

硝酸盐对力复霉素 SV 和脂肪合成的调节作用

顾薇玲 陆小燕 耿运琪* 刘慈俊
金志坤 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所微生物室, 上海)

地中海诺卡氏菌菌体的脂肪分析指出 + KNO₃ 菌体的中性脂比 - KNO₃ 菌体的含量低, 但两种菌体的中性脂所含脂肪酸组分上无显著的差异。定量分析表明, 在硝酸盐存在下力复霉素 SV 产量的增加几乎相当于脂肪含量的减少。显然, 在硝酸盐存在的情况下, 用于合成脂肪的中间代谢物被用于力复霉素 SV 合成, 从而使 SV 产量增高。

琥珀酰 CoA 转化为甲基丙二酰 CoA 的酶系(甲基丙二酰 CoA 变位酶、甲基丙二酰 CoA 消旋酶、草酰乙酸羧基转移酶和苹果酸脱氢酶)活力的测定指出, +KNO₃ 菌体中这些酶的活力高于 -KNO₃ 菌体, 且在无硝酸盐培养基发酵中途补加硝酸盐后, 这些酶活力也相应增高, 这就进一步说明在硝酸盐存在下, 菌体有较多的乙酰 CoA 从脂肪合成转到丙酸衍生物——甲基丙二酰 CoA 的合成, 减少了脂肪的合成, 从而促进了力复霉素的产生。

前文报道了硝酸盐对地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) 合成力复霉素 SV 有促进作用的同时, 也观察到加硝酸钾菌体与不加硝酸钾菌体的脂肪含量也有明显差异^[1,2]。众所周知, 脂肪酸、大环内酯抗生素以及力复霉素的脂肪环链部分都是乙酰 CoA 或丙酰 CoA 逐步缩合而成的^[3], 因此我们认为硝酸盐的作用很可能是将合成脂肪酸的前体转移到合成力复霉素的大环部分。本文从菌体脂肪组份分析和酶活力的变化方面, 为脂肪前体转移到力复霉素合成提供论据。

材料和方法

(一) 菌种

地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) NG12-4, 详见前文^[1]。

(二) 培养方法

斜面及液体种子配比和培养方法与前文相同^[1,2]。

发酵培养基为无渣培养基: 1. 黄豆粉 1%, 鱼粉 0.5%, 加培养基一半体积的水, 煮沸 30 分

钟后, 过滤取清液, 加入 5% 葡萄糖灭菌备用。2. 葡萄糖 5%, 蛋白胨 1%, KH₂PO₄ 0.02%, CaCO₃ 0.3%, CoCl₂ 3μg/ml, 加培养基的一半体积的水, 灭菌备用。

接种前将 1, 2 两部分等体积混和(自然 pH), 然后按 7% 的接种量将种子接入发酵培养基。

培养温度、条件同前文^[1,2]。

(三) 分析方法

1. 力复霉素 SV 效价测定、葡萄糖测定、菌体生长测定方法均同前文^[1,2]

2. 脂肪含量的测定: 取 150 ml 发酵液过滤, 将菌体洗净后, 加入 5g 碳酸钙作为分散剂, 于 80—90℃ 烘干、碾碎, 用索氏脂肪浸出器于 70—74℃ 抽提 6 小时。溶剂为氯仿: 甲醇 = 2:1。将抽提液浓缩到 10 ml, 取其中 2 ml 于已称重的小烧杯中, 37℃ 干燥至恒重, 称重。

3. 菌体脂肪分析: 用薄板层析法测定。硅胶系黄岩荧光化学厂生产的薄板层析用的硅胶 H。

本文于 1981 年 12 月 17 日收到。

* 南开大学生物系微生物教研室

中国科学院上海有机化学研究所金宝箢同志协助进行薄板层析扫描, 本所朱亚芳、陈乃先同志分别协助进行气相色谱分析及照相工作, 谨此致谢。

(1) 中性脂分析: 展开剂为石油醚(60—90℃): 乙醚=7:3。(V:V)。显色剂: 10% 磷钼酸乙醇(95%)溶液喷洒后 80℃ 加热 5 分钟。

(2) 磷脂分析: 展开剂为氯仿: 甲醇: 水=65:25:4 (V:V), 显色剂为钼显色剂^[4]。显色后用岛津 910 型薄板层析扫描仪进行定量比较。

4. 气相色谱分析

(1) 总脂肪酸样品制备: 按 Kates 的方法^[5]。

(2) 甲酯化方法: 参照 Warring 等的方法^[6]。

(3) 色谱分析: 将甲酯化和干燥过的样品用氯仿溶解后供分析用。所用仪器为: 上海分析仪器厂 103 型气相色谱仪。固定液用聚二乙二醇丁二酸酯, 氢焰 150℃。

5. 酶活测定

(1) 无细胞抽出液制备: 同前文^[3]。

(2) 甲基丙二酰 CoA 变位酶: 按 Kellermeier 等方法^[10]测定。

(3) 甲基丙二酰 CoA 消旋酶: 按 Allen 等的方法^[11]测定。

(4) 草酰乙酸羧基转移酶: 参照 Wood 等的方法^[12]测定。

(5) 苹果酸脱氢酶: 测定方法同前文^[12]。

蛋白质测定方法: 同前文^[12]。

结果和讨论

(一) 硝酸盐对脂肪合成和力复霉素 SV 合成的影响

当培养基中加入 0.8% 硝酸盐后, 可以观察到 +KNO₃ 菌体与 -KNO₃ 菌体在生长和利用糖上无明显差别(图 1), 但在力复霉素 SV 的合成以及脂肪的积累方面则差别甚大(图 2)。在力复霉素大量产生时期, 即 72 小时以后, +KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 合成直线上升, 但此时脂肪的积累不再增加; 而 -KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 的合成则极缓慢, 却积累了大量的脂肪。从

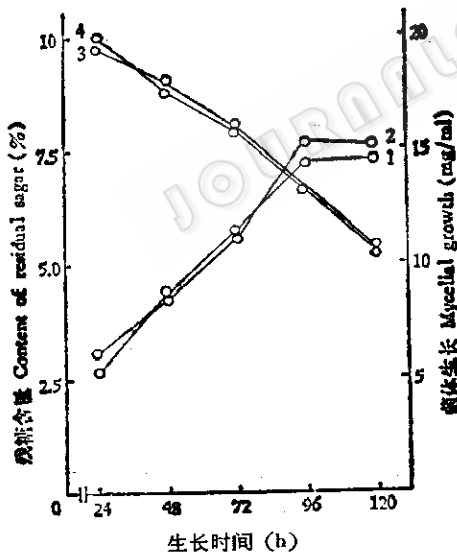


图 1 硝酸盐对菌体生长和利用糖的影响

Fig. 1 Effect of nitrate on the utilization of sugar and mycelial growth of *N. mediterranei*

1. +KNO₃ 菌体生长 Growth of mycelia in the broth (+KNO₃)
2. -KNO₃ 菌体生长 Growth of mycelia in the broth (-KNO₃)
3. +KNO₃ 发酵液残糖 Residual sugar in the broth (+KNO₃)
4. -KNO₃ 发酵液残糖 Residual sugar in the broth (-KNO₃)

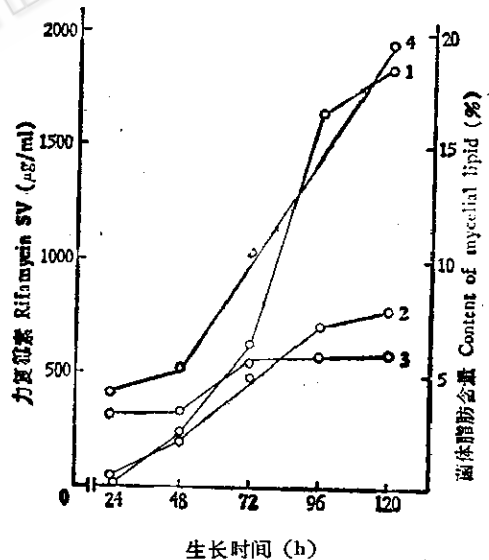


图 2 硝酸盐对力复霉素 SV 和脂肪合成的影响

Fig. 2 Effect of nitrate on the synthesis of rifamycin SV and mycelial lipid

1. +KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 产量 rifamycin SV of +KNO₃ mycelia
2. -KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 产量 rifamycin SV of -KNO₃ mycelia
3. +KNO₃ 菌体的脂肪含量 lipid content of +KNO₃ mycelia
4. -KNO₃ 菌体的脂肪含量 lipid content of -KNO₃ mycelia

(1) 中性脂分析: 展开剂为石油醚(60—90℃): 乙醚=7:3。(V:V)。显色剂: 10% 磷钼酸乙醇(95%)溶液喷洒后 80℃ 加热 5 分钟。

(2) 磷脂分析: 展开剂为氯仿: 甲醇: 水=65:25:4 (V:V), 显色剂为钼显色剂^[4]。显色后用岛津 910 型薄板层析扫描仪进行定量比较。

4. 气相色谱分析

(1) 总脂肪酸样品制备: 按 Kates 的方法^[5]。

(2) 甲酯化方法: 参照 Warring 等的方法^[6]。

(3) 色谱分析: 将甲酯化和干燥过的样品用氯仿溶解后供分析用。所用仪器为: 上海分析仪器厂 103 型气相色谱仪。固定液用聚二乙二醇丁二酸酯, 氢焰 150℃。

5. 酶活测定

(1) 无细胞抽出液制备: 同前文^[3]。

(2) 甲基丙二酰 CoA 变位酶: 按 Kellermeier 等方法^[10]测定。

(3) 甲基丙二酰 CoA 消旋酶: 按 Allen 等的方法^[11]测定。

(4) 草酰乙酸羧基转移酶: 参照 Wood 等的方法^[12]测定。

(5) 苹果酸脱氢酶: 测定方法同前文^[12]。

蛋白质测定方法: 同前文^[12]。

结果和讨论

(一) 硝酸盐对脂肪合成和力复霉素 SV 合成的影响

当培养基中加入 0.8% 硝酸盐后, 可以观察到 +KNO₃ 菌体与 -KNO₃ 菌体在生长和利用糖上无明显差别(图 1), 但在力复霉素 SV 的合成以及脂肪的积累方面则差别甚大(图 2)。在力复霉素大量产生时期, 即 72 小时以后, +KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 合成直线上升, 但此时脂肪的积累不再增加; 而 -KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 的合成则极缓慢, 却积累了大量的脂肪。从

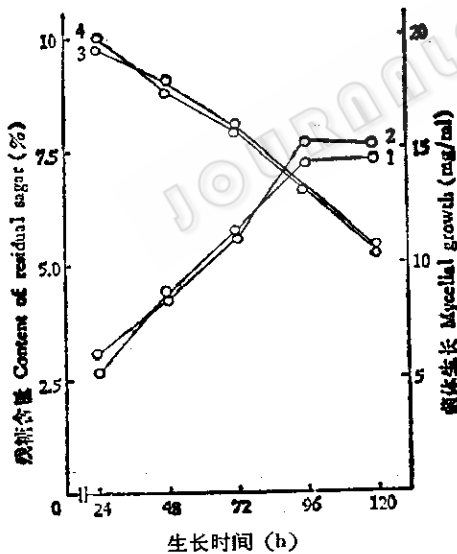


图 1 硝酸盐对菌体生长和利用糖的影响

Fig. 1 Effect of nitrate on the utilization of sugar and mycelial growth of *N. mediterranei*

1. +KNO₃ 菌体生长 Growth of mycelia in the broth (+KNO₃)
2. -KNO₃ 菌体生长 Growth of mycelia in the broth (-KNO₃)
3. +KNO₃ 发酵液残糖 Residual sugar in the broth (+KNO₃)
4. -KNO₃ 发酵液残糖 Residual sugar in the broth (-KNO₃)

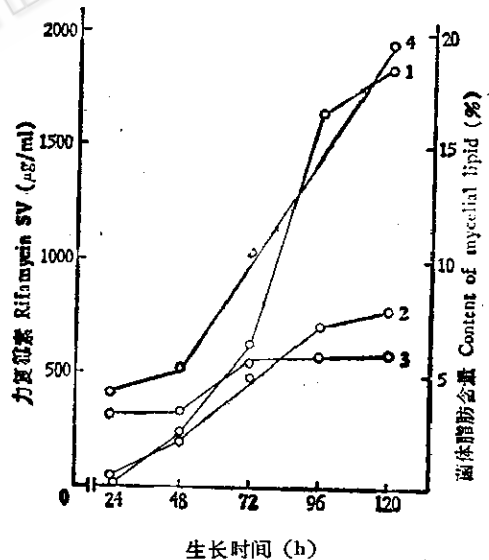


图 2 硝酸盐对力复霉素 SV 和脂肪合成的影响

Fig. 2 Effect of nitrate on the synthesis of rifamycin SV and mycelial lipid

1. +KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 产量 rifamycin SV of +KNO₃ mycelia
2. -KNO₃ 菌体的力复霉素 SV 产量 rifamycin SV of -KNO₃ mycelia
3. +KNO₃ 菌体的脂肪含量 lipid content of +KNO₃ mycelia
4. -KNO₃ 菌体的脂肪含量 lipid content of -KNO₃ mycelia

这个变化的关系可以推测, 在生长和利用糖相似的情况下, $+KNO_3$ 菌体将合成脂肪的原料合成了力复霉素 SV。

(二) 菌体脂肪分析

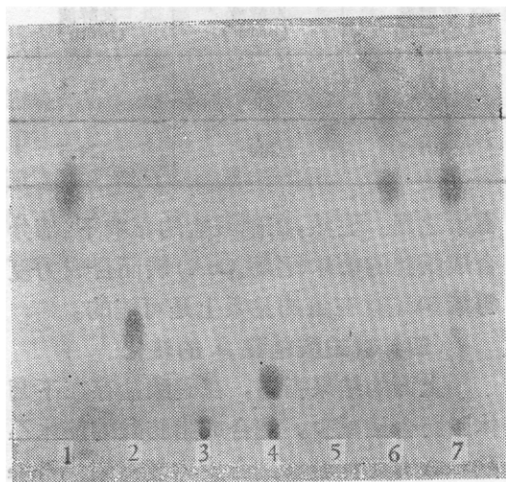


图3 两种菌体脂肪抽出液层析比较(中性脂)

Fig. 3 TLC chromatogram of lipid (neutral fraction) extracted from different kinds of mycelia

1. 甘油三酯 Triglyceride 2. 油酸 Oleic acid
3. 麦角固醇 Ergosterol 4. 胆固醇 Cholesterol
5. 廿烷 Eicosane 6. $+KNO_3$ 菌体脂肪抽提液 Lipid extracts of $+KNO_3$ mycelia
7. $-KNO_3$ 菌体脂肪抽提液 Lipid extracts of $-KNO_3$ mycelia

表1 两种菌体中性脂的定量分析*

Table 1 The quantitative analysis of mycelial neutral lipids

实验 experiment	菌体类别 mycelia	$+KNO_3$ 菌体 mycelia	$-KNO_3$ 菌体 mycelia
1		1.517	2.696
2		2.749	4.445

* 经薄板层析显色后, 用岛津 910 型扫描仪进行。数值为积分值。

The results were obtained by scanning with Shimadzu type 910 after staining of TLC. The values were expressed in integration.

从薄板层析结果(图3), 可以看到 $+KNO_3$ 菌体和 $-KNO_3$ 菌体的脂肪组分

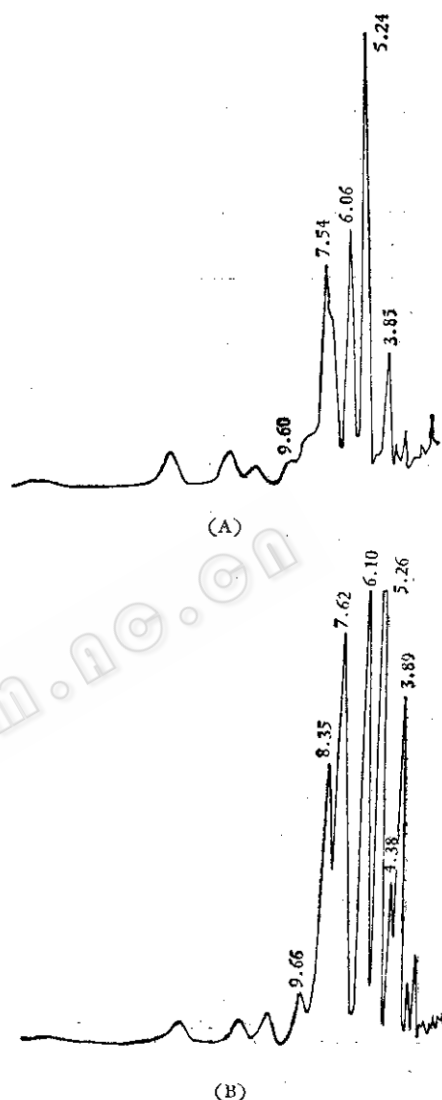


图4 菌体脂肪酸气相分析图谱

Fig. 4 GC-spectrum of fatty acids in mycelia

- A. $+KNO_3$ 菌体 in $+KNO_3$ mycelia
- B. $-KNO_3$ 菌体 in $-KNO_3$ mycelia

基本相近, 其主要成分为中性脂(甘油三酯)。菌体中性脂的定量分析表明(表1), $-KNO_3$ 菌体中性脂含量是 $+KNO_3$ 菌体的一倍。另外, 从磷脂板层析也证明两者的磷脂组成和数量也基本相近。进一步对其组成脂肪的脂肪酸经皂化、甲酯化后进行气相色谱分析, 也证明这一点, 其结果见图

表 2 硝酸盐对菌体脂肪含量的影响

Table 2 Effect of nitrate on mycelial lipid content

培养条件 nitrate	菌体 Dry weight of mycelia mg/150ml 发酵液 (broth)	力复霉素 SV Rifamycin SV		脂肪 lipid mg/150ml 发酵液 (broth)	总脂肪酸 Total fatty acids mg/150ml 发酵液 (broth)
		μg/ml	mg/150ml 发酵液 (broth)		
-KNO ₃	2707	1180	177	594	347.5
+KNO ₃	2343	2700	405	200	124.5

4。

从图 4 可看到两种菌体的脂肪酸组分也基本相似,仅有几个(如滞留时间为 4.38 与 8.35 分钟)在 +KNO₃ 菌体中是极少量,而在 -KNO₃ 菌体中则量较多,但从它们所占的比例来看,不足以对力复霉素 SV 合成总量产生明显的影响。

(三) 菌体脂肪含量与力复霉素 SV 合成之间量的关系

菌体脂肪含量和力复霉素 SV 合成之间的关系如表 2 所示:

Sensi^[7] 和 Martin^[8] 曾提出力复霉素的合成是以芳香部分 C₇N 作起始单位,然后逐步延伸出环链部分,据此我们可以进行下列估算:

力复霉素 SV 的分子量为 697, C₇N 部分为 133, 占 18.9%, 大环部分为 564, 占 81.1%。根据表 2 结果进行推算:

两种菌体力复霉素 SV 合成的总量差

$$= (+\text{KNO}_3 \text{ 菌体的 SV 的产量})$$

$$- (-\text{KNO}_3 \text{ 菌体的 SV 产量})$$

$$= 405 \text{ mg} - 177 \text{ mg} = 228 \text{ mg}$$

如按照 SV 大环占总分子量 81.1% 计算,则合成 228 mg 力复霉素 SV 约需要 228 mg $\times 81.1\% = 184.91\text{mg}$ 脂肪前体。而两种菌体总脂肪酸差为

$$347.5 \text{ mg} - 124.5 \text{ mg} = 223 \text{ mg},$$

也就是说脂肪酸的相差量足以供合成力复

霉素之用。显然,在硝酸盐的影响下,部分合成脂肪的前体(乙酰 CoA) 转而合成力复霉素 SV, 这在量的关系上是可能的。

(四) 琥珀酰辅酶 A 的转化

上面的结果指出,在硝酸盐存在下菌体脂肪含量减少,使合成脂肪酸的前体乙酰 CoA 有可能转移到合成力复霉素。White 等^[9] 用同位素示踪方法证明力复霉素分子中除 C₇N 部分外,是由 8 个丙酸和 3 个醋

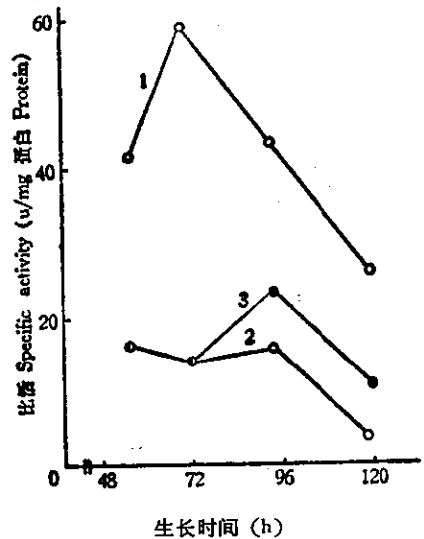


图 5 不同菌体甲基丙二酰 CoA 变位酶活力比较

Fig. 5 Comparison of the activities of methylmalonyl-CoA mutase in different kinds of mycelia

1. +KNO₃ 菌体 In +KNO₃ mycelia
2. -KNO₃ 菌体 In -KNO₃ mycelia
3. 在 54 h 加入 0.8% KNO₃ 菌体 Mycelia to which 0.8% KNO₃ was added after 54 h

酸缩合而成。所以乙酰 CoA 要转移到力复霉素的合成必须大部分已转变为丙酸或丙酸衍生物——甲基丙二酰 CoA, 再在 C_7N 上逐步连结形成力复霉素。

前文已报道了三羧酸循环的大部分酶活力因硝酸盐的存在而提高。这些酶活力的提高, 自然有利于琥珀酰 CoA 的产生, 而在琥珀酰 CoA 转化中, 甲基丙二酰 CoA 消旋酶和变位酶是必需的酶, 因此我们比较了 $+KNO_3$ 菌体和 $-KNO_3$ 菌体中这两个酶的活力^[10], 见图 5 和图 6。

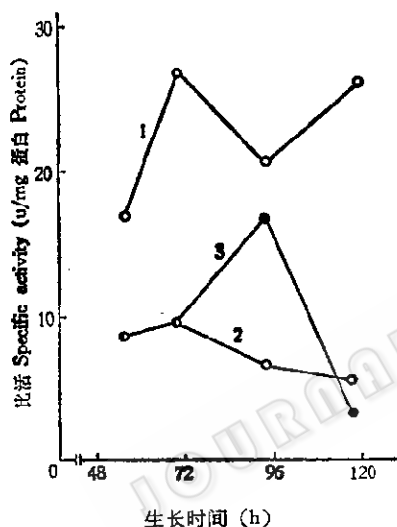


图 6 不同菌体甲基丙二酰 CoA 消旋酶活力比较

Fig. 6 Comparison of the activities of methylmalonyl CoA racemase in different kinds of mycelia

1. $+KNO_3$ 菌体 In $+KNO_3$ mycelia
2. $-KNO_3$ 菌体 In $-KNO_3$ mycelia
3. 在 54 小时后加入 0.8% KNO_3 菌体 Mycelia to which 0.8% KNO_3 was added after 54 h

结果表明, 在 $+KNO_3$ 菌体中所测得的甲基丙二酰 CoA 变位酶、消旋酶和草酰乙酸羧基转移酶活力均高于 $-KNO_3$ 菌体, 且在 $-KNO_3$ 菌体培养中途补加入 0.8% 硝酸钾也同样能使这些酶活力提高 (图 5, 6), 以产生更多的甲基丙二酰 CoA。看来, 力复霉素生物合成中, 大环部分是通

过三羧酸循环中的琥珀酰 CoA 转化为甲基丙二酰 CoA, 再进一步缩合而成的, 而硝酸盐的加入促进了这一转化, 因此使力复霉素 SV 的产量增高。

四碳化合物琥珀酸, 除了来自三羧酸循环外还可由乙醛酸循环产生, 异柠檬酸是这两个代谢途径的共同中间体。为此我们测定了乙醛酸循环的关键酶: 异柠檬酸酶和苹果酸合成酶的活力^[11]。实验结果指出: 不论在 $+KNO_3$ 菌体或 $-KNO_3$ 菌体中, 这两个酶活力都很低, 而且无显著差别, 这说明乙醛酸循环在地中海诺卡氏菌中不是主要的代谢途径。

综上所述, 脂肪含量的降低和琥珀酰 CoA 转化为甲基丙二酰 CoA 酶系活力的提高, 是硝酸盐作用的一个重要方面。这样, 菌体有较多的乙酰 CoA 从合成脂肪转到合成丙酸衍生物, 从而促进了力复霉素的产生。

参 考 文 献

- [1] 焦瑞身等: 植物生理学报, 5: 395, 1979.
- [2] 陈聿美等: 植物生理学报, 6: 291, 1980.
- [3] Birch, A. J. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 1964: 1485, 1964.
- [4] Dittmer, J. C. and R. L.: *Lester J. of Lipid Res.*, 5: 126, 1964.
- [5] Kates, M.: *Techniques of Lipidology*, by Kates, M. Amsterdam, North-Holland Pub. Co. 1972, p 363.
- [6] Warring, A. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 443: 157, 1976.
- [7] Sensi, P. and J. E. Thiemann: *Progress in Industrial Microbiology*, 6: 21, 1967.
- [8] Martin, J. F.: *Ann. Rev. of Microbiol.*, 31: 13, 1977.
- [9] White, R. J. et al.: *Nature*, 243: 273, 1973.
- [10] Kellermmyer, W. and H. G. Wood: *Methods in Enzymology*, Vol. 13 by Lowenstein, J. M.; Academic Press, 1969, p 207.
- [11] Allen, S. H. G. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 13 by Lowenstein, J. M.; Academic Press, 1969, p 194.
- [12] Wood, H. G. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 13 by Lowenstein, J. M.; Academic Press, 1969, p 215.

[13] Dixon, G. H. and H. L. Kornberg, *Bio-*

chem. J., 72(1): 3p, 1959.

THE REGULATORY EFFECT OF NITRATE ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE PRODUCTION OF RIFAMYCIN SV AND THE BIOSYNTHESIS OF CELLULAR LIPID COMPONENTS

Gu Weiling Lu Xiaoyan Geng Yunqi* Liu Cijun

Jin Zhikun Jiao Ruishen (Chiao Jui-shen)

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

As reported in the previous papers (Acta Phytophysiol. Sinica, 5: 395—402, 1979, *ibid*, 6: 291—298, 1980), nitrate was found to stimulate the synthesis of rifamycin remarkably. At the same time, the presence of nitrate enhanced the activities of nitrate reductase and of most of the enzymes belonging to the HMP, TCA and shikimate pathway. The lipid content of $-KNO_3$ mycelia was much higher than that of $+KNO_3$ mycelia. It was suggested that the stimulative effect of nitrate on the synthesis of rifamycin was carried out through regulating the biosynthetic pathway of lipid and rifamycin SV.

By extraction and analysis of lipid, it was found that the $+KNO_3$ mycelia contained much less neutral fat than that of the $-KNO_3$ mycelia and the fatty acid components between these two neutral fat fractions was devoid of obvious difference. The results of quantitative analysis showed that the increased production of rifamycin SV was roughly equivalent to the amount of decreased content of lipid. The data clearly su-

ggested that nitrate increased the biosynthesis of rifamycin at the expense of lipids.

It was also found that the enzymic activities of the reaction of succinyl-CoA to methylmalonyl-CoA (including methylmalonyl-CoA mutase, racemase, oxaloacetate transcarboxylase and malate dehydrogenase) in the mycelia grown in KNO_3 containing medium were higher than that of control. Again this result confirmed that acetyl-CoA, used in synthesis of lipid under normal conditions, was channelled to form more methylmalonyl-CoA and then to synthesize the polyketide chain of rifamycin SV while nitrate was incorporated in the medium. Thus, results from this paper together with those from previous reports demonstrated that the presence of nitrate somehow enhanced the activity of HMP and TCA cycles and more acetyl-CoA was converted to the C_4 -intermediates of the polyketide chain of rifamycin so that a much higher yield of antibiotic was observed.

* Biology Department, Nankai University.