(AT)结构域的结构与功能, 发现其底物特异性并不强, 可将 40 多种羧酸作为起始单元掺入到聚酮链中。通过对 AT 活性位点的氨基酸残基进行定点突变可改变底物的特异性, 有望合成新的活性更高、作用范围更广、毒性更低的阿维菌素衍生物<sup>[65]</sup>。

### 3.3 基于合成生物学理念的菌株遗传改造

合成生物学方法与代谢工程不同, 重点是首先设计和合成各种复杂生物功能模块和系统, 以用于生产特定产物, 可通过构建合适的底盘细胞、重构调控网络和优化生物合成途径来提高产物产量<sup>[16,66]</sup>。

阿维链霉菌基因组中有 38 个次级代谢生物合成基因簇<sup>[67]</sup>, 但目前仅有阿维菌素、寡霉素、菲律宾菌素等几种主要的产物得到分离鉴定, 表明阿维链霉菌不仅具有合成丰富次级代谢产物的潜力, 同时可为多种次级代谢产物合成提供充足的前体、能量和还原力, 适于开发为合成生物学底盘细胞。2010 年, 日本 Ikeda 团队将阿维链霉菌基因组精简, 即缺失染色体左臂约 1.4 Mb 的非必需区域和寡霉素等次级代谢产物合成基因簇, 构建了一系列底盘细胞 SUKA2~SUKA22, 并成功地异源表达了链霉菌来源的链霉素、头霉素、普拉地内酯和植物来源的萜类化合物前体<sup>[68]</sup>。2013 年, 他们利用之前改造的底盘细胞 SUKA17 或 SUKA22 对不同类型的 20 个次级代谢生物合成基因簇进行了异源表达<sup>[69]</sup>。2015 年, 该团队又利用底盘细胞 SUKA22 异源表达了多个在其他链霉菌中处于沉默的萜类化合物基因簇, 并获得了 13 个新的萜类化合物<sup>[70]</sup>。

由于链霉菌丝状生长的特性, 使其基因表达调控难以精确设计、定量和预测。2015 年, 中国科学院微生物研究所的张立新和姜春波两个团队合作, 通过制备单细胞阿维链霉菌的原生质体, 首次建立了基于流式细胞仪和报告基因(sfGFP)的对链霉菌调控元件进行单细胞精确定量的方法, 通过对近 200 个天然或人工合成的启动子和核糖体结合位点(RBS)调控元件进行高通量定量表征, 极大地丰富了链霉菌调控元件库。然后又成功利用绝缘子 RiboJ 消除了启动子和 RBS 之间的干扰作用, 提高了这些调控元件的性能。这些调控元件模块也被成功地应用于激活阿维链霉菌中处于沉默的番茄红素基因簇的表达, 并通过可预测地替换调控元件使番茄红素产量达到了工业生产的要求<sup>[71]</sup>。该研究开发的调控元件还可用于调节阿维菌素合成基因的表达水平, 通过优化生物合成过程提高阿维菌素产量。

## 4 阿维菌素的中国“智”造升级

1991 年默克公司在我国获得阿维菌素的临时登记,而我国的阿维菌素研究始于 1984 年,其中沈寅初、李季伦两位院士为阿维菌素的中国“智”造做出了重要贡献,也曾获得了诺贝尔奖提名。

1984 年,上海市农药研究所沈寅初团队从广东揭阳土壤中分离到 7051 菌株,经鉴定为阿维链霉菌,该菌产生的有效杀虫成分 7051 杀虫素与阿维菌素结构一致,这一技术成果于 1992 年率先转让于海门制药厂(浙江海正药业股份有限公司前身)进行工业生产,获得 1995 年上海市一等奖(畜用阿维菌素)和 1997 年化工部一等奖(农用阿维菌素),并于 1999 年获得国家科技进步二等奖。李季伦团队于 1986 年开始研究阿维菌素,阿维菌素的研究及工业化生产被列为国家“七五”、“八五”、“九五”重点科技攻关项目。经过连续攻关,阿维菌素的摇瓶发酵单位从最初的 50~100  $\mu\text{g/mL}$  提高到 3500~4000  $\mu\text{g/mL}$ 。1996 年,齐鲁制药厂与李季伦团队合作完成了阿维菌素的中试生产工作,在 30 吨发酵罐上的发酵单位达到 3000  $\mu\text{g/mL}$ ,并采用直接结晶法提取阿维菌素 B1,提取率达到 61.5%,提前完成了攻关任务。1998 年,阿维菌素在齐鲁制药厂正式投入工业化大生产。2006 年,李季伦等的阿维菌素研究成果获得了国家科技进步二等奖。

科技进步的推动和市场需求的拉动,使阿维菌素产业在我国不断壮大,成为中国农药领域中发展最快的品种。至 2005 年,阿维菌素原药登记企业有 14 家,年产能超过 1000 吨,原药销售价格由最初的 2 万元/公斤降到 1000~1300 元/公斤,我国阿维菌素生产能力占世界的 90%,成为名副其实的阿维菌素生产大国。从 2007 年起,阿维菌素这一“贵族产品”彻底走下神坛,成为家喻户晓的农民用得起的生物农药,正式进入“平民阶段”。

巨大的产业需要以科技创新为坚实基础。华东理工大学张嗣良团队不断对阿维菌素发酵工艺进行优化<sup>[44~47]</sup>,张立新团队利用响应面法优化了发酵培养基,建立了利用 96 孔板培养细胞和紫外检测阿维菌素产量的高通量筛选体系,利用该体系结合新的诱变手段筛选到了具有核心竞争力的高效生产菌

株<sup>[48~51]</sup>。2010 年 4 月,中国 13 家阿维菌素主要生产企业成立了阿维菌素产业联盟,使产业联盟与新技术相结合,以形成优势互补,通过科技创新带动整个产业的发展,提升该产业的国际竞争能力。张立新团队与产业联盟组长单位威远生物化工有限公司建立了长期合作关系,合作的阿维菌素项目于 2011 年获得内蒙古自治区科技进步一等奖。

2013 年 1 月,中国科学院微生物研究所主持的 973 项目“合成微生物体系的适配性研究”正式启动,旨在运用新兴的合成生物学手段大幅度提高阿维菌素的发酵单位。该项目以阿维链霉菌为底盘细胞,从元件挖掘(Mining)、建模(Modeling)、元件组装与通路搭建(Manipulation)、系统测试(Measurement)、绿色工业制造(Manufacture) 5 个方面(简称“5M”策略)<sup>[16,72]</sup>展开研究,实现了阿维菌素高产关键元件的精确定位、改造和高产菌株的发酵、提取工艺优化,在 120~550 立方米发酵罐中,提高了阿维菌素 B1a 的产量至 9000  $\mu\text{g/mL}$  以上,达到了原始菌株的 1000 倍。同时还建立一种简单的分离提取工艺,使阿维菌素 B1 的回收率高达 90%,生产效率较曾经垄断阿维菌素国际市场的默克公司提高了 60% 以上,市场价格降低至 500 元/公斤,对提升我国阿维菌素产业整体技术水平、引领行业技术进步,起到了积极的促进作用。2015 年 9 月,中国成为阿维菌素原药的唯一生产国,默克公司全面停产阿维菌素原药,转而向中国采购。张立新团队的“阿维菌素的微生物高效合成及其生物制造”项目成果荣获了 2016 年度国家科技进步奖二等奖。

截至 2018 年 6 月 25 日,NCBI 收录的与阿维菌素产量有关的 SCI 论文有 86 篇。在 2000 年以前国外学者共发表 14 篇(引用 650 次),但没有中国学者发表的论文;2000~2009 年国外学者发表 17 篇(引用 1625 次),中国学者只有 6 篇(引用 241 次);从 2010 年至今,中国学者发表的 SCI 论文数量迅速增加到 38 篇(引用 688 次),而这期间国外学者发表的论文数只有 11 篇(引用 391 次)(图 4)。目前中国学者在该领域发表的 SCI 文章数(44 篇)已超过了国外学者发表文章的总和(42 篇)。可见,近 20 年来中国对阿维菌素高产研究的影响力不断提升。

目前国内阿维菌素相关的登记证超过 2500 个,



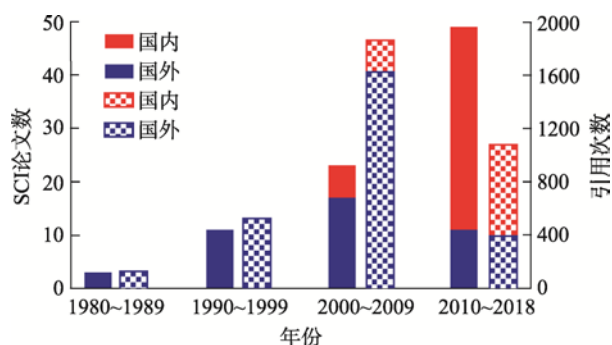


图 4 与阿维菌素产量有关的 SCI 论文及引用次数

Fig. 4 Number of SCI articles and citations related to avermectin production

涉及的企业超过 1000 家,其中原药生产企业 29 家,产生了 4 个上市公司,形成了一个巨大的产业链。阿维菌素是目前唯一一个年产值达到 30 亿元的生物农药,原料药远销世界各国,创造了巨大的社会和经济效益。

以上数据充分显示了中国科研工作者在阿维菌素研发中从跟跑到并跑再到领跑的过程,最终使中国从阿维菌素“发酵大国”转变成为“发酵强国”,为用遗传学方法提高其他微生物药物的产量和效率提供了宝贵的经验和借鉴。

## 5 结语与展望

阿维菌素从发现至今已有 40 多年的历史,如今仍在杀虫剂舞台上独具魅力,备受市场宠爱,尚无其他药物可以替代它的重要地位。随着研究的深入,将会有更多结构和作用机制新颖的阿维菌素衍生物产品问世,使阿维菌素类药物不断升级换代,降低其耐药性,提高其广谱性,并开发出具有抗真菌、抗病毒、抗结核、抗肿瘤等活性的新药。最近发现,阿维菌素 B2 的杀虫谱不同于 B1,对根结线虫、根腐线虫、胞囊线虫、茎线虫和松材线虫等多种植物线虫有特别高的杀灭活性,有望作为一种阿维菌素新产品推广应用,具有广阔的市场前景。此外,还可以将阿维菌素高产工业菌株打造成为新的合成生物学底盘细胞,利用它异源表达有价值的但产量较低的微生物活性物质,为新药开发做出贡献。期待阿维菌素再续新的篇章。

回顾我国阿维菌素的产业化历程可以看出,它

的辉煌是基于基础研究的逐渐深入、新技术的不断应用以及研究团队与企业的通力合作,利用微生物智能化特点,大幅度提高了阿维菌素的单位生产效率,降低了生产成本,使我国阿维菌素产品拥有了自主知识产权、国际领先的创新技术和国际市场的话语权,从而完成了从无到有、从弱到强、再到独占国际市场的自主创新、弯道超车的壮举<sup>[1,72,73]</sup>,是中国科学家、企业家和一线工人集体智慧和埋头苦干的结晶,为其他微生物药物的高效生产提供了可借鉴的思路和方法。

## 参考文献(References):

- [1] Chen JS, Liu M, Zhang LX. Avermectin, from winning the Nobel Prize to "innovation in China". *Acta microbiol Sin*, 2016, 56(3): 543–558.  
陈金松, 刘梅, 张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造. *微生物学报*, 2016, 56(3): 543–558. [DOI]
- [2] Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1979, 15(3): 361–367. [DOI]
- [3] Miller TW, Chalet L, Cole DJ, Cole LJ, Flor JE, Goegelman RT, Gullo VP, Joshua H, Kempf AJ, Krellwitz WR, Monaghan RL, Ormond RE, Wilson KE, Albers-Schönberg G, Putter I. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1979, 15(3): 368–371. [DOI]
- [4] Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, Eary CH, Suhayda D, Cifelli S, Riek RF, Campbell WC. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1979, 15(3): 372–378. [DOI]
- [5] Chabala JC, Mrozik H, Tolman RL, Eskola P, Lusi A, Peterson LH, Woods MF, Fisher MH, Campbell WC, Egerton JR, Ostlind DA. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J Med Chem*, 1980, 23(10): 1134–1136. [DOI]
- [6] Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, Albers-Schönberg G, Jacob TA. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science*, 1983, 221(4613): 823–828. [DOI]
- [7] Kass IS, Wang CC, Walrond JP, Stretton AO. Avermectin B1a, a paralysing anthelmintic that affects interneurons and inhibiting motoneurons in *Ascaris*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(10): 6211–6215. [DOI]

- [8] McKellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbemycins. *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19(5): 331–351. [DOI]
- [9] Wolstenholme AJ, Rogers AT. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 2005, 131(Suppl.): S85–S95. [DOI]
- [10] Lim LE, Vilcheze C, Ng C, Jacobs WR Jr, Ramon-Garcia S, Thompson CJ. Anthelmintic avermectins kill *Mycobacterium tuberculosis*, including multidrug-resistant clinical strains. *Antimicrob Agents Chemoth*, 2013, 57(2): 1040–1046. [DOI]
- [11] Guo H, Ren B, Dai H, Dai S, Zhang Y, Liu Y, Cao B, Zhang L. Reversal of meticillin resistance in *Staphylococcus aureus* by the anthelmintic avermectin. *Int J Antimicrob Agents*, 2014, 44(3): 274–276. [DOI]
- [12] Omura S, Crump A. Ivermectin: Panacea for resource-poor communities. *Trends Parasitol*, 2014, 30(9): 445–455. [DOI]
- [13] Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Dueñas-Gonzalez A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(2): 317–331. [DOI]
- [14] Ikeda H, Ōmura S. Avermectin biosynthesis. *Chem Rev*, 1997, 97 (7): 2591–2610. [DOI]
- [15] Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, Omura S. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (17): 9509–9514. [DOI]
- [16] Chen J, Liu M, Liu X, Miao J, Fu C, Gao H, Müller R, Zhang Q, Zhang L. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. *Synth Syst Biotechnol*, 2016, 1(1): 7–16. [DOI]
- [17] Ikeda H, Pang CH, Endo H, Ohta T, Tanaka H, Omura S. Construction of a single-component producer from the wild-type avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot*, 1995, 48(6): 532–534. [DOI]
- [18] Stutzman-Engwall K, Conlon S, Fedechko R, McArthur H, Pekrun K, Chen Y, Jenne S, La C, Trinh N, Kim S, Zhang YX, Fox R, Gustafsson C, Krebber A. Semi-synthetic DNA shuffling of *aveC* leads to improved industrial scale production of doramectin by *Streptomyces avermitilis*. *Metab Eng*, 2005, 7(1): 27–37. [DOI]
- [19] Sun P, Zhao Q, Yu F, Zhang H, Wu Z, Wang Y, Wang Y, Zhang Q, Liu W. Spiroketal formation and modification in avermectin biosynthesis involves a dual activity of *AveC*. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(4): 1540–1548. [DOI]
- [20] Ōmura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(21): 12215–12220. [DOI]
- [21] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Ōmura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 526–531. [DOI]
- [22] Guo J, Zhao J, Li L, Chen Z, Wen Y, Li J. The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis. *Mol Genet Genomics*, 2010, 283(2): 123–133. [DOI]
- [23] Kitani S, Ikeda H, Sakamoto T, Noguchi S, Nihira T. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(6): 1089–1096. [DOI]
- [24] Zhuo Y, Zhang W, Chen D, Gao H, Tao J, Liu M, Gou Z, Zhou X, Ye BC, Zhang Q, Zhang S, Zhang LX. Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11250–11254. [DOI]
- [25] Yang R, Liu X, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. The PhoP transcription factor negatively regulates avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(24): 10547–10557. [DOI]
- [26] Liu X, Cheng Y, Lyu M, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. Redox-sensing regulator Rex regulates aerobic metabolism, morphological differentiation, and avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Sci Rep*, 2017, 7: 44567. [DOI]
- [27] Zhu JY, Chen Z, Li JL, Wen Y. AvaR1, a butenolide-type autoregulator receptor in *Streptomyces avermitilis*, directly represses avenolide and avermectin biosynthesis and multiple physiological responses. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2577. [DOI]
- [28] Zhu J, Sun D, Liu W, Chen Z, Li J, Wen Y. AvaR2, a pseudo  $\gamma$ -butyrolactone receptor homologue from *Streptomyces avermitilis*, is a pleiotropic repressor of avermectin and avenolide biosynthesis and cell growth. *Mol Microbiol*, 2016, 102(4): 562–578. [DOI]
- [29] He JM, Zhu H, Zheng GS, Liu PP, Wang J, Zhao GP, Zhu GQ, Jiang WH, Lu YH. Direct involvement of the master nitrogen metabolism regulator GlnR in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J Biol Chem*, 2016, 291(51): 26443–26454. [DOI]
- [30] Sun D, Zhu J, Chen Z, Li J, Wen Y. SAV742, a novel AraC-family regulator from *Streptomyces avermitilis*, controls avermectin biosynthesis, cell growth and develop-

- pment. *Sci Rep*, 2016, 6: 36915. [DOI]
- [31] Chen L, Lu Y, Chen J, Zhang W, Shu D, Qin Z, Yang S, Jiang W. Characterization of a negative regulator AveI for avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* NRRL8165. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(2): 277–286. [DOI]
- [32] Chen L, Chen J, Jiang Y, Zhang W, Jiang W, Lu Y. Transcriptomics analyses reveal global roles of the regulator AveI in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 298(2): 199–207. [DOI]
- [33] Liu Y, Yan T, Jiang L, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. Characterization of SAV7471, a TetR-family transcriptional regulator involved in the regulation of coenzyme A metabolism in *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol*, 2013, 195(19): 4365–4372. [DOI]
- [34] He F, Liu W, Sun D, Luo S, Chen Z, Wen Y, Li J. Engineering of the TetR family transcriptional regulator SAV151 and its target genes increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 399–409. [DOI]
- [35] Guo J, Zhang X, Luo S, He F, Chen Z, Wen Y, Li J. A novel TetR family transcriptional regulator, SAV576, negatively controls avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71330. [DOI]
- [36] Guo J, Zhang X, Chen Z, Wen Y, Li J. Two adjacent and similar TetR family transcriptional regulator genes, SAV577 and SAV576, co-regulate avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99224. [DOI]
- [37] Liu W, Zhang Q, Guo J, Chen Z, Li J, Wen Y. Increasing avermectin production in *Streptomyces avermitilis* by manipulating the expression of a novel TetR-family regulator and its target gene product. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(15): 5157–5173. [DOI]
- [38] Miyamoto KT, Kitani S, Komatsu M, Ikeda H, Nihira T. The autoregulator receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 8): 2266–2275. [DOI]
- [39] Guo J, Zhang X, Lu XR, Liu WS, Chen Z, Li JL, Deng LH, Wen Y. SAV4189, a MarR-family regulator in *Streptomyces avermitilis*, activates avermectin biosynthesis. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1358. [DOI]
- [40] Jiang L, Liu Y, Wang P, Wen Y, Song Y, Chen Z, Li J. Inactivation of the extracytoplasmic function sigma factor Sig6 stimulates avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(10): 1955–1961. [DOI]
- [41] Luo S, Sun D, Zhu J, Chen Z, Wen Y, Li J. An extracytoplasmic function sigma factor,  $\sigma^{25}$ , differentially regulates avermectin and oligomycin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(16): 7097–7112. [DOI]
- [42] Sun D, Wang Q, Chen Z, Li JL, Wen Y. An alternative  $\sigma$  factor,  $\sigma^8$ , controls avermectin production and multiple stress responses in *Streptomyces avermitilis*. *Front Microbiol*, 2017, 8: 736. [DOI]
- [43] Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(39): 16410–16415. [DOI]
- [44] Chen J, Zhang S, Chu J, Zhuang Y, Luo J, Bai H. Ethanol evolution rate: a new parameter to determine the feeding rate for the production of avermectins by *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(2): 109–113. [DOI]
- [45] Wu YB, Chu XH, Wang YH, Chu J, Zhuang YP, Zhang SL. Optimization of avermectin fermentation process based on parameter association analysis. *J East China Univ Sci Technol*, 2007, 33(5): 643–646.
- 巫延斌, 储消和, 王永红, 储炬, 庄英萍, 张嗣良. 阿维菌素发酵过程参数相关性研究及过程优化. 华东理工大学学报(自然科学版), 2007, 33(5): 643–646. [DOI]
- [46] Yao XY, Chu XH, Zhuang YP, Liang JG, Wang YH, Chu J, Zhang SL. Effect of inoculation methods on avermectin fermentation by *Streptomyces avermitilis*. *J Food Sci Biotech*, 2009, 28(5): 682–687.
- 姚小员, 储消和, 庄英萍, 梁剑光, 王永红, 储炬, 张嗣良. 接种方式对阿维菌素发酵过程的影响. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 682–687. [DOI]
- [47] 张嗣良, 王永红, 陈凝, 夏建业, 庄英萍, 储炬, 巫延斌, 杭海峰, 黄明志. 阿维菌素发酵过程优化与放大的方法与装置. 中国: CN101671712, 2010. [DOI]
- [48] Gao H, Liu M, Liu J, Dai H, Zhou X, Liu X, Zhuo Y, Zhang W, Zhang L. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresour Technol*, 2009, 100(17): 4012–4016. [DOI]
- [49] Gao H, Liu M, Zhou X, Liu J, Zhuo Y, Gou Z, Xu B, Zhang W, Liu X, Luo A, Zheng C, Chen X, Zhang L. Identification of avermectin-high-producing strains by high-throughput screening methods. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(4): 1219–1225. [DOI]
- [50] Gao H, Liu M, Zhuo Y, Zhou XL, Liu JT, Chen DF, Zhang WQ, Gou ZX, Shang P, Zhang LX. Assessing the potential of an induced-mutation strategy for avermectin overproducers. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4583–4586. [DOI]
- [51] Liu M, Gao H, Shang P, Zhou X, Ashforth E, Zhuo Y, Chen D, Ren B, Liu Z, Zhang L. Magnetic field is the dominant factor to induce the response of *Streptomyces avermitilis* in altered gravity simulated by diamagnetic levitation. *PLoS One*, 2011, 6(10): e24697. [DOI]

- [52] Li M, Chen Z, Zhang X, Song Y, Wen Y, Li J. Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose ATP-binding cassette transporter in *Streptomyces avermectinis*. *Bioresour Technol*, 2010, 101(23): 9228–9235. [DOI]
- [53] Li L, Guo J, Wen Y, Chen Z, Song Y, Li J. Overexpression of ribosome recycling factor causes increased production of avermectin in *Streptomyces avermectinis* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(7): 673–679. [DOI]
- [54] Qiu J, Zhuo Y, Zhu D, Zhou X, Zhang L, Bai L, Deng Z. Overexpression of the ABC transporter AvtAB increases avermectin production in *Streptomyces avermectinis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92(2): 337–345. [DOI]
- [55] Zhao X, Wang Q, Guo W, Cai Y, Wang C, Wang S, Xiang S, Song Y. Overexpression of *metK* shows different effects on avermectin production in various *Streptomyces avermectinis* strains. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(10): 1869–1875. [DOI]
- [56] Tian P, Cao P, Hu D, Wang D, Zhang J, Wang L, Zhu Y, Gao Q. Comparative metabolomics reveals the mechanism of avermectin production enhancement by S-adenosylmethionine. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(4–5): 595–604. [DOI]
- [57] Gaisser S, Kellenberger L, Kaja AL, Weston AJ, Lill RE, Wirtz G, Kendrew SG, Low L, Sheridan RM, Wilkinson B, Galloway IS, Stutzman-Engwall K, McArthur HA, Staunton J, Leadlay PF. Direct production of ivermectin-like drugs after domain exchange in the avermectin polyketide synthase of *Streptomyces avermectinis* ATCC-31272. *Org Biomol Chem*, 2003, 1(16): 2840–2847. [DOI]
- [58] Zhang XL, Chen Z, Zhao JL, Song Y, Wen Y, Li JL. Deletion analysis of oligomycin PKS genes (*olmA*) in *Streptomyces avermectinis*. *Chin Sci Bull*, 2004, 49(4): 350–354. [DOI]
- [59] Zhang X, Chen Z, Li M, Wen Y, Song Y, Li J. Construction of ivermectin producer by domain swaps of avermectin polyketide synthase in *Streptomyces avermectinis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 986–994. [DOI]
- [60] Li M, Chen Z, Lin X, Zhang X, Song Y, Wen Y, Li J. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermectinis*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(20): 5359–5363. [DOI]
- [61] Zhang J, Yan YJ, An J, Huang SX, Wang XJ, Xiang WS. Designed biosynthesis of 25-methyl and 25-ethyl ivermectin with enhanced insecticidal activity by domain swap of avermectin polyketide synthase. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 152. [DOI]
- [62] Cropp TA, Wilson DJ, Reynolds KA. Identification of a cyclohexylcarbonyl CoA biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(9): 980–983. [DOI]
- [63] Wang JB, Pan HX, Tang GL. Production of doramectin by rational engineering of the avermectin biosynthetic pathway. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(11): 3320–3323. [DOI]
- [64] Sun P, Zhao Q, Wu Z, Zhang W, Liu W. 1,19-seco-ivermectin analogues from a *ΔaveCDE* mutant *Streptomyces avermectinis* strain. *J Nat Prod*, 2015, 78(2): 301–305. [DOI]
- [65] Wang F, Wang Y, Ji J, Zhou Z, Yu J, Zhu H, Su Z, Zhang L, Zheng J. Structural and functional analysis of the loading acyltransferase from avermectin modular polyketide synthase. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(4): 1017–1025. [DOI]
- [66] Zhuo Y, Zhang T, Wang Q, Cruz-Morales P, Zhang B, Liu M, Barona-Gómez F, Zhang L. Synthetic biology of avermectin for production improvement and structure diversification. *Biotechnol J*, 2014, 9(3): 316–325. [DOI]
- [67] Ikeda H, Kazuo SY, Omura S. Genome mining of the *Streptomyces avermectinis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(2): 233–50. [DOI]
- [68] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Canec DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6): 2646–2651. [DOI]
- [69] Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozono I, Izumikawa M, Hashimoto J, Takagi M, Omura S, Shin-Ya K, Cane DE, Ikeda H. Engineered *Streptomyces avermectinis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol*, 2013, 2(7): 384–396. [DOI]
- [70] Yamada Y, Arima S, Nagamitsu T, Johmoto K, Uekusa H, Eguchi T, Shin-ya K, Cane DE, Ikeda H. Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. *J Antibiot*, 2015, 68(6): 385–394. [DOI]
- [71] Bai C, Zhang Y, Zhao X, Hu Y, Xiang S, Miao J, Lou C, Zhang L. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (39): 12181–12186. [DOI]
- [72] Gao Q, Tan GY, Xia X, Zhang L. Learn from microbial intelligence for avermectins overproduction. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 48: 251–257. [DOI]
- [73] Chen J, Miao J, Liu M, Liu X, Bao L, Jiang Y, Wang D, Zhang Q, Zhang L. Different fates of avermectin and artemisinin in China. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(6): 634–636. [DOI]