

## 研究报告



## 红树林链霉菌 ZFSM1-146 中抗菌活性物质的发现

向晨晨<sup>1</sup> 周珊珊<sup>1</sup> 柴树茂<sup>1</sup> 曹明明<sup>1</sup> 王立岩<sup>\*2</sup> 冯治洋<sup>\*1</sup>

1 南京农业大学食品科技学院 江苏 南京 210095

2 深圳大学生命与海洋科学学院 广东 深圳 518060

**摘要:**【背景】红树林来源的放线菌蕴含着丰富的次级代谢产物资源,是挖掘小分子药物的重要来源。【目的】对红树林放线菌天然产物进行研究,分离和鉴定其中的抗菌活性化合物。【方法】采用稀释涂布平板法分离纯化红树林土壤中的放线菌,通过琼脂块法初筛和滤纸片法复筛获得具有抗菌活性的放线菌;基于 16S rRNA 基因序列分析和系统发育树构建确定目标放线菌种类;通过高效液相色谱法对目标放线菌的发酵产物进行分析,采用硅胶柱层析和高效液相色谱分离技术结合的活性追踪法纯化抗菌活性物质;经高分辨电喷雾电离质谱和核磁共振波谱技术鉴定抗菌活性物质的结构。

【结果】从红树林土壤中筛选到一株抗菌活性较强的放线菌 ZFSM1-146, 16S rRNA 基因序列及其基因片段构建的系统发育树分析初步确定其为抗生链霉菌(*Streptomyces antibioticus*);菌株 ZFSM1-146 可产生抗菌活性化合物 1-3, 化合物 1-3 经结构鉴定分别为放线菌素 X<sub>0β</sub>、X<sub>2</sub> 和 D。经培养基初步优化,抗菌活性最强的放线菌素 X<sub>2</sub> 的产量约达到原来的 2 倍。【结论】从红树林土壤中筛选出一株可产生抗菌活性物质的抗生链霉菌 ZFSM1-146,并鉴定出 3 个抗菌活性成分均为放线菌素类化合物,为后续进行放线菌素的产量优化和通过分子遗传手段进行结构改造提供了宝贵的菌种资源。

关键词: 红树林, 抗生链霉菌, 抗菌活性物质, 放线菌素

## Discovery of antibacterial compounds from a mangrove

*Streptomyces* strain ZFSM1-146XIANG Chenchen<sup>1</sup> ZHOU Shanshan<sup>1</sup> CHAI Shumao<sup>1</sup> CAO Mingming<sup>1</sup>WANG Liyan<sup>\*2</sup> FENG Zhiyang<sup>\*1</sup>

1 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

2 College of Life Science and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

**Abstract:** [Background] Secondary metabolites from mangrove actinomycetes are an important source for the discovery of small molecule drugs. [Objective] To isolate and identify the antibacterial secondary metabolites from mangrove actinomycetes. [Methods] The mangrove actinomycete strains were separated

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31770049); Shenzhen Science and Technology Project (JCYJ20180305123659726)

**\*Corresponding authors:** WANG Liyan: E-mail: lwang@szu.edu.cn

FENG Zhiyang: Tel: 86-25-84399511; E-mail: zfeng@njau.edu.cn

**Received:** 28-12-2020; **Accepted:** 06-03-2021; **Published online:** 01-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31770049); 深圳市科技计划(JCYJ20180305123659726)

**\*通信作者:** 王立岩: E-mail: lwang@szu.edu.cn

冯治洋: Tel: 025-84399511; E-mail: zfeng@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-12-28; 接受日期: 2021-03-06; 网络首发日期: 2021-04-01

and purified using dilution plate method, and antibacterial activity of the strains were assayed by agar block and filter disk methods. The 16S rRNA gene sequence of an actinomycete strain was used for species analysis and construction of the phylogenetic tree. The fermentation broth of the actinomycete strain was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), and the antibacterial compounds were purified by silica gel column chromatography and HPLC combining with activity-tracking method. The structures of the antibacterial compounds were elucidated by high resolution electrospray ionization mass spectroscopy (HR-ESI-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). **[Results]** An actinomycetes strain ZFSM1-146 with strong antibacterial activity was obtained from mangrove soil. Species and phylogenetic tree analysis showed that the strain belongs to *Streptomyces antibioticus*. Strain ZFSM1-146 could produce antibacterial compounds 1–3, which were identified as actinomycin X<sub>0β</sub>, X<sub>2</sub> and D, respectively. After preliminary medium optimization, the yield of actinomycin X<sub>2</sub>, which showed the strongest antibacterial activity among the 3 compounds, was almost twice as the original yield. **[Conclusion]** *S. antibioticus* ZFSM1-146 was obtained from mangrove soil and could produce antibacterial compound actinomycins. This study provided a valuable strain for improving the yield of actinomycins as well as producing new analogs through genetic manipulation.

**Keywords:** mangrove, *Streptomyces antibioticus*, antibacterial compounds, actinomycins

微生物来源的天然产物及其衍生物是药物研发的重要来源<sup>[1]</sup>, 已广泛应用于治疗癌症、细菌和病毒感染以及免疫抑制等疾病<sup>[2]</sup>。然而, 从普通陆地环境微生物中挖掘结构新颖、活性独特的次级代谢产物越来越困难, 研究者们把目光投向了特殊环境, 如红树林<sup>[3-4]</sup>、海洋<sup>[5]</sup>、极地<sup>[6]</sup>、沙漠<sup>[7]</sup>、热泉<sup>[8]</sup>等。

红树林是一种生长在热带和亚热带海岸潮间带、受周期性潮水浸没的独特植物群落, 具有耐缺氧、高水分、高盐等特征, 是蕴含丰富微生物资源的特殊生态系统<sup>[9]</sup>。放线菌是天然产物的重要来源之一<sup>[10]</sup>。截至目前, 从微生物中获得的生物活性化合物中, 45%是由放线菌产生的<sup>[11]</sup>。在极端环境中生长的微生物是特殊代谢产物的重要来源<sup>[12]</sup>。放线菌一般适宜干燥、偏碱性的环境, 而红树林土壤中的放线菌长期生存于湿润、强酸性、高盐的环境, 必然有其独特的分子适应机制, 具备形成结构新颖的次级代谢产物的潜能。因此, 红树林土壤是筛选和发现放线菌新物种及生物活性次级代谢产物的宝贵资源。

本研究从红树林土壤中筛选出一株抗菌活性较强的放线菌, 通过 16S rRNA 基因序列及其基因片段构建的系统发育树分析, 确定其与已知菌种

的亲缘关系。通过活性追踪法, 确定发酵粗提物中的抗菌活性物质; 并通过质谱和核磁共振波谱手段, 鉴定出抗菌活性物质的结构。本研究中抗菌活性物质生产菌的发现, 为后续相关抗菌化合物的生产提供了可能的菌种资源, 为后续相关化合物类似药的开发提供了物质基础, 同时表明了红树林土壤放线菌资源丰富, 具有挖掘新型天然产物的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 红树林土壤样品

红树林土壤样品采集自广东省深圳市红树林自然保护区(22°31'21"N, 114°1'54"E)。

#### 1.1.2 供试菌

*Bacillus subtilis* 168、*Staphylococcus aureus* ATCC 25923、*Escherichia coli* ATCC 25922 均由本实验室保存; Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 由南京农业大学食品生物技术与酶工程研究室惠赠。

#### 1.1.3 培养基

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20.00 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.50 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, MgSO<sub>4</sub> 0.50 g, KNO<sub>3</sub> 1.00 g, NaCl 0.50 g, 琼脂 20.00 g, 蒸馏水

定容至 1 L, pH 7.3。用于放线菌的筛选。

R5 培养基: 蔗糖 103.00 g,  $K_2SO_4$  0.25 g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  10.12 g, 葡萄糖 10.00 g, 酪蛋白氨基酸 0.10 g, 微量元素溶液 2 mL (400  $\mu$ L/L 母液), 酵母粉 5.00 g, TES Buffer 5.73 g, 蒸馏水定容至 1 L。灭菌后添加  $KH_2PO_4$  (0.5%) 10 mL,  $CaCl_2$  (5 mol/L) 4 mL, L-Proline (20%) 15 mL, NaOH (1 mol/L) 7 mL。用于放线菌种子培养及发酵。

ISP4 培养基: 可溶性淀粉 10.0 g,  $K_2HPO_4$  1.0 g,  $MgSO_4$  1.0 g, NaCl 1.0 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.0 g,  $CaCO_3$  2.0 g, 现配现用:  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/30 mL (54.9  $\mu$ L),  $MnCl_2$  1.0 g/50 mL (196.25  $\mu$ L),  $ZnSO_4$  1.0 g/50 mL (222.5  $\mu$ L), 蒸馏水定容至 1 L。用于放线菌种子培养及发酵。

LB 培养基: NaCl 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 蒸馏水定容至 1 L。用于供试菌的培养。

MH 肉汤培养基: 称取 21.0 g MH 肉汤培养基粉末于 1 L 水中溶解。用于测定化合物 MIC 值。

TSB 培养基: 称取 30.0 g TSB 培养基粉末于 1 L 水中溶解。用于培养放线菌以提取基因组 DNA。

M I 培养基: 酵母粉 20.0 g,  $KH_2PO_4$  1.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 8.0。

M II 培养基: 大豆粉 20.0 g,  $KH_2PO_4$  1.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 8.0。

M III 培养基: 可溶性淀粉 22.5 g, 酵母粉 5.0 g,  $KH_2PO_4$  1.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 8.0。

M IV 培养基: 葡萄糖 22.5 g, 酵母粉 5.0 g,  $KH_2PO_4$  1.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 8.0。

M I-M IV 培养基用于放线菌素产量优化。

所有培养基均  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

分析纯甲醇、分析纯乙酸乙酯、分析纯二氯甲烷等有机试剂, 上海凌峰化学试剂有限公司; 色谱级甲醇, TEDIA 公司。

细菌 DNA 提取试剂盒, 礼美生物科技(上海)有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 北京擎科新业生物技术有限公司。

恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器有限公司; 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 岛津公司; 超净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 恒温培养箱, 上海申安医疗器械有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 红树林土壤放线菌的分离

采用稀释涂布平板法: 称取 5 g 土样于 45 mL 无菌水中溶解, 28 °C、225 r/min 摇床振荡 45 min, 即终浓度为  $10^{-1}$  g/mL; 吸取 0.5 mL 土壤悬液至 4.5 mL 无菌水中, 连续进行 10 倍比梯度稀释, 使其终浓度为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  g/mL, 各取 0.2 mL 分别涂布于高氏一号培养基平板上, 置恒温培养箱 28 °C 培养 7 d, 每个稀释度做 3 个重复。挑出放线菌后于高氏一号培养基纯化培养 3 次(所有高氏一号培养基内均含有终浓度 50 mg/L 重铬酸钾), 最后再挑取单菌落涂布于高氏一号培养基, 7 d 后收孢子。

### 1.2.2 活性放线菌初筛及复筛

参照张孟<sup>[13]</sup>的初筛方法, 将测试菌株分别划线于 R5 和 ISP4 固体培养基上, 28 °C 培养 7 d, 在平板上铺一层含 1% 琼脂且含指示菌(*B. subtilis* 168 和 *S. aureus* ATCC 25923)的 LB 培养基, 12 h 后观察抑菌圈。将 40  $\mu$ L 菌株孢子接种到含 40 mL R5 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 28 °C、225 r/min 培养 3 d, 按 10% 的量分别转接至 50 mL R5 和 ISP4 (含 5% 树脂)液体培养基, 于 28 °C、225 r/min 培养, 每个编号做 3 个重复。7 d 后, 将 R5 培养基发酵液按 1:1 (体积比)加入乙酸乙酯萃取, 上层经旋转蒸发仪减压蒸干, 溶于 800  $\mu$ L 甲醇, 得到 R5 粗提物; 12 d 后, 收集 ISP4 液体培养基发酵液中的树脂, 洗后晾干, 用 4 mL 甲醇浸泡萃取, 上清经旋转蒸发仪减压蒸干后溶于 800  $\mu$ L 甲醇, 得到

ISP4 粗提物; 根据滤纸片法<sup>[14]</sup>, 分别吸取 10  $\mu\text{L}$  R5 和 ISP4 粗提物于直径为 6 mm 的无菌滤纸片上, 晾干后置于含 *B. subtilis* 168 和 *S. aureus* ATCC 25923 的 LB 平板上, 12 h 后观察抑菌结果, 同时以甲醇为阴性对照。

### 1.2.3 菌种鉴定

取菌株 ZFSM1-146 的孢子 3  $\mu\text{L}$  接种于含 3 mL TSB 液体培养基的玻璃管中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、225 r/min 培养 3 d, 使用细菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板, 利用扩增细菌 16S rRNA 基因的通用引物对 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGACTT-3')<sup>[15]</sup>进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ Prime STAR Mix 25  $\mu\text{L}$ , 27F (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 1492R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 模板浓度(150 ng/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , DMSO 2.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 16.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  1 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  5 s (每个循环后降 1  $^{\circ}\text{C}$ ), 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 40 s, 10 个循环; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 40 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。通过琼脂糖凝胶电泳和 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物后, 送通用(安徽)生物公司测序。

将菌株 ZFSM1-146 的 16S rRNA 基因序列上传到 NCBI 网站进行 BLAST 比对, 寻找相似性近的菌株, 选用 MEGA 5.0 的 ClustalW Multiple Alignment 对结果中一致性高的 16S rRNA 基因序列和 ZFSM1-146 序列进行多序列比对, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 设定步长检验次数 1 000 次, 位点缺失阈值 50%, 同时以 *Micromonospora inyonensis* DSM 46123 作为外参, 进一步确定菌株 ZFSM1-146 与已知菌种的亲缘关系。

### 1.2.4 发酵产物的提取分离及抗菌活性物质的确定

取菌株 ZFSM1-146 孢子 40  $\mu\text{L}$  接种到含 40 mL R5 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、225 r/min 培养 3 d, 取 40 mL 种子液转接至含 400 mL R5 液体培养基的 1 L 摇瓶中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、225 r/min 发

酵 7 d, 共发酵 10 L。发酵液用等体积乙酸乙酯萃取 3 次后合并萃取液, 蒸干后发酵粗提物以二氯甲烷:甲醇为梯度洗脱剂进行硅胶色谱层析分离, 分离组分分别用滤纸片法检测抑菌活性。发酵粗提物与分离组分利用 HPLC 与活性检测确定目标化合物后, 利用 HPLC 纯化目标化合物。

HPLC 检测条件: 流动相: MeOH-H<sub>2</sub>O; 色谱柱: Fisher Wharton Xbrige-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm; 流速: 1 mL/min。检测程序: 0–30 min, 20%–100% MeOH; 30–35 min, 100% MeOH。研究中的 HPLC 检测方法均保持一致。

HPLC 纯化条件: 流动相: MeOH-H<sub>2</sub>O; 色谱柱: SHIMADZU Shim-Pack GIS-C18, 10  $\mu\text{m}$ , 10 mm $\times$ 250 mm; 流速: 4 mL/min。检测程序: 0–35 min, 75% MeOH。

### 1.2.5 抗菌活性物质结构鉴定

通过 HPLC 纯化, 得到化合物 1–3 的纯品。对化合物 1–3 进行 HR-ESI-MS 检测, 确定分子量并计算分子式。化合物 1–3 用氘代氯仿溶解后, 利用 NMR 技术检测化合物 1–3 的氢谱和碳谱。

### 1.2.6 抗菌活性物质最小抑菌浓度的测定

参照传统的微量肉汤稀释法<sup>[16]</sup>进行体外抗菌活性试验, 测定化合物 1–3 的最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。化合物 1–3 用 DMSO 溶解, 配制成母液; *B. subtilis* 168、*S. aureus* ATCC 25923 和 MRSA ATCC 43300 为供试菌时, 设置的药物终浓度梯度为 1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006、0.003、0.001 5、0.000 75  $\mu\text{mol/L}$ , *E. coli* ATCC 25922 为供试菌时, 设置的药物终浓度梯度为 160、80、40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.16、0.08  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 1.2.7 放线菌素产量优化

采用 M I–MIV 培养基<sup>[17]</sup>优化放线菌素 X<sub>Op</sub>、X<sub>2</sub> 和 D 的产量, 发酵条件及产物提取方法同利用 R5 培养基的菌种发酵与产物提取方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 红树林土壤放线菌的分离及活性筛选

通过高氏一号培养基从红树林土壤共分离得到 350 株放线菌。分离的放线菌先通过琼脂块法初筛, 结果显示 22 株放线菌分别在 R5 和 ISP4 平板上对 *B. subtilis* 168 和 *S. aureus* ATCC 25923 都有抑菌活性; 初筛得到的放线菌再经滤纸片法复筛, 结果显示 11 株放线菌的 R5 或 ISP4 发酵粗提物对 *B. subtilis* 168 和 *S. aureus* ATCC 25923 有抑菌活性(表 1)。菌株 ZFSM1-146 发酵产物的抑菌活性最强, 发酵液呈深黄色, 选取该菌株做进一步研究。

### 2.2 菌种鉴定及系统发育树的构建

菌株 ZFSM1-146 的 16S rRNA 基因序列经 BLAST 比对, 结果表明菌株 ZFSM1-146 与链霉菌属 (*Streptomyces*) 的菌株具有较高的相似性。利用 MEGA 5.0, 将菌株 ZFSM1-146 的 16S rRNA 基因序列与相似性相近的不同链霉菌菌株 16S rRNA 基因序列采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 结果见图 1。菌株 ZFSM1-146 与 *Streptomyces antibioticus* NRRL B-1701 在同一个分支, Bootstrap 值达到 100%, 相似性为 100%。可初步确定菌株 ZFSM1-146 属于链霉菌属的抗生链霉菌。将菌株

表 1 复筛检测 R5 和 ISP4 发酵粗提物对 *B. subtilis* 168 和 *S. aureus* ATCC 25923 的抑菌圈直径

Table 1 The inhibition zone diameter of R5 and ISP4 fermentation crude extracts against *B. subtilis* 168 and *S. aureus* ATCC 25923 was detected by re-screening

No.	R5 inhibition zone diameter (cm)		ISP4 inhibition zone diameter (cm)	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
	168	ATCC 25923	168	ATCC 25923
ZFSF12-2	1.0	0.8	0.0	0.0
ZFSF21-28	0.0	0.0	2.0	1.8
ZFSM1-4	2.5	1.5	2.4	1.8
ZFSM1-29	2.0	2.0	2.0	1.6
ZFSM1-88	1.8	1.4	0.0	0.0
ZFSM1-92	1.6	2.0	1.8	1.8
ZFSM1-96	2.5	1.5	2.4	1.8
ZFSM1-129	2.5	1.5	2.4	1.8
ZFSM1-146	2.6	2.4	2.0	1.6
ZFSL1-82	0.0	0.0	2.0	1.8
ZFSL2-2	1.2	1.4	1.5	1.4

ZFSM1-146 的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank 数据库, 获得登录号为 MW362453。

### 2.3 发酵及抗菌活性物质的确定

菌株 ZFSM1-146 发酵液经乙酸乙酯萃取、旋转蒸发仪蒸干后得到粗提物; 通过硅胶色谱层析方法, 粗提物以二氯甲烷-甲醇体系(100:0、99:1、98:2、97:3、96:4、95:5、94:6、93:7、90:10、85:15、0:100, 体积比)梯度洗脱, 得到 13 个硅胶组分 Fr1-Fr13。Fr1-Fr13 经 HPLC 和滤

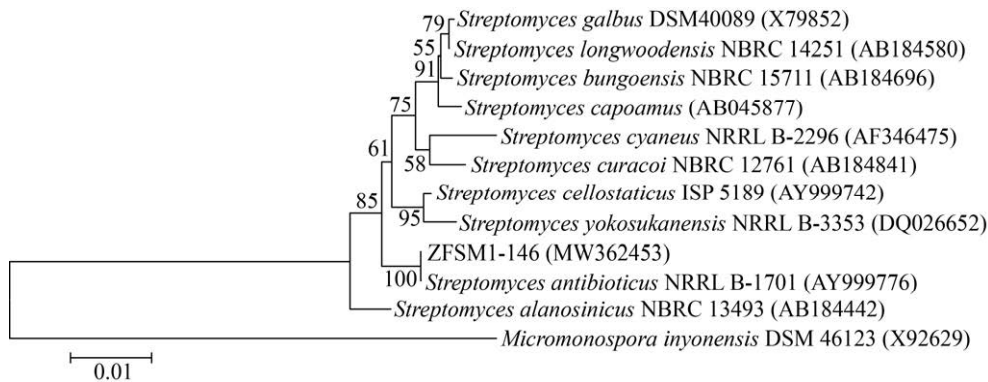


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 ZFSM1-146 系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain ZFSM1-146 based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号内表示 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支处数值表示 Bootstrap 值; 标尺表示进化距离

Note: The GenBank accession number of 16S rRNA gene sequences are shown in the brackets; Numbers at branch nodes represent bootstrap value; Bar (0.01) represents sequence divergence

纸片法抑菌活性检测, 结果显示 Fr5–Fr13 有抑菌活性(图 2A); 比对 Fr5–Fr13 的 HPLC 结果, 分别取少量 Fr5 和 Fr7 合并, 利用 HPLC 检测条件分段收集各个峰的洗脱液, 得到 i、ii、iii 和 iv 这 4 个组分(图 2C), 再次通过滤纸片法检测抑菌活性, 结果显示 ii、iii 和 iv 组分有抑菌活性(图 2B)。将 ii、iii 和 iv 组分分别通过 HPLC 检测, 结果显示分别与粗提物中的化合物 1、2 和 3 一致。由此可以确定菌株 ZFSM1-146 产生的抗菌活性物质主要为化合物 1–3 (图 2C)。其他具有抗菌活性的硅胶组分没有进一步分析是因为它们同样含有化合物 1。通过 HPLC 纯化, 得到化合物 1–3 的纯品, 经计算, 化合物 1–3 的产量分别为  $7.4 \pm 0.4$ 、 $72.6 \pm 3.1$  和  $54.7 \pm 4.3$  mg/L。

#### 2.4 抗菌活性物质结构解析

化合物 1, 红色粉末, 通过 HR-ESI-MS 确定化合物 1 的  $m/z$  为 1 271.630 8  $[M+H]^+$ , 并计算出分子式为  $C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$ 。将化合物 1 的碳谱数据通过微谱数据库中  $^{13}C$  NMR 库查询, 该化合物与放线菌素类化合物相似度极高。进一步与文献中的放线菌素  $X_{O\beta}$  的核磁数据比对, 发现化合物 1 与文献中报道的放线菌素  $X_{O\beta}$  的数据一致<sup>[18]</sup>, 因此确定化合物 1 为 Actinomycin  $X_{O\beta}$ 。

化合物 2, 红色粉末, 通过 HR-ESI-MS 确定化合物 2 的  $m/z$  为 1 269.616 3  $[M+H]^+$ , 并计算出分子式为  $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$ , 比化合物 1 少 2 个氢原子。比较化合物 1 与化合物 2 的碳谱数据, 发现二者极为相似, 但化合物 2 在低场多了一个信号  $\delta_C$  209.04, 推测化合物 2 的  $\beta$ -Ring 中脯氨酸  $C_4$  上的羟基被氧原子取代, 形成羰基, 导致碳的化学位移升高。与文献[19]报道的核磁数据比对, 化合物 2 的核磁数据与放线菌素  $X_2$  的数据一致, 可确定化合物 2 为 Actinomycin  $X_2$ 。

化合物 3, 红色粉末, 通过 HR-ESI-MS 确定化合物 3 的  $m/z$  为 1 255.638 0  $[M+H]^+$ , 并计算出分子式为  $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ , 比化合物 1 少 1 个氧原子; 比化合物 2 少 1 个氧原子、多 2 个氢原子。比较化

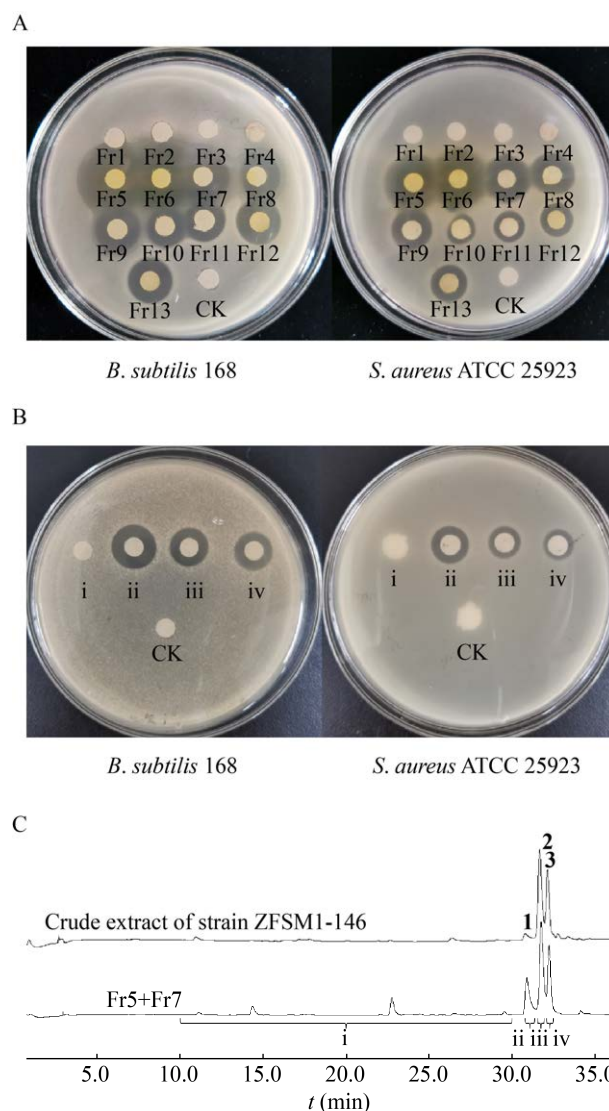


图 2 菌株 ZFSM1-146 发酵产物抗菌活性及 HPLC 分析  
Figure 2 Antibacterial activity and HPLC analysis of strain ZFSM1-146 fermentation products

注: A: 硅胶柱层析 Fr1–Fr13 的抗菌活性检测; B: Fr5+Fr7 分段收集产物的抗菌活性检测; C: ZFSM1-146 发酵产物及 Fr5+Fr7 HPLC 分析(检测波长为 254 nm)。i: Fr5+Fr7 中 10–30 min 收集的产物; ii: Fr5+Fr7 中 30.7–31.3 min 收集的产物; iii: Fr5+Fr7 中 31.6–32.0 min 收集的产物; iv: Fr5+Fr7 中 32.2–32.5 min 收集的产物

Note: A: Antibacterial activity of Fr1–Fr13 of silica gel column chromatography; B: Antibacterial activity of different fractions from Fr5+Fr7; C: HPLC profiles of crude extract of ZFSM1-146 fermentation broth and Fr5+Fr7 (detection at 254 nm). i: 10–30 min HPLC fraction of Fr5+Fr7; ii: 30.7–31.3 min HPLC fraction of Fr5+Fr7; iii: 31.6–32.0 min HPLC fraction of Fr5+Fr7; iv: 32.2–32.5 min HPLC fraction of Fr5+Fr7

合物 2 与化合物 3 的碳谱数据, 发现化合物 3 在高场多了一个信号  $\delta_c$  23.01, 推测化合物 3 的  $\beta$ -Ring 中脯氨酸 C<sub>4</sub> 上的羟基变成亚甲基, 导致碳的化学位移下降。与文献报道的核磁数据比对<sup>[18]</sup>, 化合物 3 的核磁数据与放线菌素 D 的数据一致, 可确定化合物 3 为 Actinomycin D。

化合物 1-3 的化学结构见图 3, 核磁数据归属见表 2。

### 2.5 抗菌活性物质最小抑菌浓度测定

表 3 是 3 种放线菌素对不同细菌的 MIC 值, 放线菌素 X<sub>O $\beta$</sub> 、X<sub>2</sub> 和 D 对 *B. subtilis* 168、*S. aureus* ATCC 25923 和 MRSA ATCC 43300 都具有明显的抑菌活性; 放线菌素 X<sub>2</sub> 和 D 的抑菌效果明显优于放线菌素 X<sub>O $\beta$</sub> , 而且放线菌素 X<sub>2</sub> 的抑菌活性最强。上述结果显示放线菌素 X<sub>2</sub> 和 D 在治疗由 *B. subtilis* 和 *S. aureus* 引起的传染病(尤其是 MRSA 引起的肺炎)方面具有潜在用途<sup>[17]</sup>。

### 2.6 放线菌素产量的初步优化

通过 M I-MIV 这 4 种培养基, 优化链霉菌

ZFSM1-146 放线菌素的产量, 结果表明 MIII 培养基放线菌素的产量最高, X<sub>O $\beta$</sub> 、X<sub>2</sub> 和 D 这 3 个组分分别达到 8.4 $\pm$ 0.8、136.0 $\pm$ 5.8 和 39.4 $\pm$ 1.9 mg/L (表 4), 其中放线菌素 X<sub>2</sub> 的产量达到 136.0 $\pm$ 5.8 mg/L, 约达到优化前的 2 倍。王聪等<sup>[20]</sup>对海洋来源放线菌 *S. parvulus* OUCMDZ-2554 产放线菌素 D 的发酵条件进行优化, 通过单因素和正交试验, 确定发酵培养基为: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, 酵母浸膏 5 g, 可溶性淀粉 22.5 g, 陈海水 1 L, 起始 pH 7.5; 最佳培养条件: 种龄 4 d, 装液量 150/500 mL, 盐度 3%, 发酵时间 12 d。优化后放线菌素 D 的产量是优化前的 3.6 倍, 达到 364 mg/L。在此基础上, Wang 等<sup>[17]</sup>对能同时产放线菌素 X<sub>O $\beta$</sub> 、X<sub>2</sub> 和 D 的 *S. heliomycini* WH1 的发酵条件进行优化, 他们先通过单因素试验确定培养基的盐浓度和 pH 值对该菌株生产放线菌素产量有一定的影响; 其次选择大豆粉培养基(2% 大豆粉, pH 8.0)和 M I-MIV 培养基发酵, 结果显示菌株用 M II 培养基发酵生产放线菌素 X<sub>O $\beta$</sub> 、X<sub>2</sub> 和 D 的产量最高; 最后选取

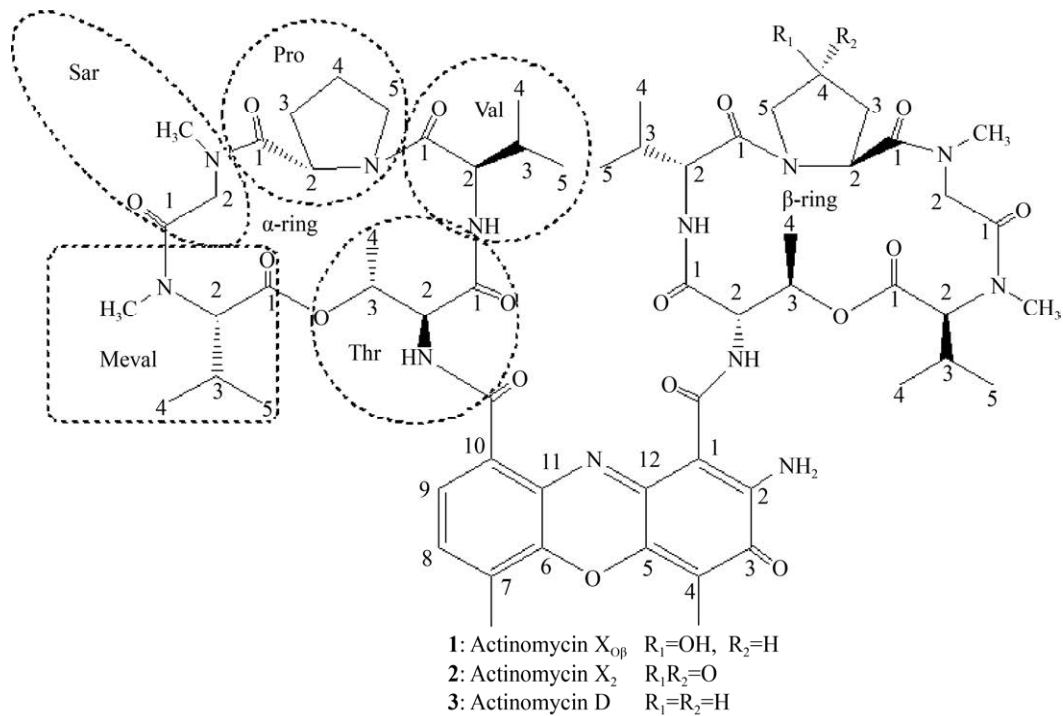


图 3 化合物 1-3 的结构

Figure 3 The structures of compounds 1-3

表 2 化合物 1-3 的核磁数据(CDCl<sub>3</sub>)Table 2 The NMR data (CDCl<sub>3</sub>) of compounds 1-3

Position	1		2		3	
	<sup>13</sup> C NMR (δ <sub>C</sub> ) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H NMR (δ <sub>H</sub> ) <sup>b</sup>	<sup>13</sup> C NMR (δ <sub>C</sub> ) <sup>c</sup>	<sup>1</sup> H NMR (δ <sub>H</sub> ) <sup>d</sup>	<sup>13</sup> C NMR (δ <sub>C</sub> ) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H NMR (δ <sub>H</sub> ) <sup>b</sup>
Chromophore						
1	102.86, C		101.86, C		101.91, C	
2	147.01, C		147.51, C		147.72, C	
3	179.16, C		179.21, C		179.28, C	
4	113.67, C		113.75, C		113.67, C	
5	145.02, C		146.06, C		145.25, C	
6	140.73, C		140.64, C		140.63, C	
7	128.50, C		128.03, C		127.79, C	
8	130.46, CH	7.36, d (7.6)	130.47, CH	7.36, d (7.7)	130.42, CH	7.36, d (7.4)
9	126.18, CH	7.64, d (7.8)	126.31, CH	7.61, d (7.7)	125.90, CH	7.62, d (7.2)
10	131.36, C		132.23, C		132.73, C	
11	129.63, C		129.29, C		129.28, C	
12	146.05, C		145.17, C		146.03, C	
4-Me	7.90, CH <sub>3</sub>	2.23, s	7.93, CH <sub>3</sub>	2.23, s	7.94, CH <sub>3</sub>	2.25, s
7-Me	15.26, CH <sub>3</sub>	2.54, s	15.23, CH <sub>3</sub>	2.55, s	15.21, CH <sub>3</sub>	2.55, s
1-CO	169.09, C		166.65, C		169.17, C	
10-CO	166.79, C		166.20, C		166.67, C	
α-ring						
L-Thr						
1	168.84, C		168.77, C		168.67, C	
NH		7.49, d (6.9)		7.16, d (7.0)		7.18, d (6.7)
2	55.48, CH	4.84, dd (7.0, 2.0)	55.09, CH	4.54, dd (5.7, 2.5)	55.38, CH	4.51, dd (6.7, 2.4)
3	75.36, CH	5.25, m	74.88, CH	5.15, m	75.21, CH	5.21, m
4	17.79, CH <sub>3</sub>	1.29, d (6.1)	17.31, CH <sub>3</sub>	1.13, d (6.5)	17.92, CH <sub>3</sub>	1.25, d (5.0)
D-Val						
1	173.34, C		173.69, C		173.90, C	
NH		8.20, d (4.8)		7.67, d (4.9)		8.00, d (5.0)
2	58.91, CH	3.59, m	58.67, CH	3.56, dd (9.2, 6.2)	59.07, CH	3.55, m
3	31.44, CH	2.12, m	31.84, CH	2.13, m	31.97, CH	2.15, m
4	19.19, CH <sub>3</sub>	0.90, d (7.0)	18.96, CH <sub>3</sub>	0.90, d (7.4)	19.20, CH <sub>3</sub>	0.91, d (6.4)
5	19.38, CH <sub>3</sub>	1.13, d (6.7)	19.20, CH <sub>3</sub>	1.12, d (7.2)	19.43, CH <sub>3</sub>	1.12, d (5.8)
L-Pro						
1	173.49, C		173.28, C		173.50, C	
2	56.92, CH	6.04, d (8.9)	56.53, CH	5.95, d (9.1)	56.58, CH	6.01, d (8.8)
3	31.97, CH <sub>2</sub>	2.06, m	31.14, CH <sub>2</sub>	1.84, m	31.44, CH <sub>2</sub>	1.81, m
		2.69, m		2.75, m		2.67, m
4	23.00, CH <sub>2</sub>	2.13, m	23.12, CH <sub>2</sub>	2.07, m	23.17, CH <sub>2</sub>	2.08, m
		2.18, m		2.28, m		2.29, m
5	47.62, CH <sub>2</sub>	3.87, m	47.58, CH <sub>2</sub>	3.74, m	47.75, CH <sub>2</sub>	3.73, m
				3.90, m		3.97, m
Sar						
1	166.50, C		166.43, C		166.64, C	
N-Me	35.10, CH <sub>3</sub>	2.94, s	34.92, CH <sub>3</sub>	2.88, s	35.12, CH <sub>3</sub>	2.88, s
2	51.50, CH <sub>2</sub>	3.65, d (17.6)	51.47, CH <sub>2</sub>	3.64, d (17.3)	51.55, CH <sub>2</sub>	3.64, d (17.2)

(待续)



(续表 2)

			4.74, d (17.6)		4.72, d (17.3)		4.72, d (17.2)
Meval	1	167.70, C		167.64, C		167.81, C	
	N-Me	39.42, CH <sub>3</sub>	2.95, s	39.54, CH <sub>3</sub>	2.92, s	39.42, CH <sub>3</sub>	2.90, s
	2	71.37, CH	2.69, m	71.38, CH	2.65, m	71.55, CH	2.67, m
	3	27.26, CH	2.69, m	27.06, CH	2.65, m	27.07, CH	2.67, m
	4	19.32, CH <sub>3</sub>	0.75, d (2.9)	19.35, CH <sub>3</sub>	0.73, d (5.7)	19.38, CH <sub>3</sub>	0.74, d (5.0)
	5	21.75, CH <sub>3</sub>	0.96, d (6.0)	21.75, CH <sub>3</sub>	0.95, d (5.6)	21.84, CH <sub>3</sub>	0.96, d (6.2)
β-ring							
L-Thr	1	167.70, C		169.06, C		167.70, C	
	NH		7.44, d (6.3)		7.67, d (4.9)		7.75, d (5.3)
	2	54.87, CH	4.51, dd (6.4, 2.6)	54.89, CH	4.48, dd (6.0, 2.5)	54.99, CH	4.62, dd (6.4, 2.1)
	3	74.75, CH	5.25, m	74.79, CH	5.24, m	75.10, CH	5.17, m
	4	17.68, CH <sub>3</sub>	1.25, d (6.1)	17.86, CH <sub>3</sub>	1.26, d (6.1)	17.50, CH <sub>3</sub>	1.25, d (5.0)
D-Val	1	173.03, C		174.17, C		173.47, C	
	NH		7.93, d (6.1)		8.20, d (5.8)		8.18, d (5.5)
	2	58.07, CH	3.56, m	57.29, CH	3.70, dd (9.7, 6.0)	58.89, CH	3.55, m
	3	31.23, CH	2.12, m	31.99, CH	2.28, m	31.69, CH	2.23, m
	4	19.02, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.9)	19.06, CH <sub>3</sub>	0.89, d (7.4)	19.12, CH <sub>3</sub>	0.88, d (6.2)
	5	19.15, CH <sub>3</sub>	1.11, d (6.7)	19.23, CH <sub>3</sub>	1.16, d (7.0)	19.24, CH <sub>3</sub>	1.12, d (5.8)
L-Pro	1	173.24, C		172.84, C		173.41, C	
	2	56.57, CH	5.98, d (9.0)	54.40, CH	6.56, d (10.4)	56.40, CH	5.95, d (8.7)
	3	39.69, CH <sub>2</sub>	2.13, m	42.05, CH <sub>2</sub>	2.33, d (17.5)	31.09, CH <sub>2</sub>	1.86, m
			2.16, m		3.84, dd (17.8, 11.1)		2.97, m
	4	69.96, CH	4.15, d (17.1)	209.04, C		23.01, CH <sub>2</sub>	2.11, m
							2.29, m
	5	54.77, CH <sub>2</sub>	3.73, m	53.00, CH <sub>2</sub>	3.97, d (19.3)	47.50, CH <sub>2</sub>	3.73, m
			3.94, m		4.56, m		3.84, m
Sar	1	166.20, C		166.04, C		166.42, C	
	N-Me	35.16, CH <sub>3</sub>	2.88, s	35.06, CH <sub>3</sub>	2.89, s	35.05, CH <sub>3</sub>	2.88, s
	2	51.37, CH <sub>2</sub>	3.63, d (17.6)	51.44, CH <sub>2</sub>	3.64, d (17.4)	51.52, CH <sub>2</sub>	3.61, d (17.6)
			4.58, d (17.6)		4.60, d (17.4)		4.79, d (17.6)
Meval	1	166.50, C		167.67, C		166.51, C	
	N-Me	39.32, CH <sub>3</sub>	2.88, s	39.37, CH <sub>3</sub>	2.93, s	39.31, CH <sub>3</sub>	2.93, s
	2	71.36, CH	2.69, m	71.57, CH	2.70, m	71.37, CH	2.63, m
	3	27.14, CH	2.69, m	27.10, CH	2.70, m	27.05, CH	2.63, m
	4	19.16, CH <sub>3</sub>	0.74, d (2.7)	19.39, CH <sub>3</sub>	0.74, d (6.2)	19.24, CH <sub>3</sub>	0.74, d (5.0)
	5	21.72, CH <sub>3</sub>	0.95, d (5.8)	21.86, CH <sub>3</sub>	0.97, d (5.9)	21.73, CH <sub>3</sub>	0.94, d (6.0)

注: <sup>a</sup>: 数据采集自 125 MHz; <sup>b</sup>: 采集自 500 MHz; <sup>c</sup>: 采集自 150 MHz; <sup>d</sup>: 采集自 600 MHz。碳谱数据中 CH<sub>3</sub>: 伯碳原子; CH<sub>2</sub>: 仲碳原子; CH: 叔碳原子; C: 季碳原子。氢谱数据中 s: 单峰; d: 双峰; dd: 双二重峰; m: 多重峰

Note: <sup>a</sup>: Data were measured at 125 MHz; <sup>b</sup>: Data were measured at 500 MHz; <sup>c</sup>: Data were measured at 150 MHz; <sup>d</sup>: Data were measured at 600 MHz. CH<sub>3</sub>: Primary carbon; CH<sub>2</sub>: Secondary carbon; CH: Tertiary carbon; C: Quaternary carbon in <sup>13</sup>C NMR data. s: Singlet; d: Doublet; dd: Double-doublet; m: Multiplet in <sup>1</sup>H NMR

表 3 放线菌素 X<sub>0β</sub>、X<sub>2</sub> 和 D 对不同细菌的 MIC 值  
Table 3 The MIC values of actinomycin X<sub>0β</sub>, X<sub>2</sub> and D against different bacteria (μmol/L)

Strains	Actinomycin X <sub>0β</sub>	Actinomycin X <sub>2</sub>	Actinomycin D
<i>B. subtilis</i> 168	0.4	0.006	0.012 5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.4	0.025	0.050 0
MRSA ATCC 43300	0.4	0.025	0.050 0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	80.0	40.000	40.000 0

表 4 不同培养基化合物 1-3 的产量  
Table 4 Yields of compounds 1-3 in different media (mg/L)

Medium	1	2	3
R5	7.4±0.4	72.6±3.1	54.7±4.3
M I	1.5±0.3	4.5±0.5	20.1±1.1
M II	3.5±0.2	43.8±1.7	14.6±1.6
M III	8.4±0.8	136.0±5.8	39.4±1.9
M IV	7.4±0.4	68.0±2.3	26.8±2.2

M II 培养基进行探索, 在盐浓度为 5%、最佳 pH 8.5 时, 放线菌素 X<sub>0β</sub>、X<sub>2</sub> 和 D 的产量分别达到 107.6±4.2、283.4±75.3、458.0±76.3 mg/L。Wang 等的研究成果<sup>[17,20]</sup>给本研究放线菌素产量优化的培养基选择提供了参考依据。M I-MIV 这 4 种培养基的区别主要在于碳源和氮源的组合不同, 通过 M I-MIV 这 4 种发酵培养基进行放线菌素产量优化, 结果表明, 菌株 ZFSM1-146 生长于以可溶性淀粉或葡萄糖作为碳源、酵母粉作为氮源的 M III、M IV 培养基时, 放线菌素产量明显高于仅以酵母粉作为碳源和氮源的 M I 培养基的放线菌素产量; 此外, 可溶性淀粉作为碳源的 M III 培养基的放线菌素产量高于葡萄糖作为碳源的 M IV 培养基的放线菌素产量。这说明在常见的微生物生长所需碳源中, 链霉菌 ZFSM1-146 发酵时利用可溶性淀粉作为碳源则放线菌素的产量最高。

本研究仅对链霉菌 ZFSM1-146 通过尝试不同发酵培养基进行放线菌素产量的初步优化, 后期可以采用 M II 培养基针对种龄、盐浓度、pH 值和发酵时间等因素探索最佳发酵条件, 进一步提高

放线菌素产量。链霉菌 ZFSM1-146 在放线菌素产量提升方面具有较大的潜力, 为后续通过不同培养条件等因素优化放线菌素产量提供了宝贵的菌种资源。

### 3 讨论与结论

放线菌素是一类环肽化合物, 由 2 个环五肽内酯组成, 分别称为 α-Ring 和 β-Ring, 通过酰胺键连接到一个杂三环发色团, 一般呈现红色或橘红色<sup>[21]</sup>。大多数放线菌素都具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤活性<sup>[22]</sup>。1940 年, Waksman 等<sup>[23]</sup>从土壤来源的抗生链霉菌中分离出第一种放线菌素。截至目前, 从链霉菌属分离鉴定的天然放线菌素类化合物已经达到 40 多种, 主要包括放线菌素 D、放线菌素 C、放线菌素 X、放线菌素 Z、放线菌素 Y 等<sup>[24]</sup>。放线菌素 D 已经被广泛研究并应用到临床上, 但由于其强烈的细胞毒性, 仅限于恶性肿瘤的治疗。由于化学合成方法步骤长、产量低、成本高, 放线菌素 D 主要通过微生物发酵获得。放线菌素的生物合成主要包括 3 个阶段: (1) 通过犬尿氨酸途径合成 3-羟基-4-甲基邻氨苯甲酸(4-MHA); (2) 在非核糖体酶的作用下合成 3-羟基-4-甲基邻氨苯甲酸-环五肽内酯; (3) 2 个 3-羟基-4-甲基邻氨苯甲酸-环五肽内酯缩合成吩恶嗪酮发色团<sup>[25]</sup>。近年来, 研究者期望通过化学全合成研究构效关系, 得到抗肿瘤活性强和细胞毒性低的放线菌素 D 类似物, 使其在临床上的广泛应用成为可能。张邦治等<sup>[26]</sup>通过保留环肽 2 位 D-Val 不变、环肽 5 位的 MeVal 替换成氨基酸侧链延长的 D-Me-Leu 和 Me-Ile 均能显著提高类似物的抗肿瘤活性。倪京满等<sup>[27]</sup>通过合成放线菌素的类似物 2,2'-双苯丙氨酸放线菌素 D, 在相同毒性情况下, 类似物的抗肿瘤活性比放线菌素 D 有一定的提高。

本研究从深圳地区红树林土壤来源的放线菌出发, 通过初筛和复筛筛选出具有抗菌活性的放线菌, 最终选择一株放线菌菌株 ZFSM1-146 挖

掘其产生的抗菌活性物质。基于 16S rRNA 基因序列及构建的系统发育树分析, 可初步确定菌株 ZFSM1-146 属于链霉菌属的抗生链霉菌。采用有机溶剂萃取法从 ZFSM1-146 发酵液中萃取出抗菌活性物质, 通过活性追踪法确定化合物 1-3 为抗菌活性物质; 经 HR-ESI-MS 和 NMR 鉴定出抗菌活性物质化合物 1-3 都属于放线菌素类化合物, 分别是放线菌素 X<sub>0β</sub>、X<sub>2</sub> 和 D, 产量分别达到 7.4±0.4、72.6±3.1 和 54.7±4.3 mg/L。通过培养基优化, MIII 培养基放线菌素的产量最高, 分别达到 8.4±0.8、136.0±5.8 和 39.4±1.9 mg/L, 其中放线菌素 X<sub>2</sub> 的产量为 136.0±5.8 mg/L, 约达到优化前的 2 倍; 相较于放线菌素 X<sub>0β</sub> 和 D, 放线菌素 X<sub>2</sub> 的抑菌活性最强。放线菌素 X<sub>2</sub> 被认为具有较放线菌素 D 更强的抗肿瘤活性, 人们对放线菌素 X<sub>2</sub> 的抗肿瘤作用正进行深入的研究<sup>[28]</sup>。本研究为研究放线菌素 X<sub>2</sub> 抗肿瘤作用提供了物质基础, 为后续通过分子遗传手段对放线菌素 X<sub>0β</sub>、X<sub>2</sub> 和 D 进行结构修饰及产量优化以得到新颖的放线菌素和抗肿瘤活性强、细胞毒性低放线菌素提供了宝贵的菌种资源, 对后续放线菌素类似药的开发具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629-661
- [2] Gullo VP, McAlpine J, Lam KS, Baker D, Petersen F. Drug discovery from natural products[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33(7): 523-531
- [3] Ma QQ, Ding WJ, Chen Z, Ma ZJ. Bisamides and rhamnosides from mangrove actinomycete *Streptomyces* sp. SZ-A15[J]. *Natural Product Research*, 2018, 32(7): 761-766
- [4] Tan LTH, Chan KG, Pusparajah P, Yin WF, Khan TM, Lee LH, Goh BH. Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticancer agents[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 1-16
- [5] Braddock AA, Theodorakis EA. Marine spirotetronates: biosynthetic edifices that inspire drug discovery[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(4): 232
- [6] Zeng YX, Chen B, Zou Y, Zheng TL. Polar microorganisms, a potential source for new natural medicines: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(5): 695-700 (in Chinese)
- [7] 曾胤新, 陈波, 邹扬, 郑天凌. 极地微生物——新天然药物的潜在来源[J]. *微生物学报*, 2008, 48(5): 695-700
- [7] Rateb ME, Ebel R, Jaspars M. Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2018, 111(8): 1467-1477
- [8] Saxena R, Dhakan DB, Mittal P, Waiker P, Chowdhury A, Ghatak A, Sharma VK. Metagenomic analysis of hot springs in central India reveals hydrocarbon degrading thermophiles and pathways essential for survival in extreme environments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 2123
- [9] Ye JJ, Zheng HY, Wu Y, Jiang LX, Chen JH, Huang SS, Huang DL. Diversity and antimicrobial activity of actinobacteria isolated from mangrove rhizosphere soil in the Maowei Sea of Guangxi[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2018, 13(11): 1221-1226,1231 (in Chinese)
- [9] 叶景静, 郑红芸, 吴越, 蒋莲秀, 陈建宏, 黄庶识, 黄大林. 广西茅尾海红树林植物根际土壤放线菌多样性及抗菌活性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(11): 1221-1226,1231
- [10] Palazzotto E, Tong YJ, Lee SY, Weber T. Synthetic biology and metabolic engineering of actinomycetes for natural product discovery[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107366
- [11] Mahajan GB, Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes: a review[J]. *Frontiers in Bioscience: Elite Edition*, 2012, 4: 240-253
- [12] Sayed AM, Hassan MHA, Alhadrami HA, Hassan HM, Goodfellow M, Rateb ME. Extreme environments: Microbiology leading to specialized metabolites[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(3): 630-657
- [13] Zhang M. Screening and identification of marine *Actinomyces* and study on of its antimicrobial active substances[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese)
- [13] 张孟. 海洋抑菌放线菌的筛选、鉴定及其抑菌活性物质研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2017
- [14] Lin ZT, Ye ZJ, Zhuang LP, Xu L, Zhang G, Qiang H. Isolation and structure identification of the antimicrobial compounds from a marine actinomycetes strains[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2017, 39(3): 559-566 (in Chinese)
- [14] 林真亭, 叶子坚, 庄玲萍, 许莉, 张岗, 强华. 一株海洋放线菌抗菌活性物质的分离与结构解析[J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39(3): 559-566
- [15] Farris MH, Olson JB. Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45(4): 376-381
- [16] Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. Antibacterial

- cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study[J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(8): 1427-1430
- [17] Wang DY, Wang C, Gui PY, Liu HS, Khalaf SMH, Elsayed EA, Wadaan MAM, Hozzein WN, Zhu WM. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomycini*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1147
- [18] Song XQ, Jiang X, Sun JB, Zhang CY, Zhang Y, Lu LC, Ju JH. Antibacterial secondary metabolites produced by mangrove-derived actinomycete streptomycetes *Costaricanus* SCSIO ZS0073[J]. *Natural Product Research and Development*, 2017, 29(3): 410-414 (in Chinese)  
宋现芹, 蒋鑫, 孙建彬, 张春燕, 张云, 卢来春, 鞠建华. 红树林放线菌 *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073 抗菌活性次级代谢产物的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(3): 410-414
- [19] Matsui T, Tanaka J, Namihira T, Shinzato N. Antibiotics production by an actinomycete isolated from the termite gut[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(6): 731-735
- [20] Wang C, Liu PP, Wang Y, Sun KL, Jia HJ, Zhu WM. Optimization of fermentation conditions for production of actinomycin D by marine-derived *Streptomyces parvulus* OUCMDZ-2554[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2014, 33(3): 34-42 (in Chinese)  
王聪, 刘培培, 王义, 孙坤来, 贾海健, 朱伟明. 海洋来源放线菌 *Streptomyces parvulus* OUCMDZ-2554 产放线菌素 D 的发酵条件优化[J]. *中国海洋药物*, 2014, 33(3): 34-42
- [21] Cai WL, Wang XC, Elshahawi SI, Ponomareva LV, Liu XD, McErlean MR, Cui Z, Arlinghaus AL, Thorson JS, Van Lanen SG. Antibacterial and cytotoxic actinomycins Y6-Y9 and zp from *Streptomyces* sp. strain gö-GS12[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(10): 2731-2739
- [22] Chen CX, Song FH, Wang Q, Abdel-Mageed WM, Guo H, Fu CZ, Hou WY, Dai HQ, Liu XT, Yang N, et al. A marine-derived *Streptomyces* sp. MS449 produces high yield of actinomycin X2 and actinomycin D with potent anti-tuberculosis activity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(4): 919-927
- [23] Waksman SA, Woodruff HB. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil *Actinomyces*[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1940, 45(2): 609-614
- [24] Liu MC, Jia YX, Xie YC, Zhang CY, Ma JY, Sun CL, Ju JH. Identification of the actinomycin D biosynthetic pathway from marine-derived *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(4): 240-252
- [25] Yuan W, Jiao WH, Wang Y, Chen B, Ye BP. Progress on biosynthesis of actinomycins[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2014, 36(1): 1-7 (in Chinese)  
袁薇, 焦伟华, 王颖, 陈彪, 叶波平. 放线菌素生物合成研究进展[J]. *氨基酸和生物资源*, 2014, 36(1): 1-7
- [26] Zhang BZ, Wang KR, Wang ZZ, Li XL, Wang XL, Ni JM. Design, synthesis and *in vitro* antitumor activity of novel actinomycin D analogs[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2010, 31(7): 1346-1352 (in Chinese)  
张邦治, 王凯荣, 王则周, 李欣楠, 王小丽, 倪京满. 放线菌素 D 新类似物的设计、合成与体外抗肿瘤活性[J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(7): 1346-1352
- [27] Ni JM, Wang R, Jia ZP, Pan XF, Hu XY. Studies on the synthesis and bioactivity of 5,5'-Val2-AMD and 2,2'-Phe2-AMD[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 1998, 19(2): 243-245 (in Chinese)  
倪京满, 王锐, 贾正平, 潘鑫复, 胡晓愚. 抗癌药物放线菌素 D 类似物的全合成及生物活性研究[J]. *高等学校化学学报*, 1998, 19(2): 243-245
- [28] Sun ZY, Zhang MM, Qin DH, Yang XP. Study on actinomycin X<sub>2</sub>, a secondary metabolite produced by actinomycete Z802031[J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 32(3): 18-22 (in Chinese)  
孙肇暘, 张明明, 秦德华, 杨秀萍. 放线菌 Z802031 次级代谢产物放线菌素 X<sub>2</sub> 的研究[J]. *首都师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 32(3): 18-22