

铵离子对梅岭霉素生物合成的调控效应

王 平 庄英萍 储 炬 张嗣良*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要 通过考察不同浓度的硫酸铵对梅岭霉素生物合成的影响,证实在低浓度下,硫酸铵可以促进梅岭霉素的生物合成,当其浓度大于 5mmol/L 时,菌丝生长和产物合成均受到抑制,而耗糖速率却随着铵离子的浓度增大而增大。在此基础上,进一步测定了与梅岭霉素生物合成和糖代谢过程密切相关的 6 种酶的活性变化,结果表明较高浓度的铵离子对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、柠檬酸合成酶、琥珀酸脱氢酶以及脂肪酸合成酶的活性均表现出一定的促进作用,而对缬氨酸脱氢酶和甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶的活性进行抑制,由此产生的结果一方面是 HMP 途径和 TCA 循环得到了加强,促进了菌体的初级代谢,另一方面则是梅岭霉素生物合成所需前体的来源受到限制,从而造成了梅岭霉素的低产。

关键词 梅岭霉素 铵离子 生物合成 酶活性

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)03-0405-05

梅岭霉素(Meilingmycin)是由南昌链霉菌(*Streptomyces nanchangensis*)产生的,具有十六元大环内酯结构的农用、兽用抗生素。它与当前国内外广泛使用的阿维菌素(Avermectin)和密尔比霉素(Milbemycin)具有相同的大环母核结构,而侧链结构不同。它也是由多种组分组成,其中 MB1 为其主要组分,其结构与国外报道的密尔比霉素 α_{11} 相同^[1],一般占总组分的 40% 以上。由于梅岭霉素具有高效、广谱的杀虫、驱虫生物学活性,在某些方面甚至优于阿维菌素^[2],因此是一种十分具有市场前景的亟待开发的新型生物农药。

由于梅岭霉素是一种新的抗生素,对其各方面的研究并不是很多。庄英萍等^[3]在对培养基配方进行优化的基础上,运用发酵过程参数相关分析的调控方法,使 MB1 效价达到了 520 μ g/mL 的较高水平。而孙宇晖^[4]则从基因的角度基本阐明了南昌链霉菌的有关生物合成基因簇结构,为进一步深入研究奠定了基础。最近,国外有关研究人员也发现了密尔比霉素 α_{11} (即梅岭霉素 MB1)拥有比产业化产品更好的生物学活性,因此也开始关注这个物质,并运用化学合成的方法对其进行了侧链的改造^[5]。

梅岭霉素作为一种大环内酯类抗生素,同其它同类抗生素相似,推测其内酯环也是由一个侧链脂肪酸 CoA 作为引物,依次接上 7 个丙二酰 CoA 和 5 个甲基丙二酰 CoA 单体,在聚酮合成酶的作用下头

尾缩合而形成^[6]。其整个生物合成过程会受到多种因素影响,其中氮源的供应在菌体生长和生产过程中起着至关重要的作用。有关铵离子对其它大环类抗生素如阿维菌素、泰乐菌素(Tylosin)等的影响已有较多报道^[7,8],但其对梅岭霉素生物合成的研究还处于空白。本文从铵离子对梅岭霉素生物合成影响入手,系统比较了与其生物合成密切相关的缬氨酸脱氢酶、甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、柠檬酸合成酶、琥珀酸脱氢酶以及脂肪酸合成酶的活性变化情况,阐述了铵离子对它们各自的作用机制,为更有效地进行发酵调控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 南昌链霉菌(*Streptomyces nanchangensis*) NS-6-10,由江西农业大学提供原始菌株,经本研究室多次诱变后获得。

1.1.2 主要试剂 乙酰 CoA、丙酰 CoA、丙二酰 CoA、NAD、NADP、NADPH、乳酸脱氢酶等均购自 Sigma 公司;冯来酰胺为 Fluka 产品;DTNB 及牛血清白蛋白为上海源聚生物科技有限公司进口分装。

1.1.3 培养基 斜面培养基为高氏一号培养基^[9];种子培养基每升中含有玉米粉 15g,淀粉 5g,黄豆饼粉 5g,酵母粉 0.5g, KH_2PO_4 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, NaCl 0.5g, CaCO_3 1g,消前 pH8.0;发酵培养基每升中含有

基金项目 国家“十五”科技攻关项目(2001BA708B07-05);上海市重点学科项目

* 通讯作者。Tel 86-21-64253658;Fax 86-21-64253702;E-mail: siliangz@163.ecust.edu.cn

作者简介 王 平(1973-)男,内蒙古呼和浩特人,工程师,硕士研究生,主要从事微生物代谢调控及过程优化研究。E-mail: wangping5@126.com

收稿日期 2004-10-25,修回日期 2005-02-24

玉米粉 44g, 淀粉 34g, 黄豆饼粉 10g, K_2HPO_4 0.5g, KNO_3 0.7g, NaCl 0.5g, $CaCO_3$ 3g, 豆油 6g, 消前 pH8.0。

1.2 培养方法

1.2.1 斜面培养 将保存于冷冻甘油管中的孢子接到茄子瓶斜面, 32℃ 恒温培养 10d 后, 从中挑一个丰满的菌落转接到另一个茄子瓶斜面, 32℃ 培养 10d, 得到 F2 代。

1.2.2 种子培养 由 F2 代茄子瓶斜面挖块接入种子培养基, 32℃、220r/min 回转式摇床(偏心距 5cm)培养 30h。

1.2.3 发酵培养 将种子液接入发酵培养基, 接种量 10%, 30℃, 220r/min 摇床培养 200h, 中间每天取样检测相关参数。每个配方 3 个平行样。将平行样混合进行预处理后的每个样品重复测定 3 次, 取其平均值, 误差最大不超过 5%。

1.3 无细胞粗提液的制备

4℃ 冷冻离心(4000r/min, 5min)收集菌体, 用冷的无菌生理盐水清洗两次后, 悬浮于 5mL PED 缓冲液(内含 75mmol/L KH_2PO_4 , 1mmol/L EDTA, 2mmol/L 二硫苏糖醇, pH7.0)中, 冰浴中用超声破碎仪(KS-250 型)破碎 150s, 4℃、12000r/min 离心 30min, 取上清液置 -85℃ 冰箱保存备用。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生长量测定 采用核酸紫外吸收法^[10]。

1.4.2 总糖测定 采用 DNS 法^[11]。

1.4.3 梅岭霉素含量测定 采用 HPLC 法。Agilent 1100 液相色谱仪, 配备 G1314A 紫外可见波长检测器, 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C8(5 μ m, 4.6mm × 150mm), 流动相 乙腈-水(75:25, V/V), 流速 1.2mL/min, 检测波长 238nm, 柱温 30℃。

1.4.4 酶活力测定 缬氨酸脱氢酶、甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、柠檬酸合成酶、琥珀酸脱氢酶和脂肪酸合成酶测定及酶活单位的定义分别按文献[12~17]的方法进行, 比活力用每毫克蛋白中所含酶活单位表示。采用 UNICO UV-2102PC 型分光光度计实时跟踪检测。蛋白质测定用考马斯亮蓝 G-250 法^[18], 以牛血清白蛋白作标准曲线。

2 结果和讨论

2.1 铵离子浓度对梅岭霉素生物合成的影响

在发酵培养基中分别加入不同浓度的硫酸铵, 使其最终浓度分别为 0, 2.5, 5, 7.5, 12.5, 20 和

25mmol/L, 培养 200h 后测定菌丝总核酸含量和梅岭霉素主要组分 MB1 的含量(图 1-A)。结果显示, 当硫酸铵浓度小于 5mmol/L 时, 硫酸铵可以明显促进梅岭霉素的生物合成, 浓度为 5mmol/L 时梅岭霉素产量最高, 而当硫酸铵浓度大于 5mmol/L 时, 梅岭霉素的合成则被抑制, 产量急剧下降; 达到 25mmol/L 时, 梅岭霉素的合成量几乎为零。与此相对应的表征菌丝量的总核酸在 5mmol/L 时达到其最大值。

随着铵离子浓度的升高, 虽然菌体生长受到明显抑制, 但耗糖却随铵离子浓度增大而一直增大(图 1-B)。由于耗糖量不断增大, 由此产生大量的酸性中间产物^[19], 如丙酮酸和 TCA 中的各种物质, 造成发酵液 pH 降低, 当糖耗尽时, pH 大幅度回升。表明硫酸铵能够极大地促进菌体的初级代谢, 且在实验范围内随着铵离子浓度的增加初级代谢增强。

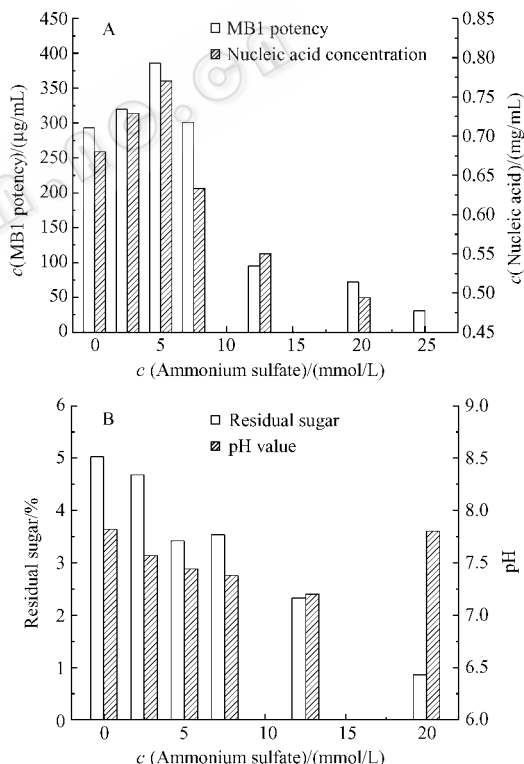


图 1 (A) 不同浓度的硫酸铵对菌丝生长和梅岭霉素 MB1 生物合成的影响; (B) 培养 191h 后含不同浓度硫酸铵的培养基中的残糖及 pH 变化趋势

Fig.1 (A) Effect of ammonium sulfate concentration on mycelia growth and production of meilingmycin MB1; (B) The tendency of residual sugar and pH value in the flask (191h) with different ammonium sulfate concentration

2.2 铵离子对初级代谢和次级代谢过程中有关酶活性的影响

2.2.1 铵离子对缬氨酸脱氢酶(EC1.4.1.8)活性的影响 与其它大环内酯类抗生素相似, 梅岭霉素也是由短链脂肪酸单体经聚酮合成酶头尾缩合而成。由

于内酯环的形成是整个合成过程的关键步骤^[8],其合成前体乙酸和丙酸单元来源则显得十分关键。研究发现^[20],发酵过程中添加缬氨酸可明显提高大环内酯类抗生素的产量,缬氨酸代谢途径也是大环合成活性前体 2-甲基丙二酰 CoA 和丙酰 CoA 来源的主要途径之一,而且缬氨酸脱氢酶作为缬氨酸代谢途径的第一个酶,其活性与抗生素产量有很强的正相关关系,而氨基酸降解途径又可能是铵离子调控抗生素生物合成的靶点^[8]。因此,首先对梅岭霉素合成过程中的缬氨酸脱氢酶(简称 VDH)活性进行了测定。

VDH 活性变化曲线(图 2)显示,无论对照还是添加不同浓度的铵离子,VDH 均表现出在发酵前期的活力水平较高,而在中后期则一直维持较低状态,且在 50h 酶活力水平较高时,2.5mmol/L 和 5mmol/L 的硫酸铵可以增强酶的活力,当达到 7.5mmol/L 以上时,VDH 的活力受到抑制。这与梅岭霉素生物合成水平变化趋势是相吻合的。由此可见,铵离子直接参与了调控缬氨酸脱氢酶的活性,影响到大环合成前体是否充足。而且可以推断,经由缬氨酸代谢所生成的前体主要是在发酵前期完成的。

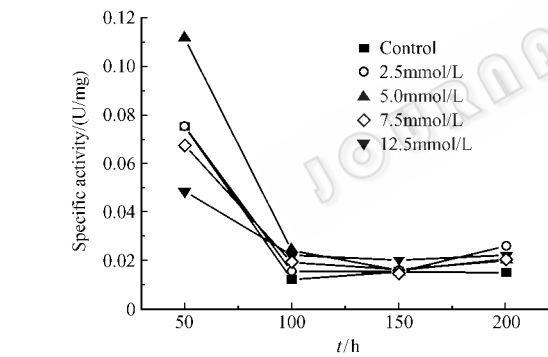


图 2 梅岭霉素发酵过程中不同硫酸铵浓度下 VDH 活性变化趋势

Fig.2 The tendency of VDH in the meilingmycin fermentation with different ammonium sulfate concentration

2.2.2 铵离子对甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶(EC2.1.3.1)活性的影响:甲基丙二酰 CoA 是梅岭霉素生物合成过程中的一个重要前体,其来源目前认为至少有 3 条途径^[21],它们分别是甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶、甲基丙二酰 CoA 变位酶和丙酰 CoA 羧化酶途径。其中前两个途径被认为在大环前体生物合成过程起主要作用^[21-22]。本实验对甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶(简称 MCT)的活性进行了测定。

图 3 显示的是 MB1 发酵水平较高(硫酸铵浓度为 5mmol/L)和水平很低(硫酸铵浓度为 12.5mmol/L)

两种配方时 MCT 活力随发酵时间的变化情况。

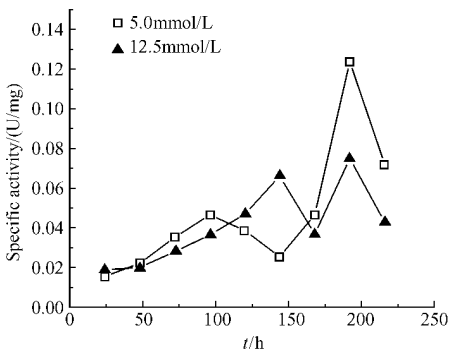


图 3 培养基中含 5mmol/L 和 12.5mmol/L 硫酸铵时 MCT 活性变化趋势

Fig.3 The tendency of MCT in the meilingmycin fermentation with 5mmol/L and 12.5mmol/L ammonium sulfate concentration

在两种情况下,MCT 的活性均表现出两个峰值。高产量配方的第一个峰值出现在 96h,第二个出现在 192h;而低产量配方第一个峰值推迟,出现在 144h,第二个也出现在 192h。在绝大多数时间内,铵离子高浓度配方其 MCT 活性相对较低,说明铵离子也对 MCT 有一定的抑制作用。在高浓度铵离子的情况下,酶活第一个峰值推迟出现,可能是由于铵离子极大地促进了菌体的初级代谢而延缓了其进入次级代谢的缘故。192h 酶活高峰的出现也反映了此时梅岭霉素生物合成处于高峰的实际情况。

2.2.3 铵离子对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性(EC1.1.1.49)的影响:在大环内酯类抗生素生物合成过程中,内酯环的合成需要消耗较多的 NADPH,若 NADPH 不足将会限制抗生素的合成。由于 NADPH 主要来源于 HMP 途径,该途径酶活性高低直接影响到 NADPH 是否充足。本实验对 HMP 途径的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性进行了测定(图 4)。

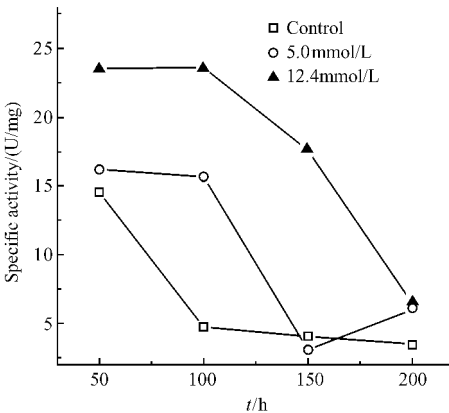


图 4 不同硫酸铵浓度下 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性变化趋势

Fig.4 The tendency of Glucose-6-Phosphate dehydrogenase in the meilingmycin fermentation with different ammonium sulfate concentration

6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性总体表现在前期和中期,而且铵离子对其活性有较大的促进作用。由于在低浓度铵离子的情况下 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活力较低,但梅岭霉素产量较高,而在中后期梅岭霉素合成高峰时 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活力却维持在较低状态,由此说明,梅岭霉素生物合成过程中, NADPH 供应是充足的,并非内酯环合成的限制性因素。而且在实验范围内,由于铵离子促进了 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性,使葡萄糖经由 HMP 途径的代谢增强,强化了菌体生长,这也是前文述及耗糖速率随铵离子浓度增大而增大在酶学水平上的一个解释。

2.2.4 铵离子对柠檬酸合成酶(EC4.1.3.7)和琥珀酸脱氢酶(EC1.3.5.1)活性的影响:柠檬酸合成酶(简称 CS)是 TCA 循环的关键酶,其活性的高低能够反映出 TCA 循环的强弱。而 TCA 循环中间产物琥珀酸的流向对于次级代谢至关重要。琥珀酸脱氢酶(简称 SDH)催化从琥珀酸生成延胡索酸的反应,如果酶活力高,则琥珀酸大多沿 TCA 生成其它中间体,相应的由琥珀酰 CoA 异构化产生大环合成前体 2-甲基丙二酰 CoA^[23] 的量将受到限制。

CS 的活性经历了一个先降后升的过程(图 5-A)。在发酵前期酶活较高,150h 左右到达低谷,随后出现上升趋势,且铵离子对 CS 的活性有一定的促进作用。SDH 活性基本上是在持续降低(图 5-B),铵离子也对其有较强促进作用。在 150 ~ 200h 时间内,CS 活性上升而 SDH 仍保持较低状态,反映出从琥珀酰 CoA 生成次级代谢前体甲基丙二酰 CoA 通量增加了,而且当硫酸铵浓度为 5mmol/L 时,在 150 ~ 200h 时间内,SDH 的活性处于最低状态而 CS 活性则有大幅上升,有可能为梅岭霉素合成提供了更加充足的前体物质,促进发酵水平进一步提高。

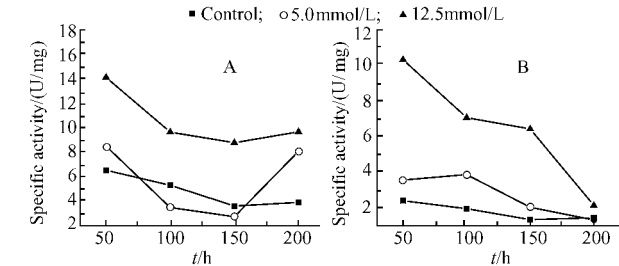


图5 不同硫酸铵浓度下柠檬酸合成酶(A);琥珀酸脱氢酶(B)活性变化趋势

Fig.5 The tendency of CS(A) and the tendency of SDH(B) in the meilingmycin fermentation with different ammonium sulfate concentration

2.2.5 铵离子对脂肪酸合成酶(EC2.3.1.85)活性的影响聚酮合成酶合成大环内酯的过程与长链脂

肪酸合成过程是相似的^[7],它们在数量与形成时间上有相关关系,并且竞争共同的酰基 CoA 前体物质。为了进一步明确前体物质的流向,本实验对 MB1 发酵水平较高(硫酸铵浓度为 5mmol/L)和水平很低(硫酸铵浓度为 12.5mmol/L)两种配方下的脂肪酸合成酶(简称 FAS)的活性也进行了测定。

在发酵过程中 FAS 的活性呈现 3 个峰值(图 6)。第一个出现在 24h 对数生长期,推测其主要用于菌体生长所必需的脂肪酸的生物合成;第二个出现在 80h 前后开始产素期;第三个则出现在发酵后期产素高峰期。后两个峰值的出现可能与前体累积所产生的诱导效应有关。从总体水平看,较高浓度的铵离子可以促进前期和后期 FAS 的活性,而发酵中期的酶活水平则互有上下。因此,在产素高峰期,由于高浓度铵离子使 FAS 的活性上升得更高,由此会合成更多的脂肪酸,大量分流了前体物质,造成梅岭霉素生物合成前体不足而导致低产。

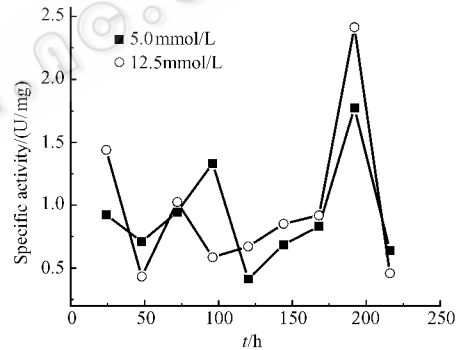


图6 培养基中含 5mmol/L 和 12.5mmol/L 硫酸铵时脂肪酸合成酶活性变化趋势

Fig.6 The tendency of FAS in the meilingmycin fermentation with 5mmol/L and 12.5mmol/L ammonium sulfate concentration

3 结论

铵离子对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、柠檬酸合成酶以及琥珀酸脱氢酶的活性均表现出一定的促进作用,因此,随着铵离子浓度的提高,与之相对应的 HMP 途径和 TCA 循环均得到了加强,糖耗水平也不断提高,极大地促进了南昌链霉菌的初级代谢,同时高浓度的铵离子又可以不同程度地抑制 VDH 和 MCT 的活性,使梅岭霉素内酯环合成所需的前体来源受到制约,这两个方面是导致低产的主要因素。而 FAS 合成脂肪酸与内酯环的合成竞争共同的前体,铵离子在一定程度上促进了 FAS 的活性,产生较多的脂肪酸而分流了前体,因此, FAS 的活力水平保持较低状态也是梅岭霉素高产的一个重要因素。

参 考 文 献

- [1] Takahashi S, Miyaoka H, Tanaka K, *et al.* Milbemycins α_{11} , α_{12} , α_{13} , α_{14} and α_{15} : a new family of milbemycins from *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties, *J Antibiotics*, 1993, **46**(9):1364 – 1371.
- [2] 陈 斌, 庄英萍, 储 炬, 等. 微生物发酵制备梅岭霉素. 精细与专用化学品, 2003, **1**:17 – 19.
- [3] 庄英萍, 陈 斌, 晏秋鸿, 等. 梅岭霉素发酵过程参数相关分析和优化. 中国抗生素杂志, 2004, **29**(1):1 – 3.
- [4] Sun Y, Zhou X, Tu G, *et al.* Identification of a gene cluster encoding meilingmycin biosynthesis among multiple polyketide synthase contigs isolated from *Streptomyces nanchangensis* NS3226. *Arch Microbiol*, 2003, **180**:101 – 107.
- [5] Tsukiyama T, Kisaki K, Tsukamoto Y, *et al.* Synthesis of novel 26-substituted milbemycin A4 derivatives and their acaricidal activities, *J Antibiotics*, 2004, **57**(7):446 – 455.
- [6] Ikeda H, Omura S. Control of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* for the selective production of a useful component. *J Antibiotics*, 1995, **48**(7):549 – 562.
- [7] Novák J, Hájek P, Rezanka T, *et al.* Nitrogen regulation of fatty acids and avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **93**:57 – 61.
- [8] Omura S, Tanaka Y, Mamada H, *et al.* Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J Antibiotics*, 1984, **37**(5):494 – 501.
- [9] 陈天寿主编. 微生物培养基的制造与应用. 北京:中国农业出版社, 1995:519.
- [10] 李树瑞, 谢幸珠, 胡章助, 等. 复合培养基中菌体浓度的测定研究—总核酸测定法. 华东化工学院学报, 1982, **2**:177 – 186.
- [11] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第二版). 北京:高等教育出版社, 1997, 1 – 3.
- [12] Vancura A, Vancurova I, Volc J, *et al.* Valine dehydrogenase from *Streptomyces fradiae*: purification and properties. *J General Microbiol*, 1988, **134**:3213 – 3219.
- [13] Vu-Trong K, Bhuwathanapun S, Gray P P. Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae*: regulatory role of adenylate nucleotide pool and enzymes involved in biosynthesis of tylosin precursors. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 1980, **17**:519 – 525.
- [14] Bergmeyer H U. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd ed. Florida Basel: Verlag Chemie. 1983(Vol. III),190.
- [15] 丁正同, 蒋雨平, 任惠民, 等. 小鼠慢性暴露于百草枯对其脑线粒体呼吸链复合酶活性的影响. 中国临床神经科学, 2003, **11**(3):243 – 246.
- [16] Dickie P, Weiner J H. Purification and characterization of membrane-bound fumarate reductase from anaerobically grown *Escherichia coli*. *Can J Biochem*, 1979, **57**:813 – 821.
- [17] 田维熙, 董 妍, 权 晖, 等. 不同生长期蛋鸡的体脂水平和肝脏脂肪酸合成酶活性的关系. 生物化学杂志, 1996, **12**(2):234 – 236.
- [18] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(下册). 北京:高等教育出版社, 2001, 34.
- [19] 张嗣良, 储 炬. 多尺度微生物过程优化. 北京:化学工业出版社, 2003, 100.
- [20] Tang L, Zhang Y X, Hutchinson C R. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursor for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriology*, 1994, **176**:6107 – 6119.
- [21] 张蔚文, 焦瑞身. 力复霉素前体甲基丙二酰 CoA 合成途径的研究. 微生物学报, 1996, **36**(4):276 – 283.
- [22] 廖福荣编写. 菜油对弗氏链霉菌甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶活性的影响. 国外医药-抗生素分册, 1999, **20**(5):220 – 222.
- [23] 卜晨光, 宫 衡. 豆油对红霉素生物合成的影响及作用机制分析. 华东理工大学学报, 2004, **30**(2):139 – 142.

Regulatory effects of ammonium ions on the biosynthesis of meilingmycin

WANG Ping ZHUANG Ying-ping CHU Ju ZHANG Si-liang*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Based on the effects of different ammonium sulfate concentrations on meilingmycin biosynthesis, the results show that lower concentration of ammonium ions stimulates the biosynthesis of meilingmycin, while the concentration of higher than 5mmol/L inhibits the mycelial growth and the biosynthesis of the products. However, the sugar consumption rate increases with the elevating concentration of ammonium sulfate. On this basis, six enzymes, which are greatly related to the meilingmycin biosynthesis and the glucose metabolism, were measured and analyzed during the meilingmycin fermentation process. The results suggest that glucose-6-phosphate dehydrogenase, citrate synthase, succinate dehydrogenase and fatty acid synthase are stimulated by higher concentration of ammonium ions, while valine dehydrogenase and methylmalonyl-CoA carboxyltransferase are inhibited. From the results it follows that ammonium ions favors primary metabolism, that is, the HMP passway and the TCA circle is enhanced, as well as the source of the precursors for the biosynthesis of meilingmycin is restricted, which bring about the lower production of meilingmycin.

Key words: Meilingmycin, Ammonium ion, Biosynthesis, Enzyme activity