

吴贵贵, 韩萍, 钟素珍, 等. *Streptomyces albovinaceus* DSM 40136 中环二肽的盐胁迫发掘 [J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2022, 46(3): 247-250.

WU Guigui, HAN Ping, ZHONG Suzhen, et al. The mining of the cyclodipeptide from *Streptomyces albovinaceus* DSM 40136 through salt stress [J]. Journal of Jiangxi Normal University(Natural Science) 2022, 46(3): 247-250.

文章编号: 1000-5862(2022)03-0247-04

Streptomyces albovinaceus DSM 40136 中环二肽的盐胁迫发掘

吴贵贵¹, 韩萍¹, 钟素珍¹, 谢运昌^{1*}, 朱 笃^{1,2*}

(1. 江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022; 2. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330038)

摘要: 该文选择陆生放线菌 *Streptomyces albovinaceus* DSM 40136, 结合菌株肽类次级代谢产物生物合成基因簇的分析, 利用盐胁迫策略对其进行产物发掘, 成功地利用添加海盐质量分数为 3% 的 M-ISP4 培养基激活菌株生产出具有多种生物学活性的环二肽 Cyclo(L-Pro-L-Leu)。该产物的发掘表明: 利用海盐胁迫策略可有效应用于陆生放线菌次级代谢潜能的激活, 且新产物的发掘也为环二肽生物合成研究及代谢工程改造提供了良好的出发菌株。

关键词: 环二肽; 放线菌; 盐胁迫; 次级代谢产物

中图分类号: Q 93 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2022.03.05

0 引言

放线菌可生产大量种类丰富、结构新颖且活性优良的次级代谢产物, 是临床药物开发的重要资源^[1]。通过发掘放线菌所蕴含的次级代谢产物来开发新药物, 这是治疗当前极端耐药、抗药性疾病的有效手段之一^[2-3]。目前, 随着放线菌研究的深入, 一种新型的菌株次级代谢产物发掘策略——OSMAC(one strain many compounds)——应运而生, 该策略的核心思想是通过改变菌株的培养条件与培养体系的各种参数来激活单一菌株生产多种次级代谢产物^[4-6]。通过提升培养基的盐离子浓度开发菌株次级代谢潜能是 OSMAC 策略最为简便易行的方法之一, 该方法已成功运用于放线菌次级代谢产物发掘领域中^[7]。

环二肽是由 2 个氨基酸分子通过形成肽键缩合而成的最小环肽, 也被称为二酮哌嗪类化合物^[8-9]。环二肽的命名由每个氨基酸的 3 个字母缩写加上绝对构型前缀组成(如 Cyclo(L/D-Xaa-L/D-Yaa))。环二肽含有稳定的六元环结构和刚性空间构象, 具有

广泛的生物学活性, 是目前临床药用先导化合物开发的热点^[10]。放线菌蕴含丰富的环二肽类次级代谢产物, 是重要的活性环二肽发掘对象^[11]。在放线菌中, 环二肽的生物合成途径主要有 2 大类: 一类是通过非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS) 合成环二肽; 另一类是通过特异性的环二肽合酶(cyclodipeptide synthase, CDPS) 以氨酰-tRNA 为底物合成环二肽^[12-13]。这 2 类环二肽合成催化酶的编码基因也可以作为分子标记, 在放线菌菌株基因组信息的指导下, 结合盐胁迫等 OSMAC 策略, 可针对性地开发放线菌环二肽活性分子。

Streptomyces albovinaceus DSM 40136 (= NRRL B-2566) 是 1 株来源于陆生土壤的放线菌, 也称为 *S. globisporus* DSM 40136^[14]。该菌株已完成了全基因组测序分析(NCBI Accession: NZ_MUAX0000000.1)。基于生物信息学软件, 对该菌株的次级代谢潜能分析发现: 该菌株具有大量的肽类次级代谢生物合成基因(簇), 可用于发掘以环二肽为代表的多种肽类次级代谢产物。本文以该菌株为研究对象, 选择常规放线菌培养基, 通过添加海盐对菌株进行胁迫培养, 成功

收稿日期: 2021-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(82160671, 32060021) 和江西省自然科学基金(20202BAB203021) 资助项目。

通信作者: 朱 笃(1971—) 男, 江西高安人, 教授, 博士, 主要从事生物过程工程、次级代谢调控研究。E-mail: zhudu12@163.com

谢运昌(1984—) 男, 江西赣州人, 讲师, 博士, 主要从事放线菌次级代谢产物的组合生物合成与基因组挖掘研究。E-mail: xieyunchang1984@sina.com

地利用含海盐质量分数为3%的M-ISP4培养基激活菌株生产出具有抗肿瘤、免疫及代谢调控活性的环二肽 Cyclo(L-Pro-L-Leu)^[15]。该环二肽的成功合成不仅有效拓展了放线菌环二肽的开发途径和菌株资源库,而且为放线菌次级代谢产物的发掘提供了良好的借鉴与参考,有利于促进放线菌源次级代谢产物的综合开发与利用。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养方法

S. albobinaceus DSM 40136 购自德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ)。该菌株使用 M-ISP4 (可溶性淀粉 1% 细菌学蛋白胨 0.1% 酵母提取粉 0.05% K_2HPO_4 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% $(NH_4)_2SO_4$ 0.2% NaCl 0.1% $CaCO_3$ 0.2% pH 值为 7.2~7.4 固体培养基加入琼脂粉 1.5%~2.0%) 平板在 28~30 °C 下进行传代培养。培养基配置所需试剂均购自国药集团。

1.2 菌株次级代谢产物生物合成基因(簇)分析

S. albobinaceus DSM 40136 菌株的基因组测序数据自 NCBI(Accession: NZ_MUAX000000000.1) 下载,然后将编辑成 FASTA 格式的菌株基因组数据上传至 antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>),分析菌株含有的次级代谢产物生物合成基因簇的分布信息和产物结构预测数据,再依据比较分析结果游离相应的基因簇序列,进一步利用 2ndfind 软件(<http://biosyn.nih.gov/2ndfind/>) 和 Blast 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对游离得到的基因(簇)进行校对修订,最终获取菌株次级代谢产物生物合成基因簇的分布排列信息。

1.3 菌株发酵培养及代谢产物的分离纯化

菌株的代谢产物分析培养采用 250 mL 三角瓶进行,往瓶内加入 50 mL M-ISP4 液体培养基,然后添加含海盐质量分数为 3% 的 M-ISP4 液体培养基。在上述 2 种培养基中分别接入约 1 cm^2 平板培养的菌体,在 28~30 °C、转速为 200 rpm 的条件下培养 7 d。然后发酵菌液用 100 mL 乙酸乙酯进行萃取,萃取物用旋转蒸发器处理后溶解于 2 mL 甲醇中,并取样 20 μL 进行 HPLC 分析。

针对环二肽产物的分离纯化,本文采用 2 级发酵体系,其中第 1 级发酵为种子发酵,将菌株接种于 50 mL 添加含海盐质量分数为 3% 的 M-ISP4 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28~30 °C、转速 200 rpm 的

条件下培养 2 d;然后将 50 mL 种子菌液转接于 200 mL 添加含海盐质量分数为 3% 的 M-ISP4 液体培养基的 1 L 三角瓶中,继续在 28~30 °C、转速为 200 rpm 的条件下培养 6 d。最后,将菌体与发酵液上清分离,用乙酸乙酯萃取发酵上清液中的产物,并用旋转蒸发器处理成萃取浸膏。

将萃取浸膏混合在正向硅胶中进行处理,首先进行正向柱层析,洗脱流动相为 $V(\text{MeOH}) : V(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 0 : 100, 2 : 98, 4 : 96, 6 : 94, 8 : 92, 1 : 9, 2 : 8, 5 : 5$ 。然后将含有环二肽产物的流分 ($V(\text{MeOH}) : V(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 2 : 98$) 进行分子筛柱层析,并收集含有环二肽的层析流分,进行后续制备 HPLC 分离,最后将获得的化合物纯品溶解于 DMSO- d_6 中进行 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR 鉴定,确定为 Cyclo(L-Pro-L-Leu) 分子。

1.4 菌株发酵产物及分离纯化产物的 HPLC 分析方法

HPLC 分析使用的仪器为 Agilent 1260 Infinity System,使用的分析柱为 Prodigy ODS-2 C-18 分析柱 ($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}, 5\ \mu\text{m}$)。检测使用的流动相有: A 相为 15% 的乙腈水溶液,含 0.1% 的乙酸; B 相为 85% 的乙腈水溶液,含 0.1% 的乙酸。分析条件是: 0~20 min, 0%~80% 的 B 相; 20~21 min, 80%~100% 的 B 相; 21~25 min, 100% 的 B 相; 25~30 min, 0% 的 B 相。流速为 $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 254 nm。

2 结果与讨论

2.1 *S. albobinaceus* DSM 40136 次级代谢产物生产潜能的分析

通过将菌株的全基因组序列上传至开源生物信息学分析平台 antiSMASH,发现菌株具有 24 个次级代谢产物生物合成基因簇(见表 1)。其中与环肽(包括环二肽)相关的 NRPS 类生物合成基因簇至少有 6 个,这说明菌株具有较高的肽类次级代谢产物发掘前景。但菌株内部的分析结果并未发现 CDPS 类生物合成基因簇,这表明在菌株中可能不存在利用氨酰-tRNA 直接合成环二肽的生物合成途径。

2.2 *S. albobinaceus* DSM 40136 的盐胁迫培养与代谢产物生产激活

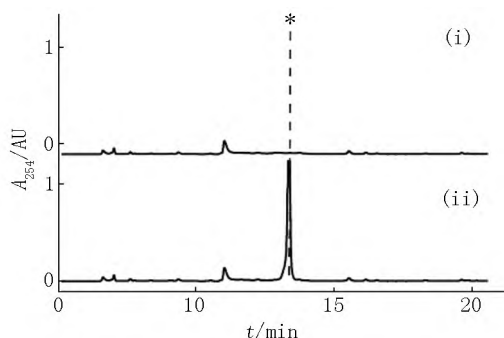
针对菌株的分析结果,筛选放线菌可用的各类发酵培养基培养菌株,并进行代谢产物分析,同时在相同的培养基中添加质量分数为 3% 的海盐进行菌株的胁迫培养。从 M-ISP4 和 M-ISP4+3% 海盐的培养代谢产物 HPLC 的对比分析结果中发现: 菌株能够在含有质量分数为 3% 的海盐胁迫下激活生产一个新产物,且该产物信号保留时间为 13~14 min(见

图1)。

表1 *Streptomyces albovinaceus* DSM 40136 次级代谢产物生物合成基因簇的分析结果

编码	类型	位置/bp	预测结构	基因簇同源性/%
1	T1PKS NRPS	136 315~185 446	kanamycin	2
2	T3PKS	277 813~318 061	alkylresorcinol	100
3	melanin	356 858~367 331	melanin	100
4	T1PKS RiPP-like NRPS	572 484~658 213	C-1027	17
5	terpene	712 662~738 775	hopene	69
6	RiPP-like	1 319 713~1 331 146	未知	未知
7	NRPS	1 483 894~1 557 128	daptomycin	14
8	siderophore	1 599 389~1 630 594	ficellomycin	3
9	phenazine	1 981 555~2 070 921	streptophenazine	95
10	terpene	2 092 901~2 111 826	未知	未知
11	ectoine	2 238 288~2 246 094	showdomycin	35
12	lanthipeptide	2 472 704~2 494 771	AmfS	100
13	T1PKS NRPS	2 580 212~2 632 742	enduracidin	8
14	butyrolactone	3 210 623~3 221 585	kedarcidin	1
16	lassopeptide	3 360 397~3 383 091	keywimysin	100
17	T1PKS	4 490 259~4 548 967	streptolydigin	13
18	NRPS	4 931 785~4 974 938	bottromycin A2	24
19	siderophore	5 086 548~5 098 326	desferrioxamin B	100
20	lanthipeptide	5 142 457~5 173 589	未知	未知
21	NRPS	5 460 850~5 583 289	viguiepinol	73
22	ectoine	6 270 226~6 280 624	ectoine	100
23	terpene	6 704 045~6 723 814	steffimycin D	19
24	terpene	7 017 387~7 042 664	isorenieratene	87

注: bp 为碱基对; NRPS 为非核糖体肽合成酶; PKS 为聚酮合酶; T1~3PKS 为 I~III 型聚酮合酶; RiPP 为核糖体合成和翻译后修饰肽。



(i) M-ISP4 培养基; (ii) M-ISP4+3%海盐; * 为新产物信号。

图1 HPLC 分析 *S. albovinaceus* DSM 40136 盐胁迫培养产物情况

用 5 L 含海盐质量分数为 3% 的 M-ISP4 培养基进行扩大规模培养,富集萃取产物,并进行化合物的分离纯化,获得约 6 mg 白色粉末的目标产物纯品。

2.3 Cyclo(L-Pro-L-Leu) 的结构鉴定

通过 NMR 分析(见图 2 和图 3),目标产物的结构特征数据如下:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 4.20 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 4.01 (1H, dd, $J = 5.6, 6.4$ Hz, H-9), 3.39 (2H, m, H-3), 2.15 (1H, m, H-5a), 1.94 (1H, m, H-5b), 1.85 (2H, m, H-4), 1.81 (2H, m, H-10), 1.38 (1H, m, H-11), 0.87 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-12), 0.86 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-13)。

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} : 170.5 (C, C-1), 166.7 (C, C-7), 58.5 (CH, C-6), 52.7 (CH, C-9), 44.9 (CH₂, C-3), 37.8 (CH₂, C-10), 27.5 (CH₂, C-5), 24.1 (CH, C-11), 22.9 (CH₂, C-4), 22.5 (CH₃, C-12), 22.0 (CH₃, C-13)。

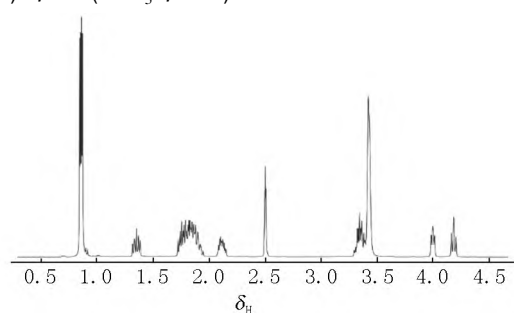


图2 Cyclo(L-Pro-L-Leu)的 $^1\text{H NMR}$ 分析图

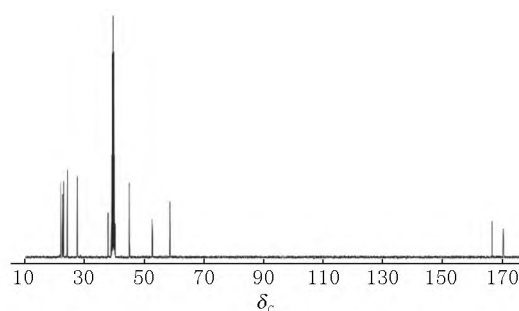


图3 Cyclo(L-Pro-L-Leu)的 $^{13}\text{C NMR}$ 分析图
通过与文献报道结果对比,将目标产物的结构

确定为具有抗肿瘤、免疫及代谢调控等多种活性的环二肽 Cyclo(L-Pro-L-Leu)^[15]。结果进一步证明该菌株含有合成该环二肽分子的功能基因,可用于后续生物合成及代谢工程研究与开发。

3 结论

本文通过盐胁迫策略成功激活了 *S. albobovina-ceus* DSM 40136 生产环二肽 Cyclo(L-Pro-L-Leu)。研究结果表明:盐胁迫是一项切实可靠的 OSMAC 发掘策略,且可用于陆生放线菌菌株的次级代谢产物开发。此外,本文发掘了 1 株可生产具有良好生物学活性的环二肽 Cyclo(L-Pro-L-Leu) 的菌株,该菌株可用于后续环二肽生物合成机制研究与代谢工程改造,促进放线菌菌株资源的综合研究与利用。

4 参考文献

- [1] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities [J]. Nature Review: Drug Discovery, 2021, 20(3): 200-216.
- [2] JOSE P A, MAHARSHI A, JHA B. Actinobacteria in natural products research: progress and prospects [J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126708.
- [3] PANTER F, BADER C D, MÜLLER R. Synergizing the potential of bacterial genomics and metabolomics to find novel antibiotics [J]. Chemical Science, 2021, 12(17): 5994-6010.
- [4] ROMANO S, JACKSON S A, PATRY S, et al. Extending the "one strain many compounds" (OSMAC) principle to marine microorganisms [J]. Marine Drugs, 2018, 16(7): 244.
- [5] FOULSTON L. Genome mining and prospects for antibiotic discovery [J]. Current Opinion in Microbiology, 2019, 51: 1-8.
- [6] HUG J J, KRUG D, MÜLLER R. Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products [J]. Nature Reviews: Chemistry, 2020, 4(4): 172-193.
- [7] YANG Chunfang, HUANG Chunshuai, ZHANG Wenjun, et al. Heterologous expression of fluostatin gene cluster leads to a bioactive heterodimer [J]. Organic Letters, 2015, 17(21): 5324-5327.
- [8] BORTHWICK A D. 2,5-diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products [J]. Chemical Review, 2012, 112(7): 3641-3716.
- [9] GIESSEN T W, MARAHIEL M A. The tRNA-dependent biosynthesis of modified cyclic dipeptides [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(8): 14610-14631.
- [10] DE CARVALHO M P, ABRAHAM W R. Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines [J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, 19(21): 3564-3577.
- [11] KATZ L, BALTZ R H. Natural product discovery: past, present and future [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2016, 43(2/3): 155-176.
- [12] BELIN P, MOUTIEZ M, LAUTRU S, et al. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways [J]. Natural Product Reports, 2012, 29(9): 961-979.
- [13] STRIEKER M, TANOVIC A, MARAHIEL M A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2010, 20(2): 234-240.
- [14] GESSNER A, HEITZLER T, ZHANG Songya, et al. Changing biosynthetic profiles by expressing *bldA* in *Streptomyces* strains [J]. Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology, 2015, 16(15): 2244-2252.
- [15] FDHILA F, VÁZQUEZ V, SÁNCHEZ J L, et al. dd-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus* [J]. Journal of Natural Products, 2003, 66(10): 1299-1301.

The Mining of the Cyclodipeptide from *Streptomyces albobovineus* DSM 40136 Through Salt Stress

WU Guigui¹, HAN Ping¹, ZHONG Suzhen¹, XIE Yunchang^{1*}, ZHU Du^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China; 2. College of Life Sciences, Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang Jiangxi 330038, China)

Abstract: In this paper, the *Streptomyces albobovineus* DSM 40136 with detail genomic sequence is selected to cultivated by salt stress. After the comparison analysis of the fermentation extract, the strain can be activated to produce Cyclo(L-Pro-L-Leu) in the cultivated by M-HSP4 medium added 3% sea salt. This activation of natural product biosynthesis indicates that the feasible of salt stress applies in secondary metabolites development derived from terrestrial actinomycetes. Additionally, the *S. albobovineus* DSM 40136, new Cyclo(L-Pro-L-Leu) producer, are also new strain deserved in future biosynthesis mechanism research and metabolic engineering modification.

Key words: cyclodipeptides; actinomycetes; salt stress; secondary metabolites (责任编辑: 刘显亮)