

力复霉素合成与谷氨酰胺合成酶活力的正相关性*

倪榴英 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)

本文报道了地中海诺卡氏菌 U-32 的氮代谢研究的初步结果。U-32 的丙氨酸脱氢酶 (ADH) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 同化氮途径受培养基中氮浓度的调节。高氮时, GS 的活力低, ADH 活力高;低氮时, GS 活力高, ADH 活力低, 发酵后期 ADH 活力近于零。

U-32 合成力复霉素 SV 的能力亦与氮浓度有关。高氮时, ADH 活力高, GS 活力低, SV 产量很低;低氮时, ADH 活力低, GS 活力高, SV 产量高, 从而表明 GS 的活力与 SV 产量间有正的相关性。据此推测, 高活力的 GS 促进了谷氨酰胺 (Gln) 的合成, 而后者作为一个最好的氨基供体, 有可能为 SV 中芳香前体 (C_9N) 提供了氮原子, 从而促进 SV 的生成。洗涤菌体的实验结果表明, 饲喂 Gln 的菌体 SV 产量最高, 这为上述推论提供了又一个证据。GS 在初级代谢中是个关键酶, 看来在次级代谢中也是一个重要的酶。

U-32 在以硝酸钾为氮源时, 菌体生长、GS、ADH、SV 产量等都相似于低氮状况, 不论 KNO_3 , 用量相当于高氮和低氮中含氮量时, 或者用 KNO_3 与 $(NH_4)_2SO_4$ 作混合氮源时, 均使 GS 升高, ADH 降低, SV 产量增加。这表明 KNO_3 能控制菌体内氮的浓度于较低水平, 从而有利于 GS 及 SV 合成。硝酸盐对氮浓度的调节作用的机制尚待进一步研究。

关键词 力复霉素; 谷氨酰胺合成酶

近十年来, 氮同化和氮对氮代谢的控制方面的研究在逐步深入^[1], 但工作主要集中于肠道细菌, 如大肠杆菌等, 在放线菌方面研究的广度和深度均不及细菌。现在已知 60% 以上的抗生素是由放线菌产生的, 而且大部分抗生素分子中均含有氮, 其中许多抗生素的合成受培养基中氮的影响^[2-6]。因此, 研究放线菌的氮同化和氮对氮代谢的控制具有理论和实践意义。

硝酸钾对于力复霉素 SV 的合成的促进很明显。对 SV 促进作用的机理也已有入探讨^[7-9], 工作主要集中于碳代谢方面。本文报道了地中海诺卡氏菌 U-32 的氮代谢研究的初步结果, 指出地中海诺卡氏菌 U-32 的丙氨酸脱氢酶 (ADH) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 同化氮途径受培养基中氮浓度的调节, 并且发现 GS 的活力与 SV 产

量间有正的相关性。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei*) U-32。上海第三制药厂提供。

(二) 培养方法

将培养在本氏斜面培养基上的新鲜菌丝体接种到液体种子培养基中^[7], 28℃ 转床培养 40 小时后, 按 10% 的接种量接种到无机发酵培养基中, 其成份为 (g/l): 葡萄糖 40, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, NaCl 1, $CaCO_3$ 5, 微量盐溶液 1ml ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1%; $MnCl \cdot 4H_2O$, 0.1%);

本文于 1982 年 9 月 26 日收到。

* 本文所用符号如下: ADH: 丙氨酸脱氢酶; GDH: 谷氨酸脱氢酶; GS: 谷氨酰胺合成酶; GOGAT: 谷氨酸合成酶; NR: 硝酸还原酶; SV: 力复霉素 SV; L-Glu: L-谷氨酸; DL-Gln: DL-谷氨酰胺。

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1%), pH7.0, 氮源配方见各实验。培养在 28℃ 旋转摇床上进行, 转床的旋转半径为 2.5cm 转速为每分钟 190 转。

(三) 分析方法

1. 力复霉素 SV 效价的测定: 用杯碟法生物测定, 以藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 为检定菌。

2. 菌体生长的测定: 准确吸取 5ml 发酵液, 吸滤后用蒸馏水将菌体充分洗涤, 连同滤纸在 80℃ 烘干至恒重后称重。

3. 酶活力的测定方法: (1) 无细胞抽出液制备: 取发酵液过滤, 用蒸馏水充分洗涤菌体, 将得到的湿菌体以 1:10 (g:ml) 的比例悬浮到缓冲液中。硝酸还原酶 (NR) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 用咪唑缓冲液^[10]抽提, 其余酶的抽提用 Tris 缓冲液^[11]。菌体在 0℃ 用 MSE 超声波击碎器 20KC 处理 10 min, 然后离心, 取上清液备用。用于 NR 测定的抽提液以 1500 × g 离心 3 min, 其余酶测定所用抽提液为 18000 × g 条件下离心 30 min 的上清液。

(2) 酶活力的测定: NR 按 Guerrero 等^[11]方法测定。ADH 按 Hong 等^[12]方法测定。GS 按 Stadtman 方法^[13]测定。比活力: NR 以 $\Delta A_{540\text{nm}}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质表示, ADH 以 $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质表示, GS 以 $\Delta A_{540\text{nm}}/\text{min}/\text{mg}$ 蛋白质表示。

4. 蛋白质测定按 Lowry 等^[14]方法测定。

结果与讨论

(一) 氨浓度对力复霉素 SV 合成的影响

一些抗生素合成受过量氨的阻遏, 这种现象称为“氨阻遏”^[12,6]。U-32 菌株合成力复霉素 SV 的能力亦与氨浓度有关 (图 1)。我们观察了不同浓度硫酸铵 [(NH_4)₂SO₄] 对力复霉素 SV 合成和菌体生长的影响, 从图 1 可以看出 SV 产量在低浓度 (NH_4)₂SO₄ 作为氮源时高, 而菌体生长在低氨和过量氨时均稍差。

(二) 氨浓度对同化氨途径的调节

上面实验结果表明力复霉素 SV 合成

与氨浓度有关。我们接着又观察了以高 (0.8%) 或低 (0.2%) 浓度的 (NH_4)₂SO₄ 作为氮源时, 几个与氨同化反应有关酶的活力 (图 2)。从图 2 中可以看到以高、低浓度 (NH_4)₂SO₄ 为氮源时, 发酵过程中两者 pH 变化的差别不大。在高氨时, 菌体前期生长迅速, 菌体内丙氨酸脱氢酶 (ADH) 活力高, 谷氨酰胺合成酶 (GS) 活力在发酵后期始终处在低水平。低氨时, 菌体生长缓慢上升, 仅在发酵前期菌体内有低活力的 (ADH), 发酵后期 (ADH) 活力近于零, 生长前期 GS 水平较低, 整个合成期则始终维持在较高水平, 与高氨相比, 低氨时 GS 水平为高氨时的 2 倍。高氨条件下, 生长前期 GS 水平很高, 但迅速下降, 其生理作用尚待进一步研究。

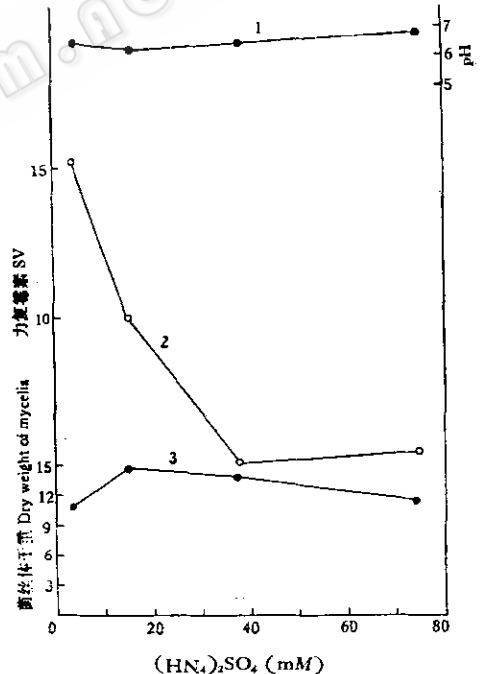


图 1 (NH_4)₂SO₄ 浓度对 U-32 的菌体生长、力复霉素 SV 合成的影响

Fig. 1 Effects of (NH_4)₂SO₄ concentration on the growth and production

1. pH 2. 力复霉素 SV (微克/mg 菌丝体干重)
SV (μg/mg dry weight of mycelia)

3. 菌丝体干重 Dry weight of mycelia (mg/ml)

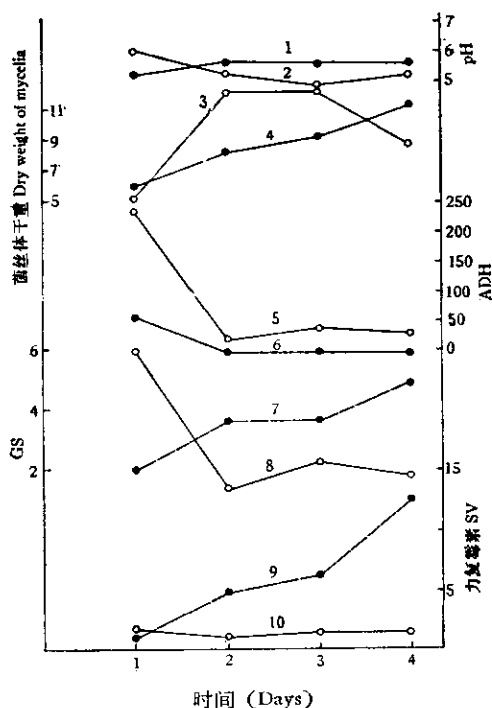


图2 培养基中 NH_4^+ 浓度对 U-32 的 pH, 菌体生长、力复霉素 SV 合成、ADH、GS 活力的影响

Fig. 2 Effects of ammonium concentration on pH, growth SV and specific activity of ADH and GS

1, 2. pH 3, 4. 菌丝体干重 Dry weight of mycelia (mg/ml) 5, 6. ADH 比活力 Specific activity of ADH 7, 8. GS 比活力 Specific activity of GS 9, 10. 力复霉素 SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 菌丝体干重) SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight of mycelia)

●—● 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ○—○ 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

从图2中我们还可以明显地看到菌体内 GS 水平与力复霉素 SV 合成之间有一种正相关性。即,以低浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,菌体内 GS 活力高,它的 SV 合成量也高;反之,以高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,GS 水平低,SV 产量也低。氮原子存在于许多抗生素分子内,并且通常从含氮的初级代谢物衍生。SV 中也含有一个氮原子,从 GS 水平与 SV 合成的正相关性推测,高活力的 GS 促进了谷氨酰胺 (Gln) 的合成,而后者作为一个最好的氨基供体,有可能为 SV 中芳香部分的“ C_7N ”提供了

氮原子,从而有助于 SV 的合成。从图2中我们也可以看到菌体内 ADH 水平与力复霉素 SV 合成之间存在着负的相关性,有关机制,尚待进一步了解。

(三) 硝酸钾对氮同化途径的影响

硝酸钾 (KNO_3) 对力复霉素 SV 合成的促进作用相当明显,在有机培养基中加入 0.8% KNO_3 , SV 产量可增加 1.7 倍^[7]。关于它对 SV 促进的机理已有人探讨^[8,9],工作主要集中于碳代谢方面。为了进一步阐明硝酸盐的作用机制,了解它对氮代谢以及 SV 合成的作用,我们观察了高浓度

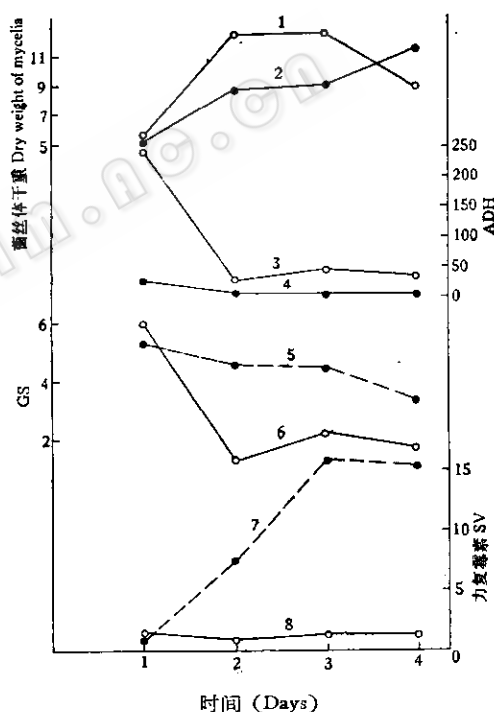


图3 高浓度的 KNO_3 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 U-32 的生长、力复霉素 SV 合成、ADH、GS 活力的影响

Fig. 3 Effects of high concentration of KNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on growth SV production and specific activity of ADH and GS

1, 2. 菌丝体干重 Dry weight of mycelia (mg/ml) 3, 4. ADH 比活力 Specific activity of ADH 5, 6. GS 比活力 Specific activity of GS 7, 8. 力复霉素 SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 菌丝体干重) SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight of mycelia)

●—● 1.2% KNO_3 , ○—○ 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

KNO_3 (1.2%, 相当于 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的含氮量) 和低浓度 KNO_3 (0.3%, 相当于 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的含氮量) 对发酵过程和酶活力的影响。图 3 为高浓度 KNO_3 和高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时的情况。两者相比, 以 KNO_3 为氮源时, 菌体生长缓慢, ADH 活力受抑制, 但 GS 水平显著上升, SV 合成也大幅度地提高。低浓度 KNO_3 中的情况, 不同于高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时结果, 而与低浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和高浓度 KNO_3 时相似(图 4), 生长正常, ADH 明显受到抑制, GS 水平升高, SV 合成增加。图 5 则

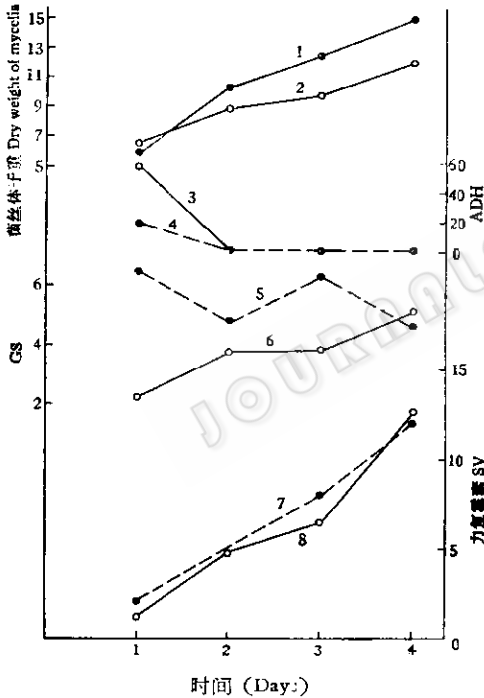


图 4 低浓度的 KNO_3 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 U-32 的生长、力复霉素 SV 合成、ADH、GS 活力的影响
Fig. 4 Effects of low concentration of KNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on growth SV production and specific activity of ADH and GS

- 1, 2. 菌丝体干重 Dry weight of mycelia (mg/ml)
3, 4. ADH 比活力 Specific activity of ADH
5, 6. GS 比活力 Specific activity of GS
7, 8. 力复霉素 SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 菌丝体干重)
SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight of mycelia)
●—● 0.3% KNO_3 ○—○ 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

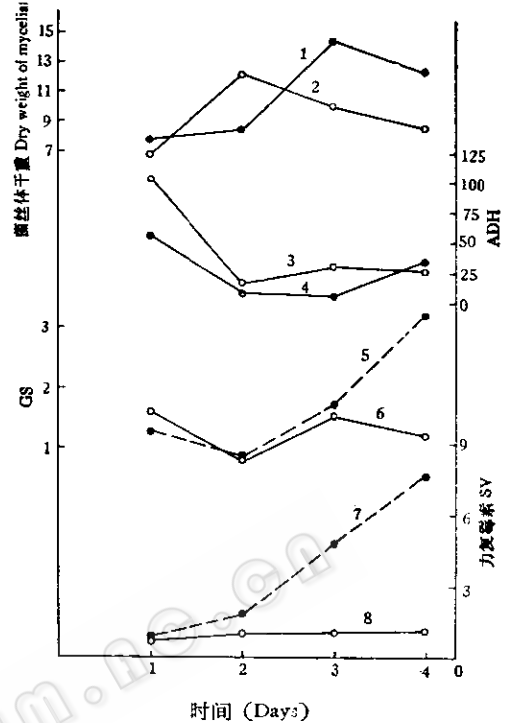


图 5 0.45% KNO_3 与 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为混合氮源时 U-32 的生长、力复霉素 SV 合成、ADH 和 GS 比活力

Fig. 5 Growth, SV production and specific activity of ADH and GS in media containing 0.45% KNO_3 + 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- 1, 2. 菌丝体干重 Dry weight of mycelia (mg/ml)
3, 4. ADH 比活力 Specific activity of ADH
5, 6. GS 比活力 Specific activity of GS
7, 8. 力复霉素 SV
SV ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight of mycelia)

- 0.45% KNO_3 + 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
○—○ 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

表明了以 0.45% KNO_3 与 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 一起作混合氮源(氮含量相当于 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时的情况。可以看到 KNO_3 加入造成前期生长略有延迟, 后期生长迅速。与高氮相比, KNO_3 与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作混合氮源时, 在生长后期菌体内 GS 水平显著提高, ADH 则受到抑制, SV 合成明显增加。显然, 硝酸盐的存在, 逆转了高氮对 GS 酶的不良影响。已有很多文献报道^[4-6], 证明高氮对 GS 合成有阻遏作用, 从本文结果

看来,硝酸盐有纠正过量氮的阻遏作用。

高、低浓度的 KNO_3 及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别为氮源时菌体内硝酸还原酶(NR)的水平见图6。以 KNO_3 为氮源培养的菌体内有较高水平的NR, 过量 KNO_3 存在看来对NR有抑制作用。可能NR控制着 KNO_3 还原为氨的速率, 使生成的氨始终处于低氨水平, 因而高、低浓度的 KNO_3 为氮源时所表现的情况与低氨时类似。Brown^[15] 用一种海洋假单胞菌研究硝酸盐同化生理时也观察到这一类似结果, 他指出, 在硝酸盐上生长, 生理上相当于氮限制, 可能是因为硝酸盐吸收水平上或者NR的水平上发生了某种限制。在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源的培养条件下生长的菌体内仅有很低水平的NR, 估计这是菌体内组成型NR的酶活力。

从上述实验结果, 我们可以看到无论 KNO_3 以高浓度或低浓度作为氮源, 还是 KNO_3 与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 一起作为氮源, 与高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 相比, KNO_3 的存在都导致GS水平上升, ADH抑制, SV产量提高。明显看到菌体内GS水平与力复霉素SV合成正相关, 而菌体内ADH水平与力

复霉素SV合成则呈负的相关性。力复霉素SV是环桥类抗生素, 它的分子由多酮链(Polyketide)和芳香环组成。根据我们已发表工作^[8,9]及本文看来, KNO_3 促进SV合成, 一方面是调节碳的代谢朝着有利于为SV多酮链合成提供前体(甲基丙二酰CoA)的方向进行, 另一方面又调节氮代谢朝着有利于为芳香环^[16,17] (C_7N) 提供氮原子的方向进行。也就是说, KNO_3 加入, 同时促进了碳代谢与氮代谢。至于 KNO_3 如何使碳、氮代谢协同, 这是个很值得深入探讨的问题。

另外, 在以上所研究的各条件下未能检出谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酸合成酶(GOGAT), 但可测得谷-丙转氨酶(GPT), 谷-草转氨酶(GOT), 天冬氨酸酶(aspartase)的存在。显然, 通过ADH与GPT或天冬氨酸酶与GOT的共同作用均可为GS反应提供谷氨酸。

与氨同化有关的酶在各种微生物中分布的情况是不同的。比如, 丝状真菌中没有GOGAT, 但有需要辅酶I(NAD)或辅酶II(NADP)的GDH^[1]。一种蓝绿藻中有GS/GOGAT, 但无GDH^[18]。裂殖酵母中虽然GDH, GS/GOGAT均有^[19], 但这三种酶水平对于 NH_4^+ 水平变化的反应不同。大多数细菌主要通过GDH途径来同化氨, 但许多芽孢菌^[12]、藻类^[18]则以ADH为氨同化的主要途径。U-32为一变株, 在它的菌丝体中未测出GOGAT, 究竟是因为地中海诺卡氏菌本来就无此酶, 还是U-32本身是GOGAT缺失变株, 值得进一步研究。

(四) 洗涤菌体中谷氨酰胺对SV合成的影响

为了进一步确证以上的这种推测, 我们用洗涤菌体进行了试验。先将菌体转入含0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的无机发酵培养基中

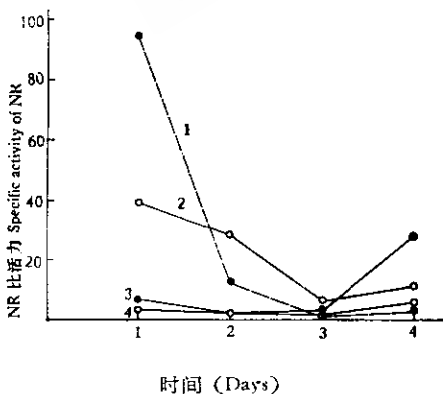


图6 不同氮源中生长的菌体内NR活力比较

Fig. 6 Specific activity of NR of mycelia grown in different nitrogen source media

1. 0.3% KNO_3 2. 1.2% KNO_3
3. 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4. 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

表 1 用洗涤菌体试验不同氮源对 SV 合成的影响

Table 1 Effect of different nitrogen source on the SV Production in the washed mycelium experiment:

氮源(浓度) Nitrogen source (concentration)	对照 Control	L-Glu (10mM)	DL-Gln (10mM)
SV 产量(微克/毫克干重) SV Yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight)	0.57	0.63	1.16
SV 增加(%) SV increase (%)	100	110.5	203.5

培养 60 小时, 收集菌体, 洗涤后放入保温液中保温 23 小时。保温液中分别加入 10mM L-Glu、DL-Gln 作为氮源, 以不加氮源为对照。结果如表 1 所示。加入 DL-Gln 这一组 SV 合成量最高, 超过对照一倍, 而加入 L-Glu 的仅比对照高 10% 左右。这为以上的推测, 就是 Gln 有可能为 SV 中芳香部分的“C₇N”提供了氮原子, 提供了一个证据。应用 ¹⁵N 标记酰胺氮的谷氨酰胺的实验进一步证实这一结论^[20]。

参 考 文 献

- [1] Brown, C. M.: in “Microorganisms and nitrogen sources”, Ed. by J. W. Payne, John Wiley and Sons, Chichester, 1980, pp. 511—531.
- [2] Aharonowitz, Y.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 209—233, 1980.
- [3] Aharonowitz, Y. and A. L. Demain.: *Can. J. Microbiol.*, **25**: 61—67, 1979.
- [4] Aharonowitz, Y.: in “Genetics of industrial microorganisms”, O. K. Sebek and A. I. Laskin (eds), American Society for Microbiology, 1979, pp. 210—217.
- [5] Gräfe, U. et al.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, **17**: 201—209, 1977.
- [6] Lara, F. et al.: in “Abstracts of 6th international fermentation symposium 5th international symposium on yeasts”, 1980, p. 17.
- [7] 焦瑞身等: 植物生理学报, **5**: 395—402, 1979.
- [8] 陈聿美等: 植物生理学报, **6**: 291—298, 1980.
- [9] 顾薇玲等: 微生物学报, **23**(4): 313—319, 1983.
- [10] Woolfolk, C. A. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**: 177—192, 1966.
- [11] Guerrero, M. G. et al.: *Arch. Microbiol.*, **91**: 287—304, 1973.
- [12] Hong, M. M. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **36**: 288, 1950.
- [13] Stadtman, E. R.: in “Advances in enzyme regulation”, Ed. by G. Weber, Pergamon Press, Oxford, 1970, Vol. 8, pp. 99—117.
- [14] Lowry, P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- [15] Brown, C. M. and B. Johnson.: in “Advances in aquatic microbiology”, Ed. by M. R. Droop and H. W. Jannasch, Academic Press, London, 1977, 1: 49—114.
- [16] White, R. J. et al.: *Nature*, **243**: 273—277, 1973.
- [17] White, R. J. and E. Martinelli.: *FEBS Letter*, **49**: 233—236, 1974.
- [18] Brown, C. M.: in “Microorganisms and nitrogen sources”, Ed. by J. W. Payne, John Wiley and Sons, Chichester, 1980, p. 590.
- [19] Brown, C. M. et al.: *Nature, New Biol.*, **246**: 115, 1973.
- [20] 焦瑞身等: 中国科学(B 辑), 1983 年 12 期, 1097—1104.

A POSITIVE CORRELATION BETWEEN RIFAMYCIN SV BIOSYNTHESIS AND THE ACTIVITY OF GLUTAMINE SYNTHETASE

Ni Liuying Liu Cijun Jin Zhikun Chiao Ruishen

(Department of Microbiology, Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica Shanghai.)

Results reported in this paper show that the pathways of ammonia assimilation in *Nocardia mediterranei* U-32 were regulated by the concentration of ammonia in a synthetic medium. When the ammonia concentration in the culture medium was high, the activity of glutamine synthetase (GS) was low, while that of the alanine dehydrogenase (ADH) was high. Under the condition of low ammonia concentration, however, the activity of GS was increased remarkably, but the ADH activity was reduced.

Besides, it was also obtained that excessive amounts of ammonium inhibited rifamycin SV biosynthesis. Thus a positive correlation between rifamycin SV biosynthesis and GS activity was observed in *N. mediterranei* U-32. It is suggested that a high specific activity of GS primarily stimulated the glutamine production and glutamine in turn supplied the nitrogen atom to the C₇N moiety, the aromatic

precursor of rifamycin SV, thereby enhancing rifamycin SV production. The results obtained from the washed mycelium experiments provided another evidence for the suggestion mentioned above. It seems that the GS is a key enzyme not only in primary metabolism but also in secondary metabolism.

The addition of potassium nitrate, either with the ammonia simultaneously or as the sole nitrogen source at low or high concentration, increased both the GS activity and rifamycin SV production, but decreased the ADH level. It seems that nitrate is able to control the concentration of ammonia in the mycelia to a lower level, so that both the synthesis of GS and SV were enhanced. The regulatory mechanism of nitrate on the concentration of ammonia requires further clarification.

Key words

Rifamycin; Glutamine synthetase