

非定向激活沉默基因簇挖掘链霉菌 活性次级代谢产物研究进展

宋国栋¹, 廖宏娟¹, 张志斌¹, 朱 筠^{1,2*}

¹江西师范大学生命科学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 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, 南昌 330013

摘要:链霉菌(*Streptomyces* spp.)是活性次级代谢产物的主要生产菌,在发现结构新颖化合物上具有重大潜力。随着对链霉菌基因组数据的深入分析,发现大量产次级代谢产物合成基因簇处于沉默状态,因此利用非定向和定向策略激活链霉菌中沉默基因簇、挖掘结构新颖化合物成为当前的主要手段。本文主要综述了培养基组成改变或培养条件优化、共培养、添加化学激发子及全局性调控等非定向策略在挖掘链霉菌次级代谢产物中的应用以及取得的进展,以为链霉菌次级代谢产物高效开发提供参考。

关键词:链霉菌;次级代谢产物;沉默基因簇;共培养;激发子

中图分类号:Q936

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)8-1442-15

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.8.017

Advances in non-directed activation of silent gene clusters for mining active secondary metabolites of *Streptomyces*

SONG Guo-dong¹, LIAO Hong-juan¹, ZHANG Zhi-bin¹, ZHU Du^{1,2*}

¹Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; ²Key Lab of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province, College of life sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China

Abstract: *Streptomyces* are major producers of active secondary metabolites and show great potential for discovering structurally novel compounds. In-depth analysis of *Streptomyces* genomic data revealed that a large number of gene clusters producing secondary metabolites were silenced. Therefore, the use of undirected and directed strategies to activate silenced gene clusters in *Streptomyces* has become a major means of mining structurally novel compounds. In this review, we reviewed the application and progress of non-directed strategies in secondary metabolite mining of *Streptomyces*, such as changing medium composition or optimizing culture conditions, co-culture, adding chemical elicitors and global regulation, in order to provide reference for the efficient development of secondary metabolites in *Streptomyces*.

Key words: *Streptomyces*; secondary metabolites; silent gene cluster; co-culture; elicitors

微生物次级代谢产物是一类结构多样、功能复杂且具备特殊生物活性的物质,在药物研究与开发领域占据着重要的地位。截至目前,从微生物中鉴定出大约30万种化合物,有超过60%的抗生素来源于链霉菌。然而,随着大量次级代谢产物的分离,从链霉菌中发现具有显著生物活性且结构新颖抗生素的概率越来越低^[1-3]。近些年,随着基因组测序技

术在微生物测序方面的广泛应用,大量的链霉菌基因组信息被公开^[4]。通过对链霉菌基因组数据进行生物信息学分析,发现其中仍有一大部分的基因处于沉默状态,这表明还有大量潜在的次级代谢产物尚未被发现^[5]。受限于常规培养条件,链霉菌生物合成基因簇未能有效激活,因而其独特的代谢产物途径往往表达较少或不表达。因此,通过激活链霉菌沉默基因簇以挖掘新型活性次级代谢产物具有重要意义。

为了激活链霉菌沉默基因表达,以发现更多活

收稿日期:2022-07-19 接受日期:2023-01-06

基金项目:国家自然科学基金(82160671)

*通信作者 Tel:86-791-83832166; E-mail: zhudu12@163.com

性次级代谢产物,迄今已有多种激活沉默基因簇的方法得到开发和应用^[6,7]。常用的策略可分为两大类:一类是非定向激活策略,即通过改变培养基的组成(碳源、氮源、微量元素、化学激发子)^[8,9]、菌株的生长环境(温度、pH、曝气、容器类型)^[6]或微生物共培养^[10]等方式,诱导链霉菌产生不同的代谢产物;另一类是定向激活策略,即通过基因编辑技术(CRISPR-Cas9)^[11]、靶向激活特定基因簇(启动子工程、途径特异性调控因子激活、异源表达)等手

段^[12,13],使链霉菌沉默基因得以表达。相较于定向激活策略,非定向激活策略不需要建立目标菌株的遗传操作体系,因此具有操作简单、可同时激活多个生物合成基因簇(而不是某一特定的生物合成基因簇)等优点,其应用更为广泛。本文简要综述了改变培养基组成或培养条件激活策略、共培养策略、添加化学激发子及全局性调控等非定向激活链霉菌沉默基因的策略(见图1),并描述了这一领域所面临的问题和未来的发展前景。

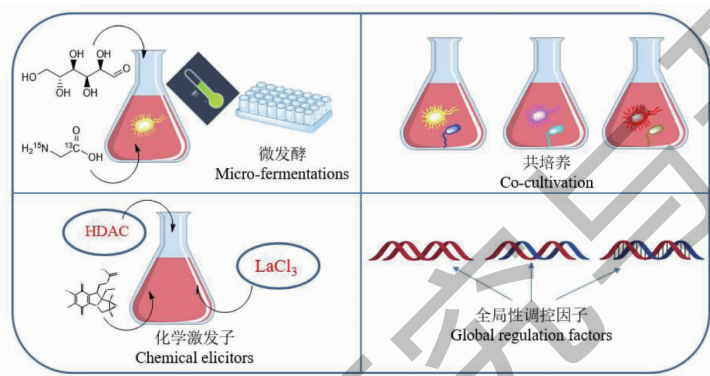


图1 非定向策略激活沉默基因

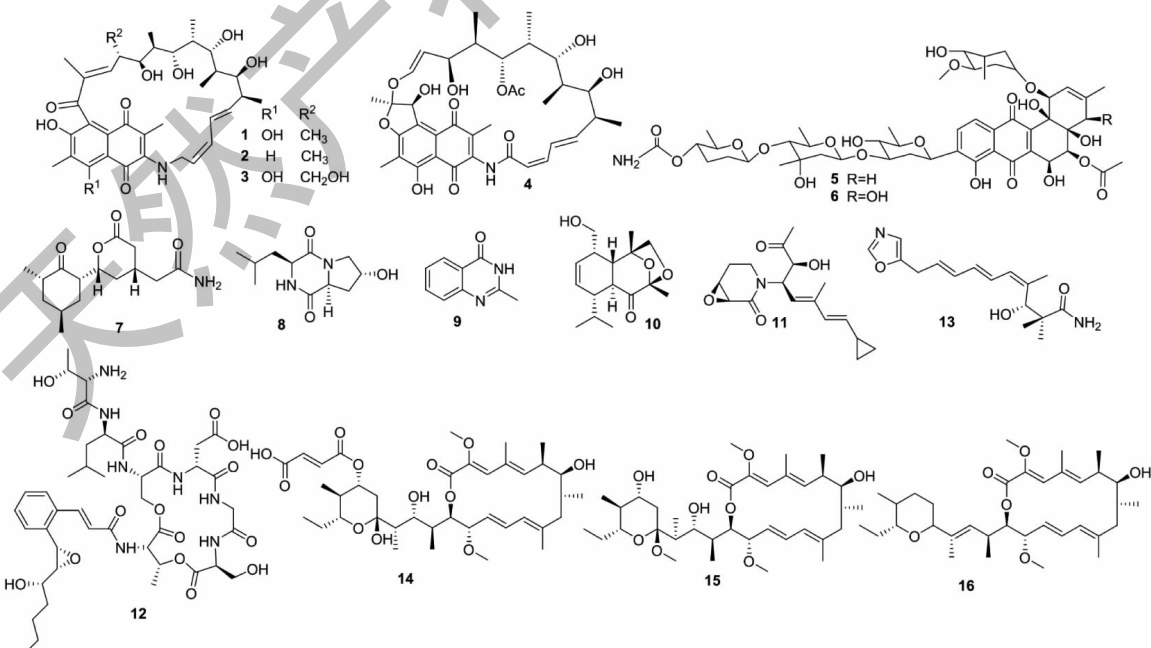
Fig. 1 No-target strategies for activating silent genes clusters

1 改变培养基组成或培养条件的激活策略

1.1 改变培养基的组成

培养基组成(即碳源、氮源、无机盐等)对次级

代谢产物的影响非常复杂,且对不同微生物产生相当明显的差异^[14]。大量的研究表明,营养组成的变化可激发链霉菌产生各种新型化合物^[15](见图2、表1)。



续图2(Continued Fig.2)

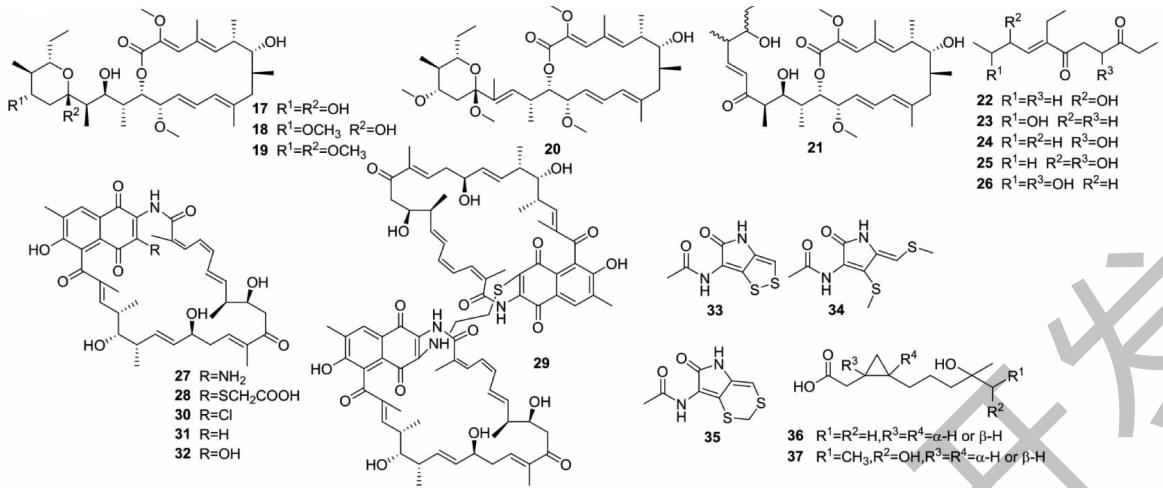


图2 化合物1~37结构

Fig. 2 Structures of compounds 1-37

表1 改变培养基组成、培养条件发现新的活性代谢产物

Table 1 Change of medium composition, culture conditions to discover new active metabolites

来源 Source	方法 Method	化合物 Compound	生物活性 Bioactivity	分类 Classification	参考文献 Ref.
<i>Streptomyces</i> sp. C34	更换碳源(葡萄糖→甘油)	Chaxamycins A ~ D (1 ~ 4)	Chaxamycin D, 抑制金黄色葡萄球菌, 与热休克蛋白相互作用起抗肿瘤效果	聚酮类	19
<i>Streptomyces pratensis</i> NA-ZhouS1	添加金属离子(Ni)	Stremycin A, B(5, 6)	对铜绿假单胞菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌等表现出抑菌活性	安古环素类	32
<i>Streptomyces</i> sp. WU20	添加金属离子(Ni)	环唑啉类似物(11)	抑制枯草芽孢杆菌	环唑啉类	33
<i>Streptomyces</i> sp. FXJ1.172	添加金属离子(Fe)	Cyclic depsipeptide NC-1(12)	抑制牛分歧杆菌	环肽类	34
<i>Streptomyces</i> sp. YB104	更换培养基(ACM)	Inthomycin B(13)	除草剂功能	聚酮类	35
<i>Streptomyces</i> sp. CS	更换培养基(YMG)	24-Demethyl-bafilomycin C1(14)、巴弗洛霉素衍生物(15, 16)	抗真菌、肿瘤细胞活性	大环内酯类	36, 37
	ISP2	巴弗洛霉素衍生物(17 ~ 21)	对MDA-MB-435细胞系有毒性	大环内酯类	38
	Waksman	Metabolites(22 ~ 26)	-	聚酮类	39
	燕麦培养基	Naphthomycins L, M, N(27 ~ 29)	抗真菌活性	安莎霉素类	40
<i>Streptomyces</i> sp. DT-A37	更换培养基(大米固体培养基)	全霉素 Holomycin(35)	-	二硫醇吡咯酮类	41
<i>Streptomyces peucetius</i> DM07	低温	环丙烷乙酸衍生物(36, 37)	抗细菌活性	环丙烷类	42
<i>Streptomyces peucetius</i> DM07	低温	Peucemycin(38)	抗菌活性、抑制癌细胞	大环内酯类	42
<i>Streptomyces parvulus</i> Tü 64	溶氧量增加	手霉素 Manumycin(57, 58)	抗菌活性	聚酮类	6
<i>Streptomyces</i> sp. DSM 14386	添加卤素(NaCl, NaBr)	Svetamycins A ~ G(59 ~ 65)	抗菌活性	环肽类	45
<i>Streptomyces</i> sp. AI	pH	Rubromycins(66 ~ 69)	抗菌活性	环肽类	6

注:“-”表示生物活性未知。

Note:“-” means bioactivity is unknown.

1.1.1 碳氮源

Martin等^[16]描述了碳氮源种类及碳氮比对次

级代谢产物的影响。葡萄糖是一种优质的生长碳源,但是浓度过高时会干扰次级代谢产物的形成,这

已经被 Romero-Rodriguez 等^[17] 所验证。Gullon 等^[18] 观察到当葡萄糖作为碳源,可以通过抑制 *S. lividans* 中 *afsMRNA* (编码一个参与刺激次级代谢产物生物合成的全局性调控基因) 的表达,从而抑制放线菌紫红素 (actinorhodin) 的产生;当葡萄糖用甘油替代时,则没有观察到这种抑制作用。同样地, Rateb 等^[19] 将 ISP2 培养基中的葡萄糖换成甘油用于培养 *Streptomyces* sp. C34,并从该菌分离到 4 个新的聚酮类化合物 *chaxamycins A ~ D* (1~4)。Sujatha 等^[20] 比较了葡萄糖、乳糖、果糖、甘油等 14 种碳源对海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. BT-408 生产聚酮类抗生素产量的影响,结果发现该菌以葡萄糖为碳源时产量最高,其次是果糖。

氮是蛋白质和核酸的重要组成之一,不同的氮源会对细菌生长和次级代谢产物的合成有一定的影响^[21]。链霉菌中低浓度的氮源有利于次级代谢产物的合成已被广泛证明^[14]。Sujatha 等^[20] 比较了 6 种无机氮源和 13 种氨基酸(作为唯一氮源)对 *Streptomyces* sp. BT-408 生产聚酮类抗生素的影响,结果表明硝酸铵为氮源时抗生素产量最高。N-乙酰葡萄糖胺 (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) 是细菌肽聚糖的一部分,它是一种优质的碳氮源。Rigali 等^[22] 研究了 GlcNAc 对 *S. griseus* (链霉素的生产者) 形态分化与次级代谢产物产生的影响。结果表明,添加较多的 GlcNAc, *S. griseus* 的形态分化和抗生素的生产都被抑制,而添加较少的 GlcNAc 则得到相反的效果。同时, Wezel 等^[23] 发现,较少的 GlcNAc 有利于 *S. cescolonies* A3 中抗生素的生成,而较多的 GlcNAc 则呈现抑制作用。此后证明,这种现象在链霉菌中普遍存在,称为氮抑制。这种机制不仅会影响初级氮代谢,还会影响到次级代谢产物的生物合成。

总之,碳氮源种类和浓度对链霉菌的生长发育以及次级代谢产物的合成都有重要影响,且这一过程要受到严格的基因调控。碳源选择的这一过程被称为碳分解代谢物阻遏效应 (carbon catabolite repression, CCR),与其它革兰氏阳性菌不同,链霉菌中的 CCR 不受磷酸烯醇丙酮-磷酸转移酶系统 (phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system, PTS) 的控制,而是通过质子转运体运输葡萄糖^[24],同时被葡萄糖激酶 (glucokinase, Glk) 磷酸化,目前已证明了 Glk 在 CCR 这一过程中的关键作用^[25],被称为 Glk 依赖机制,此外葡萄糖依赖机制也被认为在 CCR 中发挥着重要作用^[25]。与 Glk 相似,在氮代谢

中, GlnR (一种全局性调控因子) 在双组分系统 (two-component system, TCS) 中发挥着重要的作用^[26]。

1.1.2 微量元素

营养元素尤其是微量元素对微生物次级代谢产物的合成和积累有重要作用。微量元素可作为次级代谢产物的组成元素,也可对次级代谢产物合成酶的活性有激活或抑制作用。

磷是细胞生长过程中的中重要元素,参与遗传物质合成、能量代谢、信号转导、维持膜完整性等多个至关重要的过程,并通过磷酸化发挥重要的信号传导作用^[27]。近些年,磷酸盐对次级代谢产物的分子机制已被阐明,即 PhoR-PhoP (又称 Pho 规则) 双分子系统^[27]。已无机磷酸盐对链霉菌生理和抗生素产量影响的报道,高浓度磷酸盐 (≥ 10 mmol/L) 培养基会导致次级代谢产物产量骤减或消失;相反,低磷酸盐水平 (< 0.1 nmol/L) 可导致次级代谢产物的增加^[28]。一些研究表明,PhoR-PhoP 系统通过间接的方式影响其他转录因子 (AtrA^[29]、AveR^[30]) 表达,从而引起次级代谢产物的变化。

微量元素被证明既能刺激次级代谢产物的增加,又能激活微生物中沉默的生物合成基因簇^[31]。金属离子与微生物之间通常存在三种相互作用:在细胞中发生反应、同化反应和异化反应。Akhter 等^[32] 采用不同类型 (NiCl₂、CoCl₂、ZnSO₄、CrCl₃、MnCl₂)、不同浓度 (100、200、400、800 μ mol/L) 金属离子对从海洋沉积物中分离出的 *S. pratensis* NA-ZhouS1 进行发酵培养,确定 Ni 离子效果最佳,并成功分离出 2 个新的芳香族聚酮 stremycin A、B (5、6) 以及 4 个已知的化合物 (7~10)。Shi 等^[33] 同样用含镍培养基从 *Streptomyces* sp. WU20 中分离到 1 个新型的环唑啉类似物 (11)。Liu 等^[34] 将 *Streptomyces* sp. FXJ1.172 放在添加了铁离子的葡萄糖-酵母提取物-麦芽提取物 (Glucose-yeast extract-malt extract, GYM) 培养基中培养,产生了 1 个新型的环肽类化合物 cyclic depsipeptide NC-1 (12)。

1.1.3 更换培养基

除了改变培养基中的碳源、氮源、添加微量元素等方式,更换培养基也可以获得更丰富的代谢产物。Wu 等^[35] 使用不同的培养基 (ISP2、ISP4、ACM 和 TSB),对一株海洋来源的链霉菌发酵培养,最终在 ACM 培养基中分离出 1 个新型聚酮类化合物 inthomycin B (13)。Lu 等^[36-40] 对 *Streptomyces* sp. CS 进行培养,在 YMG 琼脂培养基产生 3 个新的大环内酯类

化合物(14~16),在ISP2培养基中产生5个新的巴弗洛霉素衍生物(17~21),在Waksman合成培养基中产生5个新的聚酮类化合物(22~26),在燕麦培养基中产生3个新的安莎霉素类化合物 naphthomycins L、M、N(27~29)以及3个已知的 naphthomycins(30~32)。Ding等^[41]将一株海洋来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. DT-A37 放在 Gause's 液体培养基中培养,分离得到2个主产物:全霉素(holomycin)(33)及其开环衍生物(34)。随后Ding等^[41]又将这株链霉菌放在大米固体中培养发酵,从其培养提取物中分离出新的全霉素衍生物(35)和2个新的环丙烷乙酸衍生物(36,37)。

1.2 培养条件的改变

微生物在培养过程中的外界环境如温度、pH、曝气、容器类型等因素都会影响微生物基因表达,因

而对次级代谢产物的合成有着显著的影响。最早在2002年,Bode等^[6]通过改变外界培养参数(如曝气、温度、pH、培养容器),从6种不同的微生物中分离出100多种化合物,分属于25种以上不同的结构类型。

1.2.1 温度

次级代谢产物的产生直接受微生物酶活性的影响,温度过高导致酶失活,温度过低则会影响酶促反应速率。链霉菌 *S. peucetius* DM07 以生产重要的萘环类药物而闻名,在同一培养基中,Pham等^[42]将菌株在不同温度下(18、23、28和37℃)培养72h,发现在18℃培养条件下的产物于17.5min出现新峰,而在其他的温度下该峰不存在,通过进一步的分离与纯化得到1个新型大环内酯类化合物 peucemycin(38)(见图3和表1)。

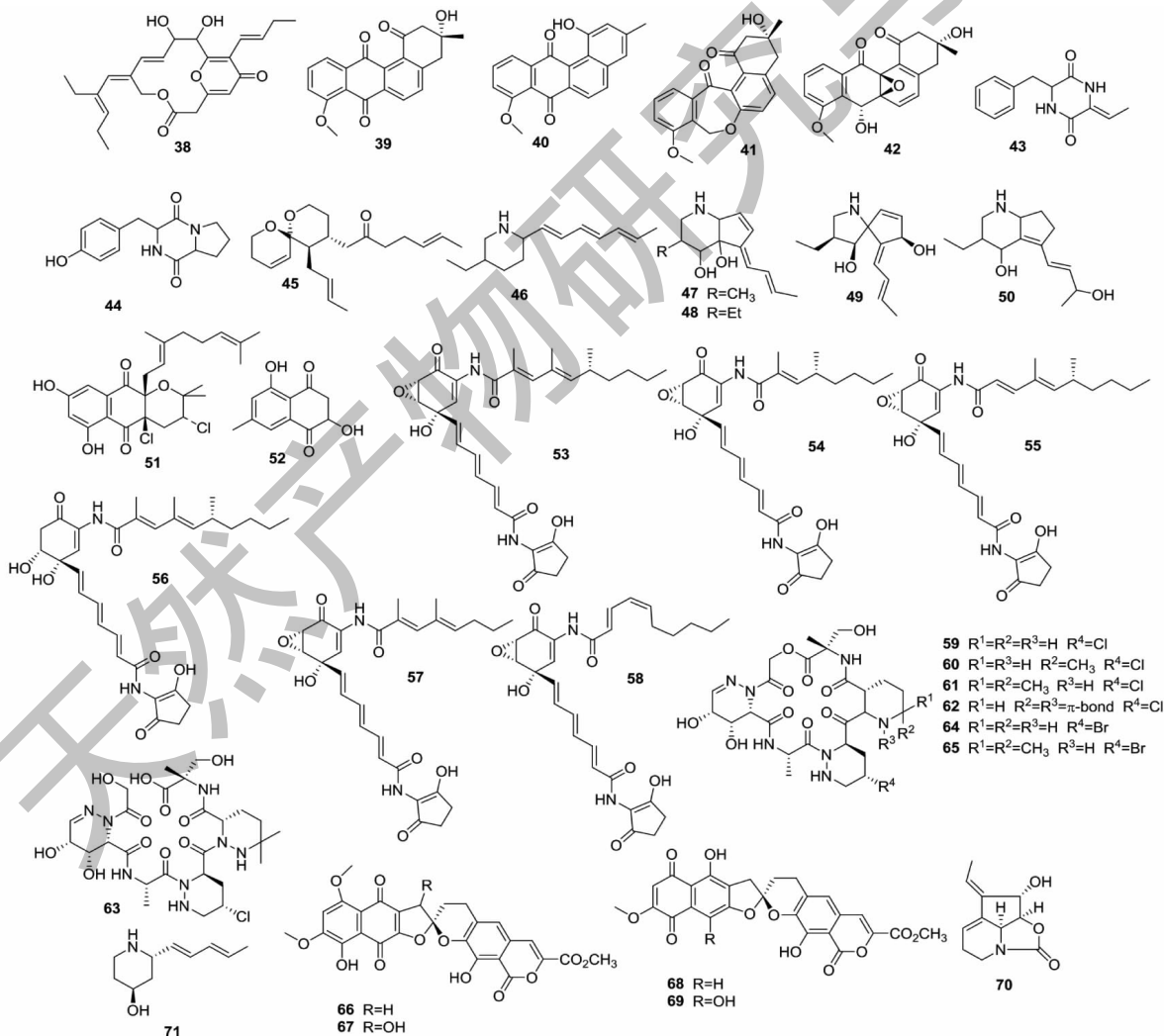


图3 化合物38~71结构

Fig. 3 Structures of compounds 38-71

1.2.2 曝气或溶氧量

含氧量的变化可以影响生化反应,进而调控代谢途径,激活不同的基因簇。链霉菌 *Streptomyces* sp. Go40/14 所有的代谢产物都可以通过改变发酵罐体积、培养基组成或曝气程度分离获得,化合物 **39 ~ 43** 几乎在所有的条件下都能获得;而化合物 **44** 和 **45** 只能在特殊的发酵罐得到;化合物 **46 ~ 49** 可通过高曝气获得;化合物 **50** 只能在体积超过 90L、高曝气的发酵罐中得到^[6]。Gallagher 等^[43,44] 用海洋来源的链霉菌 *Streptomyces* sp. CNQ-525 来探究氧气浓度对次级代谢产物生成的影响,当在低氧环境下生长时,观察到萜类化合物 napyradiomycin (**51**) 的产量减少,而另外 1 个萜类化合物的中间体 8-amino-flaviolin (**52**) 大量增加。*S. parvulus* Tu64 在常规培养条件下的主要代谢产物为聚酮类化合物 manumycin A (**53**),同时伴有 manumycins B ~ D (**54 ~ 56**) 的产生,但随着压力以及溶氧量的增加,导致该菌产生了 20 个新的聚酮类化合物 manumycin 或 manumycin 类似物,这里仅列出来 2 种(**57, 58**)^[6]。

1.2.3 盐度、pH

盐度、pH 与温度一样都是微生物生理生化保持稳定的一个重要因素。微生物暴露在添加不同卤素的培养基中,可能会激活隐秘的生物合成基因簇,产生不同的次级代谢产物。*Streptomyces* sp. DSM 14386 在含 1.5% NaCl 的培养基中产生 5 个新型的环肽类化合物 Svetamycins A ~ E (**59 ~ 63**),在含 1.5% NaBr 的培养基中产生 2 个溴化同源物 Svetamycins F、G (**64, 65**),这些物质均在常规培养基中未被发现^[45,46]。培养环境 pH 通过影响酶的活性及膜表面的带电性质,改变底物的进出速率与进出方式,进而影响基因簇的表达。*Streptomyces* sp. A1 在 pH 为微酸的情况下产生双苯并螺环缩酮类化合物 Rubromycins (**66 ~ 69**),当环境 pH 为 7.3 时,则会产生化合物 **70** 和 **71**^[6]。Sakar 等^[47] 从靠海附近的湿润环境中分离到一株 *Streptomyces* sp. MS1/7,并报道了 pH 对该菌次级代谢产物产量的影响,发现其在酸性(pH 4.0)培养基中没有抗菌活性,pH 大于 7.0 表现出一定的活性,pH = 10.0 时仍表现出抗菌活性,但是在 pH 为 9.0 时抗菌活性最高。

1.3 培养条件的优化策略

在改变培养基组成或培养条件的激活策略中,培养条件的优化可以通过一次次地修改某个单一因素来实现,也可以基于更复杂的数学和统计方法来

帮助实现,即人工神经网络(artificial neural network, ANN)、遗传算法(genetic algorithm, GA)、响应面法(response surface methodology, RSM)等^[48]。RSM 方法是 Box 等^[49] 开发的一种使用因子设计来优化所需代谢物的生产过程,常用于优化配方变量和优化发酵过程。Managamuri 等^[50] 对 *S. sparsus* VSM-30 培养基组成进行优化,包括孵育时间、温度、pH、碳氮源等,实现抗真菌、抗细菌和抗氧化等活性物质的增加。在另一项研究中, Singh 等^[51] 应用 ANN 与 GA 结合的方法优化了 *S. triostinicus* 的培养基组分,并从该菌种分离到放线菌素 V,该菌株在先前并没有检测此类抗生素的产生,且应用 ANN/GA 获得的抗生素产量比 RSM 获得的产量高 36.7%。

2 共培养策略

传统微生物天然产物的生产通常是在一个营养丰富的单一培养基中完成的,这些培养基虽然有效,但是与细菌原始、复杂且贫瘠的环境相比有着明显的区别^[52]。共培养体系是激活沉默生物合成基因簇、刺激新型次级代谢产物产生的有效策略之一,其主要通过模拟种间争夺养分、空间等条件时所遇的生存压力来分析微生物形态变化、监测细胞密度等,进而发现共培养体系中微生物次级代谢产物的变化^[53]。根据培养基状态的不同可以分为液体共培养(混合发酵)和固体共培养^[10]。根据共培养微生物的类型,我们可以分为:链霉菌与链霉菌共培养、链霉菌与非链霉菌共培养两大类^[54]。

2.1 链霉菌与链霉菌共培养

Yamanaka 等^[55] 对 76 株链霉菌的交叉共培养证明,20% 以上的链霉菌在共培养条件下表现为菌株长势迅速且次级代谢产物产量增加。铁色素类化合物去铁胺(desferrioxamine E) (**72**) (见图 4) 是从 *S. griseus* 培养液上清中分离纯化的一种铁载体,它与链霉菌生长及相关生物产品的产生有关。将该菌与不同链霉菌菌株共培养,使链霉菌出现不同程度的次级代谢产物增加或形态分化。当 *S. griseus* 与 *S. coelicolor* A3 (破坏了铁载体合成基因簇,单独不可培养) 共培养时, *S. coelicolor* A3 恢复正常生长,表明了 desferrioxamine E 在链霉菌的生存发育中起到一定的作用^[55]。*S. coelicolor* M145 与其他链霉菌 (*Streptomyces* sp. E14、*Streptomyces* sp. SPB74 等) 相互作用时,至少产生了 12 个不同的去铁胺^[56]。

Promomycin (**73**) 是在链霉菌中发现的可以促进抗生素生产的聚醚类化合物,结构上与 lonomycin

(74) 相关,本身具有抗菌活性。将产生这种物质的链霉菌与不同的链霉菌(常规培养未有抗生素类物质产生)共培养,均有抗生素物质产生^[57]。*S. lividans* 是两种红色素的生产者,但这些色素的产生需要具备一定的条件,在实验室正常培养条件下,并不会产生这些色素,需要在一种激素类似物(75)的刺

激下才可以产生^[58]。Onaka 等^[58]将从土壤中分离出的 400 个放线菌用于刺激 *S. lividans* 的生长,将 *Streptomyces* sp. TP-A0584 与目标菌种共培养后发现 *S. lividans* 产生红色素,后经分离得到 1 个新的多肽类抗生素 goadsporin,低浓度的 goadsporin 具有促进孢子形成的作用,高浓度则会抑制菌体的生长。

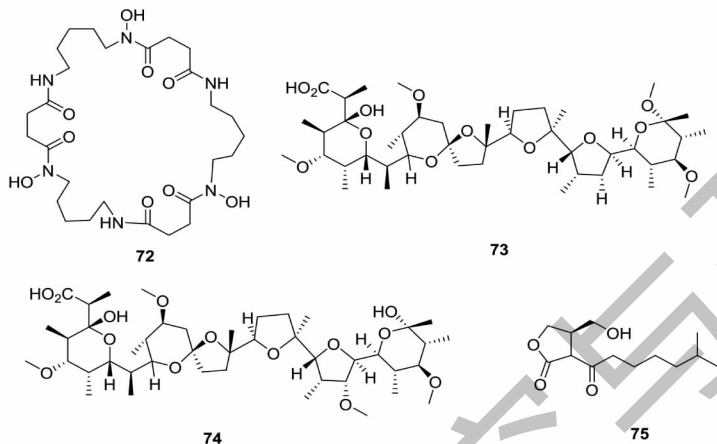


图 4 化合物 72~75 结构

Fig. 4 Structures of compounds 72-75

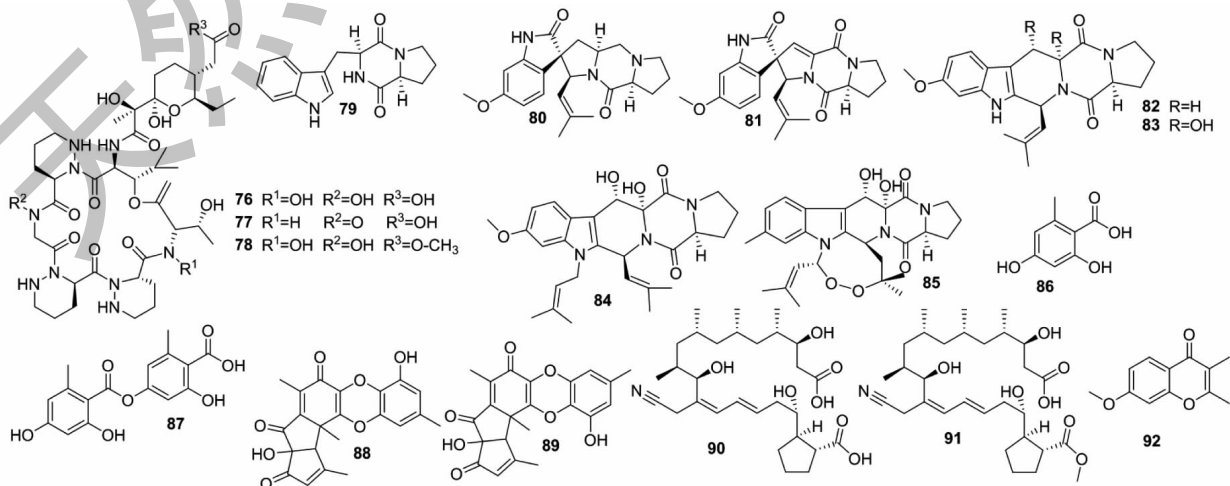
2.2 链霉菌与非链霉菌共培养

2.2.1 链霉菌与细菌

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等人类致病菌一直是实验室筛选具有生物活性次级代谢产物的指示菌株。最近几十年发现,这些致病菌在通过共培养方式来激活沉默基因簇方面具有优势,因而一直尝试将它们与放线菌共培养,尤其是链霉菌属^[59]。

Bing 等^[60]发现 *Streptomyces* sp. FXJ2.014 单一

培养主要产生的生物活性代谢产物是醌霉素 (quinomycin A),将其与枯草芽孢杆菌在液体培养基中共培养可产生 1 个新的醌霉素结构类似物 quinomycin FXJ2.014-HB,并通过实验验证,这种新产生的醌霉素具有成为低细胞毒性抗生素的潜力。Daniel 等^[61]将一株海洋来源的链霉菌与枯草芽孢杆菌共培养,发现了 1 个新的环肽类化合物 dentigerumycin E,检测了 dentigerumycin E (76) 及其化学衍生物(77、78)生物活性,发现 dentigerumycin E 具有抗人类癌细胞增殖活性(见图 5、表 2)。



续图 5 (Continued Fig.5)

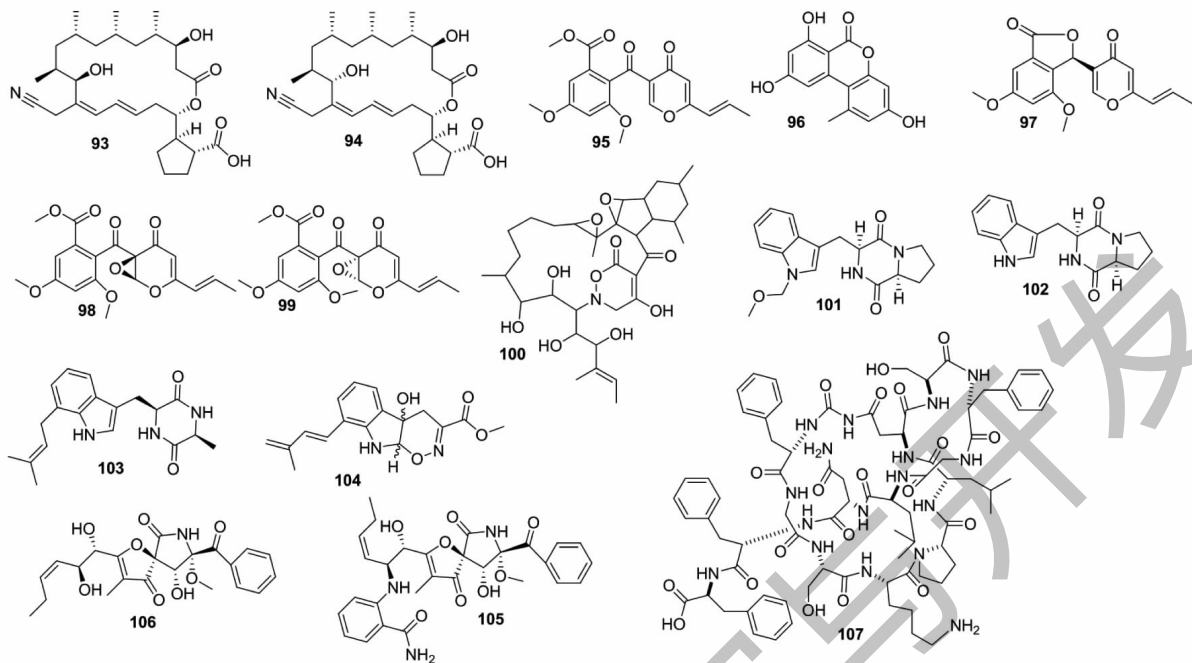


图5 化合物76~107结构

Fig. 5 Structures of compounds 76-107

表2 共培养挖掘新的活性代谢产物

Table 2 Co-culture mining for new active metabolites

来源 Source	方法 Method	化合物 Compound	生物活性 Bioactivity	分类 Classification	参考文献 Ref.
<i>Streptomyces</i> JB5	sp. 共培养(枯草芽孢杆菌)	Dentigerumycin E (76) 2- <i>N</i> ,16- <i>N</i> -Deoxydentigerumycin E (77) dentigerumycin methyl ester (78)	对癌细胞有抑制作用 - -	环肽类	61
<i>Streptomyces bullii</i>	共培养(<i>Aspergillus fumigatus</i> MBC-F1-10)	Brevianamide (79)、spirotryprostain A (80)、6-methoxy spirotryprostain (81)、烟曲霉震颤素 B fumitremorgin B (82)、烟曲霉震颤素 C fumitremorgin C (84)、12,13-dihydroxy derivative (83)、verruculogen (85)	化合物(79~85)均有灭杀寄生虫的活性	生物碱类	68
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	共培养(<i>Aspergillus nidulans</i>)	Orsellinic acid (86)、lecanoric acid (87)、polyketides F-9775A (88)、polyketides F-9775B (89)	87为ATP合成抑制剂;88,89具有抑制骨质疏松的效果	聚酮类	69
<i>Streptomyces rochei</i> MB037	共培养(<i>Rhinochla diella similis</i> 35)	Borrelidins J, K (90, 91)	90具有抗菌活性	大环内酯类	70
<i>Streptomyces fradiae</i> 007	共培养(<i>Penicillium</i> sp. WC-29-5)	Deoxyfunicone (95)、交链孢酚 alternariol (96)、(9 <i>R</i> , 14 <i>S</i>)-epoxy-11-deoxyfunicone (98)、(9 <i>S</i> , 14 <i>R</i>)-epoxy-11-deoxyfunicone (99)	98, 99具有抑制肿瘤细胞的活性	聚酮类	71
<i>Streptomyces endus</i> S-522	共培养(<i>Tsukamurella pulmonis</i> TP-B0596)	Alchivemycin A (100)	抗菌活性	聚酮类	72

注:“-”表示生物活性未知。

Note:“-” means bioactivity is unknown.

Sung 等^[62]从红树林根部分离到一株链霉菌 *Streptomyces* sp. PTY08712, 通过分析其基因组发现

该菌株具有产生多种次级代谢产物的强大潜力。使用多种培养基单独培养时, 在其提取物中发现的次

级代谢产物,与基因组数据显示的潜在的次级代谢产物的种类相比存在巨大的偏差。后将其与枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)共培养,该菌株中的沉默生物合成基因簇被激活,granaticin、granatomycin D 和 dihydrogranaticin 等 3 种抗生素产量增加。单一培养 *S. coelicolor* A3 时会产生少量三吡咯色素类化合物 undecylprodigiosin, Mavituna 等^[63]将该链霉菌与大肠杆菌共培养,最终 undecylprodigiosin 的产量有显著增加。

Burkholderia vietnamiensis (ATCC BAA-248)、*Brucella neotomae* (ATCC 23459)、*Yersinia pestis* (A1122) 和 *Xanthomonas axonopodis* (ATCC 8718) 均为变形杆菌,与链霉菌(*Streptomyces* sp. Bo33) 共培养时产生 1 个新型的醌类天然抗生素 resistomycin, 对菌株单独培养时均未检测到该物质的产生^[64]。

2.2.2 链霉菌与真菌

真菌是一类庞大的群体,人们已经从真菌发现了大量的次级代谢产物^[65],并且许多次级代谢产物表现出生物活性,因而具有重大的药物开发潜力^[66]。目前,最成功的共培养方法可能涉及到与各种真菌的共培养,由于许多真菌与放线菌在不同的生态环境中共存,这意味着他们之间存在着普遍的相互作用^[67](见图 5 和表 2)。

Rateb 等^[68]报道将 *S. bullii* 与 *Aspergillus fumigatus* MBC-F1-10 分别接种在麦芽提取物培养基,在 LC-MS 色谱图中几乎看不到任何占主导地位的峰,用相同的培养基将两者共同培养,其 LC-MS 谱图非常复杂,最后经过分离鉴定,得到 7 个新型的生物碱类化合物(79~85)。Schroeckh 等^[69]将印尼曲霉 *A. nidulans* 与 *S. hygroscopicus* 共培养时会产生 4 个新型的聚酮类化合物(86~89),这是在单独培养时未曾发现的。

在 Yu 等^[70]的研究中,以 *S. rochei* MB037 和 *Rhinocladiella similis* 35 进行共培养,并以两株菌的单独培养作为对照。从培养液中成功分离出 2 个新型的大环内酯类化合物 borrelidins J、K(90、91),以及三种已知的大环内酯类化合物(92~94),且化合物 90、91 仅在共培养中被检测到。Wang 等^[71]将 *Penicillium* sp. WC-29-5 与 *S. fradiae* 007 共培养,从培养液中共分离出 5 个新型的聚酮类化合物(95~99),其中化合物 deoxyfunicone(95)、交链孢酚 alternariol(96)、(9R,14S)-epoxy-11-deoxyfunicone(98)、(9S,14R)-epoxy-11-deoxyfunicone(99),仅在共培养

中发现,且化合物 98 和 99 表现出一定的细胞毒性活性。

Tsukamurella pulmonis TP-B0596 是一种含霉菌酸的真菌,与 *S. lividans* 共培养能诱导红色素的产生。Onaka 等^[72]将 112 株链霉菌与 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 共培养,经 HPLC 分析发现其中 41 个菌株诱导了新的次级代谢产物产生,如新型聚酮类抗生素 alchivemycin A(100)。

链霉菌与非链霉菌共培养时,两者的关系并不是一成不变的。链霉菌既可以是生产者也可以是诱导者。如 Wakefield 等^[73]将一株源自海洋的真菌 *Aspergillus fumigatus* MR2012 与高干旱沙漠分离的 *S. leeuwenhoekii* C34 共培养来研究两者的相互作用。真菌 MR2012 与链霉菌 C34 共培养导致许多新化合物产生,其中包括真菌来源的 6 个新型的生物碱类化合物 brevianamide X(101)、brevianamide F(102)、terezine D(103)、luteoride D(104)、pseurotin G(105)、11-O-methy pseurotin A(106),这是该真菌在单独培养时从未检测到的;除了在链霉菌 C34 检测到的代谢物外,共培养条件下分离出 1 个新型的环肽类化合物 chaxapeptin(107),这也是单独培养未检测到的。

3 添加化学激发子

化学激发子是小分子物质,当添加到培养基中时可诱导微生物生物合成基因簇的表达并产生次级代谢产物^[74]。在自然界中,链霉菌生活在比较复杂的环境之中,周围常存在细菌、真菌、动物和植物,为了解决本身生存问题,其会产生大量化学信号分子来调节自己与四周环境的适应性,从而满足特定合成基因的调控表达机制,以便其更好地生存^[75](见图 6、表 3)。

有报道称,大多数激发子是抗生素,它们能在较低的浓度下诱导次级代谢产物的产生^[76]。如前面提到的从一株链霉菌中分离得到的抗生素 goadsporin,低浓度(<1 μmol/L)的 goadsporin 能刺激链霉菌次级代谢产物的增加;高浓度的 goadsporin 则会抑制细胞的增殖^[58]。Etoposide(108)和 ivermectin(109)是已知的抗生素,在低浓度下均可以诱导次级代谢产物的增加^[41]。*S. coelicolor* 能生产 undecylprodignine(110)、streptorubin B(111)等色素型次级代谢产物^[77,78]。为了确定干扰次级代谢的小分子,Craney 等^[79]筛选了 30569 种小分子,以链霉菌在固体培养基培养期间色素的沉着能力作为检测标准。

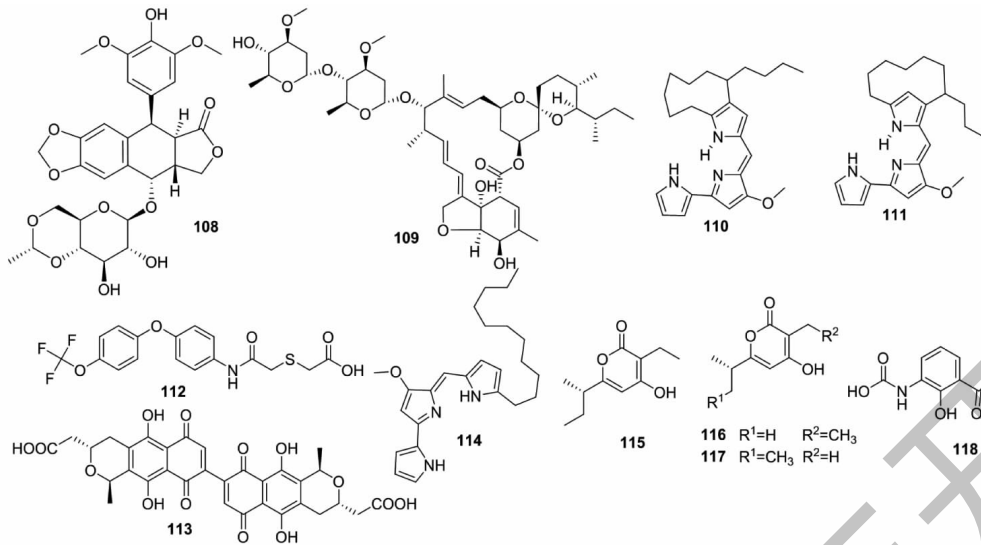


图6 化合物 108 ~ 118 结构

Fig. 6 Structures of compounds 108-118

表3 添加化学激发子发现新的活性代谢产物

Table 3 Addition of chemical excitons to discover new active metabolites

来源 Source	方法 Method	化合物 Compound	生物活性 Bioactivity	分类 Classification	参考文献 Ref.
<i>Streptomyces coelicolor</i>	添加 ARC2	放线紫红素 Actinorhodin (113) 十一烷基灵菌红素 Undecylprodigiosin (114) Germicidins A ~ C (115 ~ 117)	抗菌活性	苯并异色烷醌类 三吡咯色素类 不饱和和内脂类	79
<i>Streptomyces</i> R818	sp. 添加 LaCl ₃	Urauchimycin D (118)	抗菌活性	环肽类	84

结果观察到有 112 种小分子有色素沉着能力,其中 19 种小分子表现出较好的效果。19 个小分子中有 4 个具有相似的结构:ARC2、ARC3、ARC4 和 ARC5,称为 ARC2 系列。在实验中,将购买的 ARC2 (**112**) 及其 ARC2 衍生物 Cl-ARC2 用于多种链霉菌中,成功诱导出 1 个苯并异色烷醌类化合物 (**113**)、1 个三吡咯色素类化合物 (**114**) 以及 3 个不饱和和内脂类化合物 (**115 ~ 117**)^[14,74,79,80]。

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 是一类重要的酶,负责从组蛋白的 N 端尾部去除乙酰基团^[81]。组蛋白的 N 端通过添加/去除小基团如甲基、乙酰基或磷酸基团来修饰,这些修饰可以影响基因的转录^[82]。链霉菌属于原核生物,没有组蛋白可以供 DNA 附着,HDAC 抑制剂对细菌的研究较少。在一项初步研究中,Moore 等^[81]研究了 HDAC 抑制剂对 *S. coelicolor* A3 次级代谢产物产生的影响。实验在两种固体培养基中进行,正常情况下 R5 培养基会产生两种色素且产量正常,MM 培养基则会

降低两种色素的产量。当加入一定体积的丁酸钠 (sodium butyrate, 一种典型的 HDAC 抑制剂) 会使 MM 培养基上色素的产量增加,而 R5 培养基上的色素产量降低。随后使用不同的 HDAC 抑制剂,得出了相似的结果。在液体培养基中,加入丁酸钠,通过定量 PCR 进行检测发现 *S. coelicolor* A3 中 5 个公认的沉默基因被表达^[81]。

稀土金属也是一类激发因子,最近的研究证明,其在刺激沉默基因簇产生次级代谢产物方面也相当有效果^[83]。如 Xu 等^[84]在正常培养基中添加 LaCl₃ 用于培养来自于深海的 50 株放线菌,其中有 15 株由于添加了 LaCl₃ 导致抗病原菌活性物质的产量增加,并检测到新的环肽类化合物如 uranchimycin D (**118**)。此外,糖、金属离子等也可以作为激发子触发沉默基因簇表达^[23,32,85]。

总之,无论选择哪种激发子进行诱导,其优势都是明显可见的。同时添加激发子是最简单、最具有成本效益的方式,当然缺点也是明显的,激发子过多

过少都会造成一定的影响,过多会造成微生物的直接死亡,过少则表现为没有影响,因此使用时需要选择合适的激发子的浓度^[74]。

4 全局性调控

链霉菌的次级代谢产物可以通过多种复杂的代谢途径合成,且相关基因的表达往往要受到极为严格的调控^[86]。其中,全局性调控是指在全局性调控因子的作用下发挥的调控作用,该因子不属于任何一个基因簇,在特定的环境条件下,可同时诱导多个基因的表达,还可以影响形态结构以及生长发育^[87]。

天蓝色链霉菌 bld 基因是全局性调控中第一个被描述的,该基因的突变会导致抗生素合成的中断以及生长发育停止。早在 2000 年,天蓝色链霉菌中就有超过 10 个 bld 基因被鉴定,这些基因调控着不同的产物^[88],其中 bld A 基因是 bld 基因中研究最多的,其通过调控 mRNA 的转录,从而控制次级代谢产物的合成^[89]。同时研究者在其他链霉菌的基因组中也发现了 bld 基因的同源基因,逐渐被用于链霉菌沉默基因簇的激活^[90]。除了 bld 基因外,目前还有 nsdA^[91]、farR1^[92]、abrC1/C2/C3^[93]、SCB1, 2,3^[94]、adpA^[95]、crp^[96] 等全局性调控因子用于链霉菌沉默基因簇的激活。

5 总结

抗生素的发现是医学发展史上的重大里程碑,

极大地降低了病菌感染的发生率和死亡率。目前已经发现的抗生素类约 60% 的是由链霉菌产生,然而,随着抗生素的大量使用,耐药性及超级细菌问题同样日益突出^[1]。为了应对耐药性以及超级细菌的这一问题,我们急需挖掘新的抗生素。通过对链霉菌基因组数据进行生物信息学分析,发现存在着很大一部分的基因处于沉默状态^[5]。因而,链霉菌中沉默基因簇的激活是当下重要的问题之一。越来越多的学者注意到了链霉菌发现新化合物的潜力,开始研究如何刺激沉默基因簇的激活。

根据激活的目标基因是否明确,我们将目前的激活策略分为定向激活策略和非定向激活策略。非定向激活策略包括改变培养基组成或培养条件的激活策略、共培养策略、添加化学激发子和全局性调控等,与一些基于基因的手段如核糖体工程、启动子工程、转录因子调控等相比,非定向激活策略有着自身的优势及局限性(见表 4)。近些年,一些新的、前沿的手段被研发,如微流体平台^[14]、微发酵与基因组尺度的代谢模型结合^[97]、生物发生管与组学相结合^[98]、HiTEs^[99] 等,在激发沉默基因簇中起着巨大的作用。将非定向激活策略与代谢物指纹图谱分析结合已证明在挖掘次级代谢产物中取得重大成果^[100]。

表 4 非定向沉默基因簇激活策略的优缺点

Table 4 Advantages and disadvantages of non-directed strategies for activating silent gene clusters

激活策略 Activation strategy	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
培养基成分改变或培养条件优化	操作简单,成本低,应用范围广,可同时激活多个不同的基因簇	筛选过程工作量大,周期长,具有一定的盲目性
微生物共培养	模拟物种间的相互作用	微生物共培养激活沉默基因簇机制复杂,对涉及三种及以上微生物的共培养体系研究相对困难
化学激发子	作用位点清晰,工作量小	激发子可能影响其他代谢途径
全局性调控	作用位点清晰,单一操作可影响多种次级代谢产物	需要了解目标菌株的基因信息

本文仅仅是对改变培养基组成或培养条件的激活策略、共培养策略以及添加化学激发子策略进行简单的概括,未涉及或仅涉及到很少一部分基因层面的技术。目前,无论是非定向激活策略还是定向激活都有各自的优势及局限性,单独使用某一种策略很难全面激活沉默基因簇。因此,在基因组测序技术的不断进步的前提下,将基础微生物学方法、计算方法和技术创新等更彻底地结合起来,将更有助

于发现链霉菌巨大的次级代谢产物合成潜力。

参考文献

- Salwan R, et al. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria [J]. Microbiol Res, 2020, 231: 126374.
- Newman DJ, et al. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 [J]. J

- Nat Prod,2020,83:770-803.
- 3 Yan D, et al. Research progress on the bioactive substances of marine actinomycetes and their antitumor activities [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:323-333.
 - 4 Lee N, et al. Systems and synthetic biology to elucidate secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded in *Streptomyces* genomes [J]. Nat Prod Rep, 2021, 38: 1330-1361.
 - 5 Lee N, et al. Mini review: genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2020, 18:1548-1556.
 - 6 Bode HB, et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity [J]. ChemBioChem, 2002, 3:619-627.
 - 7 Xie MC, et al. A mini review of OSMAC approach and its application in *Aspergillus fumigatus* secondary metabolites [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:1668-1673.
 - 8 Pettit RK. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites [J]. Microb Biotechnol, 2011, 4:471-478.
 - 9 Tanaka Y, et al. Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. J Antibiot(Tokyo),2010,63:477-481.
 - 10 Tan ZQ, et al. Co-culture systems for the production of secondary metabolites: current and future prospects [J]. Open Biotechnol J, 2019, 13:18-26.
 - 11 Zhang MM, et al. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13:607-U173.
 - 12 Luo Y, et al. Activation and characterization of a cryptic poly-cyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster [J]. Nat Commun, 2013, 4:2894.
 - 13 Laureti L, et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambifaciens* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108:6258-6263.
 - 14 Romano S, et al. Extending the "one strain many compounds"(OSMAC) principle to marine microorganisms [J]. Mar Drugs, 2018, 16:244.
 - 15 Schwarz J, et al. Triaging of culture conditions for enhanced secondary metabolite diversity from different bacteria [J]. Bi-omol, 2021, 11:193.
 - 16 Martín JF, et al. Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces* [J]. Microb Biotechnol, 2010, 4:165-174.
 - 17 Romero-Rodríguez A, et al. Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned [J]. World J Microbiol and Biotechnol, 2017, 33:162.
 - 18 Gullón S, et al. The cellular mechanisms that ensure an efficient secretion in *Streptomyces* [J]. Antibiot(Basel), 2018, 7:33.
 - 19 Rateb ME, et al. Chaxamycins A-D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp [J]. J Nat Prod, 2011, 74:1491-1499.
 - 20 Sujatha P, et al. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiol Res, 2005, 160:119-126.
 - 21 Romero-Rodríguez A, et al. Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2018, 111:761-781.
 - 22 Rigali S, et al. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces* [J]. EMBO Rep, 2008, 9:670-675.
 - 23 Wezel GV, et al. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances [J]. Nat Prod Rep, 2011, 28:1311-1333.
 - 24 Wezel G, et al. GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. Mol Microbiol, 2005, 55:624-636.
 - 25 Romero-Rodríguez A, et al. Transcriptomic analysis of a classical model of carbon catabolite regulation in *Streptomyces coelicolor* [J]. BMC Microbiol, 2016, 16:77.
 - 26 Liao CH, et al. Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources in actinomycetes [J]. Proc Natl Acad Sci, 2015, 112:15630-15635.
 - 27 Santos-Beneit F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria [J]. Front Microbiol, 2015, 6:402.
 - 28 Rodríguez-García A, et al. Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a deltapHOP mutant [J]. Proteomics, 2007, 7:2410-2429.
 - 29 Gabriel C, et al. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor* [J]. Mol Microbiol, 2005, 58:131-150.
 - 30 Yang R, et al. The PhoP transcription factor negatively regulates avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99:10547-10557.
 - 31 Fil TP, et al. Copper and manganese cations alter secondary

- metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum* [J]. J Braz Chem Soc, 2016, 27: 1444-1451.
- 32 Akhter N, et al. Stress-driven discovery of new angucycline-type antibiotics from a marine *Streptomyces pratensis* NA-ZhouS1 [J]. Mar Drugs, 2018, 16: 331.
- 33 Shi Y, et al. Stress-driven discovery of a cryptic antibiotic produced by *Streptomyces* sp. WU20 from Kueishantao hydrothermal vent with an integrated metabolomics strategy [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101: 1395-1408.
- 34 Liu M, et al. Activation and Identification of NC-1: a cryptic cyclodepsipeptide from red soil-derived *Streptomyces* sp. FXJ1. 172 [J]. Eur J Org Chem, 2016, 2016: 3943-3948.
- 35 Wu Q, et al. Production and identification of inthomycin B produced by a deep-sea sediment-derived *Streptomyces* sp. YB104 based on cultivation-dependent approach [J]. Curr Microbiol, 2018, 75: 942-951.
- 36 Lu CH, et al. A new macrolide antibiotic with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. CS, a commensal microbe of *Maytenus hookeri* [J]. J Antibiot, 2003, 56: 415-418.
- 37 Lu CH, et al. Two new macrolides produced by *Streptomyces* sp. CS [J]. J Antibiot, 2004, 57: 597-600.
- 38 Li J, et al. Novel polyketides isolated from *Streptomyces* sp [J]. Helv Chim Acta, 2008, 91: 741-745.
- 39 Li JA, et al. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS [J]. J Antibiot, 2010, 63: 595-599.
- 40 Yang YH, et al. Naphthomycins L-N, ansamycin antibiotics from *Streptomyces* sp. CS [J]. J Nat Prod, 2012, 75: 1409-1413.
- 41 Ding H, et al. Derivatives of holomycin and cyclopropaneacetic acid from *Streptomyces* sp. DT-A37 [J]. Chem Biodivers, 2017, 14: e1700140.
- 42 Pham VTT, et al. Identification and enhancing production of a novel macrolide compound in engineered *Streptomyces peuceitius* [J]. RSC Adv, 2021, 11: 3168-3173.
- 43 Gallagher KA, et al. Ecological implications of hypoxia-triggered shifts in secondary metabolism [J]. Environ Microbiol, 2017, 19: 2182-2191.
- 44 Isogai S, et al. Identification of 8-amino-2, 5, 7-trihydroxynaphthalene-1, 4-dione, a novel intermediate in the biosynthesis of *Streptomyces* meroterpenoids [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 5823-5826.
- 45 Dardić D, et al. Svetamycins A-G, unusual piperazic acid-containing peptides from *Streptomyces* sp [J]. J Org Chem, 2017, 82: 6032-6043.
- 46 Pan R, et al. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: a literature review [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 294.
- 47 Sarkar S, et al. Production of a potentially novel antimicrobial compound by a biofilm-forming marine *Streptomyces* sp. in a niche-mimic rotating disk bioreactor [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2010, 33: 207-217.
- 48 Singh V, et al. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review [J]. Front Microbiol, 2017, 7: 2087.
- 49 Box G, et al. On the experimental attainment of optimum conditions [J]. J R Stat Soc, 1951, 13: 1-45.
- 50 Managamuri U, et al. Isolation, identification, optimization, and metabolite profiling of *Streptomyces sparsus* VSM-30 [J]. 3Biotech, 2017, 7: 217.
- 51 Singh V, et al. Optimization of actinomycin V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 82: 379-385.
- 52 Okada BK, et al. Antibiotic dialogues: Induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41: 19-33.
- 53 Van Bergeijk DA, et al. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18: 546-558.
- 54 Zhuang L, et al. Utilizing cross-species co-cultures for discovery of novel natural products [J]. Curr Opin Biotechnol, 2021, 69: 252-262.
- 55 Yamanaka K, et al. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis* [J]. Microbiol (Reading), 2005, 151: 2899-2905.
- 56 Traxler MF, et al. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome [J]. mBio, 2013, 4: e00459-13.
- 57 Amano S-i, et al. Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp [J]. J Antibiot, 2010, 63: 486-491.
- 58 Onaka H. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes [J]. J Antibiot, 2017, 70: 865-870.
- 59 Kim JH, et al. Discovery of novel secondary metabolites encoded in actinomycete genomes through coculture [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2021, 48: kuaa001.
- 60 Bing H, et al. Coculture of actinomycetes with *Bacillus subtilis* and its effect on the bioactive secondary metabolites [J]. Chin J Biotechnol (生物工程学报), 2009, 25: 932-940.
- 61 Daniel Shin, et al. Coculture of marine *Streptomyces* sp. with *Bacillus* sp. produces a new piperazic acid-bearing cyclic peptide [J]. Front Chem, 2018, 6: 498.
- 62 Sung AA, et al. Upregulation and identification of antibiotic

- activity of a marine-derived *Streptomyces* sp. via co-cultures with human pathogens [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15:250.
- 63 Mavituna F, et al. In search of the *E. coli* compounds that change the antibiotic production pattern of *Streptomyces coelicolor* during inter-species interaction [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 90:45-52.
- 64 Carlson S, et al. Phylum-specific regulation of resistomycin production in a *Streptomyces* sp. via microbial coculture [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78:381-387.
- 65 Vivek-Ananth RP, et al. MeFSAT: a curated natural product database specific to secondary metabolites of medicinal fungi [J]. *Rsc Advances*, 2021, 11:2596-2607.
- 66 Huang Y, et al. Research advances of endophytic fungi bioactive components [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:1419-1437.
- 67 Frey-Klett P, et al. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75:583-609.
- 68 Rateb ME, et al. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture [J]. *RSC Adv*, 2013, 3:14444-14450.
- 69 Schroeckh V, et al. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106:14558-14563.
- 70 Yu M, et al. New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinochadiella similis* 35 [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10:915.
- 71 Wang Y, et al. Phenolic polyketides from the co-cultivation of marine-derived *Penicillium* sp. WC-29-5 and *Streptomyces fradiae* 007 [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12:2079-2088.
- 72 Onaka H, et al. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77:400-406.
- 73 Wakefield J, et al. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8:1284.
- 74 Tomm HA, et al. Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46:1381-1400.
- 75 Niu G, et al. Specialised metabolites regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* spp [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40:554-573.
- 76 Seyedsayamdost MR. High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2014, 111:7266-7271.
- 77 Mo S, et al. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis [J]. *Chem Biol*, 2008, 15:137-148.
- 78 Okamoto S, et al. Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics; discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster [J]. *Chem Biol*, 2009, 16:226-236.
- 79 Craney A, et al. Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism [J]. *Chem Biol*, 2012, 19:1020-1027.
- 80 Pimentel-Elardo SM, et al. Activity-independent discovery of secondary metabolites using chemical elicitation and cheminformatic inference [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10:2616-2623.
- 81 Moore JM, et al. Use and discovery of chemical elicitors that stimulate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* bacteria [J]. *Methods Enzymol*, 2012, 517:367-385.
- 82 Munshi A, et al. Histone modifications dictate specific biological readouts [J]. *J Genet Genomics*, 2009, 36:75-88.
- 83 Zhu H, et al. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41:371-386.
- 84 Xu D, et al. Bioprospecting deep-sea actinobacteria for novel anti-infective natural products [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:787.
- 85 Gilmore SA, et al. *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) triggers a rapid, temperature-responsive morphogenetic program in thermally dimorphic fungi [J]. *Plos Genet*, 2013, 9:e1003799.
- 86 Lee YJ, et al. Multilevel regulation of bacterial gene expression with the combined STAR and antisense RNA system [J]. *Acs Synth Biol*, 2018, 7:853-865.
- 87 Axel A, et al. Regulation of fungal secondary metabolism [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11:21-32.
- 88 Bibb MJ, et al. Sigma BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182:4606-4616.
- 89 Nestor Z, et al. TTA Lynx: a web-based service for analysis of actinomycete genes containing rare TTA codon [J]. *Bioinf*, 2009, 25:2432-2433.
- 90 Makitrynsky R, et al. Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37:559-566.
- 91 Wang XJ, et al. Role of nsdA in negative regulation of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces bingchengensis* [J]. *J Antibiot*, 2009, 62:309-313.
- 92 Kitani S, et al. Identification of genes involved in the butyro-

- lactone autoregulator cascade that modulates secondary metabolism in *Streptomyces lavendulae* FRI-5 [J]. *Gene*, 2008, 425:9-16.
- 93 Yepes A, et al. Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* [J]. *PLoS One*, 2011, 6:e19980.
- 94 Hsiao NH, et al. Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system [J]. *Chem Biol*, 2009, 16:951-960.
- 95 Wang J, et al. AdpAsd, a positive regulator for morphological development and toyocamycin biosynthesis in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 [J]. *Curr Microbiol*, 2018, 75:1345-1351.
- 96 Chan G, et al. Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces* [J]. *mBio*, 2012, 3:e00407-12.
- 97 Xu N, et al. Genome-scale biological models for industrial microbial systems [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102:3439-3451.
- 98 Palazzotto E, et al. Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45:109-116.
- 99 Okada BK, et al. Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41:19-33.
- 100 Rakhmawatie MD, et al. Identification of antimycobacterial from actinobacteria (INACC A758) secondary metabolites using metabolomics data [J]. *Sains Malays*, 2022, 51:1465-1473.
-
- (上接第 1441 页)
- 69 Fu GY, et al. Determination of 7 components in Muxiang Binglang Pills by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2021, 29:263-266.
- 70 Luo HM, et al. Study on quality atandard for oral Simotang Liquid [J]. *Chin Pharm Affairs* (中国药事), 2014, 28:268-273.
- 71 He XY. Study on the change rule of material base and biological effects during the process of fried betel nut [D]. Chengdu: Chengdu University of Chinese Medicine (成都中医药大学), 2014.
- 72 Liu EZ. Effects of areca nut water extract and arecoline on serum metabolites and intestinal flora in mice [D]. Changsha: Hunan Agricultural University (湖南农业大学), 2020.
- 73 Wang H. Metabolism of chemical components in betel nut water extract and simotang oral liquid [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), 2018.