

一株诺西肽产生菌的发掘及发酵条件优化

孙启航[#], 徐允聪[#], 吴玲锐, 容佳乐, 王彦文, 曹玉丹, 罗晨, 吴旭日^{*}

(中国药科大学生命科学与技术学院生物化学教研室, 南京 211198)

摘要 诺西肽是一种典型的硫肽类抗菌化合物, 对多种革兰氏阳性耐药菌具有良好的抗菌活性。尽管水溶性低、体内活性差和结构类似物多等限制了诺西肽的临床应用, 但糖基化类似物有望成为解决诺西肽成药难题的方式之一。基于诺西肽的生物合成基因簇信息, 利用基因组数据挖掘方法定位了 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 菌株, 该菌基因组中存在一个由诺西肽合成模块和糖基化模块组成的全新基因簇。但是, 在尝试单菌多次级代谢产物策略 (OSMAC) 和引入调控蛋白 NocP 等方法后, *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 仍无法生物合成糖基化诺西肽, 仅能产生结构类似物较少的诺西肽。在此基础上, 针对诺西肽的生物合成, 采用响应面法优化了 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 的发酵条件, 使诺西肽合成效率提高了近 6 倍, 达到 58.73 mg/L, 且极少产生结构类似物。本研究通过基因组挖掘和发酵条件优化, 发现了一株适合工业化生产高质量诺西肽的候选菌株, 为诺西肽结构类似物的研究提供了基础。

关键词 诺西肽; 基因组挖掘; 发酵; 生物合成基因簇; 糖基转移酶

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)06-0725-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220612

引用本文 孙启航, 徐允聪, 吴玲锐, 等. 一株诺西肽产生菌的发掘及发酵条件优化[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(6): 725–733.

Cite this article as: SUN Qihang, XU Yuncong, WU Lingrui, et al. Discovery of a new nosiheptide-producing strain and its fermentation optimization for nosiheptide production[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(6): 725–733.

Discovery of a new nosiheptide-producing strain and its fermentation optimization for nosiheptide production

SUN Qihang[#], XU Yuncong[#], WU Lingrui, RONG Jiale, WANG Yanwen, CAO Yudan, LUO Chen, WU Xuri^{*}

Department of Biochemistry, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Nosiheptide is a typical thiopeptide antibiotic displaying potent activity toward various drug-resistant strains of Gram-positive pathogens. Although nosiheptide lacks *in vivo* activity, and good water-solubility with a series of uncontrollable analogues, which may limit its clinical application, glycosylated analogues may overcome problem of low activity and may improve its druggability. In search of novel glycosylated nosiheptide producers, we applied a genome mining strategy that identified *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 that contains all genes required. However, despite the presence of a predicted glycosyltransferase, glycosylated derivatives of nosiheptide were not detected, after following one strain many compounds (OSMAC) strategy and heterologous expression of a regulatory protein NocP. Nevertheless, nosiheptide produced by this strain was remarkably pure, and further experiments were conducted to improve its production by optimization of the culture medium. Under optimal conditions, 58.73 mg/L nosiheptide was produced, representing an almost 6-fold improvement compared to the original fermentation medium. Therefore, we consider *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 a suitable potential candidate for industrial production of nosiheptide, which provides the basis for solving the problem of nosiheptide structural analogues.

Key words nosiheptide; genome mining; fermentation; biosynthetic gene cluster; glycosyltransferase

收稿日期 2022-06-17 * 通信作者 Tel: 025-86185920 E-mail: xuriwu@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81973214)

[#]孙启航和徐允聪为共同第一作者

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973214)

SUN Qihang and XU Yuncong contributed equally to this work

抗生素是对抗病原微生物感染的重要武器,为公共健康事业做出了巨大贡献^[1-3]。然而,抗生素的滥用使得细菌耐药性传播速度迅速增长^[4-5]。因此,寻找具有新骨架、新机制的化合物迫在眉睫。

诺西肽是一种核糖体翻译后修饰肽^[6],对革兰氏阳性病原体的各种耐药株,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌具有极强的抗菌活性^[7-8],由于其抗菌机制新颖受到广泛的关注^[9]。但是,因为缺乏体内活性,诺西肽的成药研究一直受到阻碍^[10]。然而,同样属于硫肽类抗生素的诺卡沙星 I 则具有较好的体内活性^[11],其活

性主要归功于结构中的特殊糖基——二甲氨基葡萄糖,该糖基的存在一定程度上增加了溶解度,有助于药物在体内的分布,从而具有较好的体内活性。然而,诺卡沙星 I 的结构稳定性差的缺陷限制了其成药开发^[12],尽管对诺卡沙星 I 的结构进行了各种修饰^[13-15],但由于诺卡沙星 I 的复杂结构和有限的修饰位点,其成药性差这一难题仍未解决。在比较了诺西肽与诺卡沙星 I 的结构后(图 1),诺西肽由于丰富的可修饰位点及良好的结构稳定性使其成为了发现具有体内活性的新类似物的合适模型。

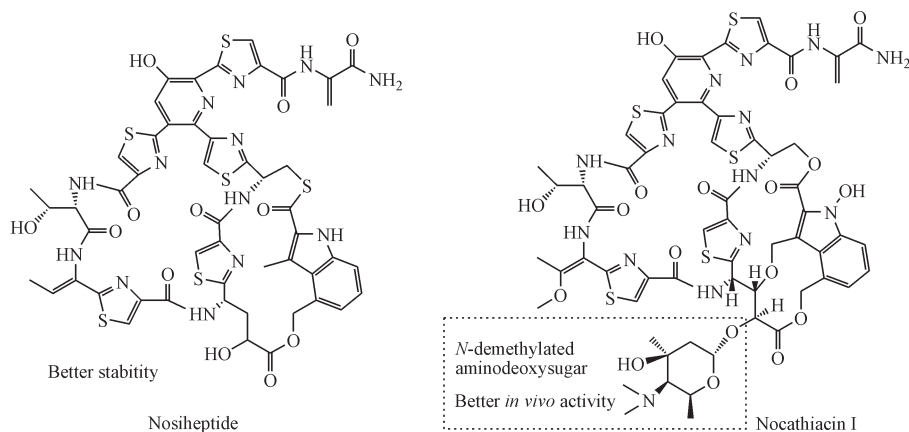


Figure 1 Structural comparison of nosiheptide and nocathiacin I

随着基因组测序技术的快速发展,以及公共数据库中可用基因组数据的增加,生物合成基因簇的挖掘成为了获得新天然产物的常用手段^[16-17]。本研究从诺西肽的生物合成基因簇出发,对可能的诺西肽衍生物生物合成基因簇进行搜索,以获得具有更好抗菌活性和理化性质的衍生物。

1 材料

1.1 试剂

乙腈(色谱纯,安徽天地高纯溶剂有限公司);甲酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);甲醇(分析纯,苏州亚盛药业有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

LC-MS(日本岛津公司);凝胶成像仪(上海天能生命科学有限公司);ODS 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本 YMC 公司);高速离心机(美国赛默飞世尔公司);Bruker Avance 500MHz 核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司);制备液相(美国 Waters 公司)。

1.3 菌株

Actinoalloteichus sp. AHMU CJ021 购自中国普通微生物菌种保藏中心。

2 方法

2.1 基因组数据挖掘诺西肽衍生物的生物合成基因簇

将 *S. actuosus* ATCC 25421 诺西肽生物合成基

因簇中 15 个核心生物合成基因^[18]用作探针在 NCBI 数据库进行比对,含有 13 个或以上相似基因且包含编码诺西肽前体肽的关键基因 *nosM*^[19] 的生物合成基因簇被用于进行 antiSMASH 分析^[20] 推测可能的代谢产物。

2.2 菌株的发酵

28 °C 条件下, *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 培养于 ISP2 固体培养基以产生孢子。将孢子悬浮液 50 μL 接种到液体 ISP2 培养基 50 mL 中, 28 °C、220 r/min 下培养 2 d 以产生种子培养物。将种子培养液 1 mL 分别接种于 50 mL 发酵培养基 SM1 (大豆粉 10 g/L、葡萄糖 18 g/L、Na₂SO₄ 1 g/L、CaCO₃ 0.2 g/L)、SM5 (蛋白胨 20 g/L、牛肉浸膏 8 g/L、葡萄糖 15 g/L、甘油 10 g/L、CaCO₃ 0.2 g/L)、SM25 (蛋白胨 10 g/L、麦芽浸膏 21 g/L、甘油 40 g/L)、SM27 (可溶性淀粉 15 g/L、K₂HPO₄ 0.4 g/L、蛋白胨 4 g/L、NaCl 0.4 g/L、牛肉浸膏 1 g/L、MgSO₄ 0.6 g/L、KNO₃ 1 g/L、FeSO₄ 0.01 g/L) 和 SM31 (酵母提取物 9 g/L、蛋白胨 1.8 g/L、葡萄糖 20 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、pH 4.5), 进行单菌多次级代谢产物 (one strain many compounds, OSMAC) 策略分析。

2.3 发酵产物的分离与鉴定

发酵 7 d 后, 加入等体积甲醇, 0.22 μm 有机滤膜过滤后进行 LC-MS 检测。以 10% ~ 90% 的乙腈洗脱 25 min, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 紫外检测波长 190 ~ 330 nm。MS 检测参数为: 负电离模式, 接口温度 295 °C, 保护气 12 L/min, 干燥气体氮气流量 8 L/min, 雾化器压力 206.85 kPa, 喷嘴电压 1.5 kV, 毛细管电压 4 kV, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 2 000。用 Waters 制备液相对目标化合物进行纯化, 制备 30 mg 纯品 (纯度 > 99.7%) 后在核磁共振波谱仪上进行分析。

2.4 转录调控蛋白 NocP 的引入

利用特异性引物从 *Nocardia* sp. ATCC 202099 扩增转录调控蛋白 NocP 的基因 *nocP*, PCR 产物用 *Nde* I 和 *Eco*R V 双酶切并连接到 pSET152E 载体 (pSET152E 为带有红霉素启动子的 pSET152 载体) 上。将重组质粒通过结合转移^[21] 导入 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 中。

2.5 单因素分析确定发酵培养基成分

Actinoalloteichus sp. AHMU CJ021 原发酵培养基成分为 20 g/L 蛋白胨、8 g/L 牛肉浸膏、15 g/L 葡

萄糖、10 g/L 甘油和 0.2 g/L CaCO₃。用单一的碳源、氮源、无机盐和氨基酸替换原发酵培养基成分, 并通过 HPLC 检测诺西肽产量。替换的 6 种碳源为麦芽糖、葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、玉米淀粉和甘油, 质量浓度为 40 g/L。氮源为牛肉浸膏、蛋白胨、酵母提取物、大豆粉、玉米浆和 (NH₄)₂SO₄, 质量浓度为 20 g/L。无机盐为 CaCl₂、FeSO₄、KCl、MgCl₂、MgSO₄ 和 ZnCl₂, 质量浓度为 0.2 g/L。氨基酸为精氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和谷氨酸, 质量浓度为 0.2 g/L。

2.6 Plackett-Burman 实验

对单因素实验中获得的最佳营养成分进行了 12 组 5 因素 2 水平的 Plackett-Burman 实验, 利用 Design Expert 10.0 软件分析实验结果, 确定对诺西肽产量有显著影响的成分, 所有实验重复 3 次。

2.7 中心组合设计响应面法 (CCD) 优化培养基

通过 20 次 3 因素 5 水平的 CCD 实验对 Plackett-Burman 实验得出的对诺西肽产量有显著影响的营养成分进行优化。利用 Design Expert 10.0 软件分析实验结果, 计算各营养成分的最佳浓度, 所有实验重复 3 次。

3 结 果

3.1 诺西肽类似物的生物合成基因簇

经过序列比对发现共有 5 个菌株中含有 13 个及以上的诺西肽核心生物合成基因, 且包含编码诺西肽前体肽的关键基因 *nosM*。同时用 antiSMASH 定位这些菌株中的诺西肽生物合成基因簇并分析其中是否含有糖基转移酶 *NocS1* 的相似蛋白。符合条件的基因簇及其宿主菌见表 1。

结果显示, 仅有 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 基因簇中的 *ctgI-102* 与糖基转移酶 *NocS1* 的氨基酸序列具有 43.3% 的同源性, 且该基因簇包含诺西肽生物合成的 15 个关键生物合成基因 (表 2)。推测该菌株具有产生糖基化诺西肽的潜力, 该糖基化衍生物可能具有与诺卡沙星 I 相似的较好的体内活性。

3.2 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 发酵产物的检测

使用 SM1、SM5、SM25、SM27 和 SM31 发酵培养基对 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 进行发酵, 利用 LC-MS 对发酵产物进行检测。结果见图 2。

Table 1 AntiSMASH analysis of screened strains by genome mining

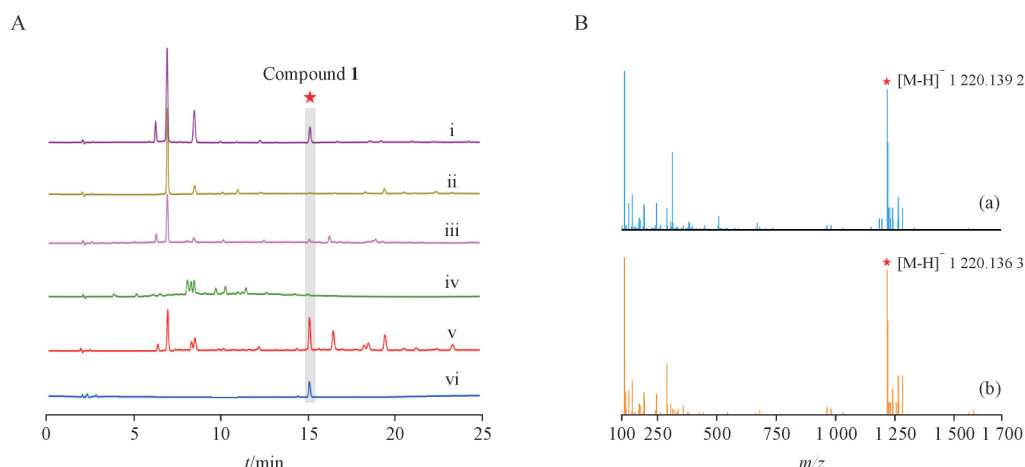
Organism	Accession No.	Predicted product	Similarity/%	Noc S1
<i>Actinoalloteichus</i> sp. AHMU CJ021	CP025990.1	nosiheptide	46	Yes
<i>Streptomyces xantholiticus</i> JCM 4863	NZ_BMW01000001.1	nosiheptide	73	No
<i>Micromonospora</i> sp. MW-13	QKKX00000000.1	nosiheptide	18	No
<i>Streptomyces afghaniensis</i> 772	AOPY00000000.1	nosiheptide	57	No
<i>Actinoplanes xinjiangensis</i>	NZ_BONA01000001.1	nosiheptide	29	No

Table 2 Deduced functions of genes in the predicted glycosylated nosiheptide biosynthetic gene cluster of *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021

Gene	Accession No.	Protein homolog	Identity/%	Proposed function
<i>cgt1-86</i>	AUS77074.1	NosP (ACR48345)	52.3	Pathway specific regulatory protein
<i>cgt1-87</i>	WP_017625644.1	NosA (ACR48330)	39.3	Hypothetical protein
<i>cgt1-88</i>	AUS77075.1	NosO (ACR48344)	72.9	Hypothetical protein
<i>cgt1-89</i>	AUS77076.1	NosN (ACR48343)	78.6	Radical SAM-dependent methyltransferase
<i>cgt1-90</i>	AUS77077.1	NosM (ACR48342)	74.4	Nosiheptide precursor peptide
<i>cgt1-91</i>	AUS77078.1	NosL (ACR48341)	56.7	Radical SAM-dependent protein
<i>cgt1-92</i>	AUS77079.1	NosK (ACR48340)	54.2	Hydrolase/acyltransferase
<i>cgt1-93</i>	AUS77080.1	NosI (ACR48338)	46.5	ATP-dependent synthetase or ligase
<i>cgt1-94</i>	AUS77081.1	NosH (ACR48337)	63.5	Hypothetical protein
<i>cgt1-95</i>	AUS77082.1	NosG (ACR48336)	46.3	Cyclodehydratase
<i>cgt1-96</i>	AUS77083.1	NosF (ACR48335)	53.9	Dehydrogenase
<i>cgt1-97</i>	AUS77084.1	NosE (ACR48334)	51.0	Dehydratase
<i>cgt1-98</i>	AUS77085.1	NosD (ACR48333)	64.0	Dehydratase
<i>cgt1-99</i>	AUS77086.1	NosC (ACR48332)	38.4	Cytochrome P450 protein
<i>cgt1-100</i>	AUS77088.1	NosB (ACR48331)	57.6	Cytochrome P450 protein
<i>cgt1-101</i>	WP_026420167	PNPOx (WP_026420167)	84.1	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase
<i>cgt1-102</i>	AUS77090.1	NocS1 (ADR01066)	43.3	Glycosyltransferase

结果表明5种培养基的提取物在15.1 min时都产生了与诺西肽标准品相对应的峰(化合物**1**)以及分子离子峰 m/z 1 220. 139 2 ($[M-H]^-$)。该产物在

SM5 发酵培养基中产率最高,达到了8.23 mg/L。核磁共振分析表明,化合物**1**与诺西肽具有一致的结构^[22],为同一物质,证明 *Actinoalloteichus* sp.

**Figure 2** OSMAC strategy for the fermentation of *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021

A: LC-MS chromatograms (UV detector) of the fermentation products from the different medium (i: SM27 ii: SM31, iii: SM25, iv: SM1, v: SM5 medium, and vi: nosiheptide standard); B: Mass spectra. a: compound **1**; b: nosiheptide standard

AHMU CJ021 为一株诺西肽产生菌。然而,尽管存在糖基转移酶基因 *ctg1-102*,却并没有在发酵产物中检测到糖基化诺西肽。通过 RT-PCR 对 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 诺西肽生物合成基因簇中各基因的转录分析发现,所有与诺西肽生物合成有关的基因,包括存在其簇内的糖基转移酶基因 *ctg1-102* 均能正常转录,从而排除了因糖基转移酶基因沉默导致的糖基化诺西肽缺失。

3.3 转录调控蛋白 NocP 的调控效应

nosP 在 *S. actuosus* ATCC 25421 的诺西肽生物合成基因簇中编码 SARP 家族转录调节因子 NosP,可激活簇内各基因的转录^[23-24]。在诺卡沙星 I 的生物合成基因簇中, *NocP* 作为 NosP 的同源物,发挥同样的转录激活功能^[25]。因此推测存在于 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 诺西肽生物合成基因簇中的糖基转移酶基因 *ctg1-102* 可能无法被

NosP 有效激活,但由于 *ctg1-102* 与 *nocS1* 较高的相似性, *ctg1-102* 的激活可能受到 NocP 调控。因此,将 NocP 在 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 中异源表达可能会激活糖基化诺西肽的产生。然而,通过穿梭载体 pSET152E 将 *nocP* 导至 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 异源表达后仍未产生糖基化诺西肽(图 3-A)。

尽管预期的糖基化诺西肽没有产生,但是在比较 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 与 *S. actuosus* ATCC 25421 的诺西肽生产情况时发现, *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 发酵得到的诺西肽具有更高的纯度(图 3-B),其发酵过程中产生的副产物,一种末端脱氢丙氨酸缺失的诺西肽类似物^[26],含量仅为 2.8%(保留时间 14.3 min),远低于 *S. actuosus* ATCC 25421 (28.63%)。因此该菌株可作为生产高纯度诺西肽的生产菌株。

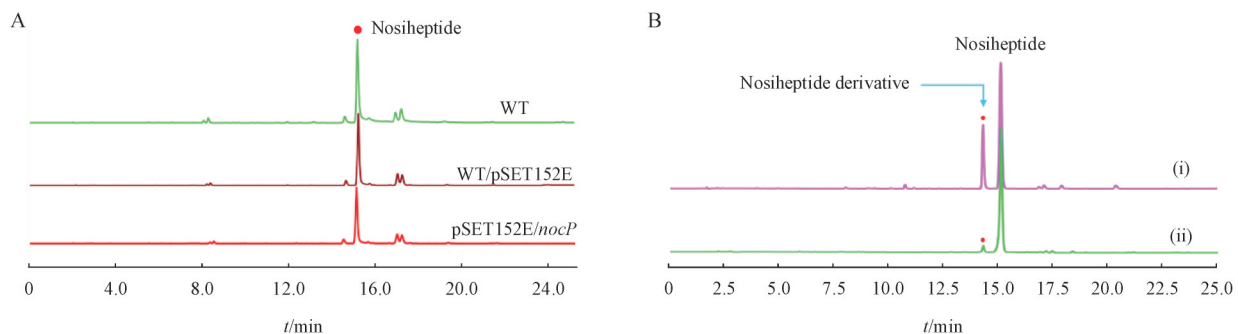


Figure 3 Effects of NocP on fermentation extractive of *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 and *S. actuosus* ATCC 25421

A: HPLC analysis of fermentation produces from different recombinant strains (WT: *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 wild type strain, WT/pSET152E: Control strains by integrating empty pSET152E vector into the chromosome of WT, pSET152E/*nocP*: Recombinant strain by integrating pSET152E-*nocP* into the WT); B: HPLC analysis of fermentation extracts (i: *S. actuosus* ATCC 25421, ii: *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021)

3.4 发酵培养基成分的单因素分析

不同的营养成分对代谢产物的产生具有较大影响^[27-28]。本研究采用单因素法研究了不同碳源、氮源、无机盐、氨基酸对 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 诺西肽产量的影响。图 4 表明,4 类营养因素中适合诺西肽发酵的成分为葡萄糖、酵母提取物、牛肉膏、酪氨酸及 KCl。

3.5 基于 Plackett-Burman 实验和响应面法的诺西肽发酵培养基优化

Plackett-Burman 实验^[11,29]被用于确定对诺西肽产量有显著影响的营养成分。在对单因素分析筛选出的营养成分进行了 12 组 5 因素 2 水平的 Plackett-Burman 实验。结果显示,诺西肽的最低产

量和最高产量分别为 3.26 和 59.57 mg/L(表 3)。且葡萄糖($P < 0.01$)、牛肉浸膏($P < 0.05$)和酵母提取物($P < 0.05$)对诺西肽的产量有显著影响。

通过 CCD 对 PB 实验中得出的 3 种营养成分进行了 3 因素 5 水平的 20 组实验^[30-31],结果如表 4。

拟合的二阶回归方程为:

$$Y = 55.579 - 4.701 \times A + 5.771 \times B - 0.236 \times C - 0.15 \times AB + 0.275 \times AC - 1.85 \times BC - 12.938 \times A^2 - 10.181 \times B^2 - 15.431 \times C^2$$

其中, Y 表示诺西肽的产量(mg/L), A 、 B 和 C 分别表示葡萄糖、牛肉浸膏和酵母提取物的质量浓度(g/L)。

采用 ANOVA 评价 CCD 产生的模型的合理

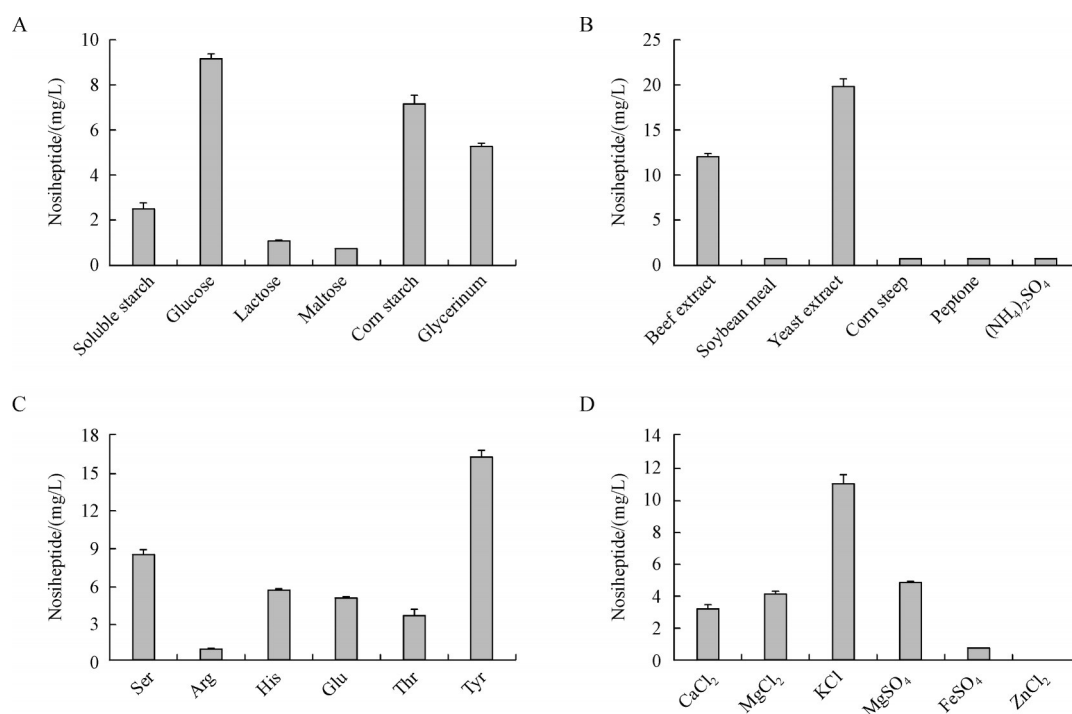


Figure 4 Effects of nutritional factors on the production of nosiheptide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Effects of carbon sources; B: Effects of nitrogen sources; C: Effects of amino acids; D: Effects of inorganic salts

Table 3 Effects of variables on nosiheptide production using P-B design

Run	Variables					Nosiheptide/(mg/L)
	Glucose/(g/L)	Yeast extract/(g/L)	Beef extract/(g/L)	KCl/(g/L)	Tyr/(g/L)	
1	20	20	10	2	0.2	51.90
2	40	20	10	2	0.2	16.25
3	40	20	10	1	0.1	26.72
4	40	10	20	2	0.1	30.39
5	20	10	10	1	0.1	29.49
6	20	20	20	1	0.2	59.57
7	20	10	20	1	0.2	43.97
8	40	10	20	2	0.2	23.14
9	40	10	10	1	0.2	3.26
10	20	10	10	2	0.1	25.93
11	20	20	20	2	0.1	52.46
12	40	20	20	1	0.1	23.55

性, R^2 为 0.99 表明该模型的结果可信度为 99%。其他相关参数例如 $\text{Pred } R^2$ (0.98)、 $\text{Adj } R^2$ (0.94) 和 Adeq 精度 (27.34 > 4) 均表明二阶回归方程及其应用模型的合理性。同时, F 检验计算出该模型的 $P < 0.001$, 表明该模型在统计分析中具有显著性。为了验证各变量统计学意义, 对葡萄糖(A)、牛肉浸膏(B)以及酵母提取物(C)进行 F 检验。如

图5所示, 葡萄糖和牛肉浸膏具有极显著的线性和平方效应 ($P < 0.001$)。酵母提取物的平方效应 C^2 ($P < 0.001$) 具有显著性, 而交互组 AB、AC、BC 的显著性不明显, 在二阶回归方程中可以忽略。因此, 葡萄糖、牛肉浸膏和酵母提取物是影响诺西肽产生的重要因素, 对于 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 诺西肽的产生有重要影响。

Table 4 Experimental design and results of central composite design

Run	Glucose/(g/L)	Beef extract/(g/L)	Yeast extract/(g/L)	Nosiheptide/(mg/L)	
				Observed	Predicated
1	20	15	25	20.13	17.15
2	30	20	20	55.94	55.58
3	40	15	15	7.31	4.82
4	30	20	20	58.12	55.58
5	20	25	25	25.38	25.29
6	30	20	20	51.89	55.58
7	20	15	15	14.72	14.47
8	40	25	15	19.35	19.76
9	40	15	25	9.17	8.60
10	30	20	6.3	11.01	12.33
11	30	20	20	56.67	55.58
12	30	20	20	55.03	55.58
13	30	20	33.6	9.22	11.54
14	30	20	20	56.51	55.58
15	40	25	25	18.48	16.14
16	9.6	20	20	9.27	11.08
17	50.4	6.3	20	14.59	17.08
18	20	25	15	32.04	30.01
19	9.6	20	20	24.98	26.89
20	30	33.6	20	35.25	36.49

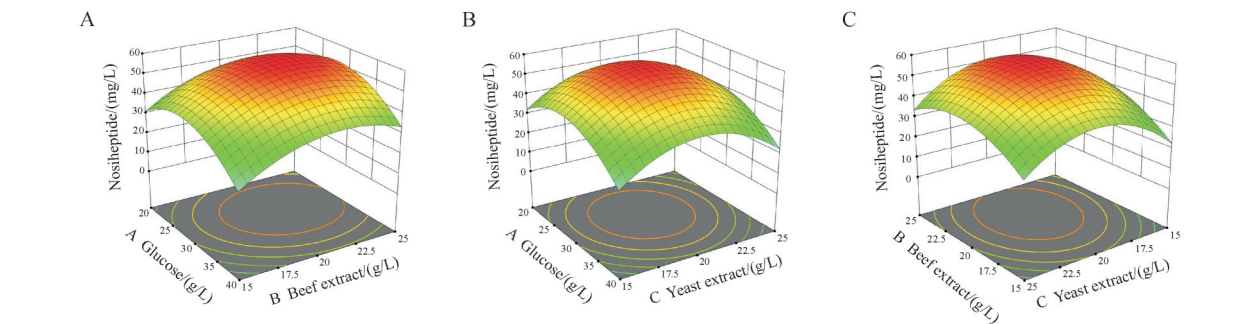


Figure 5 Response surface plots for optimized nosiheptide production
A: Glucose and beef extract and their interactive effects; B: Glucose and yeast extract and their interactive effects; C: Effects of beef extract and yeast extract and their interactive effects

3.6 诺西肽最优发酵培养基的验证

通过回归方程计算出诺西肽理论最高产量为 56.84 mg/L,对应的葡萄糖质量浓度为 28.16 g/L,牛肉浸膏质量浓度为 21.43 g/L,酵母提取物质量浓度为 19.87 g/L。用该培养基进行发酵后,得到的诺西肽为 58.73 mg/L,副产物含量仅 0.96%,与理论值相近,比原始发酵培养基 SM5 的产量提高了约 6 倍。

4 讨论

尽管异源表达调控蛋白 NocP,通过基因组数据挖掘定位的 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 仍未产生预期的糖基化诺西肽。在排除基因沉默的情况下,可能负责糖基模块生物合成的基因与该基因簇的调控系统不兼容,因此异源表达不起作用。然而,本研究发现该菌株所产生的诺西肽在纯度方面优于诺西肽产生菌 *S. actuosus* ATCC

25421。通过响应面法优化发酵条件后,产量提高了约6倍。在细菌耐药性传播如此严重的时代,这为研究诺西肽类似物以解决其水溶性和体内活性较差的问题奠定了研究基础。

5 结 论

虽然预期的糖基化衍生物无法获得,但是由于 *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 发酵生产诺西肽的副产物含量远低于常用的诺西肽生产菌株 *S. actuosus* ATCC 25421。通过响应面法优化后,诺西肽产量达 58.73 mg/L,副产物含量仅 0.96%,本研究认为该菌可以作为工业化生产高纯度诺西肽的合适候选菌株。

References

- [1] Pasquina-Lemonche L, Burns J, Turner RD, *et al.* The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall[J]. *Nature*, 2020, **582**(7811):294-297.
- [2] Culp EJ, Waglechner N, Wang WL, *et al.* Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling[J]. *Nature*, 2020, **578**(7796):582-587.
- [3] Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2019, **51**:72-80.
- [4] Furusawa C, Horinouchi T, Maeda T. Toward prediction and control of antibiotic-resistance evolution[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, **54**:45-49.
- [5] Isenman H, Fisher D. Advances in prevention and treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus* infection [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2016, **29**(6):577-582.
- [6] Hudson GA, Mitchell DA. RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, **45**:61-69.
- [7] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(1):42-51.
- [8] Crofts TS, Gasparini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, **15**(7):422-434.
- [9] Harms JM, Wilson DN, Schlunzen F, *et al.* Translational regulation via L11: molecular switches on the ribosome turned on and off by thiostrepton and micrococin[J]. *Mol Cell*, 2008, **30**(1):26-38.
- [10] Wang B, LaMattina JW, Badding ED, *et al.* Using peptide mimics to study the biosynthesis of the side-ring system of nosiheptide[J]. *Methods Enzymol*, 2018, **606**:241-268.
- [11] Yang MY, Zhang JW, Wu XR, *et al.* Optimization of critical medium components for enhancing antibacterial thiopeptide nocaithacin I production with significantly improved quality [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, **15**(4):292-300.
- [12] Li WY, Huang S, Liu XH, *et al.* N-demethylation of nocaithacin I via photo-oxidation[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(14):4051-4053.
- [13] Feng K, Wang SZ, Ma HR, *et al.* Chirality plays critical roles in enhancing the aqueous solubility of nocaithacin I by block copolymer micelles [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, **65**(1):64-71.
- [14] Xu LB, Farthing AK, Dropinski JF, *et al.* Synthesis and antibacterial activity of novel water-soluble nocaithacin analogs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, **23**(1):366-369.
- [15] Xu LB, Farthing AK, Dropinski JF, *et al.* Nocaithacin analogs: synthesis and antibacterial activity of novel water-soluble amides[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**(13):3531-3535.
- [16] Ziemert N, Alanjary M, Weber T. The evolution of genome mining in microbes—a review [J]. *Nat Prod Rep*, 2016, **33**(8):988-1005.
- [17] Russell AH, Truman AW. Genome mining strategies for ribosomally synthesised and post-translationally modified peptides [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, **18**:1838-1851.
- [18] Yu Y, Duan L, Zhang Q, *et al.* Nosiheptide biosynthesis featuring a unique indole side ring formation on the characteristic thiopeptide framework [J]. *ACS Chem Biol*, 2009, **4**(10):855-864.
- [19] Liao RJ, Duan L, Lei C, *et al.* Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications [J]. *Chem Biol*, 2009, **16**(2):141-147.
- [20] Blin K, Shaw S, Steinke K, *et al.* antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, **47**(W1):W81-W87.
- [21] Lin QH, Zhang GT, Li SM, *et al.* Development of a genetic modification system for caeruleomycin producer *Actinoalloteichus* sp. WH₁-2216-6[J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2011, **51**(8):1032-1041.
- [22] Mocek U, Chen LC, Keller PJ, *et al.* ¹H and ¹³C NMR assignments of the thiopeptide antibiotic nosiheptide [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1989, **42**(11):1643-1648.
- [23] Arias P, Fernández-Moreno MA, Malpartida F. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein [J]. *J Bacteriol*, 1999, **181**(22):6958-6968.
- [24] Li JJ, Li Y, Niu GQ, *et al.* NosP-regulated nosiheptide production responds to both peptidyl and small-molecule ligands derived from the precursor peptide [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, **25**(2):143-153.e4.
- [25] Ding Y, Yu Y, Pan HX, *et al.* Moving posttranslational modifications forward to biosynthesize the glycosylated thiopeptide

- nocathiacin I in *Nocardia* sp. ATCC202099 [J]. *Mol Biosyst*, 2010, **6**(7):1180-1185.
- [26] de Vries RH, Viel JH, Oudshoorn R, *et al.* Selective modification of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) through Diels-alder cycloadditions on dehydroalanine residues[J]. *Chemistry*, 2019, **25**(55):12698-12702.
- [27] Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **23**(6):456-475.
- [28] Schwientek P, Wendler S, Neshat A, *et al.* Comparative RNA-sequencing of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110 cultivated in different growth media[J]. *J Biotechnol*, 2013, **167**(2):166-177.
- [29] Maulvi FA, Parmar RJ, Shukla MR, *et al.* Plackett-Burman design for screening of critical variables and their effects on the optical transparency and swelling of gatifloxacin-Pluronic-loaded contact lens[J]. *Int J Pharm*, 2019, **566**:513-519.
- [30] Silva CL, Perestrelo R, Silva P, *et al.* Implementing a central composite design for the optimization of solid phase microextraction to establish the urinary volatome expression: a first approach for breast cancer[J]. *Metabolomics*, 2019, **15**(4):64.
- [31] Pan ZH, Jiao RH, Lu YH, *et al.* Enhancement of dalesconols A and B production via upregulation of laccase activity by medium optimization and inducer supplementation in submerged fermentation of *Daldinia eschscholzii* [J]. *Bioresour Technol*, 2015, **192**:346-353.



中国药科大学学报

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!