培养调控激活卡伍尔氏链霉菌 NA4 产 frontalamides 类物质的研究

张 盈[1,2]，潘华奇[1]，于素亚[1]，胡江春[1*]

（1. 中国科学院 沈阳应用生态研究所，辽宁 沈阳 110016；2. 中国科学院大学，北京 100049）

摘 要 微生物（尤其是链霉菌）是农用抗生素的主要来源之一。前期基因筛选发现卡沃尔氏链霉菌 NA4 具有产生多种 PKS 和 NRPS 类型化合物的潜能，但只分离到 PKS I 型的抗植物病原真菌的物质 bafilomycins，为了挖掘更多的抗真菌先导化合物，采用 Hiseq2500 高通量测序技术获得其基因组扫描图，经生物信息学分析和文献检索发现，其除了能产生 bafilomycins，还具有产生 polycyclic tetramate macrolactam（PTM）、alkylresorcinol 和 valinomycin 类型抗真菌活性物质的潜力。为了激活这些基因簇，采用基于 OSMAC 策略中的培养调控为手段，通过改变培养基碳氮源组分，添加氨基酸前体及不同金属离子，使用活性追踪和 HPLC-UV 发现用麸皮替代 NM2 培养基中甘油的培养条件能激活 PTM 类型 frontalamides 合成基因簇，经 LC-MS 分析有 7 个主要的化合物是 PTM 类化合物，其中的 3 个可能为新化合物。通过培养调控激活了 PTM 基因簇，为新型 PTM 类化合物进一步的分离鉴定提供参考。

关键词 卡伍尔氏链霉菌；Polycyclic tetramate macrolactam；Frontalamides；培养调控；基因组挖掘

中图分类号 Q949.32 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2018)02-0029-08

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2018.02.005

Culture Regulation to Activate Frontalamides Production by *Streptomyces cavourensis* NA4

ZHANG Ying[1,2], PAN Hua-qi[1], YU Su-ya[1], HU Jiang-chun[1]

(1. *Shenyang Inst. of Appl. Ecol., Chinese Acad. of Sci., Shenyang* 110016; 2. *Chinese Acad. of Sci., Beijing* 100049)

Abstract Microorganisms (especially *Streptomyces*) are one of the main sources of agricultural antibiotics. Gene screening in early stage has found that *Streptomyces cavourensis* NA4 to have the potential to produce a variety of PKS and NRPS type compounds, however, only bafilomycins of PKS I type against plant pathogenic fungi were isolated. In order to burrow more antifungal guiding compounds, a genome scanning draft of *S. cavourensis* NA4 was obtained using Hiseq2500 high throughput sequencing technology, it was found through bioinformatic analysis and literature retrieval, strain NA4 also possessing the potential production of polycyclic tetramate macrolactam (PTM), alkylresorcinol, and valinomycin type antifungal active matter, except for producing bafilomycins. In order to activate these gene clusters, through changing the components of carbon and nitrogen sources in the medium, and adding amino acid precursors and different metal ions, and applying activity tracing as well as HPLC-UV, it was found that using pollard to replace glycerol in NM2 medium cultural conditions could activate frontalamides synthetic gene cluster of PTM. There were seven main compounds being PTM type compound, among them three possibly were new compounds. In this study, the PTM gene cluster was activated adopting culture regulation, and it provided a guidance for further separa-

基金项目：国家自然科学基金项目(41576136)；辽宁省博士科研启动基金项目(201501036)；国家863计划项目子课题(2012AA092104-6)

作者简介：张盈 女，硕士研究生。主要从事海洋微生物基因组挖掘的研究。Tel：024-88087740，E-mail：zhangying908@163.com

* 通讯作者。男，研究员，硕士生导师。主要从事海洋微生物次级代谢产物的研究。Tel：024-88087741，E-mail：hujc@iae.ac.cn

收稿日期：2017-11-14

万方数据

tion and identification of novel PTM compounds.

Keywords *Streptomyces cavourensis*; polycyclic tetramate macrolactam (PTM); frontalamides; culture regulation; genome burrowing

植物真菌病害是植物病害中最严重的病害之一,严重威胁着农业生产、粮食安全及生物多样性[1]。主要粮食作物水稻、小麦、马铃薯、玉米等均遭受真菌病害带来的经济损失。据报道,全球每年因稻瘟病造成的水稻产量损失约占总产量的10%~15%,经济损失达数十亿美元[2]。由禾谷镰孢菌和黄色镰孢菌引起的小麦赤霉病可使小麦在大流行年份病穗率达到50%~100%,减产5%~15%[3]。面对严重的植物真菌病害,目前最常用的就是化学防治,但是化学农药的长期大面积使用带来了水土环境污染、农产品农药残留等严重问题。同时新发生的真菌病害和超级耐药病菌不断出现[4]。因此,研制安全和高效的新型生物杀菌剂迫在眉睫。微生物来源的天然产物在药物先导物发现及其新药开发中起着重要作用,是农用抗生素的主要来源之一[5-6]。特别是随着基因组学的快速发展,人们发现微生物基因组中(尤其是放线菌)蕴涵了丰富多样的次级代谢产物合成基因簇。如 *Salinispora tropica* 基因组中参与形成次级代谢产物的基因簇有17个,约占基因组总量的9.9%[7]。著名的阿维菌素产生菌 *Streptomyces avermitilis* 中则有25个次级代谢基因簇,占整个基因组的6.4%[8]。然而,目前仅仅从其中分离鉴定了几类次级代谢产物,大多数产物因其合成基因为"隐性"并没有被发掘,因此,基于基因组序列的 genome mining 技术应运而生[9]。相对于异源表达、过表达正调控基因、敲除负调控基因以及全局性启动子的改造等激活策略,培养调控不需要进行任何遗传操作,简单有效而被研究者广泛使用[10]。这种 OSMAC (One strain many compounds) 思想指导下的培养调控,强调通过改变培养基组分、培养条件、添加生物合成前体及关键酶激活或抑制剂等方式,可以有效挖掘微生物菌株次级代谢潜能,提高其代谢产物的多样性,从而实现对"隐性"次级代谢产物的激活[11]。如中国科学院南海海洋研究所张长生等,利用培养调控对深海链霉菌 SCSIO 03032 的次级代谢产物进行了深入的挖掘,从7个不同培养基条件下共分离获得21个次级代谢产物,含15个新化合物。在改良的 ISP3 培养基中,该菌产生了3个新的大环内酰胺类抗生素 heronamides D-F,而使用改良的 A1BFe+C 培养基时,该菌则产生了结构新颖独特的双吲哚螺环生物碱 spiroindimicins A-D[12-14]。前期对分离自南海深海沉积物的卡伍尔氏链霉菌 NA4 基因筛选发现其具有产生 PKS、NRPS 类化合物的潜力,但只分离到了 PKS I 型的 bafilomycins B1 和 C1[15]。为了全面、深入认识菌株 NA4 合成次级代谢产物的潜能,挖掘更多抗真菌先导化合物,采用 Illumina Hiseq2500 二代高通量测序技术测序,并组装获得其基因组扫描图,进一步生物信息学分析发现,其除了能产生已经发现的 bafilomycins,还具有产生 lantipeptide AmfS、alkylresorcinol、valinomycin、desferrioxamine_B、frontalamides、nonactin、isorenieratene、ectoine、rabelomycin 和 lassopeptide SRO15-2005 等多种结构类型化合物的潜力。经文献调研,该菌株中尚未被发现的 polycyclic tetramate macrolactam (PTM) 类化合物 frontalamides[16]、valinomycin[17] 和 alkylresorcinol[18] 具有良好的抗真菌活性。为了深入挖掘这些具有抗真菌活性的次级代谢产物,通过改变培养基碳氮源组分,添加氨基酸前体,添加不同金属离子等培养调控的手段尝试对这些合成抗真菌活性物质的"隐性"基因组进行激活,并使用活性追踪和 HPLC-DAD-MS 进行分析以期发现新的衍生物,为进一步进行目标化合物的分离和鉴定提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 卡伍尔氏链霉菌 NA4 分离自中国南海(E 111°36.160′, N 17°59.928′)水深1 464 m的海底沉积物中。

1.1.2 培养基 ①人工海水高氏一号培养基:可溶性淀粉 20.0 g,KNO_3 1.0 g,K_2HPO_4 0.5 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g,人工海水(2.5%海盐水)1.0 L,琼脂 20.0 g,pH 7.0~7.2;②ISP2 培养基:酵母膏 4.0 g,麦芽汁 10.0 g,葡萄

万方数据

糖 4.0 g,蒸馏水 1.0 L,琼脂 20.0 g,pH 7.0;③NM2 培养基(Novel Medium 2):葡萄糖 1.0 g,乳糖 10.0 g,甘油 20.0 mL,大豆蛋白胨 5.0 g,硝酸铵 1.5 g,酵母粉 3.0 g,1 倍微量元素液($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g,$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1 g,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g,蒸馏水 1.0 L) 0.2 mL,蒸馏水 1.0 L,pH 6.0;④TSBY 培养基:胰蛋白胨 15.0 g,大豆蛋白胨 5.0 g,NaCl 5.0 g,K_2HPO_4 2.5 g,葡萄糖 2.5 g,蔗糖 103.0 g,蒸馏水 1.0 L,pH 7.3 ~ 7.5;⑤PDA 培养基:新鲜去皮土豆 200.0 g,切成小块,加 1.0 L 自来水煮至土豆松软,用 8 层纱布过滤得滤液,补自来水至 1.0 L,加入葡萄糖 20.0 g,琼脂 20.0 g,自然 pH。

1.1.3　试剂与仪器　DHZ-C 恒温摇床(大仓市实验仪器有限公司);YXQ-LS-50S11 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);BSA2202S 电子天平(赛多利斯);RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);Ultimate-3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex);Waters 2695. ZQ4000 液相色谱质谱联用仪(美国 Waters 公司)。色谱乙腈及色谱甲醇(国药集团试剂有限公司);其他化学试剂均为国产 AR 纯。

1.2　方法

1.2.1　菌株 NA4 基因组 DNA 的提取　将菌株在 TSBY 液体培养基中培养 2 d,5 000 × g 离心 10 min,弃上清,收集菌丝体,用 STE 缓冲液清洗菌体 2 次,然后用 5 mL 的 STE 缓冲液重悬菌体,加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL,37 ℃温育 45 min,每隔 10 min 颠倒混匀;加入蛋白酶 K 至终浓度为 0.5 mg/mL,混匀;加入 600 μL 的 10% SDS,混匀;50 ℃温育 2 ~ 5 h,20 ~ 30 min 颠倒混匀 1 次;加入 2 mL 5 mol/L NaCl 和 5 mL 氯仿,室温静置 30 min 以上;4 500 × g 离心 10 min,取上清,加 0.6 倍体积的异丙醇,颠倒混匀,用灭菌的玻璃棒搅出总 DNA,用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次,小心弃上清,挥干,将基因组 DNA 溶于 1 ~ 2 mL TE (pH 8.0) 中,置于 -20 ℃备用。

1.2.2　菌株 NA4 全基因组测序　利用第二代测序技术,illumina 公司的 Hiseq2500 进行 NA4 的基因组序列扫描。基因组序列测定和组装由上海凌恩生物科技有限公司完成。

1.2.3　菌株 NA4 基因组预测的次级代谢产物　将 NA4 的基因组草图序列提交次级代谢产物在线分析工具 antiSMASH 3.0[19],预测 NA4 次级代谢产物合成基因簇,并进行人工校对。

1.2.4　培养基的设计　以 NM2 培养基为基础培养基,通过改变培养基碳氮源组分,添加不同金属离子及氨基酸前体,新设计了 19 种发酵培养基(表 1)。

1.2.5　菌株 NA4 的发酵培养和发酵产物分析　从活化好的 NA4 平板上,刮取 1 环孢子接种于 ISP2 培养基(250 mL 三角瓶),于 28 ℃ 180 r/min 条件下摇床培养 3 d 制备种子液,按 6% 的接种量接种于上述 20 种发酵培养基中,28 ℃ 180 r/min 摇床培养 8 d,5 000 × g 离心 10 min,发酵上清液用等体积的丁酮萃取,萃取 3 次后,将萃取液用旋转蒸发仪减压浓缩获得粗提取物样品,用无水甲醇将其配成 10 mg/mL 的浓度备用。采用滤纸片法,测试发酵粗提物对病原真菌黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抑制效果。将病原真菌接种到 PDA 平板的中央,待菌落生长至直径 5 cm 时,将浸有粗提物的滤纸片放在四周。萃取液质量浓度为 10 mg/mL,滤纸片直径为 8 mm,上样 20 μL,对照用无水甲醇。将病原真菌继续培养约 2 d,用游标卡尺测抑菌圈的大小。对具有抗病原真菌活性的粗提物进行 HPLC-UV 分析,判断是否有新的次级代谢产物激活。HPLC-UV 检测条件:流动相 A 相为 100% 色谱甲醇,含 0.05% 三氟乙酸,流动相 B 为超纯水,含 0.05% 的三氟乙酸;分析程序:0 ~ 30 min,A/B(体积比)线性梯度从 10 : 90 到 94 : 6;30 ~ 42 min,A/B(体积比)线性梯度从 94 : 6 到 100 : 0;42 ~ 47 min,A /B(体积比)100 : 0 等度;47 min 后,A /B(体积比)到起始洗脱浓度 10 : 90。检测波长为 210、238、254、280 nm。

1.2.6　HPLC-DAD-MS 识别激活的次级代谢产物　经过活性测试和 HPLC-UV 分析,对激活次级代谢产物的粗提物进行 HPLC-DAD-MS 分析和结构识别。检测条件:流动相 A 相为 100% 色谱乙腈,流动相 B 为超纯水,含 0.05% 的三氟乙酸,正负离子同时扫描模式,检测分子量 200 ~ 1 600;进样程序:0 ~ 20 min,A/B(体积比)线性梯度从 10 : 90 到 60 : 40;20 ~ 30 min,A/B(体积比)线性梯

万方数据

度从 60 : 40 到 80 : 20;30 ~ 40 min, A/B(体积比)线性梯度从 80 : 20 到 100:0;40 ~ 50 min, A/B(体积比)100 : 0 等度,50 min 后,A /B(体积比)到起始浓度 10 : 90。流速为 0.53 mL/min,检测波长为全波长扫描。

2 结果与分析

2.1 菌株 NA4 的基因组草图和生物信息学分析

对菌株 NA4 进行 Hiseq2500 测序,平均测序深度超过 200 ×,经组装获得 NA4 基因组草图。估算该基因组序列大小约为 8.02 Mbp, GC% 为 72.07%。组装获得 59 个超过 1 000 bp 的 scaffolds, Scaffold N50 286 752 bp, 总碱基大小为 7 767 524 bp。antiSMASH 分析显示其蕴含了丰富的次级代谢产物合成基因簇,预测它们编码合成 bafilomycins、lantipeptide AmfS、alkylresorcinol、valinomycin、desferrioxamine _ B、frontalamides、nonactin、isorenieratene、ectoine、rabelomycin、lassopeptide SRO15-2005 及其他未知结构类型的化合物。

2.2 发酵粗提物的抗真菌活性筛选

抗真菌活性测定结果显示,当用不同碳源替代甘油后,除果糖替代甘油其相应粗提物无抗真菌活性外,其他都具有抗真菌活性。其中蔗糖替代甘油后抗真菌活性变化不大,玉米面和玉米淀粉替代甘油后对特定真菌的抑制强度有所改变,而麸皮替代甘油后抗真菌活性均显著提高,提示其次级代谢产物可能有较大变化(表 1)。当用不同氮源替代大豆蛋白胨后,除胰蛋白胨替代其相应粗提物的抗特定真菌(镰刀菌)活性增强外,其他均无抗真菌活性。当添加氨基酸前体供应后,Ala 添加能增强其抗真菌活性,Orn 添加则降低其抗真菌活性。当添加不同浓度的金属离子后,抗真菌活性均显著降低。

表 1 培养基的设计及发酵粗提物对病原真菌的活性测试

Table 1 The design of medium and the inhibitory activities against pathogenic fungi

培养调控策略	编号	具体添加或替代方式	*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*	*Botrytis cinerea*	*Rhizoctoniasolani*
基本培养基	1	NM2	10.5 ±0.04	12.7 ±0.12	12.5 ±0.3
	2	NM2 - 甘油 + 果糖	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
	3	NM2 - 甘油 + 蔗糖	10.89 ±0.13	12.8 ±0.16	12.67 ±0.21
C 源替代	4	NM2 - 甘油 + 玉米淀粉	10.00 ±0.2	10.89 ±0.17	12.73 ±0.12
	5	NM2 - 甘油 + 麸皮	14.52 ±0.18	13.78 ±0.1	12.17 ±0.32
	6	NM2 - 甘油 + 玉米面	12.08 ±0.13	12.68 ±0.2	12.71 ±0.08
	7	NM2 - 大豆蛋白胨 + 玉米浆粉	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
	8	NM2 - 大豆蛋白胨 + 酵母膏	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
N 源替代	9	NM2 - 大豆蛋白胨 + 胰蛋白胨	12.52 ±0.24	12.7 ±0.04	11.28 ±0.3
	10	NM2 - 大豆蛋白胨 + $(NH_4)_2SO_4$	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
	11	NM2 - 大豆蛋白胨 + $NH_4H_2PO_4$	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
	12	NM2 + 0.25 mmol/L $CaCl_2$	8.56 ±0.24	9.01 ±0.12	8.65 ±0.17
	13	NM2 +0.5 mmol/L $CaCl_2$	9.38 ±0.24	10.82 ±0.3	10.83 ±0.19
金属离子调控	14	NM2 +1 mmol/L $CaCl_2$	9.43 ±0.15	10.75 ±0.23	11.00 ±0.19
	15	NM2 +0.25 mmol/L $MgCl_2$	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
	16	NM2 +0.5 mmol/L $MgCl_2$	8.69 ±0.09	8.94 ±0.15	9.21 ±0.3
	17	NM2 +1 mmol/L $MgCl_2$	8.00 (-)	8.00 (-)	8.00 (-)
前体氨基酸供应	18	NM2 +1 g/L Ala	11.61 ±0.18	13.4 ±0.09	12.04 ±0.13
	19	NM2 +1 g/L Orn	9.57 ±0.08	10.25 ±0.09	10.82 ±0.25

注:表中数据代表抑菌圈直径(mean ± s. d,mm);萃取液质量浓度为 10 mg/mL;滤纸片直径为 8 mm;上样 20 μL;" - "代表"替代";" + "代表"添加"(如:"NM2 - 甘油 + 果糖"代表"将 NM2 培养基中的甘油用等量的果糖替代")

2.3 抗真菌活性的发酵粗提物 HPLC-UV 分析

对具有抗真菌活性的粗提物,尤其是抗菌活性增强的粗提物,进行 HPLC-UV 检测,分析代谢产物的变化情况。比较使用不同碳源替代甘油培

万方数据

养 NA4 研究发现,在产生抗真菌活性的发酵培养基中,除麸皮替代甘油外均产生了 bafilomylins,它们对特定病原菌的抗菌强度变化可能因为 bafilomycins 各同系物相对产量不同引起。而麸皮替代后抗真菌活性增强,但 bafilomycins 色谱峰消失,在 RT 45 ~ 50 min 出现了一系列色谱峰,提示其已经激活了其他类型抗真菌次级代谢产物(图 1)。氮源替代结果显示,胰蛋白胨替代大豆蛋白胨对特定真菌的抑制强度发生变化主要是因为 bafilomycins 的几种主要产物的相对含量变化造成(图 2)。而添加前体氨基酸引起的抗真菌活性变化主要是 bafilomycins 产量提高(添加 Ala)或 bafilomycins 产量降低(添加 Orn)引起。添加二价金属离子导致抗真菌活性的降低也主要是 bafilomycins 产量减少的原因(图 3)。综上,结合抗真菌活性和 HPLC-UV 图谱分析结果,选择麸皮替代甘油的发酵产物进行 LC-DAD-MS 结构分析和识别。

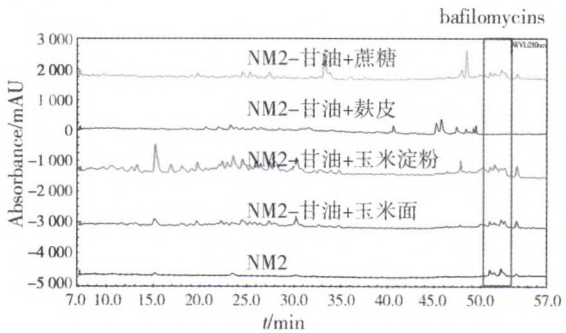


图 1　碳源替代方式下不同培养基中具有抗真菌活性粗提物的 HPLC-UV 图谱

Fig. 1　The HPLC-UV fingerprint profiles of the antifungal activity of crude extracts in different media with

2.4　HPLC-DAD-MS 分析和识别麸皮替代甘油后激活的抗真菌次级代谢产物

从 HPLC-DAD 图谱可以看出,麸皮替代甘油后激活产生了一系列紫外最大吸收波长约为 230 nm、320 nm 的化合物(图 4),推测它们应为同一类型的化合物。采用正负离子扫描模式对其主要的 7 个产物进行 LC-MS 分析,推测其分子量,结合其 DAD 紫外吸收特征、抗真菌活性以及生物信息学分析结果可推断它们是 PTM 化合物家族中的 frontalamides 及其衍生物。MS 数据分析显示(表 2),化合物 6 对应的分子量为 508 Da,推测为 frontalamide B,化合物 2 和 5 相应分子量均为 512 Da,为 HSAF(heat-stable antifungal factor)的同分异构体,化合物 1 和 3 分子量为 526 Da,而目前尚未发现该分子量的 PTM 类化合物,推测它们可能为新的 frontalamide A 二氢还原产物。

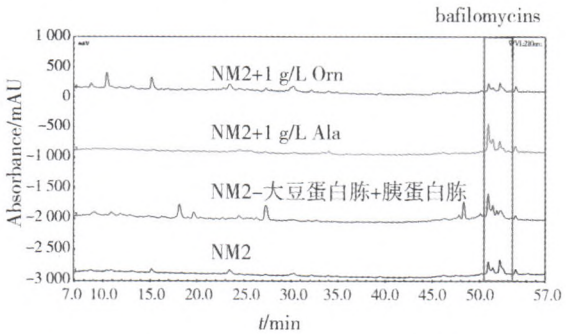


图 2　氮源替代和添加氨基酸前体方式下不同培养基中具有抗真菌活性粗提物的 HPLC-UV 图谱

Fig. 2　The HPLC-UV fingerprint profiles of the antifungal activity of crude extracts in different media with nitrogen source substitution and adding amino acid precursor

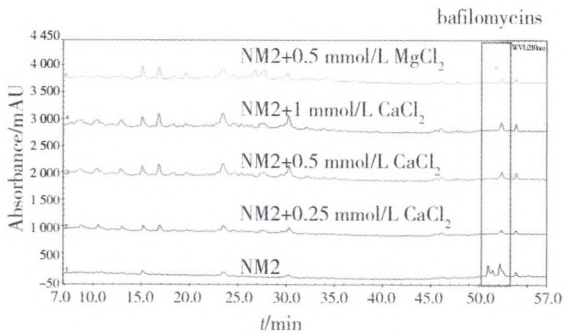


图 3　添加金属离子条件下不同培养基中具有抗真菌活性粗提物的 HPLC-UV 图谱

Fig. 3　The HPLC-UV fingerprint profiles of the antifungal activity of crude extracts in different media with adding metal ion

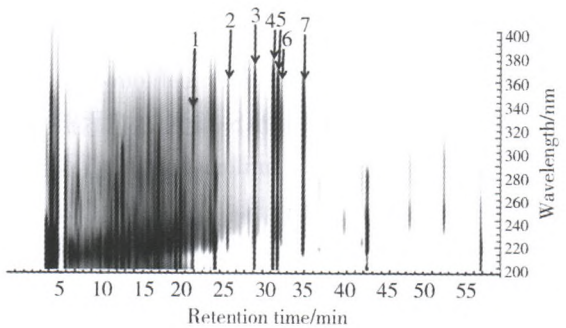


图 4　链霉菌 NA4“NM2 − 甘油 + 麸皮”培养基发酵粗提物的 HPLC-DAD 图谱

Fig. 4　The HPLC-DAD fingerprint profiles of the fermentation crude growing in the NM2 medium replacing glycerol with bran

万方数据

表 2 基于 LC-MS 分析获得的"NM2 - 甘油 + 麸皮"培养基发酵粗提物中主要的 PTMs 化合物

Table 2 The main PTM compounds of the fermentation crude of strain NA4 growing in the NM2 medium replacing glycerol with bran using LC-MS detection

对应峰的编号	保留时间/min	正离子模式/($m \cdot z^{-1}$)	负离子模式/($m \cdot z^{-1}$)	分子量
1	22.10	$[M+H]^+$ 527.2 $[M-H_2O+H]^+$ 509.2	$[M-H]^+$ 525.1	526
2	26.20	$[M+H]^+$ 513.2 $[M-H_2O+H]^+$ 495.2	$[M-H]^+$ 510.2	512
3	29.35	$[M+H]^+$ 527.1 $[M-H_2O+H]^+$ 509.1	$[M-H]^+$ 525.2	526
4	31.55	$[M+H]^+$ 511.2 $[M-H_2O+H]^+$ 493.2	$[M-H]^+$ 509.2	510
5	32.10	$[M+H]^+$ 513.2 $[M-H_2O+H]^+$ 495.1	$[M-H]^+$ 511.1	512
6	32.50	$[M+H]^+$ 509.1 $[M-H_2O+H]^+$ 491.1	$[M-H]^+$ 507.1	508
7	35.13	$[M+H]^+$ 511.2 $[M-H_2O+H]^+$ 493.2	$[M-H]^+$ 509.1	510

3 讨 论

卡伍尔氏链霉菌 NA4 分离自中国南海 1 464 m 深的海底沉积物，是挖掘抗真菌抗生素的新资源。为了深入挖掘 NA4 中抗真菌活性的次级代谢产物，本研究采用培养调控的手段尝试对上述预测化合物的合成基因簇进行激活。研究发现，碳源改变对次级代谢产物影响很大，甘油被果糖替代后抗真菌活性完全消失，不产生 bafilomycins（经 HPLC-UV 分析证明，数据未显示）；甘油被麸皮替代产生了 PTM 类型的抗真菌活性物质。甘油是三碳延伸单位的前体，它的添加有利于大环内酯类化合物的形成[20]。据报道 bafilomycins 骨架合成的结构延伸单元甲氧基丙二酰 CoA 是以甘油为前体合成的[21]。因此将基本培养基中的甘油用其他碳源替代，将不利于 bafilomycins 的产生，而有利于激活其他非 PKS 类型的基因簇。而其他碳源替代则引起了 bafilomycins 产量及其组成相对含量的变化。蛋白胨作为重要的氮源，其存在与否及含量的改变都对微生物初级代谢和次级代谢有很大的影响[22]。因此将基本培养基中的大豆蛋白胨用其他氮源替代，探索对链霉菌次级代谢的影响，以期激活初始条件下难以产生的化合物。氮源替代实验表明，将基础培养基中大豆蛋白胨替换后，除了胰蛋白胨外，其余都不再产生 bafilomycins，这也间接证明蛋白胨有利于微生物初次和次级代谢产物的产生[25]。Orn 是 PTM 类化合物 NRPS 模块腺苷酰化结构域识别的特异性氨基酸，Ala 是 valinomycin 中结构单元 L-Lac 的前体，也是转氨酶常用的氨基供体。期望 Orn、Ala 的添加有利于 PTM 和 valinomycin 化合物合成基因簇的激活，但很遗憾没有发现这些物质的产生。Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价金属离子是微生物代谢中许多关键酶的辅因子，它们参与细胞代谢并影响着细胞内的能量供应、还原-氧化水平等[23]。但添加不同浓度二价离子后，发现 bafilomycins 产量减少，抗真菌活性降低，并没有出现其他抗真菌物质。以上实验提示，虽然 Orn、Ala 和二价金属离子对链霉菌 NA4 的次级代谢有很大影响，但要产生有利预期的调控，其添加的浓度和方式还需要优化。

PTM 是 PKS-NRPS 杂合的具有多环稠合的大环内酰胺类化合物，目前发现的这类化合物有 40 多种，包括 frontalamides、alteramide A、ikarugamycin 等[23]。PTM 生物合成基因簇保守且广泛存在，该家族的化合物具有多种生物活性，包括抗真菌、抗原虫、抗细菌、抗肿瘤、抗氧化等活性[24]。但是许多 PTM 合成基因簇往往是沉默的，因此越来越多的科学家通过激活沉默的

万方数据

PTM 合成基因簇以挖掘更多结构衍生物[26,30]。在 PTM 家族化合物中存在 5/5/6 或 5/6/5 环两个大类，许多研究表明 PTM 类物质的合成基因簇基因构成决定了其复杂的成环机制[26,28-29]。在 ikarugamycin 的生物合成基因簇中 FAD 依赖的氧化还原酶 IkaB 催化形成外部 5/6 环，并最终在 NADPH 依赖的脱氢酶 IkaC 催化下形成 ikarugamycin 的内部五元环[29]（图 5）。在 frontalamides、HSAF 以及 pactamides 等具有 5/5/6 环的 PTM 合成基因簇中由脱氢酶 PtmB2/FtdC 和氧化还原酶 PtmB1/FtdB 先后催化形成外部 5/5 环，并在双功能乙醇脱氢酶 PtmC 作用下最终形成 5/5/6 环结构[30]（图 5）。链霉菌 NA4 的 PTM 基因簇 orf 3 和 orf 4 的基因编码蛋白分别与 PtmB1 和 PtmB2 同源，推测其应该合成 5/5/6 环结构的 PTM 类化合物。菌株 NA4 的 PTM 基因簇与 frontalamides 基因簇都有 P450 氧化酶（Orf6/FtdF），具有更相似的结构，其是否参与 6 元环上的氧化值得深入研究。

将 NM2 培养基中的甘油用麸皮替代后进行的 NA4 发酵，激活了最大紫外吸收波长约为 230 nm 和 320 nm 特征性 PTM 类化合物。其中化合物 4 和 7 分子量为 510 Da，可能是已知 PTM maltophilin、alteramide A、xanthobaccin A、lysobacteramide B 和 FI-2 等中的 1 个或 2 个；化合物 1 和 3 分子量为 526 Da，MS 图谱中具有较强的脱水离子峰，提示在 5/5/6 环中存在羟基，符合 frontalamide A 的结构特征，由于化合物 1 和 3 与 frontalamide 与其分子量相差 2，所以推测它们可能为 frontalamide A 5/5/6 环中双键还原或者羰基还原的产物（图 5）；化合物 2 和 5 为 HSAF 的同分异构体，目前分子量为 512 Da 的 PTM 只有 1 个 HSAF，因此化合物 2 或 5 中至少有 1 个是新的 PTM 类化合物。若想确定化合物 2 或 5 中具体有几种新的 PTM 类化合物，还需要进一步实验证明。

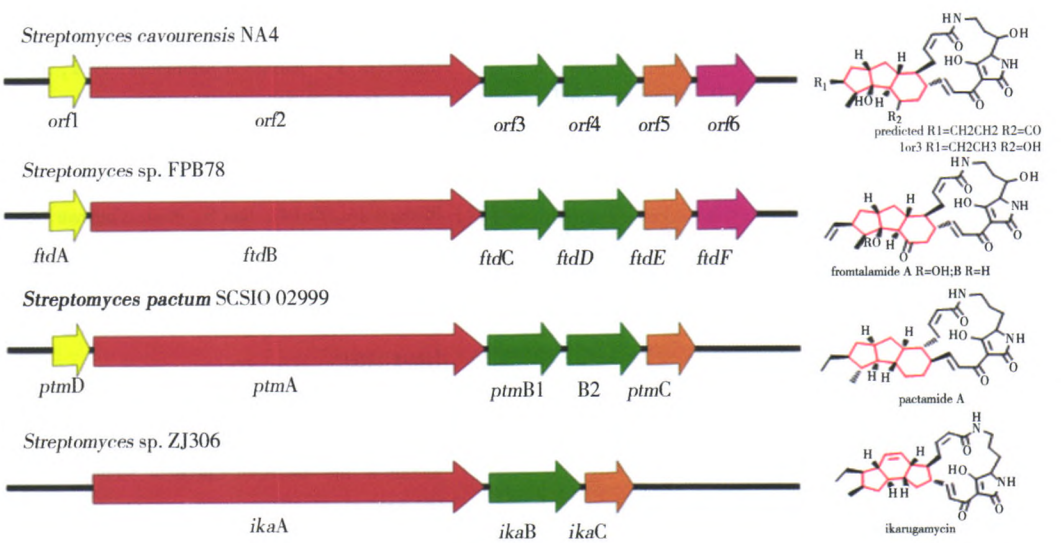


图 5　5/5/6 环和 5/6/5 环 PTM 化合物生物合成基因簇

Fig. 5　The biosynthetic clusters of the compounds of PTM about the ring of 5/5/6 and 5/6/5

参考文献：

[1] Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. Nature, 2012, 484(7393): 186-194.

[2] 李扬，王耀雯，王育荣，等. 水稻稻瘟病菌研究进展[J]. 广西农业科学，2010，41(8)：789-792.

[3] 张洁，伊艳杰，王金水，等. 小麦赤霉病的防治技术研究进展[J]. 中国植保导刊，2014，34(1)：24-28.

[4] Thaden JT, Lewis SS, Hazen KC, et al. Rising rates of carbapenem-resistant enterobacteriaceae in community hospitals: a mixed-methods review of epidemiology and microbiology practices in a network of community hospitals in the southeastern United States[J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2014, 35(8): 978-983.

[5] 武英，王辂. 开发微生物来源天然产物的新技术[J]. 国外

万方数据

医药抗生素, 2010, 31(1): 1-6.

[6] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(2): 155-176.

[7] Udaany DW, Zeigler L, Asolkar RN, et al. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(25): 10376-10381.

[8] Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(21): 12215-12220.

[9] Eerikly M, Challis G. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining[J]. Challis ChemBioChem, 2009, 10(4): 625-633.

[10] 钟晶晶,赫卫清. 链霉菌隐性次级代谢产物生物合成基因簇的激活[J]. 生命的化学, 2016, 36(2): 231-236.

[11] Bode HB, Bethe B, Höfs R. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity [J]. ChemBioChem, 2002, 3: 619-627.

[12] Zhang W, Liu Z, Li S, et al. Spiroindimicins A-D: new bisindole alkaloids from a deep-sea-derived actinomycete[J]. Organic Letters, 2012, 14(13): 3364-3367.

[13] Saurav K, Zhang W, Saha S, et al. In silico molecular docking, preclinical evaluation of spiroindimicins A-D, lynamicin A and D isolated from deep marine sea derived *Streptomyces* sp. SCSIO 03032[J]. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 2014, 6(3): 187-196.

[14] Zhang W, Li S, Zhu Y, et al. Heronamides D-F, polyketide macrolactams from the deep-sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 03032[J]. Journal of Natural Products, 2014, 77(2): 388-391.

[15] Pan HQ, Yu SY, Song CF, et al. Identification and characterization of the cntifungal substances of a novel *Streptomyces cavourensis* NA4[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(3): 353-357.

[16] Ramadhar TR, Beemelmanns C, Currie CR, et al. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery[J]. Journal of Antibiotics, 2013, 67(1): 53-58.

[17] Matter AM, Hoot SB, Anderson PD, et al. Valinomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces*: conservation, ecology and evolution[J]. Plos One, 2009, 4(9): 761-768.

[18] Kanda N, Ishizaki N, Inoue N, et al. DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic. I. taxonomy, isolation and characterization [J]. Journal of Antibiotics, 1975, 28(12): 935-942.

[19] Weber T, Blin K, Duddela S, et al. AntiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene cluster[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): W237-W243.

[20] Walton LJ, Corre C, Challis GL. Mechanisms for incorporation of glycerol-derived precursors into polyketide metabolites[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005, 33(2): 105-120.

[21] Zhang W, Fortman JL, Carlson JC, et al. Characterization of the bafilomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces lohii* [J]. ChemBioChem, 2013, 14(3): 301-306.

[22] 陈竹, 李万钧, 储炬, 等. 工业羽毛蛋白胨对红霉素基因工程菌 ZL1004 发酵过程的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(10): 751-757.

[23] Dobson LF, O'Shea DG. Antagonistic effect of divalent cations Ca^{2+} and Mg^{2+} on the morphological development of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(1): 119-126.

[24] Zhang G, Zhang W, Saha S, et al. Recent advances in discovery, biosynthesis and genome mining of medicinally relevant polyayclic totramate macrolactams[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, 16(15): 1727-1739.

[25] Jomon K, Kuroda Y, Ajisaka M, et al. A new antibiotic, ikarugamycin[J]. Journal of Antibiotics, 1972, 25: 271-280.

[26] Luo Y, Huang H, Liang J, et al. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster[J]. Nature Communications, 2013, 4(1): 1-8.

[27] Blodgett JA, Oh DC, Cao S, et al. Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(26): 11692-11697.

[28] Lou L, Qian G, Xie Y, et al. Biosynthesis of HSAF, a tetramic acid-containing macrolactam from *Lysobacter enzymogenes*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(4): 643-645.

[29] Zhang G, Zhang W, Zhang QZ, et al. Mechanistic insights into polycycle formation by reductive cyclization in ikarugamycin biosynthesis [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 53(19): 4840-4844.

[30] Saha S, Zhang W, Zhang G et al. Activation and characterization of a cryptic gene cluster reveals a cyclization cascade for polycyclic tetramate macrolactams [J]. Chemical Science, 2017, 8(2): 1607-1612.

万方数据