

doi:10.12301/j.issn.2095-6002.2021.01.008

文章编号:2095-6002(2021)01-0070-08

引用格式:魏杰,于文辰,郝若冰,等. *aurT* 基因对金褐霉素生物合成的调控及其作用机制[J]. 食品科学技术学报,2021,39(1):70-77.WEI Jie, YU Wenchen, HAO Ruobing, et al. Regulatory effect and mechanism of *aurT* gene on biosynthesis of Aureofuscin [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021,39(1):70-77.

## *aurT* 基因对金褐霉素生物合成的调控及其作用机制

魏杰<sup>1</sup>, 于文辰<sup>1</sup>, 郝若冰<sup>1</sup>, 杨静<sup>1</sup>, 许德鑫<sup>1</sup>, 高军<sup>2</sup>

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁省林业科学研究院, 辽宁 沈阳 110032)

**摘要:**通过分子克隆技术获得了金褐霉素生物合成基因簇中新基因 *aurT* (Genbank 登录号: MH247109.1), 并利用高效表达、基因敲除、高效液相色谱(HPLC)和生物信息学技术分析了 *aurT* 基因功能及其对金褐霉素生物合成的调控作用, 以期为提高金褐霉素发酵产量奠定理论基础。研究表明: *AurT* 属于 RhtB 家族调节因子, 是金褐霉素生物合成的氨基酸转运蛋白; *aurT* 基因高效表达菌株 ( $\delta$  *aurT*) 的金褐霉素产量增加了 1.3 倍; *aurT* 基因敲除菌株 ( $\Delta$  *aurT*) 的金褐霉素产量减少了 65%, 但金褐霉素的产量没有完全被抑制, 说明 *aurT* 对金褐霉素生物合成的调控过程不同于途径特异性调控基因 *aurJ3M*。比较了 4 种不同的 PI 因子结构类似物(1,2-丙二醇、丙三醇、乙二醇、三乙醇胺)对金褐霉素合成的调控作用, 结果表明: 0.4 mL 的丙三醇对金褐霉素生物合成的调节效果最佳; 发酵时间达到 96 h 时, 外源添加丙三醇后,  $\Delta$  *aurT* 菌株的金褐霉素产量为 784  $\mu$ g/mL, 而未添加的产量为 244  $\mu$ g/mL; 进一步通过 RT-PCR 反应验证在野生型菌株培养中添加丙三醇后, 增加了 *aurT* 基因的转录水平和表达, 说明 PI 因子结构类似物与基因簇中的特异性受体结合并启动了相关基因的表达, *aurT* 是通过介导 PI 因子的胞外运输来参与金褐霉素的生物合成与调控的。

**关键词:** 金褐霉素; *aurT* 基因; 高效表达; 基因敲除; PI 因子

中图分类号: TS202.3; TS201.3

文献标志码: A

金褐霉素(Aureofuscin)是从我国土壤中分离得到的链霉菌新种——金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus*)产生的一种四烯大环内酯类抗真菌物质, 具有多个共轭双键, 一个羟基侧链基团和一个大环内酯骨架, 与纳他霉素结构类似<sup>[1-2]</sup>。金褐霉素为针状结晶, 无色无味, 没有明显的熔点, 不溶于低级醚, 几乎不溶于水, LD<sub>50</sub>为 28.27 mg/kg<sup>[1]</sup>。金褐霉素在食品保鲜方面具有广阔的应用前景, 极有可能开发为新型高效、低残留、安全、稳定的食品防腐剂。金褐霉素生物合成的调控机制尚未明确, 并且金褐霉

素的产量较低, 限制了其产业化应用。研究金褐霉素生物合成中关键调控基因以及基因改造等方法, 提高金褐霉素的产量, 成为目前需要解决的关键问题。

本项目组在前期研究中建立了一种新型的金褐霉素高效液相色谱(HPLC)的快速检测方法<sup>[3]</sup>; 采用核磁共振技术检测并优化分离提取工艺, 优化野生菌株培养条件、发酵工艺<sup>[4]</sup>; 通过添加前体物质提高野生型金褐链霉菌的发酵产量<sup>[5]</sup>; 克隆得到金褐霉素生物合成基因簇中完整基因

收稿日期: 2020-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31701656)。

第一作者: 魏杰, 女, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术及贮藏保鲜方面的研究。

*aurJ3M*, 在 GenBank 上公布, 登录号为 EU697915; 发现基因 *aurJ3M* 能促进金褐霉素的生物合成, 并且其对黑根霉具有很强的抑菌性; 继续深入研究基因 *aurJ3M* 的途径特异性调控功能及其调控机制<sup>[6-8]</sup>; 金褐霉素对冬枣的保鲜效果优于纳他霉素<sup>[9]</sup>, 并且由茶多酚和金褐霉素组成的复合保鲜剂对虾夷扇贝也具有很好的保鲜效果<sup>[10]</sup>。本研究拟对基因 *aurT* 的功能及其对金褐霉素生物合成的调控机制进行分析, 试图深入了解金褐霉素的调控网络, 希望为通过基因改造等方法提高金褐霉素的产量奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

金褐链霉菌 SYAU0709 (*Streptomyces aureofuscus*. n. sp)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 JM109, 由本实验室保存。大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 和大肠杆菌/链霉菌穿梭载体 *pSET152*, 由中国科学院微生物研究所的谢锋博士赠送。

可溶性淀粉、酵母浸粉、基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒等均购自鼎国昌盛生物技术有限公司; DNA Marker、T4 DNA ligase、BamHI、EcoRV、XbaI、HindIII, 购自 Takara 生物技术有限公司。

### 1.2 主要仪器与设备

7500 型 Real-Time PCR 仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DYCP-31E 型琼脂糖凝胶电泳仪, 北京市六一仪器厂; Veriti 96 2720 t100 型 PCR 扩增仪, 美国 ABI 公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; UV-2201 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; 冰柜, 山东省青岛海尔集团; SHZ-22 型水浴恒温振荡器, 江苏省太仓市医疗器械厂; GA110 型电子天平, 梅特勒-托利多国际有限公司; Laborota 4010 型真空旋转蒸发仪, 德国 Heidolph 公司; CR-22 型高速冷冻离心机, 日本日立公司; KQ-500DB 型数控超声波清洗器, 江苏省昆山市定山湖检测仪器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 *aurT* 基因的克隆与分析

参考文献[11-13]进行实验。根据 NCBI-blast 数据库中 *pimT* 基因序列, 使用 Clustal-w 软件进行多序列同源性比对, 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *aurT*-1 (5'-ATGGTGTCACGGAGAGCAT-

3') 和 *aurT*-2 (5'-CTAGTCGGCGCGGCCCGTCG-3'), 并以金褐链霉菌 SYAU0709 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增; 使用 DNA 片段纯化试剂盒进行回收, 交由上海生物技术公司测序, 采用 Clustalw (<http://www.genome.jb/tools/clustalw/>) 和 MEGA7.0 软件对 *aurT* 序列的同源性进行比对和分析。

#### 1.3.2 *aurT* 基因过表达载体构建

参考文献[6]和文献[14]进行实验。设计并合成具有 BamHI 和 EcoRV 限制性酶切位点的引物, 上游引物 *aurT*-Bt4 (5'-GTGGATCCATGGTGTCCACG-GAGAGCAT-3') 和下游引物 *aurT*-Et5 (5'-GT-GATATCCTAGTCGGCGCGGCCCGTCG-3'), 获得带有限制性内切酶位点的 *aurT* 基因片段; 与同种限制酶消化处理的 *pSET152* 载体进行连接, 得到过表达质粒 *pSET152-aurT*。重组质粒 *pSET152-aurT* 通过 *E. coli* ET12567 与野生型 *S. aureofuscus* SYAU0709 菌株进行接合转移, 筛选获得重组转化子, 将转化子 DNA 进行 PCR 和酶切验证, 获得 *aurT* 高效表达菌株  $\delta$  *aurT*。

#### 1.3.3 *aurT* 基因敲除载体构建

参考文献[15-17]进行实验。设计引物 *aurT*-U-F (5'-CGGAATTC TGCCTCCAC TCGCTCCGCT-3')/*aurT*-U-R (5'-GCTCTAGA GGCGCTTCTG ACG-GATCTCC-3') 和 *aurT*-D-F (5'-GCTCTAGATGC-CCGTCAC CTCCTGGAAT-3')/*aurT*-D-R (5'-CCCAAGCTTA ACCTCCACGGCGCCCTCGT-3'), 以 *S. aureofuscus* DNA 为模板扩增获得 *aurT* 基因的上下游同源臂 *aurT*-5 和 *aurT*-3; 同时以 *pC1203* 质粒为模板, 扩增抗性基因 *aac(3)IV* 及复制起始位点序列 OriT 的 DNA 片段 *aac(3)IV-OriT*; 以质粒 *pUC18* 为模板, 通过酶切连接并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 将 *aurT*-5 和 *aurT*-3 及片段 *aac(3)IV-OriT* 连接在 *pUC18* 载体上, 即 *pUC18-5129* 质粒构建成功; 用 *EcoRI*/*HindIII* 依次对 *pUC18-5129* 质粒和 *pC1203* 质粒双酶切, 获得 *aurJ3M-5-aac(3)IV-OriT-3* 片段和 *pC1203* 大骨架载体, 连接并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞; 挑选阳性克隆, 构建含有阿泊拉霉素抗性基因的 *aurT* 基因敲除重组质粒 *pDaurT*, 将此质粒转化至大肠杆菌 ET12567/*pUZ8002*, 利用接合转移将重组质粒导入到 *S. aureofuscus*, 通过抗性筛选出双交换重组菌株, 获得 *aurT* 基因敲除菌株  $\Delta$  *aurT*。

#### 1.3.4 摇瓶发酵实验

将野生型 *S. aureofuscus* SYAU0709 菌株、 $\delta$  *aurT* 菌

株和  $\Delta aurT$  菌株用挖块法接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 29 °C, 220 r/min 摇床培养 40 h, 以体积分数 10% 的接种量接种, 摇床发酵 72 h, 待测。

### 1.3.5 PI 因子结构类似物对金褐霉素产量的影响实验

参考文献[18-19]进行实验。采用紫外分光光度计在 303 nm 处测定样品吸光度值, 根据线性回归方程( $Y=0.2957X+0.0377$ )计算发酵液中金褐霉素的含量; 筛选不同 PI 因子结构类似物, 确定最佳 PI 因子及其质量浓度; 添加最佳 PI 因子, 对比 PI 因子在野生型和  $\Delta aurT$  菌株中对金褐霉素产量的影响。

### 1.3.6 *aurT* 基因的 Real-Time PCR 转录水平分析

参考文献[20-22]进行实验。提取 *S. aureofuscus* 总 RNA, 使用 Takara 公司的 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录试剂盒, 完成从 mRNA 至单链 cDNA 的反转录, 通过使用 SYBR Premix Ex Taq (Takara) 进行 Real-Time PCR 反应。Real-Time PCR 反应条件: 第一链 cDNA 合成, 50 °C 30 min, 94 °C 加热 2 min; 扩增, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 68 °C 20 s, 28 或 30 个循环, 72 °C 1 min。

*aurT* 反转录检测引物: AURT1, 5'-GTCGTCG-GCAACCTCATCGGCTCATAAC-3' 和 AURT2, 5'-GCGCCCAGGCCCCACAGA-3'。扩增 *lysA* 基因的引物: LYS1, 5'-CGCCCCGCCCACAGCAGG TCTTC-3' 和 LYS2, 5'-TGGGGGTGCATGAGGAAGTATGAT-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 *aurT* 基因的克隆与测序结果分析

PCR 扩增获得金褐链霉菌生物合成基因簇中

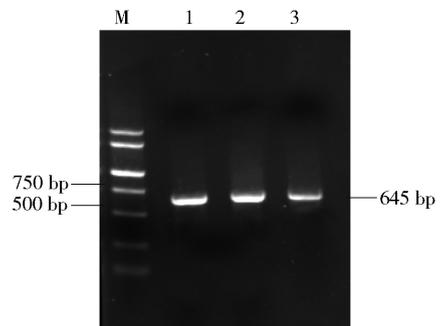
AurT	MVSTESILFAAAMSLLVIVIPGPSVLFVIGRALAHGRRRTALATVLGNLVGSYLLVTAVAW	60
PimT	MVSTESILFAAAMSLLVIVIPGPSVLFVIGRALAHGRRRTALATVVGNLIGSYLVVVAVAW	60
	***** **	
AurT	GLGALVEGSVAVFTGVKLAGAAYLVYLVGVRFRHRKEMRAADMEAPAGERRGLRITLDG	120
PimT	GLGALVETSAAVLMGVKLAGAVYLVYLVGVQAFRHRKEMRAADMEAPAGERRGLRITVLDG	120
	***** * **	
AurT	IFVGVTPNPKGVVFFAAVLPQFVNHSAGRVPQLMMVLGLVPVAIGMITDTLWGLGAAAARS	180
PimT	IFVGVTPNPKGIVFFAAVLPQFVDHSTGHVPLQMMVLGLVPVTIGMITDTLWGLGASAARS	180
	*****:***** **	
AurT	WFARSDRRLSMVGGAGGFAMIGLVTVAAATGRDD	214
PimT	WFARSDRRLSMVGGAGGFAMIGLVTVAAATGRAD	214
	***** *	

序列同源率为92% \*代表保守性

图2 AurT与PimT的氨基酸序列同源性比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence homology between AurT and PimT

645bp 的 *aurT* 基因片段, 结果如图 1。NCBI Genbank 登录号为 MH247109.1。在 NCBI-blast 数据库中比较 AurT 与 PimT 的氨基酸序列, 结果如图 2。AurT 与 PimT 的氨基酸序列同源率为 92%, AurT 属于 RhtB 家族调节因子<sup>[15]</sup>, 是金褐霉素生物合成的氨基酸转运蛋白。



M, 100 bp DNA marker; 泳道 1~3, *aurT* 基因。

图1 *aurT* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification of *aurT* gene

### 2.2 $\delta aurT$ 菌株与野生型菌株的生长和金褐霉素产量的比较

通过筛选高产金褐霉素的  $\delta aurT$  转化子 (JH-T1 ~ JH-T15), 确定  $\delta aurT$  JH-T2 菌株的金褐霉素产量最高。图 3 为野生型金褐链霉菌 SYAU0709 菌株和  $\delta aurT$  JH-T2 菌株的生长情况 (菌体干重) 及金褐霉素发酵产量的分析结果。由图 3(a) 菌体干重对比结果可知,  $\delta aurT$  JH-T2 菌株的生长要比野生型菌株快; 由图 3(b) 可知, 在 96 h 时,  $\delta aurT$  的金褐霉素产量达到 904  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 比野生型菌株提高了 1.3 倍; 由图 3(c) 可知, 通过 HPLC 分析,  $\delta aurT$  JH-T2 菌株发酵产量显著高于野生菌株, 进一步证实了 *aurT* 基因的过表达能够提高金褐霉素的产量, 说明 *aurT* 基因能够促进金褐霉素的合成。

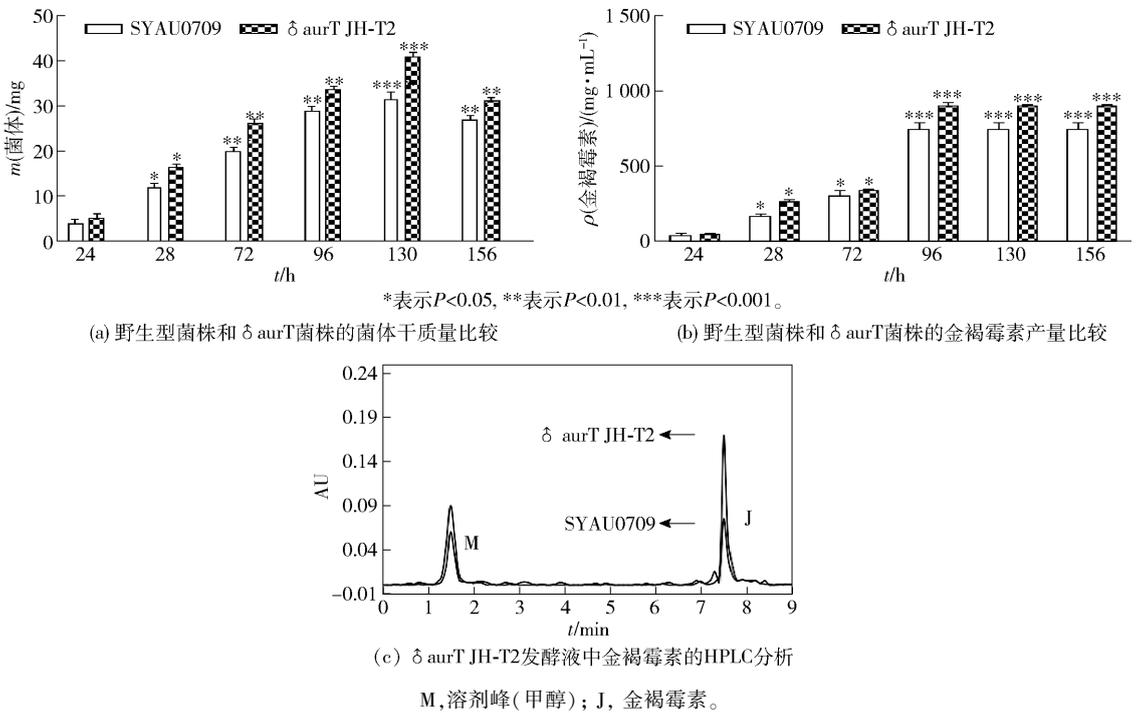
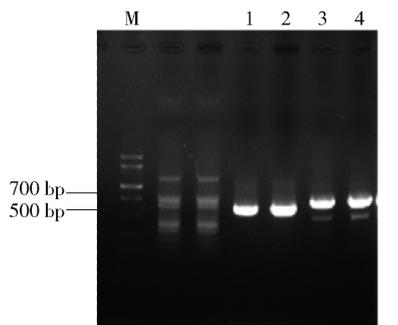


图 3 野生型菌株和  $\Delta aurT$  菌株生长情况及金褐霉素产量分析

Fig. 3 Analysis on growth of strains and yield of Aureofuscin of wild-type strains and  $\Delta aurT$

### 2.3 *aurT* 敲除突变株 $\Delta aurT$ 的构建结果

PCR 扩增引物 *aurT*-UF/*aurT*-UR 和 *aurT*-DF/*aurT*-DR, 获得 502 bp 的 *aurT*-5(上游同源臂)和 601 bp 的 *aurT*-3(下游同源臂), 结果如图 4。 *aurT* 基因敲除载体构建结果如图 5, 图 5(a) 是获得重组基因敲除质粒 pC1203- $\Delta aurT$  的构建图。用 Xba I 酶切后, 获得 1 209 bp 的 *aac*(3) *IV-OriT* 片段, 证明基因敲除质粒构建成功, 验证结果如图 5(b)。



M, marker; 泳道 1, 2, *aurT*-5; 泳道 3, 4, *aurT*-3。

图 4 *aurT* 上、下游同源臂 *aurT*-5、*aurT*-3 的克隆结果

Fig. 4 Results of cloning of homology arms *aurT*-5 and *aurT*-3 in *aurT* upstream and downstream

### 2.4 $\Delta aurT$ 菌株与野生型菌株的生长和金褐霉素产量的比较

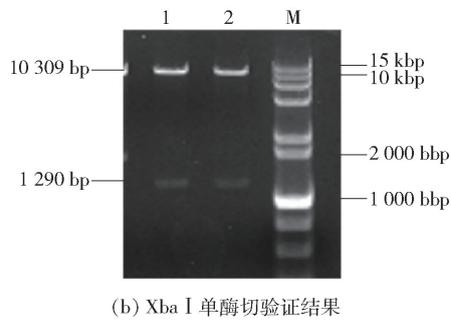
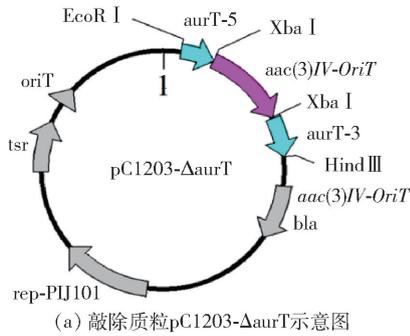
敲除菌株  $\Delta aurT$  和野生型菌株产生金褐霉素的比

较结果见图 6。由图 6(a) 可知,  $\Delta aurT$  菌株在 96 h 时金褐霉素产量达到 239  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 与野生型菌株的发酵产量(684  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相比, 降低了 65%, 但并未完全抑制金褐霉素的产生; 图 6(b) 的 HPLC 分析结果表明,  $\Delta aurT$  菌株的发酵产量低于野生型菌株, 说明 *aurT* 对金褐霉素生物合成的调控过程不同于途径特异性调控基因 *aurJ3M*, 这很可能是通过 PI 因子的分泌来影响和调控金褐霉素的生物合成过程的<sup>[15]</sup>。

### 2.5 PI 因子结构类似物对金褐霉素产量的影响

PI 因子结构类似物对金褐霉素产量的影响, 实验结果如图 7。图 7(a) 表明, 加入 1, 2-丙二醇、丙三醇、乙二醇、三乙醇胺后, 金褐霉素的发酵产量分别是 904、1 034、881、794  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 与空白对照组的产量(693  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相比, 发酵产量有不同程度提高, 其中丙三醇对金褐霉素的生物合成影响最为明显。

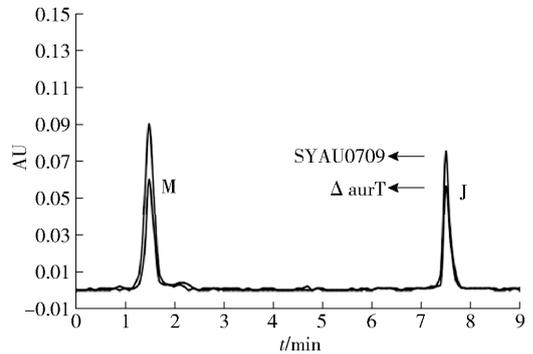
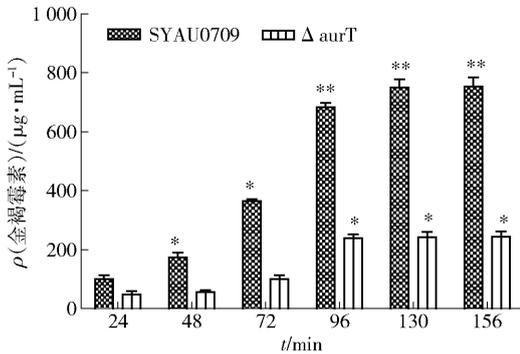
图 7(b) 的结果表明: 在野生型菌株和  $\Delta aurT$  菌株培养时加入 0.4 mL 的丙三醇, 发酵 96 h 后, 野生型菌株的金褐霉素产量为 1 034  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 比不添加时提高了 1.5 倍;  $\Delta aurT$  菌株的金褐霉素产量起初为 243  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 外源加入丙三醇后增加至 784  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 与野生型菌株的产量接近。这种现象说明, PI 因子结构类似物通过与基因簇内特异性受体结合, 启动相关基因的表达, 参与金褐霉素的生物合成调控, 能



M, marker; 泳道 1、2, pC1203-ΔaurT Xba I 单酶切获得 *aac(3)IV-OriT*。

图5 敲除质粒 pC1203-ΔaurT 示意图和 Xba I 单酶切验证结果

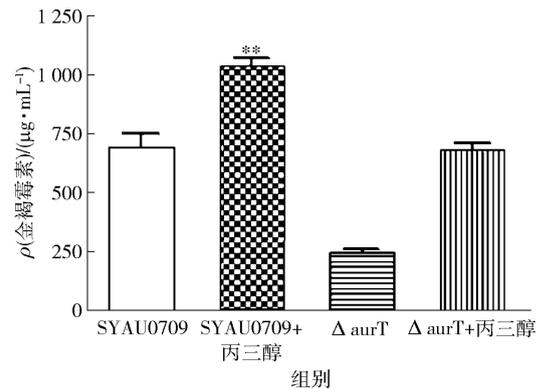
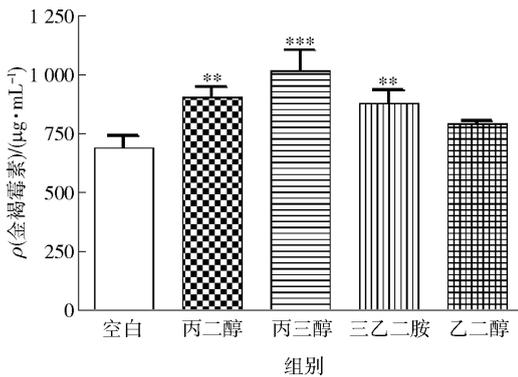
Fig.5 Schematic diagram of knockout plasmid pC1203-ΔaurT and verification results of Xba I single digestion



\* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。M, 溶剂峰(甲醇); J, 金褐霉素。

图6 野生型菌株和 ΔaurT 菌株的产金褐霉素比较结果

Fig.6 Comparison of Aureofuscin production of wild-type strains and ΔaurT



\*\* 表示  $P < 0.01$ ; \*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图7 PI 因子结构类似物对金褐霉素产量的影响

Fig.7 Effect of PI factors structural analogues on Aureofuscin production

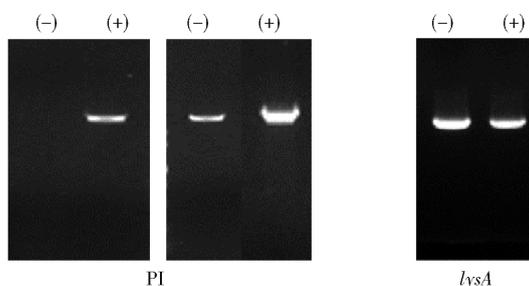
够促进金褐霉素的合成。

## 2.6 *aurT* 基因表达的 RT-PCR 分析

为了验证 *aurT* 基因表达是否受到 PI 因子诱导,在野生型菌株培养中,分别不添加和添加 PI 因

子结构类似物,实验结果如图8。图8结果表明,添加 PI 因子增加了 *aurT* 基因的转录水平,说明 PI 因子诱导 *aurT* 基因的表达,AurT 可能是诱导物 PI 因子的输出器,当 PI 因子达到一定浓度后与基因簇上

的受体蛋白结合,调控金褐霉素的合成<sup>[15]</sup>。



在金褐链霉菌野生型菌株培养中分别存在(+)或不存在(-)PI因子的情况下进行分析,PCR扩增循环28个(左图)和30个(右图);*lysA*基因(编码二氨基庚二酸脱羧酶)的转录作为内部对照,显示了在30个PCR循环后不存在(-)或存在(+)PI因子的分析结果。

图8 *aurT* 基因表达的 RT-PCR 分析

Fig. 8 Gene expression analysis of *aurT* by RT-PCR

### 3 结论

本研究获得了金褐链霉菌生物合成基因簇中 *aurT* 基因, 645 bp, NCBI Genbank 登录号为 MH247109.1。根据 NCBI 结果分析, AurT 属于 RhtB 家族调控因子, 编码 214 个氨基酸, 与 PimT 有 92% 的氨基酸序列同源性, 是金褐链霉菌的氨基酸转运子。

与野生型菌株比较, 高效表达菌株  $\delta$  *aurT* 的金褐霉素产量为 904  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 提高 1.3 倍, 敲除菌株  $\Delta$ *aurT* 的金褐霉素产量减少 65%, 但是没有完全丧失生产金褐霉素能力。这说明 *aurT* 对金褐霉素生物合成有促进作用, 但其调控作用不同于途径特异性调控基因 *aurJ3M*, 因为敲除基因 *aurJ3M* 会完全丧失生产金褐霉素的能力。

比较了 4 种不同 PI 因子结构类似物对金褐霉素合成的调控作用, 结果显示: 丙三醇的效果最佳, 当丙三醇质量浓度为 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 发酵时间达 96 h 时, 金褐霉素产量增加 1.5 倍, 达到 1 034  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $\Delta$ *aurT* 菌株金褐霉素产量是 243  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 而外源添加丙三醇后产量提高到 784  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 与野生型菌株的金褐霉素产量 693  $\mu\text{g}/\text{mL}$  接近, 说明恢复了金褐霉素的合成。在野生型菌株培养中添加丙三醇后, 通过 RT-PCR 反应验证 PI 因子诱导 *aurT* 基因的表达。丙三醇的添加增加了 *aurT* 基因的转录水平, 表明丙三醇与基因簇内特异性受体结合并启动了相关基因 *aurT* 的表达, 参与金褐霉素的生物合成调控。

本研究发现, 在信号转导级联反应中, 氨基酸输

出分子参与生产多烯大环内酯类化合物, 代表着我们对于了解多烯网络调控迈出了重要的一步。

### 参考文献:

- [1] 上海药物研究所金褐霉素研究小组. 一种新的抗真菌的抗生素: 金褐霉素 [J]. 微生物学报, 1975, 15(3): 180-187.  
Institute of Pharmaceutical Research in Shanghai in China. A original antimycotic antibiotic: aureofuscin [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1975, 15(3): 180-187.
- [2] 王富金, 武济民. 金褐霉素微生物检定法 [J]. 抗生素, 1980, 5(5): 25-26.  
WANG F J, WU J M. Aureofuscin biological standardization [J]. Antibiotic, 1980, 5(5): 25-26.
- [3] 魏杰, 孟宪军, 李辉. 发酵液中金褐霉素的提取及其鉴定 [J]. 食品科学, 2008, 29(10): 254-256.  
WEI J, MENG X J, LI H. Extraction and identification of aureofuscin from fermented broth [J]. Food Science, 2008, 29(10): 254-256.
- [4] 魏杰, 孟宪军, 姜秋实, 等. 金褐霉素高产菌株的选育及其发酵条件的优化 [J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 240-242.  
WEI J, MENG X J, JIANG Q S, et al. Study on the breeding of high aureofuscin producing strains and their fermentation conditions [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(2): 240-242.
- [5] WEI J, ZHANG G K, ZHANG X, et al. Improvement in aureofuscin production by *Streptomyces aureofuscus* with the addition of acetate and propionate sodium [J]. Bioscience Journal, 2016, 32(2): 478-485.
- [6] 魏杰, 孟宪军, 李辉. 金褐链霉菌 SYAU0709 中 *AURJ3M* 基因的克隆和序列分析 [J]. 食品科学, 2008, 29(12): 490-493.  
WEI J, MENG X J, LI H. Cloning and sequence analysis of *AURJ3M* gene in *Streptomyces aureofuscus* SYAU0709 [J]. Food Science, 2008, 29(12): 490-493.
- [7] WEI J, MENG X J, WANG Q Y. Enhanced production of aureofuscin by over-expression of *AURJ3M*, positive regulator of aureofuscin biosynthesis in *Streptomyces aureofuscus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(4): 322-329.
- [8] YANG J, XU D X, YU W C, et al. Regulation of aureofuscin production by the PAS-LuxR family regulator *AurJ3M* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 137(6): 109532
- [9] 魏杰, 宋威, 张国坤, 等. 金褐霉素和纳他霉素对冬枣

- 品质及代谢相关酶的影响[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(5): 18–22.
- WEI J, SONG W, ZHANG G K, et al. Effects of aureofuscin and natamycin on the quality and metabolizing enzymes of Dong Jujube[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 33(5): 18–22.
- [10] WEI J, ZHANG G K, ZHANG X. Effect of tea polyphenols incorporated with aureofuscin on the storage quality of scallops[J]. Fleischwirtschaft, 2016(5): 58–61.
- [11] ANTON N, MENDES M V, MARTIN J F, et al. Identification of PimR as a positive regulator of pimarinic biosynthesis in *Streptomyces natalensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2567–2575.
- [12] VOGT J H M, SCHIPPERS J H M. Setting the PAS: the role of circadian PAS domain proteins during environmental adaptation in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 513–522.
- [13] SANTOS-ABERTURAS J, PAYERO T D, VICENTE C M, et al. Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(6): 756–767.
- [14] ANTON N, SANTOS-ABERTURAS J, MENDES M V, et al. PimM, a PAS domain positive regulator of pimarinic biosynthesis in *Streptomyces natalensis* [J]. Microbiology, 2007, 153(9): 3174–3183.
- [15] CLÁUDIA M. PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimarinic-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis* [J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1): 33–46.
- [16] SANG J M, YEO J Y. Interspecies complementation of the LuxR family pathway-specific regulator involved in macrolide biosynthesis[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(1): 66–71.
- [17] ENRÍQUEZ L L, MENDES M V, ANTÓN N, et al. An efficient gene transfer system for the pimarinic producer *Streptomyces natalensis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 257: 312–318.
- [18] VICENTE C M, PAYERO T D, SANTOS-ABERTURAS J, et al. Pathway-specific regulation revisited: cross-regulation of multiple disparate gene clusters by PAS-LuxR transcriptional regulators[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(12): 5123–5135.
- [19] RECIO E, COLINAS A, RUMBERO A, et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarinic production in *Streptomyces natalensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(40): 41586–41593.
- [20] BELLMANN A, VRLJĀE M, PÁTEK M, et al. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 2001, 147: 1765–1774.
- [21] SWEENEY P, MURPHY C D, CAFFREY P. Exploiting the genome sequence of *Streptomyces nodosus* for enhanced antibiotic production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1285–1295.
- [22] HE F, LIU W S, SUN D, et al. Engineering of the TetR family transcriptional regulator SAV151 and its target genes increases avermectin production in *Streptomyces avermitilis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 399–409.

## Regulatory Effect and Mechanism of *aurT* Gene on Biosynthesis of Aureofuscin

WEI Jie<sup>1</sup>, YU Wenchen<sup>1</sup>, HAO Ruobing<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>, XU Dexin<sup>1</sup>, GAO Jun<sup>2</sup>

(1. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China;

2. Liaoning Academy of Forestry, Shenyang 110032, China)

**Abstract:** The new gene *aurT* (GenBank accession number: MH247109.1) in the Aureofuscin biosynthetic gene cluster was obtained by molecular cloning technology. And the function and regulatory mechanism of *aurT* gene on the Aureofuscin biosynthesis were analyzed by high-efficiency expression, gene knockout, high-performance liquid chromatography (HPLC) and bioinformatics technology in order to enhance the fermentation yield of Aureofuscin. The results showed that AurT belonged to the RhtB family regulator and was an amino acid transporter for Aureofuscin biosynthesis. Compared to original strain, the Aureofuscin production in the *aurT* gene highly expressing strain ( $\delta$  *aurT*) was 1.3 times

increased, which was reduced by 65% in the *aurT* gene knockout strain ( $\Delta aurT$ ), but the Aureofuscin production was not completely inhibited. It indicated that the regulation process of *aurT* on biosynthesis was different from the pathway-specific regulation gene *aurJ3M*. Four different structural analogues of PI factors (1,2-propylene glycol, glycerin, ethylene glycol, triethanolamine) were compared, and addition 0.4 mL glycerin had the best effect on regulating the Aureofuscin biosynthesis. The yield of Aureofuscin produced by  $\Delta aurT$  strain was 784  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with exogenous addition of glycerin for 96 h, which was only 244  $\mu\text{g}/\text{mL}$  without addition of glycerin. Further study using RT-PCR experiments verified that the addition of glycerol to the wild-type strain increased the transcription level and expression of *aurT* gene. It indicated that structural analogues of PI factors might bind to specific receptors in the gene cluster and initiate the expression of related genes. Aureofuscin biosynthesis was regulated by *aurT* gene via mediating the extracellular transport of PI factors.

**Keywords:** Aureofuscin; *aurT*; overexpression; gene knockout; PI factor

(责任编辑:叶红波)

(上接第 69 页)

## Effects of Ultrasound Treatment on Extraction of Pomegranate Peel Polyphenols

DENG Yong<sup>1</sup>, LIU Donghong<sup>1,2,3,\*</sup>

1. School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Institute of Agricultural Products Processing, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China;
3. Fuli Institute of Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Pomegranate peel is an easily available and inexpensive industrial by-product which is rich in polyphenols. In this study, ultrasound-assisted extraction method was used to extract polyphenols from pomegranate peel. The technological parameters were optimized and the composition and content of polyphenols from pomegranate peel were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The changes of pomegranate peel surface after ultrasonic treatment were also studied. The results showed that with ultrasonic assistant conditions, water as a solvent, had a higher yield of polyphenols, which was better than other organic solvents such as methanol. Therefore, water was used as a solvent for subsequent research. In the optimal conditions of liquid-solid ratio (mL:g) 60:1, ultrasonic power 400 W and ultrasonic time 25 min, the optimal yield of polyphenols was 39.30 mg/g (using gallic acid as the standard), which was higher than that of conventional solvent extraction method (32.58 mg/g). HPLC analysis showed that the content of punicalagin in pomegranate peel polyphenols was highest, followed by punicalin. Ultrasonic treatment could greatly enhance the extraction effect. The microscopic observation on the surface of pomegranate peel showed that ultrasound could significantly destroy the surface of pomegranate peel and affect the integrity of plant tissue, thus releasing more polyphenols.

**Keywords:** pomegranate peel; polyphenols; ultrasound-assisted extraction; HPLC; surface morphology

(责任编辑:叶红波)