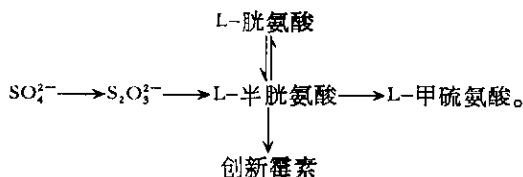


# 创新霉素分子中硫的生源研究

许津 马瑜 李元

(中国医学科学院药物研究所抗菌素室)

创新霉素产生菌——济南游动放线菌对天然含硫化合物的利用与微生物一般硫代谢的规律是一致的,即从



从 L-<sup>35</sup>S-胱氨酸掺入创新霉素的情况来看,可以认为创新霉素分子中噻嗪环的硫直接来自半胱氨酸的巯基。但在发酵过程中使用 L-胱氨酸作为前体,对于创新霉素的生物合成没有明显的刺激作用。

创新霉素是从我国土壤分离的济南游动放线菌所产生的抗革兰氏染色阴性细菌的新抗菌素。它的分子结构的母核是吡嗪噻嗪环。从有机化学的角度来看,这是一个新的杂环系统<sup>[1,2]</sup>。因此,该化合物中硫是经过什么生物合成的途径掺入到创新霉素分子中去的,值得进一步研究。本文研究了创新霉素分子中硫的生物来源,创新霉素产生菌利用含硫化合物的途径,以及该硫原子的直接前体。

## 材料和方法

### (一) 菌种

创新霉素产生菌——济南游动放线菌<sup>[3]</sup>,用冷冻干燥法保存,从冷冻干燥管接种到麦片斜面(内含麦片 6%,琼脂 2%)上,用第二代斜面进行试验。

### (二) 标记化合物

Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> 由中国科学院原子能研究所提供。

L-<sup>35</sup>S-胱氨酸盐酸盐 250 毫居里/毫克分子 Amersham 公司出品。

### (三) 创新霉素的发酵方法

种子培养基成份(%)：淀粉 3, 黄豆饼粉 1,

鱼粉 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.0001, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.2, CaCO<sub>3</sub> 0.5, 自来水配制, pH7.0—7.5。发酵培养基成份(%)：淀粉 5, 黄豆饼粉 1.5, 鱼粉 0.5, CaCO<sub>3</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.0001, 自来水配制, pH7.0—7.5。在发酵 24 小时,每瓶中加入 40 毫克色氨酸,作为吡嗪环的前体。

所有的试验均用 500 毫升三角瓶,内盛培养基 50 毫升。菌种在斜面培养基上生长 7 天,接种种子培养基,种龄 36—48 小时,再接种发酵培养基,接种量为 10%,于 28℃ 在旋转摇床(200 次/分,偏心距 2 厘米)上进行发酵培养。发酵时间根据具体试验的要求决定。

### (四) 创新霉素的化学测定

取定量发酵滤液,用 6N 盐酸酸化至 pH2—3,加入等体积乙酸乙酯抽提,离心,取上层液 1 毫升放在 50 毫升容量瓶中,在沸水浴中加热 5 分钟,除去溶媒,加入 0.25 毫升 2.5% 的对二甲氨基苯甲醛试剂和 0.1 毫升 2% NaNO<sub>2</sub> 溶液,立即加入 14 毫升浓盐酸(预先冰箱冷却),在 28℃ 水浴中放置 12 分钟,取出,用 50% 乙醇稀释到刻度,在 600 毫微米波长光下比色,根据光吸收的读数

本文于 1977 年 8 月 15 日收到。

计算创新霉素的含量。

(五) 创新霉素的分离与提纯

取一定体积创新霉素发酵滤液，酸化到 pH2，用等体积乙酸乙酯抽提，分出溶媒层，用酸性水洗一遍，再于 pH8—9 下用水抽提，分出水层，再酸化到 pH2，用乙酸乙酯抽提，分出溶媒层，加无水硫酸钠脱水，浓缩，经硅胶柱（青岛产 50—120 目，每柱装 5 克）层析，以甲醇：乙酸乙酯 = 1:9 扩展，收集洗脱液，洗脱液中创新霉素的含量用化学方法测定。洗脱液中具有放射活性的化合物用纸层析法进行分离。层析纸为新华快速型滤纸，溶媒系统：（1）苯：甲醇 = 4:1；滤纸用 0.5M pH7.0 磷酸缓冲液处理；（2）甲醇：3%NaCl 溶液 = 3:1，滤纸用 5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液处理。共扩展 30 厘米，层析后，在 Echo 同步定标器上计数，同时创新霉素用紫外光显迹，呈蓝氏荧光，或用 Ehrlich 试剂显色呈蓝色斑点。创新霉素在溶媒系统 I 中 R<sub>f</sub> 值为 0.00，在 II 中为 0.65。

(六) 放射活性计数方法

取上述洗脱液 0.3 毫升，铺于铝碟上，干后，在 Echo 定标器上用 GM-钟罩型计数管计数。标准品稀释到相当的倍数计数。

结果与讨论

一、用同位素稀释法确定创新霉素分子中硫的生物来源

为了确定创新霉素分子中硫的生物来源

源及其与微生物硫代谢的关系，首先观察了几种含硫化合物稀释 Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> 掺入创新霉素分子的情况。在每瓶发酵培养基中加入 22 微居里 Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub>，于 30 小时取出一瓶作为空白样品，其余分为五组：1. 对照组；2. 加 0.05% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；3. 加 0.087% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>；4. 加 0.042% L-胱氨酸；5. 加 0.052% L-甲硫氨酸。加后再继续培养 16 小时，然后全部取出，过滤，滤液经溶媒抽提和硅胶柱层析，得到提纯的洗脱液，测定洗脱液中创新霉素的含量和洗脱液的放射活性，并进行纸层析观察放射活性化合物在纸层谱上分布情况。

测定结果如表 1 和图 1。从图 1 看出，在洗脱液中，具有放射活性的化合物只有创新霉素一种。从表 1 可见，所试验的几种含硫化合物中，以 L-胱氨酸稀释 <sup>35</sup>S 掺入创新霉素的能力最强，S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> 次之，L-甲硫氨酸的作用当不及 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>，说明 L-甲硫氨酸并不是创新霉素的硫原子的前体。创新霉素产生菌对各种含硫化合物的利用途径可写成：

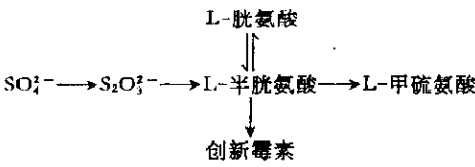


表 1 几种含硫化合物对 <sup>35</sup>S-Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 掺入创新霉素分子的稀释作用

	发 酵 液			洗 脱 液			样品放射活性 (脉冲数/分)	滤液中加入的总活性 (脉冲数/分)	滤液中创新霉素总活性 (脉冲数/分)	掺入率 (%)	加入前体后的掺入率 (样品掺入率减空白掺入率)	<sup>35</sup> S 掺入率被降低的百分数
	体积 (毫升)	效价 单位/毫升	总效价	体积 (毫升)	效价 单位/毫升	总效价						
空白组 (未加前体)	45	31	1395	25	46	1150	458	2407500	46035	1.91		
对照组	61	165	10065	30	192	5760	1438	3263500	251625	7.71	5.80	
加SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 组	39	150	5850	30	96	2880	550	2086500	111150	5.32	3.41	40
加S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 组	61	170	10370	30	199	5970	984	3263500	165920	5.08	3.17	45
加 L-胱氨酸组	61	160	9760	30	175	5250	690	3263500	126880	3.88	1.97	66
加 L-甲硫氨酸组	63	110	6930	31	74	2294	644	3370500	194040	5.75	3.84	34

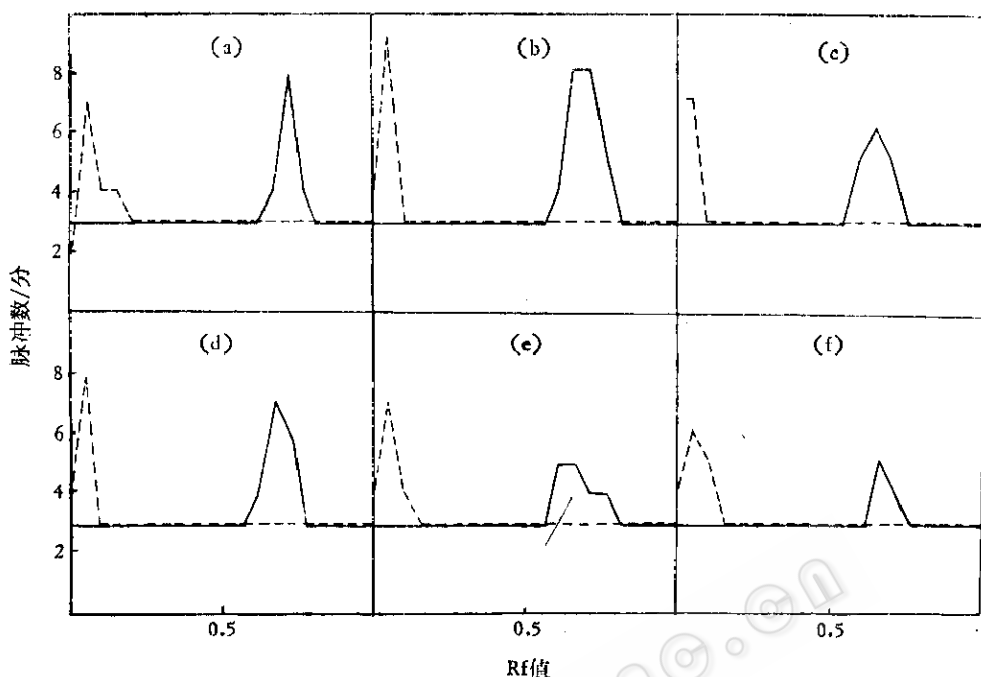


图1 几种含硫化合物掺入创新霉素试验的纸层析谱扫描结果

—— 溶媒系统(1)      - - - 溶媒系统(2)

(a) 空白; (b) 对照; (c) 加  $\text{SO}_4^{2-}$ ; (d) 加  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ; (e) 加 L-胱氨酸; (f) 加 L-甲硫氨酸

这一系统与一般微生物的硫代谢途径是一致的<sup>[4]</sup>。L-胱氨酸可能是创新霉素分子中的硫的最直接的前体。

## 二、L- $^{35}\text{S}$ -胱氨酸掺入创新霉素分子的情况

为了确证 L-胱氨酸的硫是创新霉素分子中硫的直接前体,进一步观察了 L- $^{35}\text{S}$ -胱氨酸掺入创新霉素分子的情况。培养方法同前,在培养 24 小时后,取出一瓶作为空白样品,其余每瓶中加入 15 毫克 L-胱氨酸,内含 100 微居里 L- $^{35}\text{S}$ -胱氨酸,再继续培养 24 小时,取出过滤,滤液经溶媒抽提,柱层析,洗脱液进行创新霉素含量测定,纸层析鉴别和放射活性测定。结果见表 2, 图 2。

从图 2 看出,经抽提纯化后,洗脱液中具有放射活性的化合物只有创新霉素一

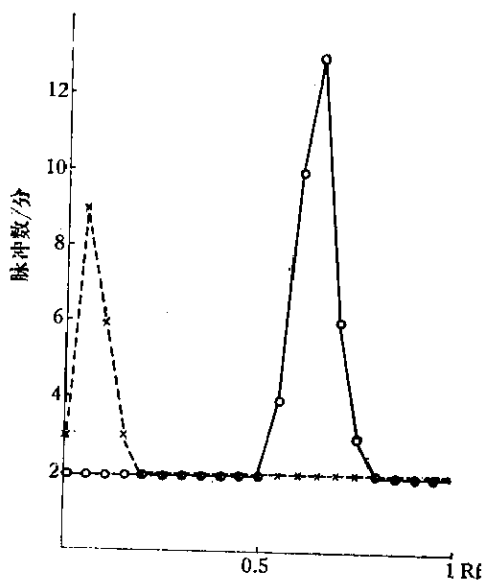


图2 L- $^{35}\text{S}$ -胱氨酸掺入创新霉素试验的纸层析谱扫描结果

溶媒系统(1) ×---×      溶媒系统(2) ○—○

种。从表 2 结果看出,发酵液中加入的 L-胱氨酸,被利用到创新霉素合成中去的达

表 2  $^{35}\text{S}$ -L-胱氨酸掺入创新霉素的情况

实验号	发 酵 液			提 取 液		样品放射活性 (脉冲数/分)	滤液中加入的总活性 (脉冲数/分)	滤液中创新霉素总活性 (脉冲数/分)	$^{35}\text{S}$ -L-胱氨酸掺入创新霉素的百分率	合成的创新霉素的毫克分子数/加入胱氨酸的毫克分子数	新合成的创新霉素中来自胱氨酸的硫的百分率
	体积 (毫升)	效价 (单位/毫升)	总效价	体积 (毫升)	效价 (单位/毫升)						
I	100	97	9700	40	88	891	1319000	194000	14.71	0.04/0.25 16%	92
II	104	98	10192	35	156	980	1429000	193700	13.56	0.04/0.25 16%	85

到14%左右;若按毫克分子计算,则在发酵液中加入 L-胱氨酸后的 24 小时内,新合成的创新霉素分子中的硫有 85—92% 是来自加入的胱氨酸。如果考虑到细胞内源胱氨酸的稀释作用,则可以认为创新霉素分子中的硫原子完全来自胱氨酸分子中的巯基。胱氨酸的硫可以看成是创新霉素噻嗪环中硫的直接前体。

由于确定了 L-胱氨酸是创新霉素生物合成的前体,我们曾将 L-胱氨酸试用于创新霉素发酵之中,以期提高创新霉素的产量。但从试验看出,在发酵的生长期加入 L-胱氨酸,对菌丝生长有利,但对产量没有明显的作用。在生物合成阶段加入 L-胱氨酸,如一次加入较大量(0.5%),则会引起菌丝自溶,这可能是由于 L-胱氨酸不仅参与创新霉素合成,同时也可以诱导 L-

胱氨酸去巯基酶的合成,从而使培养液中积累  $\text{H}_2\text{S}$  使菌丝中毒的缘故。在这一阶段如果少量分次加入 L-胱氨酸,虽然菌丝没有出现中毒现象,但对创新霉素的合成也看不出明显的刺激作用。以上事实说明, L-胱氨酸在创新霉素生物合成的过程中不是反应速度的限制因子。

### 参 考 资 料

- [1] Chuangxinmycin Research Group, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science: *Scientia Sinica*, 20:106, 1977.
- [2] 梁晓天等: 化学学报, 34: 129, 1976.
- [3] 李 群等: 微生物学报, 16: 102, 1976.
- [4] Young, L. and G. A. Maw: *The Metabolism of Sulfur Compounds*, Chap. IX, p. 148, London, Methuen and Co. Ltd., New York, John Wiley and Sons Inc. 1958.

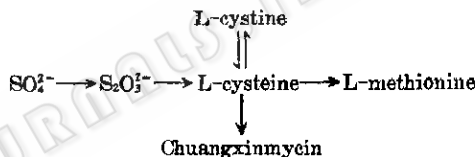
## STUDIES ON THE BIOGENESIS OF SULFUR IN CHUANGXINMYCIN MOLECULE

Xu Jin    Ma Yu    and    Li Yuan

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

By isotope competition method it was shown the utilization of natural sulfur-containing compounds by *Actinoplanes*

*tsinensis* Li et al. is consistent with the general rule of the metabolism of sulfur compounds by microorganisms, namely:



From the results of incorporation of L-<sup>35</sup>S-cystine into Chuangxinmycin molecule we considered that the sulfur in the thiophene of Chuangxinmycin molecule derives directly from the thiol group

of L-cysteine. However, no stimulation effect could be observed when L-cysteine was added into the broth during Chuangxinmycin fermentation process.