

环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2 全基因组测序及序列分析

阮文伟^{1,2,3}, 付建红^{*1,2,3}, 崔凤真^{1,2,3}, 铁瑞岚^{1,2,3}, 徐国燕^{1,2,3},
阿依卡买尔·艾克拜尔^{1,2,3}

1 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

2 干旱区植物逆境生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017

3 新疆师范大学 生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830017

阮文伟, 付建红, 崔凤真, 铁瑞岚, 徐国燕, 阿依卡买尔·艾克拜尔. 环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2 全基因组测序及序列分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3085-3102.

RUAN Wenwei, FU Jianhong, CUI Fengzhen, TIE Ruilan, XU Guoyan, Ayekabayr Ekbayr. Whole-genome sequencing and sequence analysis of *Streptomyces anulatus* 89-2-2[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3085-3102.

摘要: 【背景】环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2 是一株中度嗜盐放线菌, 其次级代谢产物具有抑制蘑菇酪氨酸酶活性、抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞内酪氨酸酶活性及黑色素合成的作用。目前 *S. anulatus* 89-2-2 基因组序列分析尚未见报道, 这限制了该菌株中酪氨酸酶抑制剂、黑色素合成抑制剂及其他次级代谢产物合成及调控的研究。【目的】解析 *S. anulatus* 89-2-2 基因组序列信息, 挖掘其次级代谢产物基因资源, 为深入研究该菌株的酪氨酸酶抑制剂产生机理及生物合成调控机制奠定基础。【方法】利用 Nanopore 测序平台对 *S. anulatus* 89-2-2 进行全基因组测序; 采用相关软件对菌株 89-2-2 的基因组序列进行拼接、基因预测、功能注释、进化分析和共线性分析, 并预测次级代谢产物合成基因簇, 比较不同链霉菌的基因组间差异, 研究不同种链霉菌的次级代谢潜力及物种间的进化关系。【结果】菌株 89-2-2 基因组为一条总长度为 8 117 999 bp 的线性染色体, G+C 含量为 71.52%, 序列已提交至 NCBI 的 GenBank 数据库, 登录号为 CP137002。生物信息学分析发现基因组含有 7 088 个编码基因, 分别在 COG、GO、KEGG、NR 数据库提取到 5 300、4 176、2 513、7 013 个基因的注释信息。同时, 通过 antiSMASH 软件预测到 34 个次级代谢产物合成基因簇, 涉及萜烯类、非核糖体肽类、聚酮类、翻译后修饰肽类等多种天然产物的合成, 其中 11 个基因

资助项目: 国家自然科学基金(32260226); 新疆维吾尔自治区“天山”创新团队计划 (2022D14004); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01A122)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260226), the Tianshan Innovation Team Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2022D14004), and the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021D01A122).

*Corresponding author. E-mail: fjh_719@163.com

Received: 2023-11-17; Accepted: 2024-02-07; Published online: 2024-03-12

簇与已知化合物编码基因簇同源性较低,说明该菌株具有产生多种新型次级代谢产物的潜力。通过对菌株 89-2-2 与 *S. microflavus* DSM40593、*Streptomyces* sp. AM2-1-1 基因组比较分析发现,菌株 89-2-2 与菌株 AM2-1-1 基因组线性关系较好,具有较近的亲缘关系;而与菌株 DSM40593 存在较大区域的倒位现象,亲缘关系较远。菌株 89-2-2 特有的基因家族和基因数目分别为 51 个和 1 235 个。这些结果表明,链霉菌属具有较强的适应多样生态环境的能力,在长期适应过程中,种间的基因组出现了局部的波动,菌株 89-2-2 特有基因与不同生境的适应关系还需要进一步研究。【结论】分析了菌株 89-2-2 的全基因组信息,为探究该菌株抑制酪氨酸酶活性与基因组间的联系、分析其次级代谢产物合成基因簇的结构、评估链霉菌次级代谢潜力奠定了基础,为新颖化合物的发现和新药物的开发提供了依据。

关键词: 中度嗜盐链霉菌; 酪氨酸酶抑制剂; 全基因组测序; 生物合成基因簇

Whole-genome sequencing and sequence analysis of *Streptomyces anulatus* 89-2-2

RUAN Wenwei^{1,2,3}, FU Jianhong^{*1,2,3}, CUI Fengzhen^{1,2,3}, TIE Ruilan^{1,2,3}, XU Guoyan^{1,2,3}, Ayekabayr Ekbayr^{1,2,3}

1 Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Urumqi 830017, Xinjiang, China

2 Key Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, Urumqi 830017, Xinjiang, China

3 College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830017, Xinjiang, China

Abstract: [Background] *Streptomyces anulatus* 89-2-2, a moderately halophilic actinomycete strain, can produce secondary metabolites capable of inhibiting the tyrosinase activity in mushrooms and the melanin synthesis and tyrosinase activity in mouse melanoma B16 cells. Few studies report the genome sequence of *S. anulatus* 89-2-2, which limits the studies on the biosynthesis and regulation of tyrosinase inhibitors, melanin synthesis inhibitors and other secondary metabolites in the strain. [Objective] This study sequenced the genome of *S. anulatus* 89-2-2 and mined the genetic resources of secondary metabolites, aiming to lay a foundation for deciphering the mechanisms of tyrosinase inhibitor production and biosynthesis regulation in this strain. [Methods] Nanopore sequencing platform was used to uncover the genome sequence of *S. anulatus* 89-2-2. Bioinformatics tools were used for sequence assembly, gene prediction, functional annotation, phylogenetic analysis, synteny analysis, and prediction of the gene clusters for biosynthesis of secondary metabolites. The genomes of different *Streptomyces* spp. were compared, and the secondary metabolic potential and the evolutionary relationship of different *Streptomyces* spp. were studied. [Results] The genome of strain 89-2-2 was a single linear chromosome with a length of 8 117 999 bp and the G+C content of 71.52%. The sequence has been submitted to the GenBank of the NCBI, with the accession number CP137002. The genome of the strain contained 7 088 coding sequences. The annotation against COG, GO, KEGG, and NR predicted 5 300, 4 176, 2 513, and 7 013 genes, respectively. The antiSMASH

predicted 34 gene clusters for the biosynthesis of secondary metabolites in the genome of 89-2-2, and these gene clusters were involved in the biosynthesis of a variety of natural products, such as terpenoids, non-ribosomal peptides, polyketides, and ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. Eleven clusters showed low similarities to the gene clusters for the biosynthesis of known compounds, which suggested that strain 89-2-2 had the potential to produce a variety of novel secondary metabolites. The genome of *S. anulatus* 89-2-2 presented high synteny with that of *Streptomyces* sp. AM2-1-1, which indicated their high homology. It showed large inversions compared with that of *S. microflavus* DSM40593, which suggested their low homology. Strain 89-2-2 had 51 specific gene families and 1 235 specific genes. The results indicated that *Streptomyces* spp. had strong ability to adapt to diverse environments, and partial fluctuations in the genomes occurred between species during the long-term adaptation. Further studies remain to be carried out to reveal the relationship between specific genes and adaptability of strain 89-2-2 to different environments. **[Conclusion]** This study analyzed the whole-genome sequence of *S. anulatus* 89-2-2, laying a foundation for further studies about the strain in terms of the association between the tyrosinase-inhibiting activity and the genome, the structures of gene clusters for the biosynthesis of secondary metabolites, and the secondary metabolic potential of *Streptomyces* spp. This study provides basic data for the discovery of novel compounds and new drugs.

Keywords: moderately halophilic *Streptomyces* spp.; tyrosinase inhibitor; whole-genome sequencing; gene cluster for biosynthesis

链霉菌是天然活性化合物的主要来源之一, 其次生代谢产物具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抑酶、杀虫、促进植物生长等活性, 被越来越多地应用于医药、食品、农业等众多领域, 成为研究人员开发和研究的关注对象, 尤其是在极端环境下生存的链霉菌更是受到研究人员的重视^[1-6]。本课题组从新疆罗布泊盐湖土壤中分离得到一株环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2, 经检测其次级代谢产物的提取物具有抑制蘑菇酪氨酸酶活性、抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞内酪氨酸酶活性以及黑色素合成的活性^[7]。

酪氨酸酶(tyrosinase, EC1.14.18.1)是一种含有双核铜离子的金属氧化酶, 是生物体合成黑色素的关键限速酶, 抑制酪氨酸酶活性是防止果蔬褐变及黑色素过度合成的有效手段。目前, 常见的抑制酪氨酸酶活性的物质有熊果苷、曲酸、壬二酸等^[8-10], 但这些酪氨酸酶抑制剂大

都效果不稳定或存在安全隐患, 如曲酸已被列入世界卫生组织国际癌症研究机构公布的三类致癌物清单^[11-12]。酪氨酸酶抑制剂在化妆品和医药上的需求不断增加, 而获得使用许可证的化合物却非常少^[13]。因此, 亟须开发安全有效的新型酪氨酸酶抑制剂。高盐、强碱、强酸、强辐射等特殊的物理、化学因素造就了极端环境链霉菌独特的次级代谢途径, 往往能产生结构新颖且具有显著生物活性的次级代谢产物^[14]。有关极端环境链霉菌产生酪氨酸酶抑制剂的研究报道较少。

运用高通量测序技术破译了越来越多的微生物基因组序列, 目前在 NCBI 上已公布全基因组序列的链霉菌有一百余个。本研究对 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 进行全基因组测序, 同时对基因组进行组装、系统发育和比较基因组学分析, 以及基因预测和功能注释, 并

测定预测的次级代谢产物对酪氨酸酶活性的影响。通过对菌株 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 基因组特征的了解, 不仅有利于发现新的生物合成基因簇, 更有利于解析 89-2-2 基因组中抑制酪氨酸酶活性物质的合成和调控基因, 为后续利用大肠杆菌等异源表达系统来生物合成酪氨酸酶抑制剂奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2 分离自新疆罗布泊盐湖土壤, 为酪氨酸酶抑制剂产生菌, 由本实验室保存, 该菌株 16S rRNA 基因序列已提交至 GenBank, 登录号为 OK255534^[7]。

1.1.2 培养基

参照文献[7]的方法配制 R₂A 培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器

酵母浸出粉、酸水解干酪素和蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 可溶性淀粉、葡萄糖、K₂HPO₄ 和 MgSO₄·7H₂O, 天津市盛奥化学试剂有限公司; 丙酮酸钠, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 琼脂, 上海科雅生物科技有限公司; 土臭素, 上海安谱瑾世标准技术服务有限公司; 蘑菇酪氨酸酶、二甲基亚砜(DMSO)和 L-多巴(L-DOPA), Sigma 公司; TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 超净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司; 多功能酶标仪, 加州分子仪器公司; 离心机和立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 菌株 89-2-2 基因组 DNA 的提取

将菌株 89-2-2 接种于 R₂A 培养基, 在恒温培养箱中 35 °C 培养 3–5 d, 取菌体于离心管中, 然后置于液氮中淬灭 15 min, –80 °C 冰箱中冻存备用。使用 TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒完成基因组 DNA 的提取。

1.3 菌株 89-2-2 基因组测序和拼接

菌株 89-2-2 的全基因组测序委托百迈客生物科技有限公司完成。基于 Nanopore 三代测序平台的全基因组测序获得的 contigs 按 Oxford Nanopore Technologies (ONT) 公司实验流程进行拼接, 利用 Canu v1.5 软件对过滤后的 paired-end reads 进行组装, 通过 Racon v3.4.3、Circlator v1.5.5 和 Pilon v1.22 软件进行矫正纠错。

1.4 菌株 89-2-2 系统发育树与比较基因组学分析

以菌株 *Streptomyces microflavus* DSM40593、*Streptomyces durocortorensis* C11-1、*Streptomyces* sp. AM2-1-1、*Streptomyces anulatus* VUW1、*Streptomyces* sp. CA-278952 的全基因组序列为参考, 基于最大似然(maximum likelihood, ML) 法原则, 使用 PhyML 软件构建全基因组系统发育树。采用 Kostas lab (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>) 平台计算菌株 89-2-2 与以上参考菌株基因组之间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)。利用 minimap2 v2.24、SyRI v1.5.4、Samtools v1.9 软件将 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 全基因组序列与已知的 *S. microflavus* DSM40593 和 *Streptomyces* sp. AM2-1-1 的全基因组序列进行比对, 获得基因组中同源基因的共线性关系, 在分子水平上比较链霉菌属基因组种间差异, 分析链霉菌属基因特点。

1.5 基因组组分预测和功能基因注释

使用 Prodigal v2.6.3 软件进行编码基因预

测。通过 RepeatMasker v4.0.5 软件预测基因组中的重复序列, 通过 Rfam 数据库和 Infernal v1.1.3 软件分析 rRNA 基因、通过 tRNAscan-SE v2.0 软件预测 tRNA 序列。使用 CRT v1.2、IslandPath-DIMOB v0.2、PhiSpy v2.3 软件分别对基因组 CRISPR 序列、基因岛、前噬菌体进行预测。运用非冗余蛋白质数据库(non-redundant protein database, NR)、基因本体数据库(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、蛋白质家族数据库(protein families database, Pfam)、蛋白质序列数据库(Swiss-Prot Protein Sequence Database, Swiss-Prot)、同源蛋白簇(clusters of orthologous groups, COG)等通用数据库和碳水化合物活性酶数据库 (Carbohydrate-Active Enzymes Database, CAZy)、病原与宿主互作数据库(pathogen host interactions database, PHI-base)、病原菌毒力因子数据库(Virulence Factor Database, VFDB)、综合抗生素耐药性数据库(comprehensive antibiotic research database, CARD)、转运蛋白分类数据库(transporter classification database, TCDB)等专有数据库比对, 进行蛋白序列功能注释。使用软件 SignalP v4.0 和 TMHMM v2.0 分别预测出信号肽和跨膜蛋白, 分析出分泌蛋白数量。使用软件 Circos v0.66 绘制 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 的全基因组注释圈图。

1.6 次级代谢产物合成基因簇的预测

利用 antiSMASH v7.0 软件对菌株 89-2-2 中的次级代谢产物生物合成基因簇进行分析。

1.7 已知的可能次级代谢产物对酪氨酸酶活性的影响

为了验证次级代谢产物合成基因簇预测分析的结果, 对菌株 89-2-2 中已知次级代谢产物土臭素(geosmin)进行酪氨酸酶抑制活性测定。参照文献[15]方法略有改动。土臭素为效应物,

溶于含 DMSO 的 PBS 缓冲溶液中, 制成含不同浓度效应物的溶液。以 0.5 mmol/L 终浓度 L-DOPA 为底物, 在 0.05 mol/L PBS 缓冲液(pH 6.8)的 200 μ L 测活体系中, 将不同浓度的效应物溶液、PBS 缓冲液、底物依次加入 96 孔微孔板中, 30 $^{\circ}$ C 保温 15 min, 最后加入蘑菇酪氨酸酶溶液, 置于酶标仪振荡 5 s 进行混匀, 在 475 nm 波长处测定体系在不同时间的吸光度值, 制作吸光度随时间增长的直线, 从直线斜率求得酶活力, 再以剩余相对酶活力对效应物浓度作图得到效应物的浓度效应曲线, 并计算 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 菌株 89-2-2 基因组的基本特征

测序共获得 read 条数 114 679, 总碱基数 1 075 574 341, 平均序列读长 9 379 bp, 组装后序列大小为 8 117 999 bp。测序序列 N50 和 N90 的长度均为 8 117 999 bp, 占总长的 100%, 重复序列为 169 265 bp, 占总长的 2.085%。测序得到的基因组信息显示, 菌株 89-2-2 基因组为一条线性染色体, 全长 8 117 999 bp, 其 G+C 含量为 71.52%, 包含 7 088 个预测的编码蛋白基因, 长度为 7 199 172 bp, 占基因组总长的 88.68%, 平均长度为 1 015 bp。基因组中有 18 个 rRNA (5S、16S、23S rRNA 各 6 个), 共 3 种类型; 71 个 tRNA, 共 44 种类型。预测出 72 个 CRISPR 序列、17 个基因岛、5 个前噬菌体、34 个基因簇。将环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2 全基因组序列提交至 GenBank 数据库中, 登录号为 CP137002。

2.2 菌株 89-2-2 系统发育树的构建与链霉菌属基因组比较分析

基于 16S rRNA 基因序列比对结果, 菌株 89-2-2 与模式株 *Streptomyces anulatus* NRRL B-2000^T 的 16S rRNA 基因相似度最高为 99.9%,

除了该模式菌株, 其与其他近源模式菌株 *Streptomyces setonii* NBRC 13085^T 和 *Streptomyces pratensis* ch24^T 也聚在同一个大的分支上^[7]。以菌株 89-2-2、*Streptomyces anulatus* VUW1、*Streptomyces* sp. AM2-1-1、*Streptomyces durocortorensis* C11-1、*Streptomyces microflavus* DSM40593、*Streptomyces* sp. CA-278952 的全基因组序列构建系统发育树, 结果见图 1。可以看出菌株 89-2-2 与 *S. anulatus* VUW1、*Streptomyces* sp. AM2-1-1 这 2 个参考菌株的进化距离更近, 亲缘关系更强; 而与 *S. microflavus* DSM40593 进化距离较远。为了验证以上推断, 基于全基因组比对计算 6 个菌株基因组的 ANI 值。结果表明, 菌株 89-2-2 与 *S. anulatus* VUW1

的 ANI 值高达 95.3%, 进一步说明菌株 89-2-2 与 *S. anulatus* VUW1 为同一物种, 将其命名为 *S. anulatus* 89-2-2。

选取 *Streptomyces anulatus* VUW1、*Streptomyces* sp. AM2-1-1、*Streptomyces microflavus* DSM40593 与 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 进行全基因组比较分析, 其基因组基本特征如表 1 所示, *S. anulatus* VUW1 的基因组最大, 编码基因数量最多, 而 *S. anulatus* VUW1 与菌株 89-2-2 的 G+C 含量等方面十分相近。菌株 89-2-2 特有基因家族数目和基因数目分别是 *S. anulatus* VUW1 的 1.82 倍和 1.39 倍; 分别是 *S. microflavus* DSM40593 的 7.29 倍和 2.43 倍, 表明菌株 89-2-2 与 *S. anulatus* VUW1 的基因组特征比较相似。

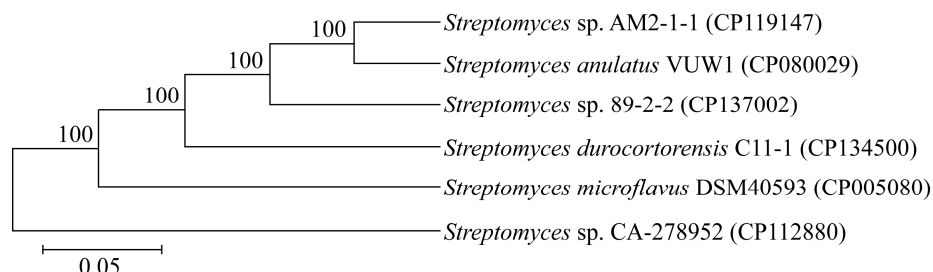


图 1 基于菌株 89-2-2 全基因组序列构建的系统发育树 括号内序号代表 GenBank 登录号; 分支节点的数字代表自举值; 标尺代表进化距离

Figure 1 Phylogenetic tree built on the basis of the whole-genome sequence of strain 89-2-2. The number in the bracket denotes GenBank accession number; The number at the branch node denotes bootstrap value; The scale plate denotes evolutionary distance.

表 1 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 及近缘 3 株菌的全基因组序列基本特征

Table 1 General genomic features of *Streptomyces anulatus* 89-2-2 and other three similar type strains

Item	<i>S. anulatus</i> 89-2-2	<i>S. anulatus</i> VUW1	<i>Streptomyces</i> sp. AM2-1-1	<i>S. microflavus</i> DSM40593
基因组长度 Genome length (bp)	8 117 999	8 874 447	7 134 031	7 905 758
G+C 含量 G+C content (%)	71.5	71.5	72	71.5
总基因数 Total gene number	7 088	7 571	6 059	6 825
特有基因数 Unique gene number	1 235	883	788	508
总基因家族数 Total gene family number	5 775	6 521	4 338	6 169
特有基因家族数 Unique gene family number	51	28	31	7
rRNA 数量 rRNA number	18	18	21	18
tRNA 数量 tRNA number	71	68	68	72

根据同源基因在基因组序列上的位置信息,将 *S. anulatus* 89-2-2 与 2 株参考菌株进行基因组之间的共线性分析,结果如图 2 所示。分析发现,在 *S. anulatus* 89-2-2 与 *S. microflavus* DSM40593 比较的共线性图中有一段较小的同线性比对(灰色线),两者比对中在基因组 1-8 Mb 的位置出现大量的倒置比对(橘黄色线)。*S. anulatus* 89-2-2 与 *Streptomyces* sp. AM2-1-1 之间存在大量同源性区域(灰色线),仅有少数的倒位区域,说明这两株菌的共线性较好。相比而言, *S. anulatus* 89-2-2 与 *Streptomyces* sp. AM2-1-1 基因序列的相似度更高,这与系统发育树分析的结果一致。以上结果反映出链霉菌属不同种之间基因组序列组成具有一定的差异性,可能是不同菌株为适应不同生存环境而产生的适应性变化。

2.3 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 功能基因分析

将 *S. anulatus* 89-2-2 预测基因的蛋白序列

分别与功能数据库(如 COG、KEGG、NR、GO 等)进行比对,选取相似度最高(identity \geq 40%)的比对结果进行注释,通过氨基酸序列的相似度来注释基因功能,注释结果如表 2 所示。

由表 2 可知,NR 注释到的功能基因数目最多,其次是 Pfam、COG、GO、Swiss-Prot 和 KEGG。其他的数据库注释到的功能基因数目较少,原因主要是数据库注释专一的功能基因。

2.3.1 NR、GO 功能分类

NR 数据库注释结果统计如图 3 所示,菌株 89-2-2 注释到的前两株菌均属于链霉菌属(*Streptomyces*),其中在链霉菌属(*Streptomyces* sp.)、链霉菌属(*Streptomyces*)中注释到的基因个数较多,分别为 4 683 个和 1 674 个,占比分别为 66.78%和 23.88%。

GO 注释包括 3 个方面的内容:生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)。

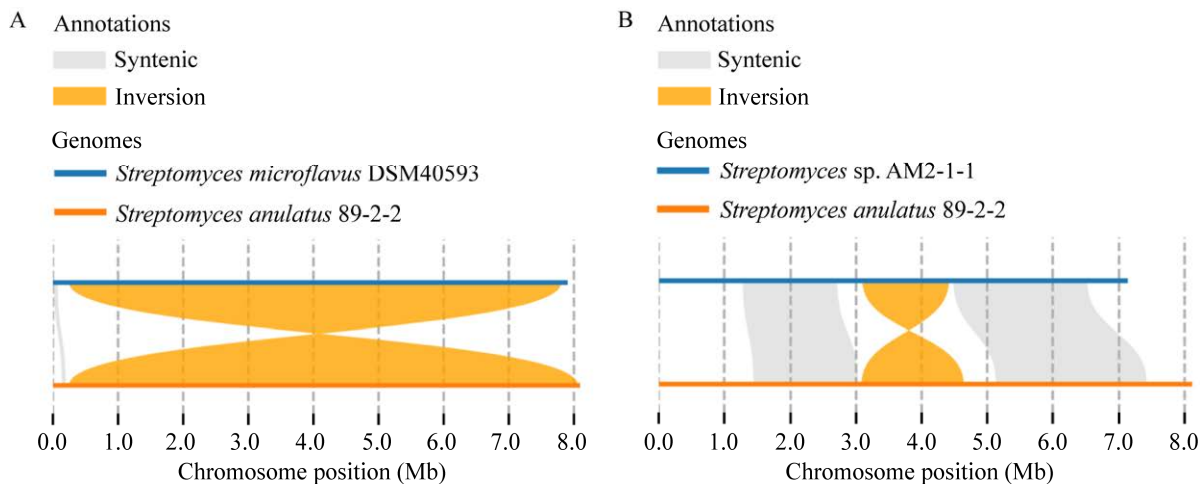


图 2 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 与 *Streptomyces microflavus* DSM40593 和 *Streptomyces* sp. AM2-1-1 的共线性分析 图中上轴表示参考序列基因组,下轴表示所测基因组。比对类型由上轴与下轴之间链接的图形颜色表示: Syntenic 为同线性比对, Inversion 为倒置比对

Figure 2 Collinearity analysis of *Streptomyces anulatus* 89-2-2 with *Streptomyces microflavus* DSM40593 and *Streptomyces* sp. AM2-1-1. The upper axis indicates the reference genome sequence and the lower axis indicates the determined genome sequence in the figure. The type of alignment is represented as the color of the connecting line between the upper and lower axes.

表 2 部分数据库注释功能基因个数统计表
Table 2 The statistics of annotated functional gene number from part of databases

数据库 Database	基因数 Gene number	100–300 bp 基因数 Number of genes with a length of 100–300 bp	大于 300 bp 基因数 Number of genes of >300 bp
COG	5 300	2 213	2 908
GO	4 716	1 931	2 594
KEGG	2 513	892	1 537
NR	7 013	3 101	3 384
Pfam	5 637	2 392	3 038
Swiss-Prot	3 430	1 147	2 200

菌株 89-2-2 共有 4 716 个基因具有 GO 注释功能,并分别归类到生物学过程的 15 个分支(占 40.6%)、分子功能的 11 个分支(占 29.7%)和细胞组分的 11 个分支(占 29.7%)(图 4)。在细胞组分中,参与细胞膜和细胞膜组分的基因占比较大,分别为 29.60%和 27.71%;在分子功能中,参与催化活性和结合的基因较多,分别为 57.74%和 42.54%;在生物学过程中,参与代谢过程和细胞过程以及单生物代谢过程的基因数量分别为

2 200、1 419、1 470 个,占比分别为 46.65%、30.09%、31.17%。

2.3.2 KEGG 代谢途径分析

菌株 89-2-2 有 2 513 个基因注释到 KEGG 数据库中,这些基因共参与 121 个代谢通路(图 5),其中涉及生命合成代谢且基因数高于 60 个的代谢通路有 ABC 转运蛋白(ko02010, 220 个基因)、氨基酸生物合成途径(ko01230, 154 个基因)、碳代谢(ko01200, 141 个基因)、群体感应(ko02024, 95 个基因)、嘌呤代谢(ko00230, 85 个基因)、双组分系统(ko02020, 69 个基因)、核糖体(ko03010, 61 个基因)。KEGG 富集分析显示碳水化合物代谢和氨基酸代谢的通路被注释到较多的基因,具有完整的糖酵解、TCA 循环和戊糖磷酸途径,以及 Gly、Ser、Thr、Phe、Val 等氨基酸的代谢途径,它们可以将环境中的蛋白质和糖类化合物分解代谢产生能量,供微生物生存。*Streptomyces anulatus* 89-2-2 中含有较多参与转运蛋白和双组分系统途径的基因,说明 *S. anulatus* 89-2-2 具有较复杂的次级代谢产物合成及其调控网络。

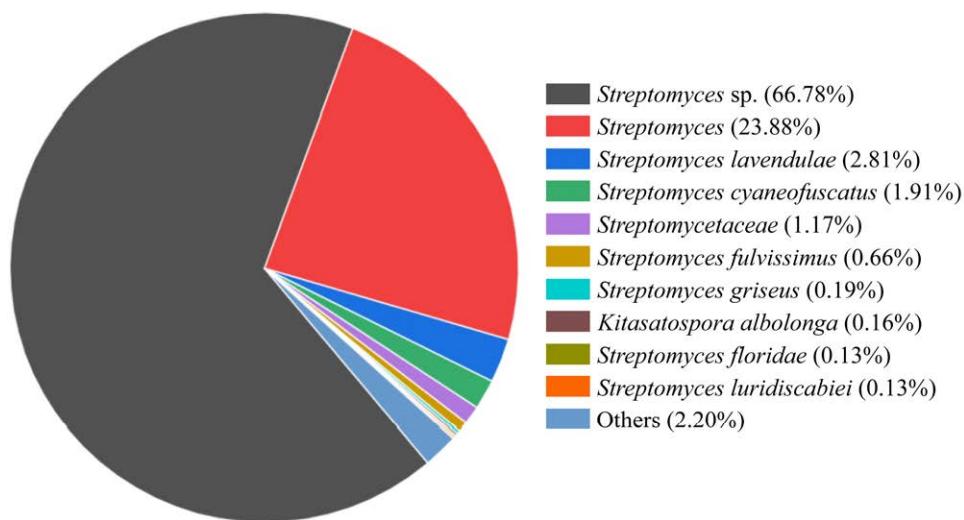


图 3 NR 数据库比对到序列的物种分布图

Figure 3 Map of species distribution from the NR database in relation to sequences.

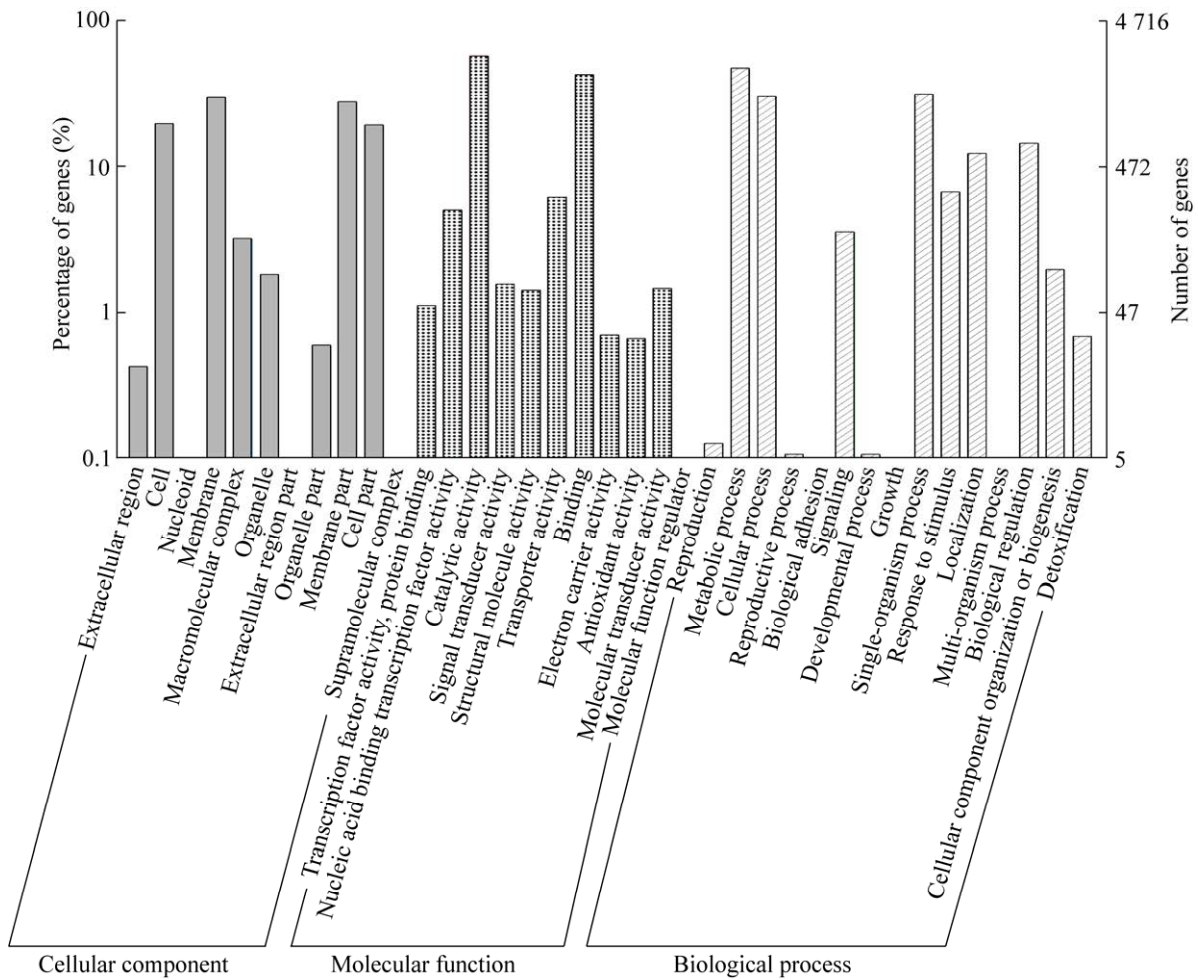


图 4 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 全基因组的 GO 功能分类

Figure 4 Gene annotation and functional classification in GO database of *Streptomyces anulatus* 89-2-2.

2.3.3 COG、Pfam、Swiss-Prot 数据库基因功能注释

为了看清 COG 数据库注释功能基因的信息和功能基因在基因组上的大体位置,使用 Circos 软件将功能基因注释结果及生物基因组以圈图的形式进行展示(图 6)。使用 BLAST 软件将 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 预测基因的蛋白序列与 COG 数据库进行比对,其中有 5 300 个基因具有 COG 注释功能。菌株 89-2-2 基因组中未知功能(function unknown)基因最多,共有 1 229 个,其次为一般功能预测(general function prediction only)、转录(transcription)、氨基酸转

运与代谢(amino acid transport and metabolism)的基因数量分别为 589、476 和 414 个。参与碳水化合物运输与代谢(carbohydrate transport and metabolism)、无机离子运输与代谢(inorganic ion transport and metabolism)、能量生产与转化(energy production and conversion)、信号转导机制(signal transduction mechanisms)的基因数量分别为 327、302、288 和 274 个。根据功能基因注释圈图可以清楚地看到编码区和功能基因在基因组上的大体位置。在 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 基因组的 1 500–1 750 kb 基因处有一个较大的编码基因簇,经 COG 数据库预测为次生

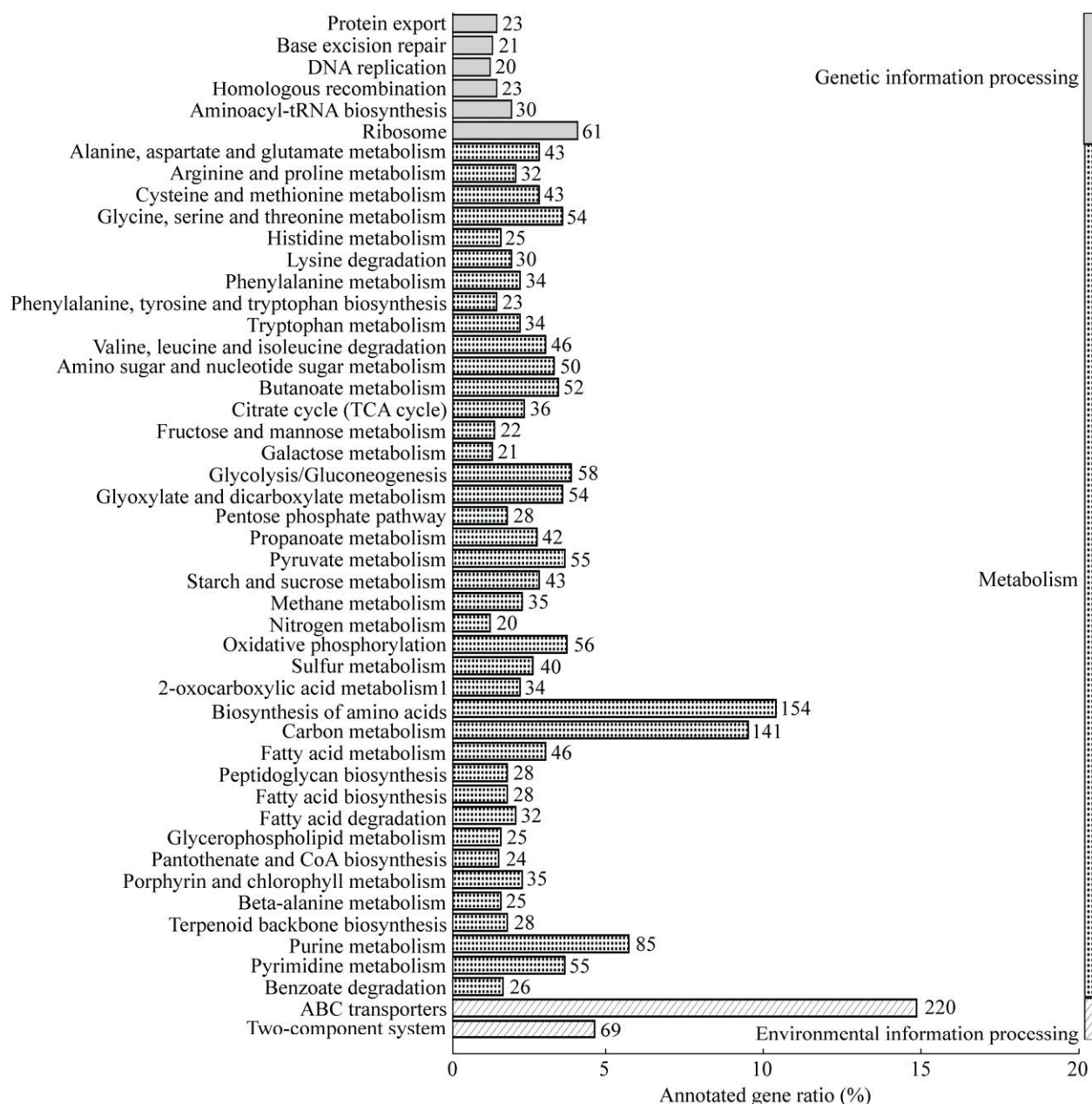


图5 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 基因组 KEGG 代谢通路分类图

Figure 5 KEGG classification map of metabolic pathways of *Streptomyces anulatus* 89-2-2 genome.

代谢产物合成、转运和代谢相关基因；KEGG 数据库在同样位置预测为萜烯生物合成基因簇；GO 数据库在差不多位置，预测为参与细胞组分，合成大分子复合物的基因。*S. anulatus* 89-2-2 基因组中参与未知功能蛋白的编码基因最多，占基因组编码蛋白基因总数的 17.34%，

表明菌株 89-2-2 具有合成多种功能独特的蛋白质的潜力。

Pfam 数据库是一种包含注释信息和多序列比对信息的蛋白家族数据库，提供了较为完整和精确的蛋白家族和功能域的分类信息，可以更好地检测到较远的同源蛋白；Swiss-Prot

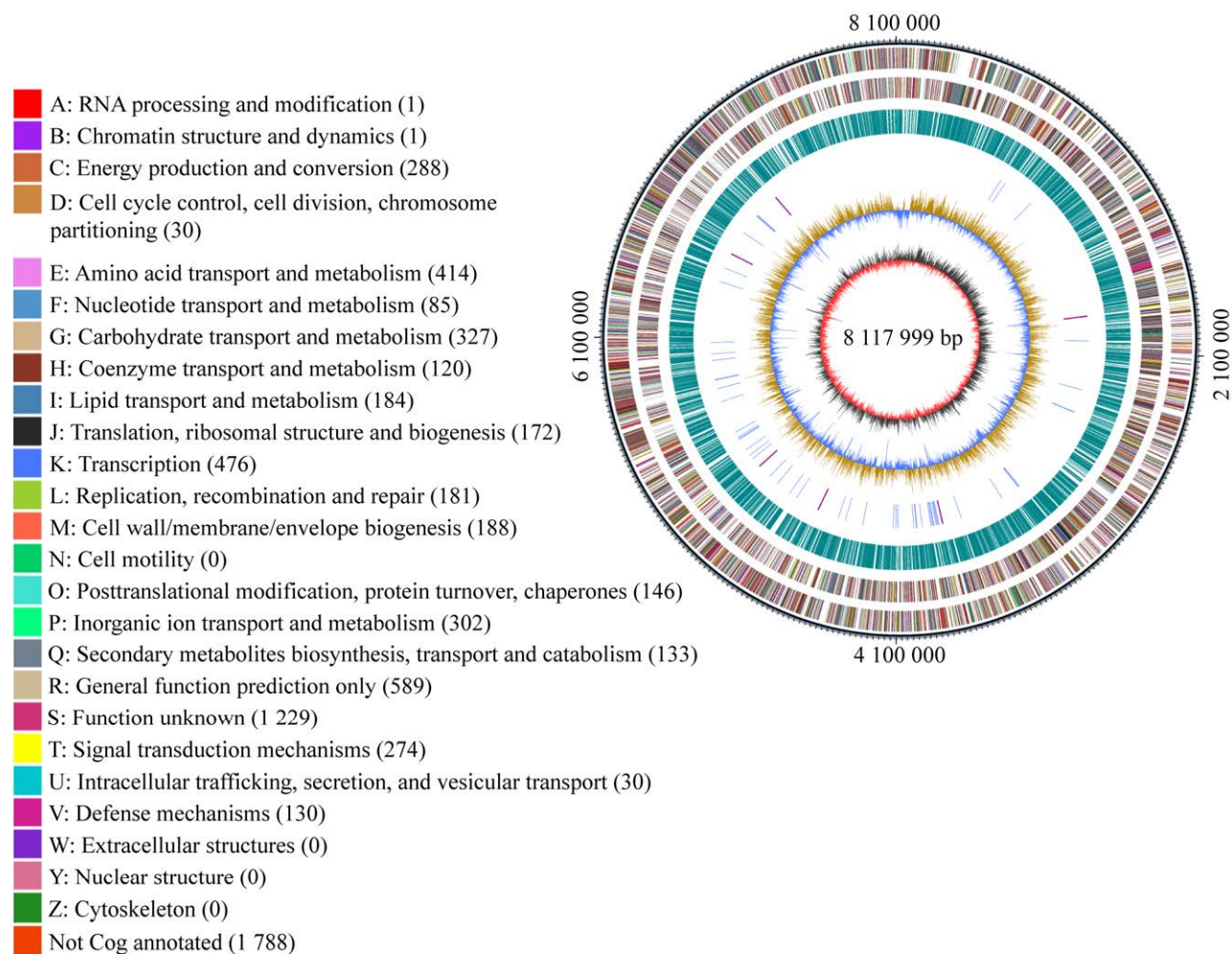


图 6 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 的全基因组注释圈图 基因组注释圈图由内到外圆圈对应的信息依次为 G+C 偏移, 红色代表 C 含量大于 G 的区域, 深灰色代表 G 含量大于 C 的区域; 第 2 圈是 G+C 含量, 蓝色部分表示该区域 G+C 含量低于基因组的平均 G+C 含量, 浅黄色部分则表示该区域 G+C 含量高于基因组的平均 G+C 含量, 峰值越高则与平均 G+C 含量差异越大; 第 3 圈是非编码 RNA, 紫色是 rRNA, 蓝色为 tRNA; 第 4 圈是重复序列; 第 5、6 圈分别为基因组正链和负链上的基因信息, COG 功能分类用不同的颜色代表; 最外圈为基因组大小的标示, 每个刻度为 5 kb

Figure 6 Genome annotation circle diagram of *Streptomyces anulatus* 89-2-2. The tracks from the inside to the outside were the gene information in turn as G+C-skew, the red indicates the zone where the C content is higher than G, the dark grey indicates the zone where the G content is higher than C; The second circle is the G+C content, blue represents that the G+C content of the zone is less than the average G+C content of the genome, light yellow represents that the G+C content of the zone is greater than the average, with the higher the peak value the greater the difference with the average G+C content; The third circle is non-coding RNA, purple means rRNA and blue means tRNA; The fourth circle is the repeat sequence; The fifth and sixth circles are the positive and negative strands genes, different colors indicate different COG function classifications; The outermost circle indicates the genome size, and each scale is 5 kb.

数据库是一个人工注释的非冗余高质量蛋白序列数据库,具有注释结果有相应实验验证、可靠性较高的特点。*Streptomyces anulatus* 89-2-2 在 Pfam 数据库和 Swiss-Prot 数据库分别获得有意义的注释基因 5 637 个和 3 430 个。

2.4 专有数据库注释及蛋白亚细胞定位分析

通过 CAZy 数据库获得糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)、糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)、多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)、辅助氧化还原酶(auxiliary activity, AA)和非催化的结合碳水化合物的功能域(carbohydrate-binding module, CBM)这六类功能类的功能蛋白注释结果,共注释到 332 个碳水化合物酶蛋白序列,其中糖苷水解酶类数量为 108 个,占比最大,非催化的结合碳水化合物的功能域次之,占比 21.98%,多糖裂解酶占比最小,为 0.90% (图 7)。将基因组的所有蛋白序列与 TCDB、PHI-base、VFDB、CARD 数据库进行比对,最终获得 1 609 个转运蛋白、2 093 个病原体宿主相互作用蛋白和 1 187 个毒力因子蛋白,但暂未发现抗生素抗性基因相关

的信息。使用软件 SignalP、TMHMM 对菌株 89-2-2 进行蛋白亚细胞定位分析,共预测到 705 个信号肽、1 725 个跨膜蛋白和 333 个分泌蛋白。

2.5 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 次级代谢产物合成基因簇预测分析

经 antiSMASH v7.0 软件预测,*Streptomyces anulatus* 89-2-2 基因组中含有 34 个次级代谢产物合成基因簇(表 3),分别为 7 个核糖体合成和翻译后修饰多肽(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs)类基因簇、4 个聚酮合成酶(polyketide synthases, PKS)类基因簇、5 个萜烯(terpene)类化合物合成基因簇、4 个非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)类基因簇、3 个 PKS-NRPS 类合成基因簇、2 个丁内酯(butyrolactone)合成基因簇、1 个四氢嘧啶(ectoine)类合成基因簇。其余 8 个基因簇被预测为 LAP [linear azol(in)e-containing peptides]、NRPS-RiPPs、NRPS-betalactone、PKS-oligosaccharide、LAP-RiPPs、NRPS-PKS-RiPPs-LAP-RREcontaining、NI-siderophore、RiPPs-NI-siderophore 类合成基因簇。与基因簇 4、5、6、10、16、18、22、25、

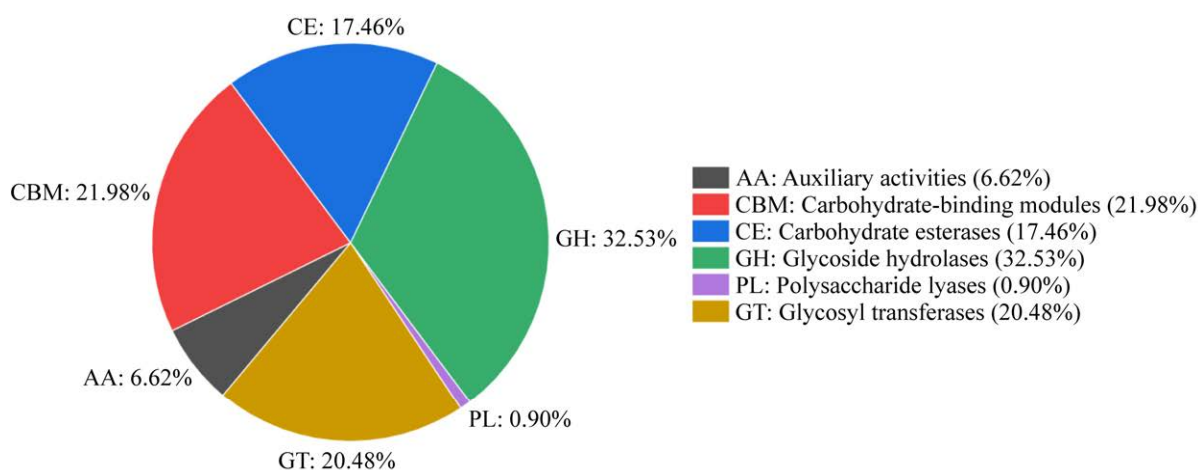


图 7 碳水化合物酶分布比例图

Figure 7 The distribution proportion diagram of carbohydrate enzyme.

表 3 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 次级代谢产物合成基因簇Table 3 The gene clusters for the biosynthesis of secondary metabolites in the genome of *Streptomyces anulatus* 89-2-2

区域编号 Region No.	基因簇类型 Gene cluster type	起始位置 Start site	终止位置 End site	推测产物 Predicted product	相似度 Similarity (%)
1	NRPS	3	47 834	—	—
2	LAP	60 346	81 408	—	—
3	NRPS-PKS-RiPPs-thiopeptide-LAP-RREcontaining	87 889	136 411	Lactazole	33
4	Terpene	150 402	173 685	Isorenieratene	100
5	NRPS-PKS	248 321	352 393	Alkylresorcinol	100
6	PKS-melanin	384 669	392 427	Melanin	100
7	RiPPs-NRPS	396 989	458 890	Valinomycin	91
8	NRPS	528 221	593 845	Crochelin A	12
9	RiPPs	640 376	648 733	Tetronasin	3
10	PKS-NRPS	667 687	715 805	10-epi-HSAF	100
11	Terpene	808 982	835 188	Hopene	69
12	RiPPs-lanthipeptide	917 241	941 280	Deoxyhangtaimycin	2
13	Butyrolactone	1 071 863	1 080 726	—	—
14	NI-siderophore	1 786 824	1 799 648	Schizokinen	25
15	Terpene	2 218 079	2 235 535	—	—
16	RiPPs-lanthipeptide	2 622 310	2 643 059	AmfS	100
17	RiPPs	2 790 255	2 798 286	Hexacosalactone A	4
18	RiPPs-lassopeptide	3 576 011	3 597 951	SRO15-2005	100
19	PKS	4 377 450	4 443 300	Lavendiol	32
20	PKS-melanin	4 769 733	4 778 662	Grixazone A	61
21	RiPPs-thiopeptide-LAP	4 981 303	5 015 829	—	—
22	RiPPs-lanthipeptide-NI-side rophore	5 409 162	5 440 662	Desferrioxamin B	100
23	RiPPs-lanthipeptide	5 530 735	5 562 127	—	—
24	PKS-oligosaccharide	5 596 766	5 669 326	Saquayamycin A	60
25	RiPPs-lassopeptide	6 190 724	6 213 262	Albusnodin	100
26	Ectoine	6 617 831	6 628 229	Ectoine	100
27	Terpene	7 082 534	7 101 765	Steffimycin D	19
28	NRPS	7 113 842	7 157 184	Griseusin	5
29	NRPS-betalactone	7 646 309	7 692 942	Lasalocid	3
30	PKS	7 694 674	7 735 792	Naringenin	100
31	NRPS-PKS	7 781 678	7 837 716	Coelichelin	81
32	NRPS	7 863 890	7 918 918	Griseobactin	100
33	Terpene	7 963 470	7 985 683	Geosmin	100
34	Butyrolactone	8 013 495	8 024 382	Coelimycin P1	16

—: 预测到的无相似性的基因簇

-: No similar gene cluster predicted.

26、30、32、33 相似的基因簇分别为异戊烯(isorenieratene)、烷基间苯二酚(alkylresorcinol)、黑色素(melanin)、10-*epi*-HSAF、AmfS、SRO15-2005、去铁胺素(desferrioxamin) B、albusnodin、依克多因(ectoine)、柚皮素(naringenin)、灰杆菌素(griseobactin)、土臭素(geosmin)的生物合成基因簇,相似度均为100%,占 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 总基因簇数量的 35.29%,这些次级代谢产物合成基因簇示意图如图 8 所示。基因簇 7、11、20、24、31 分别与缬氨霉素(valinomycin)、禾烯(hopene)、格里沙宗(grixazone) A、萨夸霉素(saquayamycin) A 和柯利谢林(coelichelin)的生物合成基因簇有较高的相似性,相似度为 60%–91%,表明菌株 *S. anulatus* 89-2-2 可能具有合成铁载体、抗生素、抗氧化、抗癌、抗肿瘤、杀虫等多种生物活性物质的能力^[16-20]。11 个基因簇与已知化合物 lactazole、crochelin A、tetronein、deoxyhangtaimycin、schizokinen、hexacosalactone A、lavendiol、steffimycin D、griseusin、lasalocid、coelimycin 编码基因簇相似性较低(相似度小于

33%); 基因簇 1、2、13、15、21、23 的核心生物合成基因簇均未找到与之匹配度很高的已知生物合成基因簇,这些与数据库中基因簇序列无一致性的孤儿基因簇占 *S. anulatus* 89-2-2 总基因簇数量的 50%,表明菌株 89-2-2 具有产生结构新颖、功能独特的化合物的可能性。

2.6 已知的可能次级代谢产物土臭素抑制酪氨酸酶活性的评价

有人研究发现从星芒松虫草(*Scabiosa stellata*)中分离得到的两个双环烯醚萜类化合物对蘑菇酪氨酸酶活性具有抑制作用^[21]。antiSMASH 预测显示菌株 89-2-2 含有萜烯类化合物土臭素(geosmin)的编码基因簇。为了验证基因组分析的结果,配制 0.11、0.22、0.42、0.603、0.767、0.933 和 1.097 mmol/L 的土臭素溶液,以曲酸为阳性对照,用 L-多巴速率氧化法测定土臭素对酪氨酸酶活性的影响。结果表明,土臭素具有中等程度的酪氨酸酶抑制活性,1.097 mmol/L 土臭素对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制率为 61.81%, IC_{50} 值为 0.876 mmol/L,土臭素对蘑菇酪氨酸酶活性的抑制曲线图见图 9。

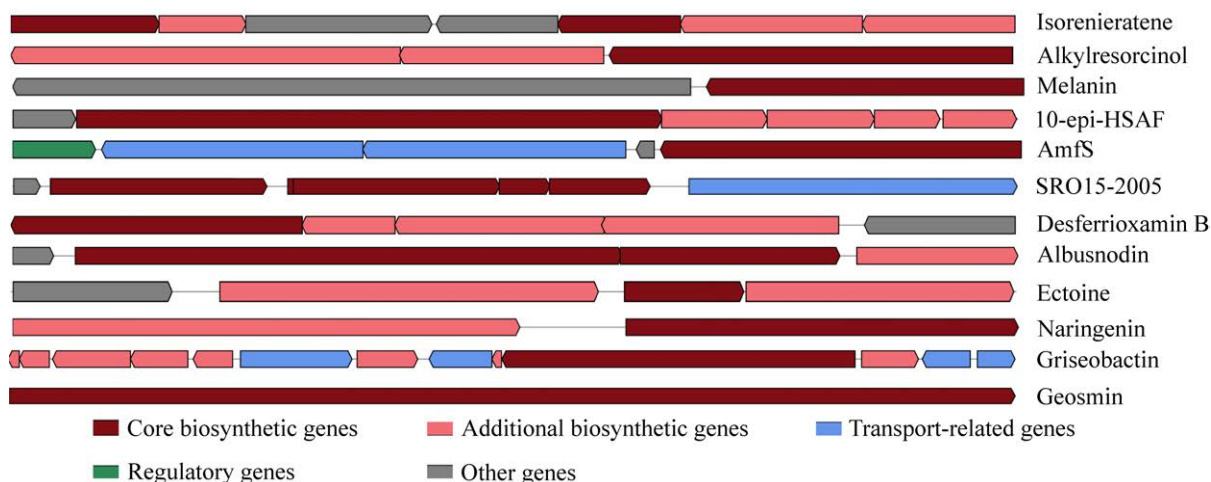


图 8 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 中已知的次级代谢产物合成基因簇

Figure 8 Gene clusters for the biosynthesis of the known secondary metabolites in the genome of *Streptomyces anulatus* 89-2-2.

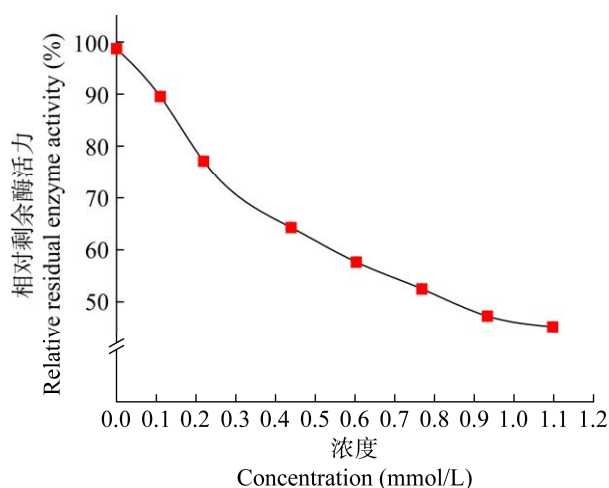


图9 土臭素对蘑菇酪氨酸酶活性的影响

Figure 9 Effect of geosmin on activity of tyrosinase.

3 讨论与结论

链霉菌产生活性化合物的能力使其成为原核生物中被探索较多的微生物之一。链霉菌可在土壤、石灰岩、淡水、海水、火山、沙漠、动植物体内等不同生境中生存，链霉菌属的菌株具有强大的代谢能力，能够较好地适应多变的环境^[22]；其庞大的转运蛋白系统承担着信号交换、营养物质吸收等一系列重要的生理活动；丰富的次级代谢产物基因簇可能有助于提高链霉菌在环境中的生存竞争和自我防御能力。*Streptomyces anulatus* 89-2-2 是我们课题组从新疆罗布泊盐湖土壤中分离得到的一株具有抑制酪氨酸酶活性和黑色素合成活性的链霉菌。目前，有关链霉菌产生酪氨酸酶抑制剂或黑色素生物合成抑制剂的研究报道较少。Nakashim 等从 *Streptomyces roseililacinus* NBRC 12815 的代谢产物中分离得到化合物 12815A (IC_{50} 为 9 $\mu\text{mol/L}$)和 12815B (IC_{50} 为 1 086 $\mu\text{mol/L}$)，其中 12815A 具有较强的酪氨酸酶抑制活性^[23]。*Streptomyces hirosimensis* TI-C3 代谢产物可抑制酪氨酸酶活性^[24]。Ishihara 等从克拉维链霉菌

(*Streptomyces claviver*) N924-2 发酵液中分离到促黑素抑制素，可抑制 B16 黑色素瘤细胞中黑色素生成 ($IC_{50}>703.34 \mu\text{mol/L}$)^[25]。Komiyama 等^[26]从 *Streptomyces* sp. OH-3984 中分离到 3 个化合物 OH-3984 K1、OH-3984 K3 和白环菌素 K3，7.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 OH-3984 K1、3.8 $\mu\text{g/mL}$ 的 OH-3984 K3 及 15 $\mu\text{g/mL}$ 的白环菌素 K3 可有效抑制 B16 黑色素瘤细胞的黑色素生成，但是不抑制酪氨酸酶活性。Imae 等^[27]从秃裸链霉菌 (*Streptomyces calvus*) N924-1 发酵液中分离到非达霉素，可抑制比基尼链霉菌 NRRLB-1049 的黑色素生成和 B16 黑色素细胞增殖，但是对蘑菇酪氨酸酶无抑制活性。Arai 等^[28]报道 *Streptomyces* sp. KP-3052 产生安菲斯汀，抑制黑色素细胞的增殖 ($IC_{50}=6.8 \mu\text{mol/L}$)。陆群等^[29]对链霉菌 *Streptomyces* sp. H7264 的次级代谢产物进行分离得到 2 个黑色素生物合成抑制剂 H7264A 和 H7264B，经理化性质和光谱分析，它们与缩酚酸肽类化合物 enopeptin A 和 B 同质。目前，对产生酪氨酸酶抑制剂和黑色素合成抑制剂的链霉菌的分类、发酵、发酵产物的分离、结构鉴定及其他生物学活性的研究已有报道，但 *Streptomyces anulatus* 89-2-2 全基因组序列分析尚未见报道，本研究尝试从基因组学角度分析菌株 89-2-2 次级代谢产物抑制酪氨酸酶活性的机制并预测其是否具有合成新型次级代谢产物的潜力。

S. anulatus 89-2-2 全基因组序列的测定结果显示该菌株的基因组总长度为 8 117 999 bp，G+C 含量为 71.52%，包含预测编码蛋白基因 7 088 个。菌株 89-2-2 与同种的模式菌株 *Streptomyces anulatus* 的 16S rRNA 基因相似性最高为 99.9%，平均核苷酸一致性(ANI 值)高达 95.3%，因此将菌株 89-2-2 命名为 *Streptomyces anulatus* 89-2-2。本研究通过对基因组进行功能

注释和比较基因组学分析,发现 *S. anulatus* 89-2-2 基因组与另外两株链霉菌(*S. microflavus* DSM40593 和 *Streptomyces* sp. AM2-1-1)的基因组都存在一些未比对到的区域,表明各菌株有自身的特异性。全基因组系统发育树分析表明菌株 89-2-2 和菌株 AM2-1-1 具有更近的亲缘关系,NCBI 数据库中菌株 AM2-1-1 的基因组信息里显示,菌株 AM2-1-1 分离于昆虫,而菌株 89-2-2 分离于高盐碱土壤,生存环境对链霉菌的遗传进化具有一定影响,菌株 89-2-2 可能通过基因水平转移或定向进化在局部区域扩充基因以增加新功能,更好地适应高盐、高温等不利环境。此外,*S. anulatus* 89-2-2 基因组中预测存在 34 个次级代谢产物合成基因簇,与已经报道的基因簇相似性分析发现,菌株 89-2-2 合成萜烯、以黑色素为代表的聚酮类化合物、铁载体、以缬氨霉素为代表的非核糖体多肽类抗生素等多种天然产物,而且这些潜在的次级代谢产物具有抗氧化、抗菌、抗癌等特性^[30-32]。菌株 89-2-2 基因组中还发现 5 个萜烯类化合物合成基因簇,采用 L-多巴速率氧化法测定该菌株可能产生的已知萜烯类化合物土臭素对蘑菇酪氨酸酶抑制活性的 IC_{50} 值为 0.876 mmol/L,这可能是菌株 89-2-2 次级代谢产物抑制酪氨酸酶活性的机制之一。

S. anulatus 89-2-2 具有 50% 孤儿基因簇,它们与已经报道的基因簇相似度较低,有可能合成新型化合物。通过与 *S. microflavus* DSM40593、*Streptomyces* sp. AM2-1-1 两个菌株进行比较基因组学分析,结果反映出 *S. anulatus* 89-2-2 具有更多的未知功能编码基因待探索,其具有较高的研究价值。本研究首次分析了环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 89-2-2 全基因组学信息,为更深入地挖掘 *S. anulatus* 89-2-2 中具有酪氨酸酶抑制活性的化合物合成基因簇信息以

及后续的异源表达等遗传操作奠定了基础。此外,解析 *S. anulatus* 89-2-2 的全基因组特征、进一步研究该菌株的相关基因功能、分析相关沉默基因簇的激活状况,为菌株 89-2-2 中活性次级代谢产物的生物合成调控机制的研究提供参考。

REFERENCES

- [1] WATVE MG, TICKOO R, JOG MM, BHOLE BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?[J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(5): 386-390.
- [2] BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [3] DURAI PANDIYAN V, SASI AH, ISLAM VIH, VALANARASU M, IGNACIMUTHU S. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya[J]. Journal de Mycologie Médicale, 2010, 20(1): 15-20.
- [4] GEORGIOUSAKI K, TSAFANTAKIS N, GUMENI S, GONZALEZ I, MACKENZIE TA, REYES F, LAMBERT C, TROUGAKOS IP, GENILLOUD O, FOKIALAKIS N. Screening for tyrosinase inhibitors from actinomycetes; identification of trichostatin derivatives from *Streptomyces* sp. CA-129531 and scale up production in bioreactor[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2020, 30(6): 126952.
- [5] HOERLEIN G. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties[J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1994, 138: 73-145.
- [6] MOHAMED H, HASSANE A, RAWWAY M, EL-SAYED M, GOMAA AER, ABDUL-RAOUF U, SHAH AM, ABDELMOTAAL H, SONG YD. Antibacterial and cytotoxic potency of thermophilic *Streptomyces werraensis* MI-S.24-3 isolated from an Egyptian extreme environment[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(8): 4961-4972.
- [7] 王俊, 付建红, 王玉苗, 阮文伟, 聂慧林, 崔凤真. 一株罗布泊盐湖链霉菌的鉴定及其代谢产物对酪氨酸酶活性、黑色素生成的抑制效应[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(9): 1548-1556.
WANG J, FU JH, WANG YM, RUAN WW, NIE HL, CUI FZ. Identification of a *Streptomyces setonii* from

- Lop Nur and inhibition effects of its metabolites on tyrosinase activity and melanin synthesis[J]. Natural Product Research and Development, 2022, 34(9): 1548-1556 (in Chinese).
- [8] QIN L, WU Y, LIU YT, CHEN YM, ZHANG P. Dual effects of alpha-arbutin on monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109398.
- [9] WANG W, GAO Y, WANG WW, ZHANG JY, YIN JF, LE T, XUE JJ, ENGELHARDT UH, JIANG HY. Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured B16F10 cells compared with arbutins[J]. Antioxidants, 2022, 11(3): 502.
- [10] WANG ZJ, XIANG HJ, DONG PL, ZHANG TT, LU CC, JIN T, CHAI KY. Pegylated azelaic acid: synthesis, tyrosinase inhibitory activity, antibacterial activity and cytotoxic studies[J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1224: 129234.
- [11] BLEYL DWR. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs vol. 1 to 42. supplement 7.440 seiten. international agency for research on cancer, Lyon 1987. preis: 65, -s.Fr[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 33(5): 462-462.
- [12] FUJIMOTO N, ONODERA H, MITSUMORI K, TAMURA T, MARUYAMA S, ITO A. Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by kojic acid in F344 rats[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(8): 1567-1572.
- [13] PILLAIYAR T, MANICKAM M, NAMASIVAYAM V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2017, 32(1): 403-425.
- [14] 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.
- [15] 付建红, 祁瑞, 郑静, 周晨婕, 陈清西. 新疆天山花楸黄酮类物质对酪氨酸酶的抑制机制[J]. 生物加工过程, 2015, 13(4): 63-67.
- FU JH, QI R, ZHENG J, ZHOU CJ, CHEN QX. Inhibition of mushroom tyrosinase by flavonoid from *Sorbus tianschanica* Ruper in Xinjiang[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2015, 13(4): 63-67 (in Chinese).
- [16] HUANG SH, LIU YS, LIU WQ, NEUBAUER P, LI J. The nonribosomal peptide valinomycin: from discovery to bioactivity and biosynthesis[J]. Microorganisms, 2021, 9(4): 780.
- [17] LIU Z, ZHANG YN, SUN JN, HUANG WC, XUE CH, MAO XZ. A novel soluble squalene-hopene cyclase and its application in efficient synthesis of hopene[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 426.
- [18] OHNISHI Y, FURUSHO Y, HIGASHI T, CHUN HK, FURIHATA K, SAKUDA S, HORINOUCHE S. Structures of grixazone A and B, A-factor-dependent yellow pigments produced under phosphate depletion by *Streptomyces griseus*[J]. The Journal of Antibiotics, 2004, 57(3): 218-223.
- [19] UCHIDA T, IMOTO M, WATANABE Y, MIURA K, DOBASHI T, MATSUDA N, SAWA T, NAGANAWA H, HAMADA M, TAKEUCHI T. Saquayamycins, new aquayamycin-group antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 1985, 38(9): 1171-1181.
- [20] CHALLIS GL, RAVEL J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 187(2): 111-114.
- [21] LEHBILI M, ALABDUL MAGID A, HUBERT J, KABOUCHE A, VOUTQUENNE-NAZABADIOKO L, RENAULT JH, NUZILLARD JM, MORJANI H, ABEDINI A, GANGLOFF SC, KABOUCHE Z. Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities[J]. Fitoterapia, 2018, 125: 41-48.
- [22] SELIM MSM, ABDELHAMID SA, MOHAMED SS. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes[J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2021, 19(1): 72.
- [23] NAKASHIMA T, ANZAI K, KUWAHARA N, KOMAKI H, MIYADOH S, HARAYAMA S, TIANERO MDB, TANAKA J, KANAMOTO A, ANDO K. Physicochemical characters of a tyrosinase inhibitor produced by *Streptomyces roseolilacinus* NBRC 12815[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32(5): 832-836.
- [24] CHANG TS, TSENG M, DING HY, TAI SSK. Isolation and characterization of *Streptomyces hiroshimensis* strain TI-C3 with anti-tyrosinase

- activity[J]. *Journal of Cosmetic Science*, 2008, 59(1): 33-40.
- [25] ISHIHARA Y, OKA M, TSUNAKAWA M, TOMITA K, HATORI M, YAMAMOTO H, KAMEI H, MIYAKI T, KONISHI M, OKI T. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(1): 25-32.
- [26] KOMIYAMA K, TAKAMATSU S, TAKAHASHI Y, SHINOSE M, HAYASHI M, TANAKA H, IWAI Y, OMURA S, IMOKAWA G. New inhibitors of melanogenesis, OH'3984 K1 and K2. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological characteristics[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1993, 46(10): 1520-1525.
- [27] IMAE K, KAMACHI H, YAMASHITA H, OKITA T, OKUYAMA S, TSUNO T, YAMASAKI T, SAWADA Y, OHBAYASHI M, NAITO T. Synthesis, stereochemistry, and biological properties of the depigmenting agents, melanostatin, feldamycin and analogs[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1991, 44(1): 76-85.
- [28] ARAI N, SHIOMI K, TAKAMATSU S, KOMIYAMA K, SHINOSE M, TAKAHASHI Y, TANAKA Y, IWAI Y, LIU JR, OMURA S. Amphistin, a new melanogenesis inhibitor, produced by an actinomycete[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1997, 50(10): 808-814.
- [29] 陆群, 田敏, 刘瑜, 俞朵. 微生物来源的黑色素生物合成抑制剂 H7264 A 和 B 的分离和鉴别[J]. *中国抗生素杂志*, 2002, 27(7): 385-386, 405.
- LU Q, TIAN M, LIU Y, YU D. Isolation and structure elucidation of melanin biosynthesis inhibitors H7264 A and B[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2002, 27(7): 385-386, 405 (in Chinese).
- [30] CORDERO RJB, CASADEVALL A. Melanin[J]. *Current Biology*, 2020, 30(4): R142-R143.
- [31] CHEN YS, ZHOU YF, CHEN M, XIE BJ, YANG JF, CHEN JG, SUN ZD. Isorenieratene interaction with human serum albumin: multi-spectroscopic analyses and docking simulation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 393-399.
- [32] SOYBIR GR, KOYUNCU H, KÖKSOY F, YALÇIN O, OZŞEKER A, ALATLI C, TOPUZLU C. Protective effect of desferrioxamin against TPA caused inflammation in CD-1 mouse skin[J]. *Surgical Oncology*, 1996, 5(5/6): 253-258.