

## 无机磷对力复霉素合成的调节\*

倪榴英 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道无机磷抑制力复霉素产生菌地中海诺卡氏菌 U-32 中力复霉素 (SV) 的合成。随着丰富培养基中无机磷浓度的增加, SV 的合成受到明显抑制, 最高抑制率达 80%, 而菌体生长则增加 65%。不同时间加入无机磷对抗生素产量的影响是不相同的, 在抗生素合成前 (0—48h), 无机磷的加入能严重影响 SV 的合成, 但在合成期 (72h 以后) 加入则几乎不影响 SV 的产量。

提高培养基中无机磷的起始浓度, 使菌体合成脂肪量增加 70%; 甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶和甲基丙二酰 CoA 羧基变位酶的活力受到明显抑制; 菌体内腺苷化合物 ADP、ATP 的含量在整个发酵期都明显增加, 细胞内能荷水平也因培养基中无机磷的起始浓度增加而提高。

**关键词** 力复霉素; 无机磷

无机磷不仅调节初级代谢的许多反应<sup>[1-2]</sup>, 而且调节次级代谢, 特别对许多抗生素的合成具有抑制作用<sup>[3-6]</sup>, 所以抗生素工业生产上也经常限制无机磷浓度。因此, 进行无机磷对于抗生素生物合成的调节作用的研究是十分重要的。

近年来已报道了一些无机磷对于抗生素生物合成的调节机制<sup>[7-10]</sup>。本文对力复霉素产生菌地中海诺卡氏菌 U-32 的磷调节作了探讨。

## 材料和方法

### (一) 菌种

地中海诺卡氏菌 (*Nocardia mediterranei* U-32) 由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, 28℃ 旋转摇床培养 40h 后, 按 10% 的接种量接种到有机无渣发酵培养基中, 其成分为 (g/L): 黄豆粉 10, 鱼粉 5 (灭菌前, 煮沸 30 分钟, 过滤, 取清液); 葡萄糖 100, 蛋白胨 10, CaCO<sub>3</sub> 3, CoCl<sub>2</sub> 3 μg/ml, pH

7.0, 无机磷含量见各实验。在 28℃ 旋转摇床上进行培养 (转床旋转半径 2.5 cm, 转速 190 r/min)。

### (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,

本文于 1986 年 11 月 24 日收到。

\* 本文所用符号如下:

Glucose: 葡萄糖

Pyruvate: 丙酮酸

Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A

Malonyl-CoA: 丙二酰辅酶 A

Methylmalonyl-CoA: 甲基丙二酰辅酶 A

Propionyl-CoA: 丙酰辅酶 A

Oxaloacetate: 草酰乙酸

Propionate: 丙酸

Succinate: 琥珀酸

α-Ketoglutarate: α-酮戊二酸

Glutamate: 谷氨酸

Fatty acid: 脂肪酸

Succinyl-CoA: 琥珀酰 CoA

Polyketide: 多酮体

Rifamycin SV: 力复霉素 SV

Carboxyltransferase: 羧基转移酶

Mutase: 变位酶

Racemase: 消旋酶

吸滤后用蒸馏水将菌体充分洗涤, 连同滤纸于 80℃ 烘干至恒重。

3. 脂肪测定: 取 150 ml 发酵液过滤, 洗净菌体, 80—90℃ 烘干、碾碎, 用索氏脂肪浸出器于 70—74℃ 抽提 10h。溶剂为氯仿: 甲醇 = 2:1。蒸去溶剂, 将浸出液放在通风橱内干燥, 称重。

4. 酶活力测定: 甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶按 Vu-Trong 等方法<sup>[11]</sup>测定。甲基丙二酰 CoA 羧基变位酶按 Kellermeier 等方法<sup>[12]</sup>测定。比活力: 以  $\Delta A_{340} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$  表示。蛋白质测定按 Lowry 等方法<sup>[13]</sup>测定。(1) 无细胞抽液的制备: 取发酵液过滤, 用蒸馏水洗涤二次, 然后用 50 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 8.0) 洗二次。按湿菌体 1:10 的比例悬浮到 Tris 缓冲液 (50 mmol/L Tris + 10 mmol/L 巯基乙醇) 中。菌体在 0℃、MSE 超声波击碎器 (20KC) 处理 10 min, 离心 (18,000 × g, 0℃) 20min, 上清液用于酶和蛋白质分析。(2) 按 Simon 等方法<sup>[14]</sup>制备丙酰 CoA。

5. 腺苷化合物的测定: (1) 菌体中腺苷化合物的抽提: 取一定体积的发酵液过滤取菌体, 用蒸馏水洗二次, 再用 20 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.0—7.7) 洗一次, 将菌体迅速转入沸腾的 10 ml 20 mmol/L Tris 缓冲液 (pH 7.0—7.7) 中, 煮沸 5 min, 立即放入冰浴中冷却, 然后离心 (3,500 × g) 3 min, 取上清液冰冻放置, 待测定。各样品同时进行菌体生长测定。(2) 按李立人等方法<sup>[15]</sup>制备荧光素酶。(3) 按 Vu-Trong 等方法<sup>[16]</sup>测定 ATP、ADP、AMP。

## 结果与讨论

### (一) 无机磷对力复霉素 SV 合成的影响

力复霉素产生菌 U-32 合成 SV 的能力受着无机磷的调节。在发酵培养基中补加递增浓度的无机磷, SV 的合成受到明显抑制 (图 1)。当无机磷浓度达 3 mmol/L 时, SV 的合成抑制 65%。图 2 表明菌体生长的促进与抗生素产生的抑制同步<sup>[16]</sup>, 无机磷的加入使菌体生长明显促进, SV

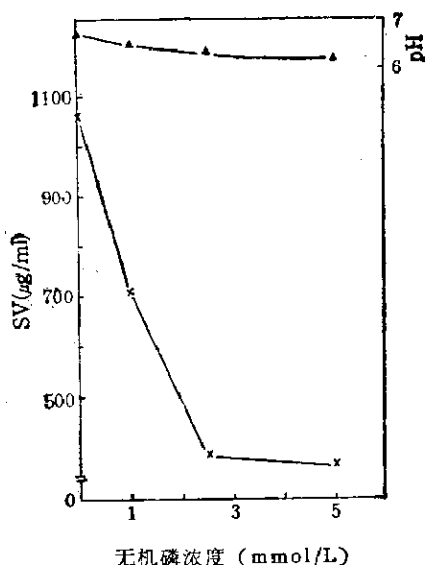


图 1 无机磷浓度对 SV 合成的影响

Fig. 1 Effect of inorganic phosphate on SV production

▲—▲ pH; ×—× 力复霉素 SV Rifamycin SV

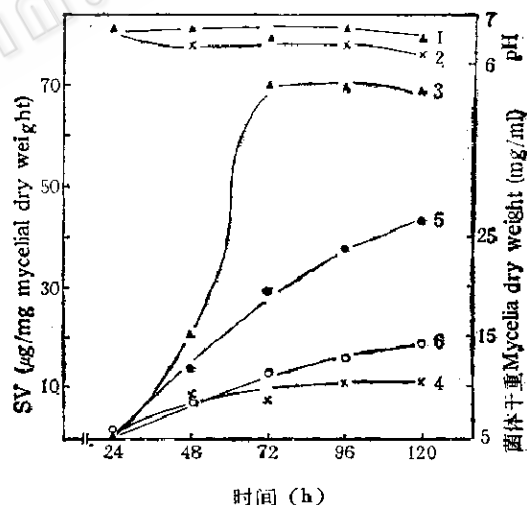


图 2 无机磷对 U-32 的 pH、菌体生长和 SV 合成的影响

Fig. 2 Effects of inorganic phosphate on pH, growth and SV production

1, 2 pH; 3, 4. 力复霉素 SV ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  菌丝体干重) Rifamycin SV yield ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  dry weight of mycelia)

5, 6. 菌丝体干重 Dry weight of mycelia ( $\text{mg}/\text{ml}$ )

▲—▲ ○—○ 对照 Control  
×—× ●—● 5mmol/L 无机磷 5mmol/L inorganic phosphate added

合成量则明显降低。当发酵培养基中无机磷的起始浓度为  $5\text{ mmol/L}$  时, SV 合成量仅为对照的  $1/7$ 。无机磷的加入对发酵过程中的 pH 值影响不大。

在发酵培养的不同时间分别补加  $8\text{ mmol/L}$ 、 $16\text{ mmol/L}$  无机磷,总发酵时间  $120\text{ h}$ , 然后测定 SV 产量,发现无机磷加入时间对抗生素产量的影响是不相同的(图 3)。在抗生素合成前期 ( $0-48\text{ h}$ ), 无机磷能严重影响 SV 的合成,但在合成后期 ( $72\text{ h}$  以后)则几乎不影响 SV 的产量。从图 2 中看出 SV 主要在  $48\text{ h}$  后合成,而无机磷的影响则发生在抗生素合成前。这一结果可能表明无机磷抑制 SV 的合成是因为阻遏了与 SV 合成有关的酶的合成。

理,我们对菌体的脂肪含量作了分析。从图 4 中看到,当培养基中无机磷的起始浓度为  $5\text{ mmol/L}$  时,培养  $120\text{ h}$  的对照菌体的脂肪合成量为每克干菌体含  $207\text{ mg}$  脂肪,加无机磷后菌体则为  $353\text{ mg}$ 。两者相比,加无机磷后菌体脂肪合成量增加  $70\%$ ,菌体生长增加  $65\%$ ,而 SV 则减少  $80\%$ 。已经知道,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由乙酰 CoA 或丙酰 CoA 逐步缩合而成的<sup>[18]</sup>,也就是说,脂肪合成与力复霉素 SV 的合成具有共同的前体。从上面所得结果推断,无机磷是通过促进与 SV 合成竞争前体的初级代谢途径——脂肪的合成来显示其抑制作用的。

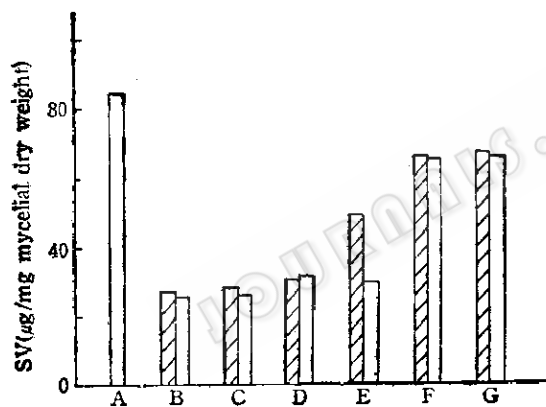


图 3 无机磷加入时间对力复霉素 SV 合成的影响

Fig. 3 Effect of time of inorganic phosphate adding on SV biosynthesis

A. 对照 Control; B. C. D. E. F. G.: 分别为  $0, 8, 24, 48, 72, 96\text{ h}$  加入无机磷 inorganic phosphate was added at  $0, 8, 24, 48, 72, 96\text{ h}$  respectively

总发酵时间 Total fermentation time:  $120\text{ h}$

▨ 加入  $8\text{ mmol/L}$  无机磷

$8\text{ mmol/L}$  inorganic phosphate added

□ 加入  $16\text{ mmol/L}$  无机磷

$16\text{ mmol/L}$  inorganic phosphate added

## (二) 无机磷对于菌体脂肪合成的影响

响

为了进一步探讨无机磷抑制作用的机

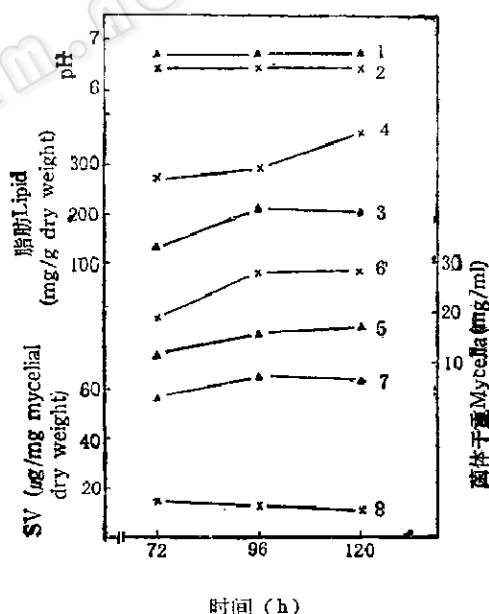


图 4 无机磷对菌体脂肪合成的影响

Fig. 4 Effect of inorganic phosphate on mycelial lipid synthesis

1, 2. pH; 3, 4. 菌体脂肪含量 Content of mycelial lipid; 5, 6. 菌体干重 Dry weight of mycelia; 7, 8. SV 产量 Rifamycin SV

▲—▲ 对照菌体 Control mycelia

×—× 加无机磷菌体 Mycelia with inorganic phosphate added

### (三) 无机磷对酶活性的影响

脂肪含量的测定结果已表明, 增加培养基中无机磷的含量能促进菌体合成脂肪, 也就是说无机磷将 SV 合成所需的前体乙酰 CoA 部分转移到脂肪合成, 因而使 SV 合成量减少。White 等<sup>[29]</sup>用同位素示踪方法证明, 力复霉素分子中除 C<sub>7</sub>N 部分外, 是由 8 个丙酸和 3 个醋酸缩合而成。乙酰 CoA 要转移到力复霉素的合成必须转变成丙酸或丙酸衍生物—甲基丙二酰 CoA。为此, 我们测定了甲基丙二酰 CoA 合成途径中的甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶和甲基丙二酰 CoA 羧基变位酶。测定结果如图 5 所示。可以看到, 当培养基中加入 5 mmol/L 无机磷后, 菌体内甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶(图 5-A)和甲基丙二酰 CoA 羧基变位酶(图 5-B)活力受到

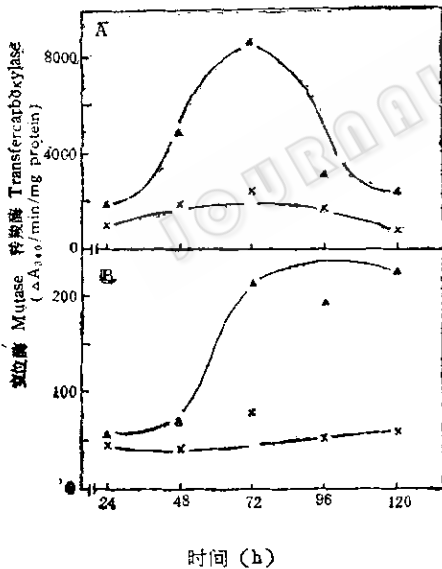


图 5 无机磷对甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶 (A)、甲基丙二酰 CoA 变位酶 (B) 的影响  
Fig. 5 Effects of inorganic phosphate on the activities of methylmalonyl-CoA carboxyltransferase and methylmalonyl-CoA mutase

▲—▲ 对照菌体 Control  
×—× 加无机磷菌体 Mycelia added with inorganic phosphate

明显抑制。这与 Vu-Trong 等<sup>[6]</sup>报导的泰乐霉素 (Tylosin) 产生菌中情况相似。以上结果说明, 无机磷对 SV 的前体形成中所涉及的酶活力进行着调节。

### (四) 无机磷对能量代谢的调节

为了探讨无机磷对能量代谢的影响, 我们分析了菌体内腺苷化合物 ATP、ADP、AMP 的含量(图 6)。当培养基中加入 5 mmol/L 无机磷后, 菌体内 ATP (图 6-C)、ADP (图 6-D) 的含量在整个产 SV 期都明显高于对照菌体内的含量, 菌体内 AMP (图 6-B) 含量则明显低于对照菌体。菌体内总腺苷化合物水平的变化(图 6-E)与 ATP、ADP 的变化相类

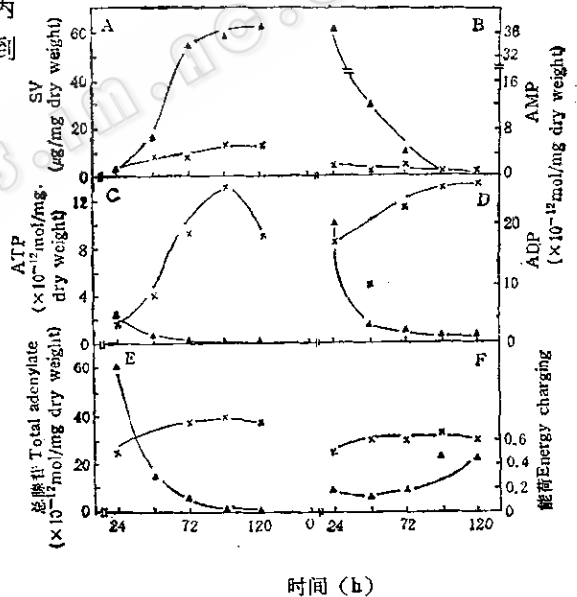


图 6 无机磷对腺苷化合物库和能荷的影响  
Fig. 6 Effects of inorganic phosphate on adenylate level and energy charging

A. 力复霉素 SV Rifamycin SV; B. AMP 含量 AMP content; C. ATP 含量 ATP content; D. ADP 含量 ADP content E. 总腺苷化合物 Total adenylate; F. 能荷 Energy charging  
▲—▲ 对照菌体 Mycelia control  
×—× 加无机磷菌体 Mycelia added with inorganic phosphate

似,即在产 SV 期,它们的水平因无机磷加入而高于对照菌体。图 6-F 表明细胞内能荷水平也因培养基中无机磷的加入而提高。类似的观察在杀假丝菌素 (Candididin)<sup>[20]</sup> 和泰乐霉素<sup>[6]</sup>中已有报道。至于这些极其活跃的代谢调节物质是如何起作用的,它们是否为抗生素的磷调节的共同调节因子,尚待进一步研究。

从以上结果可以看到,无机磷对力复霉素 SV 的生物合成的抑制作用是通过调

节一些控制 SV 生物合成的因素来显示的 (图 7)。实际上是在促进与SV合成竞争前体的初级代谢途径 (促进菌体合成脂肪); 抑制为 SV 合成提供前体的初级代谢途径 (抑制菌体的甲基丙二酰 CoA 羧基转移酶和甲基丙二酰 CoA 羧基变位酶的活力); 控制细胞内腺苷化合物及能荷水平。从中可以看到,次级代谢途径的调节是以一种复杂的方式与初级代谢调节相关联。

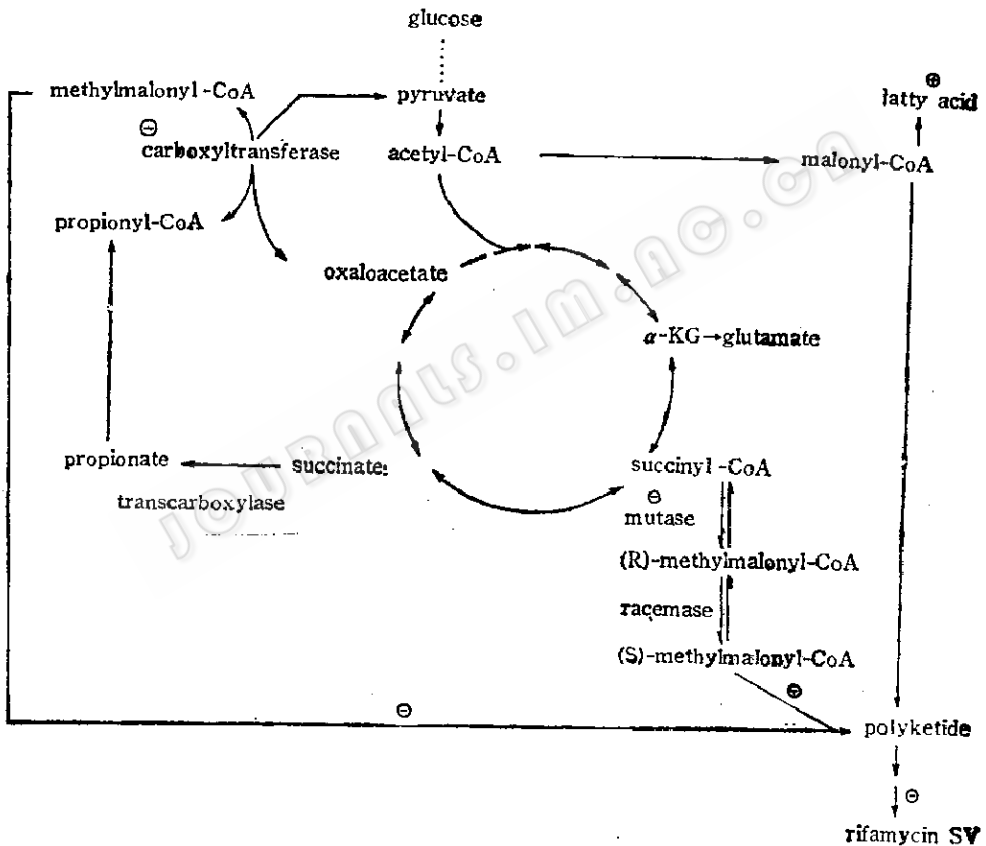


图 7 无机磷抑制力复霉素 SV 合成的作用机制模式图

Fig. 7 Possible mechanisms for inorganic phosphate inhibited rifamycin SV biosynthesis  
+ stimulation — inhibition

### 参考文献

- [1] Hostalek, Z.: *Folia. Microbiol.*, 9: 78—88, 1964.
- [2] Perlman, D. et al.: *J. Bacteriol.*, 63: 253—262, 1951.

- [3] Martin, J. F.: *Adv. Biochem. Eng.*, 6: 105—127, 1977.
- [4] Weinberg, E. D.: *Dev. Ind. Microbiol.*, 15: 70—81, 1974.
- [5] Mardry, N. et al.: *Env. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7: 365—370, 1979.
- [6] Vu-Trong, K. et al.: *Antimicrob. Agents and*

- Chemother.*, 19: 209—212, 1981.
- [7] Liu, C. M. et al.: *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 7: 196—202, 1975.
- [8] Martin, J. F. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 1103—1109, 1976.
- [9] Martin, J. F.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 13—38, 1977.
- [10] Vining, L. C.: *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*, Addison-Wesley Publishing Company, London. Amsterdam. Don Mills, Ontario. Sydney. Tokyo, 194—196, 1983.
- [11] Vu-Trong, K. et al.: *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 17: 519—525, 1980.
- [12] Kellermeyer, W. et al.: *Methods in Enzymology*, (ed. Lowenstein, J. M.), Academic Press, 13: 207—215, 1969.
- [13] Lowry, P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
- [14] Simon, E. J. et al.: *Succinyl CoA. J. Am. Chem. Soc.* 75: 2520, 1953.
- [15] 李立人等: 生物化学与生物物理进展, 6: 60—62, 1980。
- [16] Stephen, W. D. et al.: *Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi*, (ed. J. W. Bennett), Alex elegler, New York and Basel, 35—54, 1983.
- [17] Gersch, D.: *Proc. Biochem.*, 15: 21—25, 1980.
- [18] Birch, A. J. et al.: *Tetrahedron Lett.*, 1485, 1964.
- [19] White, R. J. et al.: *Nature*, 243: 273, 1973.
- [20] Martin, J. F. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83: 822—828, 1978.

## PHOSPHATE CONTROL TO RIFAMYCIN SV BIOSYNTHESIS

Ni Liuying Chiao Juishen

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

In this report, the inhibitory effect of inorganic phosphate on rifamycin SV biosynthesis was studied. When inorganic phosphate was added at the trophophase (0—48 h) of the fermentation, a pronounced suppression of rifamycin SV synthesis and a more rapid growth of the culture were found. The earlier the addition of phosphate, the more severe the inhibitory effect was.

In order to elucidate the possible mechanisms about this phosphate inhibitory effect, assayed the lipid content, enzyme activity and adenylates content in the mycelia. First, when the inorganic phosphate (5 mmol/L) was added at the beginning of the fermentation, the mycelial lipid content was increased to 353 mg/g dry weight, whereas that of the control mycelia was 207 mg/g dry weight. Second, the activities of methylmalonyl-co-

enzyme A carboxyltransferase and methylmalonyl-coenzyme A mutase were suppressed by the increased concentration of inorganic phosphate. Finally, increased level of inorganic phosphate caused a marked enhancement in the levels of ATP and ADP, and a decrease in AMP content, and the energy charge was enhanced by the addition of inorganic phosphate.

A scheme correlating the observed above results is suggested, and further study is necessary to elucidated about the target reactions brought about by the excessive amount of inorganic phosphate. It is possible that the variation in adenylate pool may function as the intracellular effectors.

### Key words

Rifamycin; Inorganic phosphate