DOI:10.3724/cbls.2026064 **CSTR**:32203.14.cbls.2026064
文章编号:1004-0374(2026)05-0917-15 ·技术与应用·

安丝菌素的生物合成途径及高产菌株研究现状

赵双英,张佩佩,付加芳,曹广祥*
(山东第一医科大学生物医学科学学院,济南 250117)

摘 要:安丝菌素作为抗体-药物偶联物的关键细胞毒素,其高产机制与工艺研究具有重要意义。本文系统梳理了高产策略的核心进展:生物合成机制解析阐明了聚酮合酶基因簇功能及后修饰酶催化网络,揭示了安丝菌素对生产菌株的多靶点自身毒性效应;菌种选育与改造融合传统诱变与分子技术,通过定向削弱竞争途径、强化限速步骤及调控因子工程,显著提升合成通量;代谢调控创新实现了前体供应精准优化与辅因子动态平衡;发酵工艺突破在规模化体系中验证了碳源时序调控与氧传递强化策略的工业可行性。未来研究需整合动态调控与智能发酵技术,推动产业化进程。

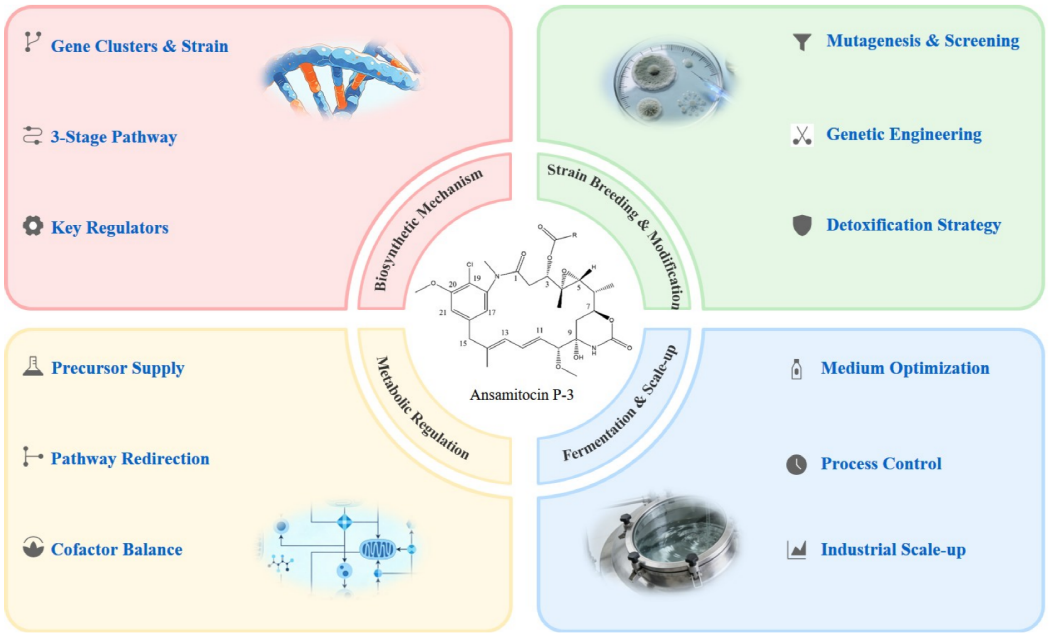
关键词:安丝菌素P-3;生物合成;代谢工程;发酵优化;抗体-药物偶联物
中图分类号:Q815;Q939.97 **文献标识码**:A

Research advances in the biosynthetic pathway and high-yield strains of ansamitocins

ZHAO Shuang-Ying, ZHANG Pei-Pei, FU Jia-Fang, CAO Guang-Xiang*
(School of Biomedical Sciences, Shandong First Medical University, Jinan 250117, China)

Abstract: Ansamitocin P-3 (AP-3), a potent cytotoxic payload for antibody-drug conjugates (ADCs), holds significant clinical value in targeted tumor therapy. However, its industrialization is hindered by low fermentation titers and high production costs, underscoring the critical need for research into its high-yield mechanisms and technologies. This review systematically summarizes recent advances in strategies to enhance AP-3 production, focusing on its biosynthetic pathway and the engineering of high-yield strains of *Actinosynnema pretiosum*. Elucidation of the AP-3 biosynthetic mechanism has clarified the modular organization of the polyketide synthase (PKS) gene cluster and the nonlinear post-modification enzymatic network. Furthermore, it has revealed the multi-target self-cytotoxicity of AP-3 against the producing strain and identified the regulatory roles of key factors, such as Asm8 and AdpA_1075. In strain development, the integration of traditional mutagenesis (e.g., UV, MNNG) and atmospheric and room temperature plasma (ARTP) with modern molecular tools like CRISPR-Cas9 has yielded remarkable results. Success has been achieved through targeted attenuation of competitive pathways, reinforcement of rate-limiting steps (e.g., supply of AHBA and methylmalonyl-CoA), engineering of regulatory factors, and alleviation of product feedback inhibition. Innovations in metabolic regulation have enabled precise optimization of precursor supply and the dynamic balancing of cofactors such as SAM and NADPH. In addition, breakthroughs in fermentation technology, including time-dependent carbon source control, enhanced oxygen transfer, and pulse-feeding strategies, have been validated for industrial feasibility in scaled-up bioreactors. The highest reported AP-3 titer of 757.7 mg/L stands as a key milestone. Finally, we summarize the primary bottlenecks hindering the industrialization of AP-3 production and propose future research directions. These focus on integrating dynamic metabolic regulation with intelligent fermentation technologies to further improve efficiency and reduce costs. This integrated approach is expected to accelerate the industrial translation of AP-3 and ensure a stable supply of this high-value cytotoxic payload for the development and clinical application of ADC drugs.

收稿日期:2025-11-13; **修回日期**:2026-02-06
基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(82204255)
***通信作者**:E-mail:caoguangxiang@sdfmu.edu.cn



Key words: ansamitocin P-3; biosynthesis; metabolic engineering; fermentation optimization; antibody-drug conjugate

安丝菌素是一种由珍贵束丝放线菌(*Actinosynnema pretiosum*)产生的苯安莎霉素类抗生素,其核心药理活性源于独特的抗微管蛋白结合机制。该分子通过不可逆地结合微管蛋白的β亚基,特异性占据长春花碱结合位点,从而破坏微管动态平衡(图1a)。这一作用导致肿瘤细胞有丝分裂阻滞,并最终诱导p53依赖性凋亡,进而表现出显著的抗增殖活性[1]。安丝菌素主要包括P-1、P-2、P-3及P-4等多种组分,其中P-3化学结构稳定、细胞毒性最强,是主要药用形式。基于其强效的细胞毒性,安丝菌素P-3(ansamitocin P-3,AP-3)已成为抗体药物偶联物(antibody-drug conjugates,ADCs)的关键细胞毒性载荷。目前,搭载AP-3的ADC药物靶向治疗HER2阳性乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤等实体瘤的临床研究已进入III期临床试验[2],凸显了其重要的转化医学价值。然而,天然AP-3的C-3位酯键(图1b)在血浆中稳定性较差,化学结构存在局限,并非直接作为ADC载荷的理想选择。因此,研究人员通过对AP-3进行针对性的化学修饰,开发出了一系列性能更优的衍生物,其中以美登素衍生物DM1和DM4最为成功[3]。这两者通过在C-3位引入硫代基团并连接不可裂解或可裂解(DM4)的连接子,显著提高了ADC的稳定性和治疗窗口。目前,基于DM1的ADC药物,如曲妥珠单抗-DM1(T-DM1)已成为治疗HER2阳性乳腺癌的一线标准疗法,而基于DM4的ADC药物,如索米妥昔单抗-DM4也在叶酸受体α(FRα)高表达的卵巢癌等领域展现出卓越疗效[4,5]。因此,对AP-3生物合成的研究,其重要目标之一是高效、低成本地生产这些高价值载荷及其衍生物,以满足日益增长的临床需求。随着ADC药物全球市场规模的持续扩张,AP-3作为高活性载荷的需求急剧增长。然而,其工业化生产面临严峻挑战,主要瓶颈是发酵效价低、生产成本高。

本文系统综述了AP-3的生物合成机制、高产策略及发酵工艺优化等方面的研究进展,旨在为解决其产业化生产瓶颈提供理论依据和工程策略,并为ADC药物关键毒性载荷的高效制造提供参考。

2 生物合成机制解析

Yu等[6]克隆了*A. pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565中AP-3的生物合成基因簇,揭示了其非连续结构。该基因簇包含对氨基苯甲酸合成酶系统、特异性甲氧基丙二酸酰基载体蛋白(ACP)、模块化聚酮合酶(PKS)基因(*asmA-D*)及后修饰基因(图2),为解析合成机制提供了关键分子靶点。

AP-3的高效生物合成依赖于其模块化通路与非线性修饰网络的精准协同[7],核心调控因子的发现是解析合成机制的首要突破,21个AP-3合成必需基因被鉴定后[8],确定核心合成途径包含三个阶段(图3)。(1)前体启动:3-氨基-5-羟基苯甲酸

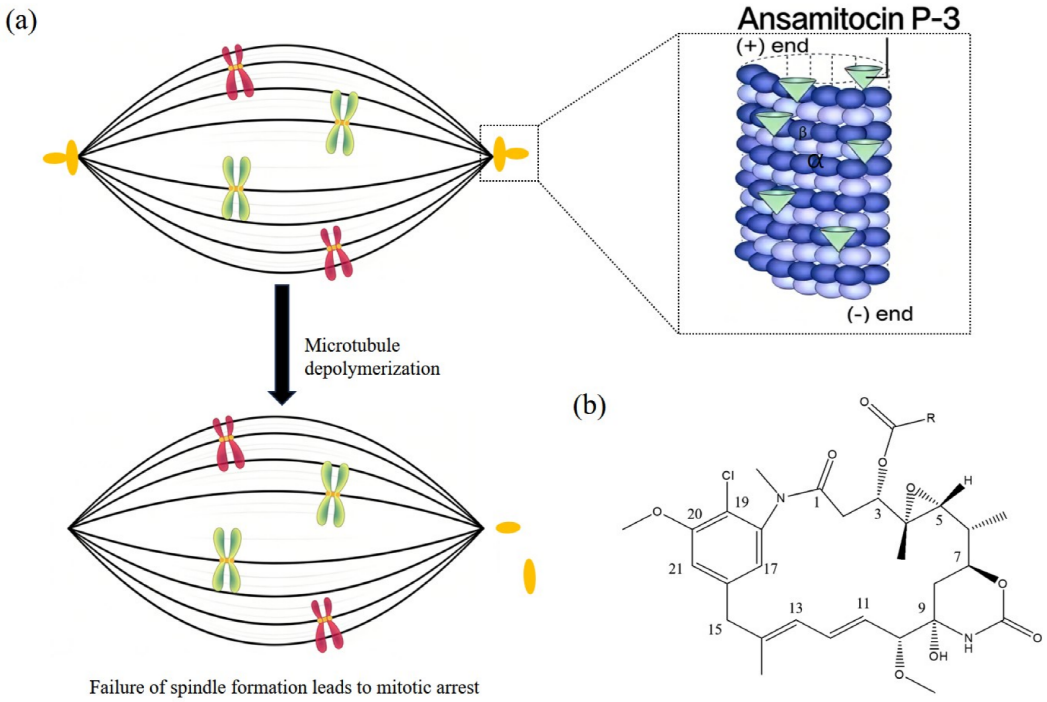


图 1　AP-3作用机制示意图(a)及化学结构(b)

Figure 1　Schematic diagram of the mechanism of action of AP-3 (a) and its chemical structure(b)

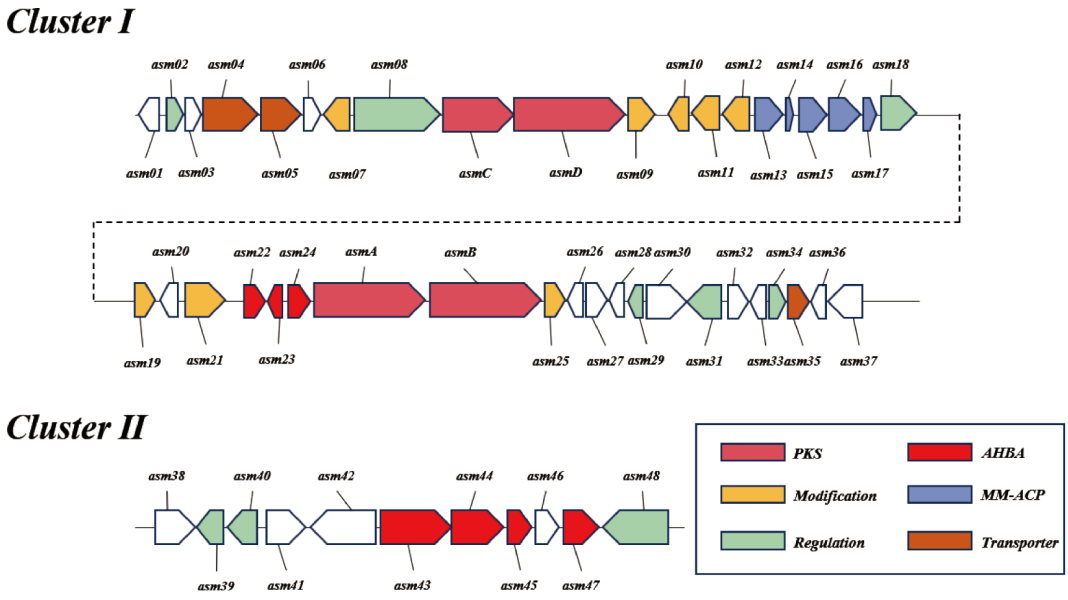


图2　珍贵束丝放线菌AP-3生物合成基因簇

Figure 2　Ansamitocin biosynthetic gene cluster in *A. pretiosum* ATCC31565

(AHBA)经安丝菌素生物合成基因簇中的腺苷化结构域激活，作为PKS的特异性起始单元；(2)链延伸：I型模块化PKS(由*asmA-D*基因编码)通过 6个核心延伸模块依次整合丙二酰-CoA、甲氧基丙二酰-ACP等延伸单元，首链延伸生成的R-构型立体中心对聚酮链正确组装至关重要；(3)环化与修饰：酰胺合酶催化大环内酰胺化，细胞色素P450等后修饰酶介导氧化、甲基化及卤化反应[7]。AP-3的具体合成过程如图4所示。关键酶功能鉴定揭示后修饰级联顺序为：Asm12(卤化酶)引入氯原子→Asm21(氨甲酰转移酶)形成环状氨基甲酸酯→Asm19(酰基转移酶)添加酯侧链→Asm7/Asm10(甲基转移酶)介导

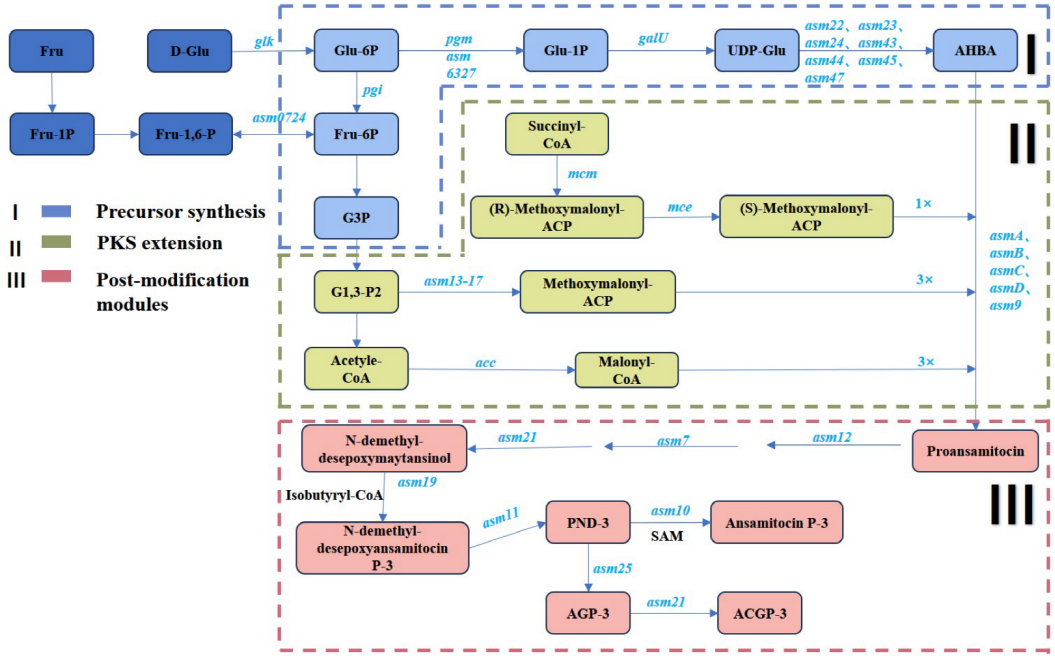


图3 AP-3生物合成路径图

Figure 3 The biosynthetic pathway diagram of AP-3

20-O-/N-甲基化[6,9]。值得注意的是,Li等[10]证实,Asm21是一种具有双重催化活性的氨甲酰转移酶,它不仅能催化聚酮骨架C-7羟基的氨甲酰化,还能对N-糖基化安丝菌素(Ansamitocinoside P-3,由*asm25*编码的糖基转移酶合成)中葡萄糖基的C-4′羟基进行氨甲酰化,从而生成新型衍生物4″-O-氨甲酰化安丝菌素苷(ACGP-3)。体外酶动力学分析进一步揭示,Asm21对糖基底物展现出更高的催化效率。这一发现极大地拓展了我们对后修饰酶底物杂泛性的认知,揭示了通过组合Asm25(N-糖基化)与Asm21(O-氨甲酰化)的级联催化,可以延伸安丝菌素的生物合成途径,为创造结构多样性衍生物提供了新策略。

调控网络的解析取得突破性进展:LAL家族因子Asm8特异性激活AHBA合成基因簇(*asm23/24/43-47*),其缺失导致合成完全阻断,外源补充AHBA可挽救[11];SARP家族因子Asm18过表达协同上调AHBA合酶(*asm43*)、聚酮合酶(*asm4*)及后修饰基因(*asm21*),使关键中间体产量提升4.7倍[12];全局因子AdpA_1075通过激活合成基因*asm28*与形态基因*ssgA_6663*实现代谢-发育偶联调控,增产85%[13]。基因组架构分析显示双簇协同:Cluster I含4个PKS基因(*asmA-D*)、环化酶*asm9*及后修饰基因;Cluster II富集AHBA辅助基因(*asm43-45*、*47*)与调控基因[6]。延伸单元的合成具有独特之处:*asm13-17*编码的甲氧基丙二酰-ACP(MM-ACP)以ACP载体形式参与延伸[6];PKS首链延伸生成的R-构型立体中心虽被后续双键迁移消除,但对聚酮链正确组装具决定性作用[14]。这些策略与多烯大环内酯类抗生素的PKS工程和后修饰途径工程以及后PKS修饰步骤的组合生物合成方法相一致[15,16],表明聚酮类天然产物生物合成中途径工程具有通用性和一定潜力。

3 菌种选育与遗传改造

本节综述通过传统诱变、常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma,ARTP)诱变及基因组重排等技术获得AP-3高产初始菌株的策略,并概述*A. pretiosum*中关键的遗传操作工具。

3.1 传统诱变

传统诱变育种通过物理或化学诱变剂诱导菌株遗传变异,是工业菌株改良的重要起点。采用紫外诱变处理*A. pretiosum* ATCC 31565(致死率>90%),结合96孔板-紫外分光光度法(OD_{254})初筛,获得突变株B24-13,其AP-3产量达112.5 mg/L,较野生型提高103%[17]。Du等[18]通过N-甲基-N′-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)化学诱变结合基于紫外分光光度法(OD_{254})的高通量预筛方法,从460株突变体中高效

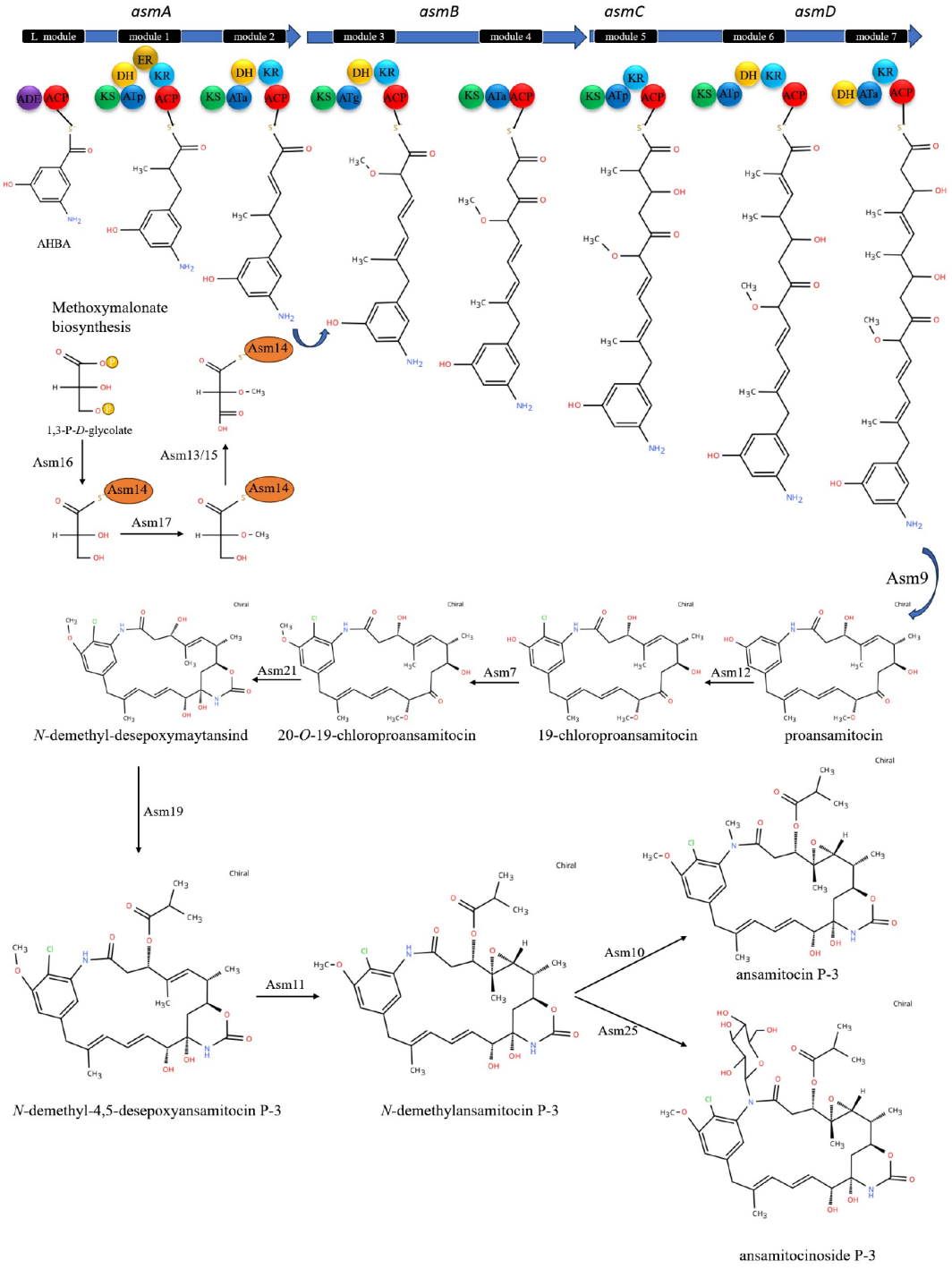


图 4　AP-3合成示意图

ADE：腺苷酰化结构域(adenylation domain)；ACP：酰基载体蛋白(acyl carrier protein)；KS：酮基合酶(ketosynthase)；DH：脱水酶(dehydratase)；ER：烯酰还原酶(enoyl-reductase)；KR：酮还原酶(ketoreductase)；AT：酰基转移酶(acyltransferase)。

Figure 4　Schematic diagram of AP-3 synthesis

ADE, adenylation domain; ACP, acyl carrier protein; KS, ketosynthase; DH, dehydratase; ER: enoyl-reductase; KR, ketoreductase; AT, acyltransferase.

分离出高产菌株M，其AP-3产量达194 mg/L，相较野生型提升3倍，为后续代谢工程改造提供了优良底盘菌株。

此外，通过诱变育种开发的工业菌株*A. pretiosum* X47可实现183.3 mg/L的AP-3产量，较原始菌株提升20倍。基因组分析显示，其高产表型源于AP-3合成

基因簇中调控基因*asm8*、*asm29*等及修饰酶基因的协同转录增强，而非基因簇序列变异，为理性代谢工程提供了靶点[19]。传统方法虽效率有限，但成本低、操作简便，仍是工业菌株改良的重要起点。

3.2 ARTP诱变

ARTP诱变作为一种新兴的物理诱变技术，因操作简便、突变率高而在微生物育种中广泛应用[20]。结合高通量筛选体系，如基于线黑粉酵母(*Filobasidium uniguttulatum*)的微孔板生测法，筛选出AP-3的高产突变株120G10[21]。进一步通过多轮基因组重排整合多亲本优良性状，例如以ARTP突变株L-40为亲本，经原生质体融合及三轮重排，获得融合子G3-96，AP-3产量达335.9 mg/L，较野生型提升93.8%[22]。ARTP与重排技术的联用，实现了从随机诱变到定向聚合正向突变的跨越。此外，通过改造正/负调控因子可有效提升代谢通量[23]。

3.4 解除产物抑制提高产量

AP-3高产的核心瓶颈在于其自身对生产菌株的多靶点毒性抑制。在毒性机制解析方面，Huang等[24]通过化学蛋白质组学技术揭示：AP-3为非竞争性抑制剂，利用光亲和探针QG-YNE特异性结合三个关键靶蛋白——dTDP-葡萄糖-4，6-脱水酶(dTGD，细胞壁合成)、黄素依赖胸苷酸合酶(FDTS，核苷酸代谢)及醛脱氢酶(ALDH，中心碳代谢)，导致细胞壁缺陷、脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)短缺及乙酰-CoA失衡三重代谢紊乱。过表达dTGD/FDTS可使野生型和高产菌WXR-24的AP-3产量分别显著提升，证实解除自身抑制是增产关键[24]；糖基转移酶Asm25可将关键前体N-demethylansamitocin P-3(PND-3)转化为副产物AGP-3，敲除该基因可将代谢流有效导向AP-3合成主途径[25]。

综上，综合应用传统诱变、ARTP、调控因子工程及解毒策略，显著提升了AP-3生产菌株的性能。各类策略对AP-3产量的提升效果如表1所示。这些成果为后续的代谢工程与发酵优化奠定了坚实的菌种基础。

4 前体供应与代谢调控

获得基础菌株后，对代谢网络进行理性设计是进一步提高产量的核心。本节系统阐述通过前体供应、竞争途径削弱、限速步骤强化、辅因子平衡、调控因子工程及解毒策略等多维度的代谢工程手段提升AP-3合成通量的研究进展。

AP-3的高效生物合成依赖于前体代谢网络的精细平衡与动态调控。研究者通过多层级策略优化胞内代谢环境，从外源前体补充、内源途径重构到辅因子工程，系统性地破解了前体供应不足与代谢流分配失衡的瓶颈，为AP-3产量突破提供了动力。

4.1 前体添加策略

外源前体的靶向补充是快速纠正代谢失衡的有效策略，其调控效应具有高度特异性。在氨基酸前体水平上，L-缬氨酸作为异丁酰辅酶A的直接前体，靶向补充可有效促进C-3位酰基侧链的生物合成，使AP-3产量提升约19.5%，同时选择性抑制其竞争组分AP-2与AP-4的生成[28]；而结构相似的L-亮氨酸则因驱动异戊酰辅酶A生成，反而抑制AP-3积累[29]。针对聚酮骨架合成的瓶颈，向AHBA缺陷株HGF073添加3-氨基-5-甲氧基苯甲酸或化学合成的proansamitocin，不仅恢复AP-3生产，更获得强效抗

表1 AP-3高产菌株选育与改造策略总结

Table 1 Summary of breeding and engineering strategies for high-yield AP-3 strains

策略类别	具体方法	产量(mg/L)	提升幅度	关键发现/靶点	参考文献
传统诱变	紫外诱变+高通量筛选	112.5	103%	突变株B24-13	[17]
	MNNG化学诱变	194	约3倍	突变株M，优良底盘	[18]
	多轮诱变选育X47	183.3	约20倍	转录增强，非基因突变	[19]
	三轮基因组重排	335.9	93.80%	融合子G3-96，聚合优良性状	[22]
调控工程	过表达*asm18*(SARP)	-	4.7倍(中间体)	协同上调合成基因簇	[12]
	过表达AdpA_1075	-	85%	代谢与形态发育偶联调控	[13]
解毒策略	过表达dTGD/FDTS	395.5/348.3	76%/55%	解除自身毒性靶点抑制	[16, 24]
	敲除糖基转移酶Asm25	4.42	约2.3倍	阻断前体PND-3的分流	[25]
途径重构	重构CAM途径	-	17倍(结构类似物)	降低终产物毒性	[26]
外排增效	过表达外排泵基因	330.6	25%	增强菌株产物耐受性	[27]

肿瘤活性的新衍生物脱氯AP-3[30],证实AHBA为聚酮骨架合成的关键限速前体。值得关注的是,化学合成的(R)-构型二酮体能绕过天然AHBA途径限制,在AHBA缺陷株中实现相当于天然途径10%的AP-3产量,为复杂前体工程化替代开辟新途径[14]。在辅因子优化方面,添加甲基供体SAM可缓解N-甲基转移酶Asm10催化瓶颈,推动PND-3高效转化为AP-3,增幅达10.6%[31]。进一步拓展至醇类前体工程,发酵初期添加异丁醇通过促进异丁酸积累及异丁酰-CoA供应,使AP-3产量提升4倍并抑制副产物AP-2生成[32]。上述策略表明,基于代谢节点特性的精准前体设计可最大化合成通量。

4.2 代谢途径改造

为降低外源添加成本并实现代谢流的持续优化,内源途径的系统性重构成为研究焦点。代谢工程策略已广泛应用于AP-3的生物合成优化,主要集中在竞争途径削弱与限速步骤强化两个方面,并与前体供应和辅因子调控形成协同。

在碳流定向调控与竞争途径削弱方面,弱化戊糖磷酸途径(如敲除*zwf*)可减少碳损失,结合过表达磷酸葡萄糖变位酶基因*pgm*以强化葡萄糖-1-磷酸(G1P)节点,使UDP-葡萄糖(UDPG)合成通量增加,AP-3产量提升3倍至185 mg/L[33]。类似地,共表达*pgm*与UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因*ugp*或敲除*zwf*/*gnd*,可使胞内UDPG积累量达野生型1.5~2.3倍,产量提高27%~45%[34]。然而,代谢组学分析揭示出新的代谢瓶颈:丙二酰辅酶A被脂肪酸合成途径大量消耗(*asm1327*上调);三羧酸循环(TCA)通量下降导致甲硫氨酸等前体短缺;糖基化副产物AGP-3/ACGP-3积累量激增至野生型的5~11倍[34]。

针对前体竞争,敲除甲基丙二酰辅酶A变位酶基因*asm2277*可阻断TCA循环分流,使产量增至70 mg/L[35];CRISPR-Cas9介导的竞争性PKS基因簇(如T1PKS-15)敲除则减少丙二酰辅酶A分流,产量提升27%,其原因是该竞争性簇会消耗AP-3合成所需的丙二酰-CoA前体,敲除后使该前体更多地用于AP-3的聚酮链延伸[36]。此外,糖基转移酶基因*asm25*的敲除可阻断PND-3向AGP-3转化,增产超过130%[25],进一步证实代谢分流是前体效率损失的核心机制。前体定向供给策略进一步拓展该思路:构建AHBA合成缺陷株HGF073,添加5-甲氧基/卤代氨基苯甲酸等非天然前体,在清除内源竞争途径的同时高产12种新衍生物[37]。此类策略系统解决了代谢分流导致的前体效率损失问题,为限速步骤强化奠定基础。

在限速步骤强化与前体池扩容方面,针对聚酮链延伸单元的供应瓶颈,主要聚焦甲基丙二酰辅酶A和丙二酰辅酶A的代谢调控。聚酮链延伸单元的合成前体通常来自于碳代谢[38-40]。丙二酰辅酶A主要是以乙酰辅酶A为底物,在乙酰辅酶A羧化酶(ACC)的催化作用下形成[41,42]。甲基丙二酰辅酶A则可以由三种途径合成:丙酰辅酶A羧化、缬氨酸代谢,以及琥珀酰辅酶A在甲基丙二酰辅酶A变位酶(MCM)及其保护蛋白MeaB共同作用下的转化[38,43]。

在酶促调控层面,于*asm12-asm13*间隔区插入双向启动子ermEp-kasOp/J23119p-kasOp上调MM-ACP合成基因,产量提升30%~50%;过表达N-甲基转移酶*asm10*(增产93%)并联合补充L-甲硫氨酸与L-缬氨酸,使产量从42 mg/L增至246 mg/L[28];上调甲硫氨酸代谢关键基因(如二氢乳清酸脱氢酶)可提升SAM供应,使通量提高85%[9]。在前体池扩容方面,改造UDPG途径过表达*pgm*/*spy*/*ugp*(增产40%)[44],强化羟乙酸单元基因簇*asm13-17*及*asmUdpg*使摇瓶产量达580 mg/L[18];过表达丙酰辅酶A羧化酶基因簇扩大甲基丙二酰辅酶A池(增产3倍)[35],协同强化甘醇酸单元与AHBA路径更使产量突破680.5 mg/L[45]。这些协同策略显著优化了碳流导向与催化效率。

在协同强化与系统优化方面,通过过表达*pgm*/*spy*/*ugp*增强UDPG途径使产量达168 mg/L[44];甲硫氨酸代谢通量与AP-3合成呈正相关[8];而异丁醇添加通过上调异丁醇脱氢酶活性及*asm19*基因转录,重塑丙二酰-CoA与乙酰-CoA代谢池[8]。在技术支撑层面,Goh等[46]开发的整合型载体系统(pAP系列)利用IS117转座子实现多位点整合,通过ermE启动子与优化RBS驱动限速基因表达,强化AHBA前体供应;Watanabe等[47]更在大肠杆菌中异源重构AHBA合成途径,为跨物种途径工程建立范式。类似地,在其他聚酮类产物(如肺炎霉素)的高产研究中,“多组学指导-多策略整合”的系统工程范式已被证实有效[48],这为AP-3的下一代高产菌株构建提供了可借鉴的技术框架。

4.3 辅因子调控

辅因子的动态平衡是维持高效生物合成的核心

驱动力。在代谢网络基础上,TCA途径提供细胞生长与次级代谢所需前体及辅因子,而戊糖磷酸途径(PPP)则通过Zwf调控代谢流分配,生成NADPH等关键辅因子[49]。在能量供应优化方面,引入NADH氧化酶基因增强呼吸链效率,促进ATP再生使AP-3合成速率提高22%;低氮发酵条件下上调TCA循环通量,可协调ATP与NADPH供应,满足聚酮合成的高耗能需求[50]。在甲基化瓶颈突破策略中,过表达甲硫氨酸腺苷转移酶加速SAM再生循环,联合外源甲硫氨酸添加使N-甲基化效率提升93%[28]。在氧化还原调控层面,醛脱氢酶APASM_1052不仅缓解醛毒性累积,还增加乙酰辅酶A供应,产量提高11.8%[24]。金属辅因子工程则证实,添加2 mmol/L的Mg^{2+}作为甲基丙二酰辅酶A变位酶(MCM)必需激活剂,可全面提升前体转化效率[51]。

当前研究已从前体单向补充演进至代谢网络多维协同:外源添加快速修正缺陷,途径改造实现碳流定向富集,辅因子工程则保障催化效率与能量稳态。未来需开发动态调控pH/温度响应型启动子系统实现合成代谢实时平衡,并探索辅因子,如NADPH/NAD^+转化模块跨途径循环新机制,以突破AP-3理论产量极限。

上述从前体供应、途径重构到辅因子平衡的多层次代谢调控策略,构成了提升AP-3合成通量的系统工程。为系统比较不同代谢工程策略的成效,表2汇总了关键干预手段及其对产量的影响,协同强化多个限速步骤是实现产量突破的有效途径。

4.4 调控因子的靶向改造

Karimian等[23]系统总结了过表达正调控基因(如*totR1*)或敲除抑制因子(如*totR5*)提升次级代谢产物通量的策略,为AP-3合成调控因子的工程化设计提供理论依据。

在实践层面,代谢通量的精细调控可通过改造不同层级的调控因子实现。在途径特异性层面,多拷贝过表达激活因子*asm39*使产量提高2.5倍,达52 mg/L;而抑制因子*asm2*的高剂量表达通过干扰天然阻遏功能增产1.6倍,产量达33 mg/L[52]。此外,SARP家族因子Asm8的过表达可协同上调生物合成基因簇[12]。在全局调控层面,改造氮代谢因子GlnR激活硝酸盐转运(ABC1)及外排基因,使产量提升28.3%[53];过表达*AdpA_1075*通过激活形态基因*ssgA_6663*及合成基因*asm28*实现产量提升85%[13];抑制AdpA依赖性蛋白酶基因*APASM_4178*具有跨菌种普适性,增产43%~46%[54]。其他菌种中保守全局调控因子的研究为AP-3调控提供借鉴,如阿维链霉菌中AfsR-AfsS系统可作为负调控因子

表2 AP-3代谢工程策略总结

Table 2 Summary of metabolic engineering strategies for AP-3

策略方向	方法	出发菌株	特点	产量(mg/L)	提升效果	关键基因/前体/机制	参考文献
前体添加	L-缬氨酸	NXJ-22	具有更优的AP-3天然合成潜力	159	126%	提供异丁酰-CoA,抑制AP-2/4	[28]
	异丁醇 (36 mmol/L)	*A. pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	61	4倍	扩大丙二酰-CoA与乙酰-CoA库	[32]
	SAM	*A. pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	268.2	10.60%	缓解N-甲基转移酶瓶颈	[31]
途径改造	敲除*zwf*+过表达*pgm*	*A. pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	185	约3倍	增强UDPG合成, 重定向碳流	[33]
	敲除*asm25*(糖基转移酶)	*A. pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	27.43	约9.4倍	阻断前体PND-3分流	[25]
	敲除竞争性PKS簇 (T1PKS-15)	*A. pretiosum* subsp. *auranticum L40*	高产AP-3的模式宿主	365	27%	减少丙二酰-CoA分流	[36]
	过表达*ugp+pgm+spy*	*A. pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	168	40%	协同强化UDPG途径	[47]
协同策略	强化AHBA与羟乙酸路径	*A. pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	680.5	显著突破	多模块前体池协同扩容	[48]
	添加Mg^{2+}(2 mmol/L)	*A.pretiosum* ATCC 31565	工业产AP-3重要放线菌	85	显著提升	激活MCM,促进前体转化	[51]
辅因子工程	过表达N-甲基转移酶+补充底物	NXJ-22	具有更优的AP-3天然合成潜力	246	约5倍	加速SAM再生循环	[28]

抑制抗生素合成，其蛋白质互作调控机制提示干预全局负调控的可能性[55]；锌响应调控因子Zur通过协同调控抗生素合成与菌体发育，为金属离子响应调控提供新思路[56]。

除了正调控因子外，对负调控因子的解析同样重要，可以揭示菌株生理与代谢之间的复杂权衡关系。例如，在*A. pretiosum* X47中，双组分系统响应调节因子PhoP是形态发育的关键负调控因子。缺失PhoP虽显著促进气生菌丝和孢子形成，但对AP-3产量无显著影响，提示其调控网络与AP-3合成途径相对独立，为形态优化与代谢工程的精准协同提供参考[57]。Wbl家族调控因子，如WhiD_sbh通过抑制级联调控通路影响次级代谢，其菌种特异性效应为代谢网络重构提供新靶标[58]。

高效、精准的基因编辑平台是挖掘调控因子与解析基因簇功能的核心驱动力。目前，在*A. pretiosum*中建立并应用的基因编辑方法已呈现出多元化的发展态势（表3），为AP-3的遗传改造提供了基础工具。然而，现有方法在编辑效率、通用性或操作便捷性上仍有提升空间，这促使研究者不断从其他微生物系统中汲取技术灵感。

例如，Jiang等[59]在丝状真菌*Glarea lozoyensis*（肺炎霉素生产者）中构建的高效CRISPR/Cas9系统，不仅实现了功能基因的快速鉴定，还发现了新的全局转录激活因子。尽管丝状真菌与放线菌在细胞结构上存在差异，但其CRISPR/Cas9系统的构建逻辑——包括gRNA设计、Cas9 codon优化、利用DNA修复机制等——具有高度通用性。因此，该工作为在*A. pretiosum*中优化类似的CRISPR编辑体系（如提高同源重组效率、减少脱靶效应）以加速调控靶点的挖掘，提供了直接且重要的方法论借鉴。

此外，放线菌属内的成功案例更具指导意义。Santos等[60]基于pSAM2位点特异性重组系统，在*Amycolatopsis*属菌株中开发了无标记基因组编辑工具，实现了大片段基因簇的精准操作。由于pSAM2系统在多种放线菌中具有功能活性，且*A. pretiosum*同属放线菌，该策略为在*A. pretiosum*中开发类似的无标记、大片段编辑平台提供了直接的技术原型和可行性依据。

综上所述，未来*A. pretiosum*基因编辑平台的开发方向应是：在完善现有方法的基础上，积极融合并适配来自丝状真菌（高效CRISPR系统）和近缘放线菌（如基于pSAM2的系统）的先进工具与技术理念，最终构建出更高效、更精准、适用于复杂代谢工程操作的下一代编辑体系。

4.5 缓解产物反馈抑制

工程化解毒策略包括三种。首先是三位一体改造：Liu等[26]通过删除内源酰基转移酶基因*asm19*阻断高毒性AP-3合成，引入外源氨基甲酰转移酶Asc21b与甲基转移酶Asm10b重构低毒性CAM合成途径，共表达环氧化酶Asc11消除副产物积累，并过表达激活因子Asm18增强前体供给，最终实现CAM产量17倍提升。然后是靶点抗性强化：Wang等[61]发现AP-3通过结合细胞分裂蛋白FtsZ即β-微管蛋白同源物干扰胞质分裂，过表达*ftsZ*基因可同步提升菌株抗性与AP-3产量。最后是外排系统增效：双转录组分析鉴定出BGC外4个外排基因，过表达外排基因*APASM_3193*可加速胞内AP-3外排，降低其反馈抑制并减少对菌体的毒性，从而提升产量和菌体活力[27]，其中APASM_2704可同时外排AP-3及结构类似物pretilactam，为多抗生素共生产奠定基础[27]。这些策略通过降低胞内毒性缓解反馈抑制，并为高

表3　*A. pretiosum* 中的基因编辑方法总结

Table 3　Summary of gene editing methods in *A. pretiosum*

编辑方法/系统	主要应用场景	技术特点与现状	代表性参考文献/说明
经典同源重组	基因敲除、点突变、小片段插入	技术成熟，效率较低、周期长；早期研究的主要手段	如构建AHBA缺陷型菌株HGF073[37]
CRISPR/Cas9系统	基因敲除、转录调控(Cas9)、基因簇删除	大幅提升编辑效率，可实现多位点编辑；目前已在*A. pretiosum*中初步建立，但体系(如启动子、递送方式)仍有优化空间	用于敲除竞争性PKS基因簇等研究[36]，表明其可行性
位点特异性重组系统	无标记编辑、大片段DNA的整合或删除	可实现无抗性标记残留的“洁净”编辑。目前还没有在*A. pretiosum*中的应用报道，是极具潜力的发展方向	pSAM2系统在近缘菌中的应用[60]，为*A. pretiosum*提供了直接参考
接合转移技术	外源DNA导入	利用*E. coli*-放线菌接合转移，是进行遗传操作(如质粒导入)的常规且关键的第一步	几乎所有涉及质粒的代谢工程研究的基础[47]

密度发酵创造生理条件。

跨越初级与次级代谢阶段的系统级调控是突破产量瓶颈的新策略。Zhao等[62]构建了链霉菌自我维持系统,该系统通过一个次级代谢启动子在发酵后期持续表达管家σ因子HrdB,使HrdB依赖的强启动子能在整个发酵周期内驱动目标基因表达。该策略实现了靛蓝、十一烷基灵菌红素和阿维菌素等产物从初级到次级代谢阶段的连续合成,在4 L发酵罐中将十一烷基灵菌红素产量提升至1.1 g/L。这为通过重构代谢时序实现AP-3持续高效生产提供了全新的工程学思路。

5 发酵工艺优化

发酵工艺优化是实现AP-3工业化量产的核心,更是衔接实验室高产菌株与实际生产应用的关键纽带。经过菌种选育、代谢调控等环节获得性能优良的生产菌株后,发酵过程中的营养供给、环境条件及操作参数,直接影响菌株合成潜力的发挥,同时决定着产物的生产效率、成本控制与批次稳定性。在规模化生产场景中,溶氧不足、代谢失衡、产物反馈抑制等问题尤为突出,亟需通过精准的工艺优化逐一破解。本章围绕培养基组分优化、关键工艺因子时序调控及规模化发酵放大三大核心方向,系统梳理碳氮源配伍、前体与辅因子添加、氧传递强化等实用策略的研究进展,重点关注低成本培养基构建与跨尺度工艺稳定性等工业生产核心需求,为AP-3高效、稳定的工业化生产提供可落地的技术支撑。

5.1 培养基优化

培养基优化通过系统评估碳源、氮源及前体等组分提升发酵效率,响应面法(response surface methodology,RSM)在多聚酮类化合物发酵优化中应用广泛[63-69]。在AP-3的生产中,多种优化策略被广泛研究并形成体系化成果。在碳源优化方面,果糖替代葡萄糖能够上调部分次级代谢基因表达(*asm6327*、*asm6396*)并优化辅因子平衡,使产量提升4倍[70,71]。而甘油-葡萄糖协同(5:5)则通过磷酸葡萄糖变位酶介导前体G1P生成,同时上调生物合成基因(*asm24*、*asm14*),产量为对照组的3.4倍[72]。在低成本培养基构建方面,通过RSM优化得到甘蔗糖蜜(63.22 g/L)-甘油(22.91 g/L)-冷榨豆粉(3.29 g/L)体系,产量达111.9 mg/L,进一步经异丁醇/豆油/维生素B_1强化后可提升至141 mg/L,成本降低50%[73]。在氮源调控方面,低有机氮(5 g/L)可重塑代谢网络,促进UDP-葡萄糖与甲基丙二酰-CoA积累,从而实现产量倍增[50]。此外,前体添加策略如L-缬氨酸(0.5 g/L)与SAM协同可分别强化C-3侧链与N-甲基化,使产量提高至246 mg/L[28]。上述研究共同构成了从碳氮源基础优化到前体精准调控的全链条策略,为AP-3的工业化生产奠定了基础。

5.2 关键因子调控

关键因子调控通过时序精准干预与代谢流定向实现增效。在金属离子工程中,Mg^{2+}通过激活甲基丙二酰辅酶A羧基转移酶(MCT)和变位酶(MCM),促进前体高效转化,产量提升至85 mg/L[51]。在时序代谢干预方面,在发酵中期48~72 h添加终浓度为36 mmol/L的异丁醇,经转化为异丁酸扩大丙二酰辅酶A和乙酰辅酶A库容,同时上调聚酮合酶基因*asm14*转录,使产量提高4倍,产量达61 mg/L[32],该效应在与遗传改造协同时进一步放大——*asm25*敲除株添加40 mmol/L异丁醇使产量提升至27.43 mg/L[25]。氧传递强化策略通过筛选大豆油等氧载体,显著改善溶氧水平并促进TCA循环与氨基酸代谢,产量提升49.48%[74]。

在胁迫诱导增效领域,稀土元素Sc^{3+}和化学诱导剂DMSO可分别通过激活代谢通路与增强磷酸戊糖途径提升前体供应,其策略具跨菌种迁移潜力[23]。

5.3 规模化发酵

规模化发酵验证了实验室成果的工业转化潜力,其核心突破体现为三级策略协同:工艺设计层面,基于果糖-甘油混合碳源的脉冲补料策略结合异丁醇诱导,使工程菌株*Oasm13-17:asmUdpg*在10 L生物反应器中的AP-3产量达757.7 mg/L,创下文献报道的最高纪录[45];氧传递瓶颈破解方面,大豆油与维生素B_1联用稳定高黏度体系溶解氧水平,在3 L规模实现423.9 mg/L产量[18];时序精准控制则证实,糖蜜-甘油培养基中延迟补加甘油可规避副产物积累,而分段补料耦合异丁醇策略使摇瓶产量达120.4 mg/L且放大后保持稳定[73]。这些成果标志着通过碳氮源配伍优化、添加剂时序调控及氧传质强化,AP-3高产工艺具备显著放大稳定性,为工业级生产奠定技术基础。

当前发酵工艺已从单一组分调整演进至多因子动态协同,未来需整合实时监测与反馈控制,实现智

能化升级以持续突破产量与经济性瓶颈。

从摇瓶到数升规模的发酵工艺优化显示,通过培养基组分的理性设计、关键因子的时序调控以及氧传递等工程问题的解决,可显著放大高产菌株的生产潜力。表 4系统梳理了不同发酵优化策略的效果,其中在10 L规模下通过脉冲补料与诱导策略获得的757.7 mg/L产量,标志着AP-3的高产工艺达到了新的里程碑,为其工业化应用提供了关键数据支撑。

6 总结与展望

AP-3作为ADC药物核心细胞毒性载荷,其高产技术已实现全链条突破。基础研究层面,多组学技术阐明了PKS基因簇模块化装配逻辑与非线性后修饰网络,关键调控因子(Asm8、AdpA_1075等)及双基因簇协同机制为定向改造提供精准靶点;菌种改良结合传统诱变、ARTP诱变与CRISPR-Cas9基因编辑,显著提升碳流分配效率与产物耐受性;代谢调控领域,前体供应优化、辅因子平衡与调控因子工程破解了合成瓶颈;发酵工艺方面,碳源时序调控、氧传递强化与脉冲补料策略的整合,在10 L反应器中达成757.7 mg/L的高产纪录,验证了规模化生产可行性。

从工业化应用核心需求来看,仍存在三大关键瓶颈:一是缺乏动态调控系统,前体合成与产物合成时序错配,影响产量稳定性与批次一致性;二是细胞耐受性不足,AP-3对生产菌株的多靶点毒性限制发酵密度与单位体积产能;三是规模化放大依赖经验试错,缺乏跨尺度关联模型,摇瓶高产特性难以稳定迁移至工业反应器。

6.1 工业化导向的调控策略展望

基于稳定性、可控性与经济性的工业生产核心诉求,以下调控策略展现出最优应用前景。

6.1.1 理性代谢工程精准调控

依托明确的生物合成机制,定向改造关键代谢节点的策略具有天然优势。敲除*asm25*、过表达*asm10*、强化外排泵基因*APASM_3193*等改造,靶点功能清晰、效果可预测,且在不同规模发酵中均实现稳定增产,表型维持性强,可作为标准化工业生产底盘,降低表型变异风险。

6.1.2 工艺层面模块化优化

无需复杂基因改造的工艺策略,适配现有生产线且成本可控。甘蔗糖蜜-甘油-冷榨豆粉构建的低成本培养基,经RSM优化后产量达141 mg/L, 成本降低50%;甘油-葡萄糖协同、中期添加异丁醇等碳源时序调控,可量化调节参数,实现自动化控制;大豆油与维生素B_1联用的氧传递强化技术,无需反应器改造即可改善传质效率,在3 L罐中实现423.9 mg/L产量,工业适配性极强。

6.1.3 前体与辅因子动态平衡技术

外源添加L-缬氨酸、SAM等物质,或通过代谢途径改造强化内源前体池(如AHBA、甲基丙二酰-CoA),可直接突破合成瓶颈。该类策略调控效应具有明确剂量依赖性,可通过HPLC实时监测动态调整,避免代谢负担与成本浪费,且不引入外源风险物质,符合药品生产质量控制要求,是工业化增产的“快效方案”。

6.1.4 跨尺度放大系统化策略

基于实验室数据构建的“碳源补料-氧传递-产物合成”关联模型,为解决规模化瓶颈提供有效路径。如10 L罐采用的脉冲补料与异丁醇诱导联用工艺,通过量化关键参数关联关系,实现产量稳定放大,减少工业试错成本,保障不同规模下的批次一致性,是“实验室高产”走向“工业量产”的关键桥梁。

表4　AP-3发酵工艺优化策略总结

Table 4　Summary of fermentation process optimization strategies for AP-3

工艺维度	优化策略	规模	产量(mg/L)	提升关键/机制	参考文献
碳源优化	果糖为唯一碳源	摇瓶	8.26	4倍,上调代谢基因与辅因子平衡	[70, 71]
	甘油:葡萄糖=5:5	摇瓶	13.86	3.4倍,促进前体G1P生成	[72]
培养基优化	糖蜜-甘油-豆粉 (RSM)	摇瓶	141	成本降低50%	[73]
前体/辅因子	L-缬氨酸+SAM	摇瓶	246	协同强化侧链与甲基化	[28]
过程调控	异丁醇	摇瓶	61	4倍,扩大酰基-CoA库	[32]
	低有机氮(5 g/L)	摇瓶	95.44	比生产率提升4倍,代谢重编程	[50]
氧传递强化	大豆油+维生素B_1	3 L罐	423.9	49.48%,改善溶氧与代谢	[18]
规模化工艺	脉冲补料+异丁醇诱导	10 L罐	757.7	文献最高纪录,碳源时序调控	[45]

6.2 未来研究方向

未来需聚焦“一体化体系构建”,以理性代谢工程改造的稳定菌株为底盘,整合模块化工艺优化与跨尺度放大模型,形成“菌株-工艺-监测”闭环系统。通过优化CRISPR-Cas9等工具挖掘新调控靶点,开发代谢物传感器等实时监测系统实现参数自动化调整,深化跨尺度放大机理研究建立参数映射模型,进一步降低生产成本,为ADC药物规模化应用提供稳定载荷供应。

参考文献

[1] Venghateri JB, Gupta TK, Verma PJ, et al. Ansamitocin P3 depolymerizes microtubules and induces apoptosis by binding to tubulin at the vinblastine site. PLoS One, 2013, 8: e75182.

[2] 李巧佴, 黎立喜, 李凤娟, 等. 抗体药物偶联物在人表皮生长因子受体2表达乳腺癌治疗中的进展. 中国医学前沿杂志(电子版), 2025, 17: 12-8.
Li Q, Li L, Li F, et al. Research progress of antibody-drug conjugates in the treatment of breast cancer with human epidermal growth factor receptor 2 expression. Chin J Front Med Sci, 2025, 17: 12–8.

[3] Fu Z, Li S, Han S, et al. Antibody drug conjugate: the ″biological missile″ for targeted cancer therapy. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7: 93.

[4] Vathiotis IA, Bafaloukos D, Syrigos KN, et al. Evolving treatment landscape of HER2-mutant non-small cell lung cancer: trastuzumab deruxtecan and beyond. Cancers (Basel), 2023, 15: 1286.

[5] Moore KN, Angelergues A, Konecny GE, et al. Mirvetuximab soravtansine in FRα-positive, platinum-resistant ovarian cancer. N Engl J Med, 2023, 389: 2162–74.

[6] Yu TW, Bai L, Clade D, et al. The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 7968–73.

[7] Kang Q, Shen Y, Bai L. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. Nat Prod Rep, 2012, 29: 243–63.

[8] Li J, Sun R, Ning X, et al. Genome-scale metabolic model of *Actinosynnema pretiosum* ATCC 31280 and its application for ansamitocin P-3 production improvement. Genes (Basel), 2018, 9: 364.

[9] Spiteller P, Bai L, Shang G, et al. The post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent ansamitocin by *Actinosynnema pretiosum*. J Am Chem Soc, 2003, 125: 14236-7.

[10] Li Y, Zhao P, Kang Q, et al. Dual carbamoylations on the polyketide and glycosyl moiety by *asm21* result in extended ansamitocin biosynthesis. Chem Biol, 2011, 18: 1571–80.

[11] Pan W, Kang Q, Wang L, et al. Asm8, a specific LAL-type activator of 3-amino-5-hydroxybenzoate biosynthesis in ansamitocin production. Sci China Life Sci, 2013, 56: 601-8.

[12] Li S, Lu C, Chang X, et al. Constitutive overexpression of *asm18* increases the production and diversity of maytansinoids in *Actinosynnema pretiosum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100: 2641–9.

[13] Guo S, Leng T, Sun X, et al. Global regulator AdpA_1075 regulates morphological differentiation and ansamitocin production in *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum*. Bioengineering (Basel), 2022, 9: 719.

[14] Kubota T, Brünjes M, Frenzel T, et al. Determination of the cryptic stereochemistry of the first PKS chain-extension step in ansamitocin biosynthesis by *Actinosynnema pretiosum*. Chembiochem, 2006, 7: 1221–5.

[15] Kong D, Lee MJ, Lin S, et al. Biosynthesis and pathway engineering of antifungal polyene macrolides in actinomycetes. J Ind Microbiol Biotechnol, 2013, 40: 529–43.

[16] Rix U, Fischer C, Remsing LL, et al. Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorialbiosynthesis. Nat Prod Rep, 2002, 19: 542–80.

[17] 荣艳, 郭静, 苏春, 等. 安丝菌素P-3生产菌株*Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum*的诱变育种及其发酵培养基优化. 化工进展, 2018, 37: 3988-94.
Rong Y, Guo J, Su C, et al. Mutagenesis breeding of *Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum* and optimization of fermentation medium for Ansamitocin P-3 production. Chem Ind Eng Prog, 2018, 37: 3988–994.

[18] Du ZQ, Zhang Y, Qian ZG, et al. Combination of traditional mutation and metabolic engineering to enhance ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum*. Biotechnol Bioeng, 2017, 114: 2794–806.

[19] Zhong C, Zong G, Qian S, et al. Complete genome sequence of *Actinosynnema pretiosum* X47, an industrial strain that produces the antibiotic ansamitocin AP-3. Curr Microbiol, 2019, 76: 954–8.

[20] Zhu Z, Ding X, Rang J, et al. Application and research progress of ARTP mutagenesis in actinomycetes breeding. Gene, 2024, 929: 148837.

[21] 栾书慧. 基于ARTP诱变的安丝菌素P-3高产菌株高通

量筛选体系的构建[D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
Luan S. Construction of a high-throughput screening system for high-yield Ansamitocin P-3 strains based on ARTP mutagenesis[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2020.

[22] 李瑞华, 李娟, 胡凤仙. 基因组重排提高珍贵橙色束丝放线菌中安丝菌素P-3. 基因组学与应用生物学, 2021, 40: 3248-54.
Li R, Li J, Hu F. Improvement of Ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* by genome shuffling. Genomics Appl Biol, 2021, 40: 3248–54.

[23] Karimian S, Farahmandzad N, Mohammadipanah F. Manipulation and epigenetic control of silent biosynthetic pathways in actinobacteria. World J Microbiol Biotechnol, 2024, 40: 65.

[24] Huang Q, Zhang X, Guo Z, et al. Biosynthesis of ansamitocin P-3 incurs stress on the producing strain *Actinosynnema pretiosum* at multiple targets. Commun Biol, 2023, 6: 860.

[25] Cheng H, Xiong G, Li Y, et al. Increased yield of AP-3 by inactivation of asm25 in *Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565. PLoS One, 2022, 17: e0265517.

[26] Liu Q, Wang Y, Xia X, et al. Combinatorial biosynthesis of 3-O-carbamoylmaytansinol by rational engineering of the tailoring steps of ansamitocins. ACS Synth Biol, 2024, 13: 721–7.

[27] Wang X, Wei J, Xiao Y, et al. Efflux identification and engineering for ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105: 695-706.

[28] Ning X, Wang X, Wu Y, et al. Identification and engineering of post-PKS modification bottlenecks for ansamitocin P-3 titer improvement in *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* ATCC 31280. Biotechnol J, 2017, 12:.

[29] 李婷兰, 韦柳静, 范宇翔, 等. 奇迹束丝放线菌合成安丝菌素过程中支链氨基酸的添加效果分析. 华东理工大学学报(自然科学版), 2013, 39: 675-80+712.
Li T, Wei L, Fan Y, et al. Analysis of the effect of branched-chain amino acid addition on Ansamitocin synthesis by *Actinosynnema mirum*. J East China Univ Sci Technol, 2013, 39: 675-80+712.

[30] Meyer A, Brünjes M, Taft F, et al. Chemoenzymatic approaches toward dechloroansamitocin P-3. Org Lett, 2007, 9: 1489–92.

[31] 李娟. 高通量筛选及发酵条件优化提高安丝菌素的产量[D]. 上海: 华东理工大学, 2020.
LI J. Improvement of ansamitocin production by high-throughput screening and fermentation condition optimization[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2020.

[32] Lin J, Bai L, Deng Z, et al. Enhanced production of ansamitocin P-3 by addition of isobutanol in fermentationof *Actinosynnema pretiosum.* Bioresour Technol, 2011, 102: 1863–8.

[33] Fan Y, Hu F, Wei L, et al. Effects of modulation of pentose-phosphate pathway on biosynthesis of ansamitocins in *Actinosynnema pretiosum*. J Biotechnol, 2016, 230: 3–10.

[34] Liu T, Jin Z, Wang Z, et al. Metabolomics analysis of *Actinosynnema pretiosum* with improved AP-3 production by enhancing UDP-glucose biosynthesis. J Biosci Bioeng, 2020, 130: 36–47.

[35] Zhao M, Fan Y, Wei L, et al. Effects of the methylmalonyl-CoA metabolic pathway on ansamitocin production in *Actinosynnema pretiosum*. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 181: 1167–78.

[36] Guo S, Sun X, Li R, et al. Two strategies to improve the supply of PKS extender units for ansamitocin P-3 biosynthesis by CRISPR-Cas9. Bioresour Bioprocess, 2022, 9: 90.

[37] Knobloch T, Harmrolfs K, Taft F, et al. Mutational biosynthesis of ansamitocin antibiotics: a diversity-oriented approach to exploit biosynthetic flexibility. Chembiochem, 2011, 12: 540–7.

[38] Chan YA, Podevels AM, Kevany BM, et al. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. Nat Prod Rep, 2009, 26: 90–114.

[39] Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. Nat Prod Rep, 2007, 24: 1262–87.

[40] Blažič M, Kosec G, Baebler Š, et al. Roles of the crotonyl-CoA carboxylase/reductase homologues in acetate assimilation and biosynthesis of immunosuppressant FK506 in *Streptomyces tsukubaensis.* Microb Cell Fact, 2015, 14: 164.

[41] Diacovich L, Peirú S, Kurth D, et al. Kinetic and structural analysis of a new group of Acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Biol Chem, 2002, 277: 31228–36.

[42] Rodríguez E, Banchio C, Diacovich L, et al. Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4166–76.

[43] Korotkova N, Lidstrom ME. MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for

protection of the enzyme from inactivation. J Biol Chem, 2004, 279: 13652–8.

[44] Fan Y, Zhao M, Wei L, et al. Enhancement of UDPG synthetic pathway improves ansamitocin production in *Actinosynnema pretiosum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100: 2651–62.

[45] Du ZQ, Zhong JJ. Rational approach to improve ansamitocin P-3 production by integrating pathway engineering and substrate feeding in *Actinosynnema pretiosum*. Biotechnol Bioeng, 2018, 115: 2456–66.

[46] Goh S, Camattari A, Ng D, et al. An integrative expression vector for *Actinosynnema pretiosum*. BMC Biotechnol, 2007, 7: 72.

[47] Watanabe K, Rude MA, Walsh CT, et al. Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100: 9774–8.

[48] Zhang X, Cheng S, Yang J, et al. Metabolic engineering of *Glarea lozoyensis* for high-level production of pneumocandin B_0. Synth Syst Biotechnol, 2025, 10: 381–90.

[49] Butler MJ, Bruheim P, Jovetic S, et al. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 4731–9.

[50] Liu T, Yang L, Chen J, et al. Metabolomic change and pathway profiling reveal enhanced ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum* with low organic nitrogen availability in culture medium. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104: 3555–68.

[51] Jia Y, Zhong JJ. Enhanced production of ansamitocin P-3 by addition of Mg^{2+} in fermentation of *Actinosynnema pretiosum*. Bioresour Technol, 2011, 102: 10147–50.

[52] Ng D, Chin HK, Wong VV. Constitutive overexpression of asm2 and asm39 increases AP-3 production in the actinomycete *Actinosynnema pretiosum*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009, 36: 1345–51.

[53] Meng S, Wu H, Wang L, et al. Enhancement of antibiotic productions by engineered nitrate utilization in actinomycetes. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101: 5341–52.

[54] Wu Y, Kang Q, Zhang LL, et al. Subtilisin-involved morphology engineering for improved antibiotic production in actinomycetes. Biomolecules, 2020, 10: 851.

[55] Hao Y, Liu W, Li X, et al. Streptomyces global regulators AfsR and AfsS interact to co-regulate antibiotic production and morphological development. Microb Biotechnol, 2024, 17: e14319.

[56] Lyu M, Cheng Y, Dai Y, et al. Zinc-responsive regulator zur regulates zinc homeostasis, secondary metabolism, and morphological differentiation in *Streptomyces avermitilis*. Appl Environ Microbiol, 2022, 88: e0027822.

[57] Zhang P, Zhang K, Liu Y, et al. Deletion of the response regulator PhoP accelerates the formation of aerial mycelium and spores in *Actinosynnema pretiosum*. Front Microbiol, 2022, 13: 845620.

[58] Zhang X, Wang J, Shi H, et al. Overexpression of the *Wbl* family regulator $whiD_{sbh}$ modulates secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. World J Microbiol Biotechnol, 2025, 41: 176.

[59] Jiang K, Jin Y, Luo P, et al. Exploration of the pneumocandin biosynthetic gene cluster based on efficient CRISPR/Cas9 gene editing strategy in *Glarea lozoyensis*. Int J Biol Macromol, 2024, 279: 135220.

[60] Santos LDF, Caraty-Philippe L, Darbon E, et al. Marker-free genome engineering in amycolatopsis using the pSAM2 site-specific recombination system. Microorganisms, 2022, 10: 828.

[61] Wang X, Wang R, Kang Q, et al. The antitumor agent ansamitocin P-3 binds to cell division protein FtsZ in *Actinosynnema pretiosum*. Biomolecules, 2020, 10: 699.

[62] Zhao M, Wang M, Wang S, et al. A self-sustained system spanning the primary and secondary metabolism stages to boost the productivity of *Streptomyces*. ACS Synth Biol, 2022, 11: 353–65.

[63] Deepak V, Kalishwaralal K, Ramkumarpandian S, et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. Bioresour Technol, 2008, 99: 8170–4.

[64] Mutalik SR, Vaidya BK, Joshi RM, et al. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. Bioresour Technol, 2008, 99: 7875–80.

[65] Zhang YJ, Li Q, Zhang YX, et al. Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM). J Zhejiang Univ Sci B, 2012, 13: 103–10.

[66] Chen H, Wu MB, Chen ZJ, et al. Enhancing production of a 24-membered ring macrolide compound by a marine bacterium using response surface methodology. J Zhejiang Univ Sci B, 2013, 14: 346–54.

[67] Gao H, Liu M, Liu J, et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. Bioresour Technol, 2009, 100: 4012–6.

[68] Sahu AK, Kumar T, Jain V. Formulation optimization of

erythromycin solid lipid nanocarrier using response surface methodology. Biomed Res Int, 2014, 2014: 689391.

[69] Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. An introduction to fermentation processes[M]//Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of fermentation technology (3rd ed). Oxford: Butterworth-Heinemann, 2017: 1–20.

[70] Li T, Fan Y, Nambou K, et al. Improvement of ansamitocin P-3 production by *Actinosynnema mirum* with fructose as the sole carbon source. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175: 2845–56.

[71] Fan Y, Gao Y, Zhou J, et al. Process optimization with alternative carbon sources and modulation of secondary metabolism for enhanced ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum*. J Biotechnol, 2014, 192 Pt A: 1–10.

[72] Gao Y, Fan Y, Nambou K, et al. Enhancement of ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum* by a synergistic effect of glycerol and glucose. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41: 143–52.

[73] Liu T, Bessembayeva L, Chen J, et al. Development of an economical fermentation platform for enhanced ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum*. Bioresources Bioprocessing, 2019, 6: 1.

[74] Zhu X, Hou K, Zheng P, et al. Improvement of biosynthetic ansamitocin P-3 production based on oxygen-vectorscreening and metabonomics analysis. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 3564185.