

# 麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌 1748 变株 68 的特性研究

王以光 肖春玲 龚利民 刘若莹

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

从麦迪霉素产生菌 *S. mycarofaciens* 1748 中筛选分离到一株无活性变株 68, 对其进行了培养特征、生理生化特性及阻断部位的研究。同时发现该变株能将螺旋霉素生物转化为 4'-丙酰螺旋霉素。

## 材料与方法

### (一) 菌种

1. 麦迪霉素产生菌: 生米卡链霉菌 (*S. mycarofaciens*) 1748 为本所保存。

2. 八叠球菌: 抗菌活性测定试验菌, 为本所保存。

### (二) 培养基

1. 斜面孢子培养基: 见参考文献[1]。

2. 菌种分离与固体发酵培养基(%): 酵母膏 0.4, 葡萄糖 0.4, 麦芽糖 1.0, 琼脂 20, pH7.0。

3. 种子培养基: 见参考文献[2]。

4. 液体发酵培养基(%): 黄豆饼粉 3.0, 葡萄糖 3.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.14,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCO}_3$  0.3。

5. 八叠球菌抗菌活性测定培养基(%): 蛋白胨 1.0, 肉膏 0.3, 酵母膏 0.3, 葡萄糖 0.1,  $\text{NaCl}$  0.5, 琼脂 2.0, pH8.0。

### (三) 无活性变株的筛选与分离

将菌种孢子悬液涂布在含有分离培养基的平皿上, 经高温培养 3 天, 移至 30—37℃ 继续培养, 单菌落按照文献[3]方法进行培养及测定活性。

### (四) 无活性变株培养特征及生理生化特性

按照放线菌的一般分类方法进行<sup>[4,5]</sup>。

### (五) 无活性变株 68 在生物合成途径中阻断部位

1. 用互补共合成的方法<sup>[1]</sup>。

2. 分离纯化及鉴别变株所产生的中间体。

3. 在无活性变株培养物中加入麦迪霉素生物合成中间体, 再培养 24 小时后, 鉴别其终产物。

### (六) 无活性变株对螺旋霉素进行微生物转化

按照参考文献[6]的方法。

## 结果与讨论

### (一) 无活性变株 68 的获得

将麦迪霉素产生菌生米卡链霉菌 1748 的孢子涂布在含有分离培养基的平皿上, 分别置于 40、41、41.5、42℃ 恒温培养 3—4 天, 移至 37℃ 培养 5—7 天, 同时以在 37℃ 培养 5—7 天的平皿作对照, 计算高温培养后孢子的存活率, 并测定不同温度处理后获得无活性变株的频率。结果以 41.5℃ 处理后获得的无活性变株的频率最高 (2—3%), 孢子的存活率为 0.01—0.1%。共获得十余株无活性变株, 从中得到变株 68。经在固体培养基上反复纯化及液体发酵培养基中试验, 该菌株均不产生抗菌活性物质。变株 68 至今在斜面中反复传代达四年之久, 未发现有回复突变现象。

### (二) 变株 68 的培养特征及生理生化特性

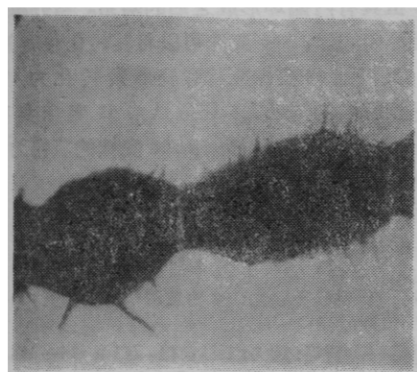
1. 形态特征: 变株 68 与原株 1748 的孢子丝均为螺旋形, 孢子为卵圆形; 68 变株孢子表面光滑(图 1), 1748 原株孢子带刺(图 2)。



图 1 68 变株孢子形态(×50000)

本文于 1991 年 2 月 11 日收到。

刘伯宁同志参加部分工作; C. R. Hutchinson 教授提供麦迪霉素生物合成中间体 platenolide I, II, 特此致谢。

图2 1748 原株孢子形态( $\times 50000$ )

## 2. 无活性变株 68 的生理生化特性 (表 1):

由表 1 可见, 无活性变株 68 与原株 1748 的生理生化反应结果基本一致。

3. 碳源利用: 无活性变株 68 利用果糖较好, 对肌醇、木糖、甘露醇、棉子糖、蔗糖、葡萄糖利用稍差, 不利用纤维素、阿拉伯糖、鼠李糖。1748 原株对果糖以外的肌醇、葡萄糖的利用也较好, 对阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、甘露醇、棉子糖、蔗糖的利

表 1 68 变株及 1748 原株的生理生化反应

生理生化反应	68 变株	1748 原株
牛奶酪化	+	++
明胶液化	+	+
黑色素反应	-	-
硝酸还原	+	+
纤维素分解	-	-
淀粉水解	+	+

用稍差, 不能利用纤维素。说明 68 变株在碳源利用方面与原株比较近似, 略有差异。

4. 培养特征: 68 变株及 1748 原株在一般放线菌常用分类培养基上的培养特征见表 2。

由表 2 可见: 68 变株仅在一些培养基上 (如燕麦粉琼脂, Bennett's 琼脂等) 与原株的培养特征有明显差别。

以上结果可以看出: 68 变株确实为来源于麦迪霉素产生菌原株的突变株。

## (三) 68 变株在麦迪霉素生物合成途径中阻断部位

我们首先使用突变株间的互补合成方

表 2 68 变株及 1748 原株的培养特征

培养基	基内菌丝体		气生菌丝体		可溶性色素	
	68	1748	68	1748	68	1748
蔗糖硝酸盐琼脂	贫乏	贫乏	少, 乳白-灰白, 细密绒毛状	少, 乳白-灰白, 细密绒毛状	无	无
葡萄糖天门冬素琼脂	褐色	褐色	极少	少, 淡灰	微染, 同基丝	微染, 同基丝
甘油苹果酸钙琼脂	奶油淡黄	灰绿灰	无	无	微染, 同基丝	微染, 同基丝
无机盐淀粉琼脂	淡玫瑰紫	淡玫瑰紫	淡灰	丰富, 灰暗紫	微染, 同基丝	微染, 同基丝
合成 1 号琼脂	淡玫瑰紫	丰富, 煤褐色	少, 乳白-淡玫瑰紫	乳白、灰暗褐	微染, 同基丝	微染, 同基丝
营养琼脂	奶油淡黄	奶油淡黄	无	无	无	无
酪氨酸琼脂	黄、煤褐	褐色	无	贫乏, 淡灰	无	无
酵母胨麦芽青琼脂	深栗色	深栗色	丰富, 鼠灰	丰富, 淡玫瑰紫	微染, 同基丝	微染, 同基丝
Bennett's 琼脂	淡柠檬黄	深栗色	无	丰富, 灰带玫瑰	微染, 同基丝	微染, 同基丝
土豆块	深栗棕	深栗色	少, 乳白-微灰	丰富, 乳白-灰白-粉白, 细绒毛状	栗棕-深栗棕	栗棕-深栗棕
燕麦粉琼脂	贫乏	灰暗紫	无	丰富, 灰暗紫	无	微染, 同基丝

法<sup>[1]</sup>，确定 68 变株在生物合成途径中的阻断部位。结果在我们所获得的十余株变株中都不能进行互补共合成。说明这些变株可能阻断在同一部位。

分离、纯化 68 变株所积累的中间体，并进行红外光谱的测定(图略)，结果表明红外吸收光谱中缺乏麦迪霉素内酯环上典型的  $C=O$  峰。说明 68 变株可能为不产生麦迪霉素内酯环的变株。为证实这一点，我们在 68 变株培养液中加入麦迪霉素大环内酯中间体 platenolide I(O 型)及 II(OH 型)，并进行微生物转化。对终产物的分析表明：68 变株生物转化 platenolide I, II 的终产物与 1748 原株所产生的麦迪霉素相似。说明 68 变株确实为阻断在麦迪霉素内酯环形成之前的部位。推断为聚酮合成酶基因缺陷型变株。这一推理在我们以后利用 68 变株作为聚酮合成酶基因克隆受体菌的工作中得到了证实<sup>[1]</sup>。它不产生内酯

环，但具有内酯环形成之后的酶系。当外源加入内酯环中间体，68 变株可以将其转化为麦迪霉素。又根据 68 变株能将螺旋霉素转化为 4''-丙酰螺旋霉素的结果<sup>[6]</sup>，可以认为 68 变株具有麦迪霉素 4''-丙酰基转移酶。68 变株的获得为微生物转化研制丙酰螺旋霉素打下了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 龚利民、王以光：生物工程学报，2(2)：24—30，1986。
- [2] 唐 莉等：生物工程学报，7(1)：24—31，1991。
- [3] 王以光：微生物学报，24(4)：357—362，1984。
- [4] Waksman, S. A.: The Actinomycetes, Vol. 2, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961.
- [5] Shirling, E. B. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 16: 313—341, 1966.
- [6] 刘若莹等：中国专利，87-104409, 9。

# THE CHARACTERIZATION OF MUTANT NO. 68 FROM MIDECAMYCIN PRODUCING STRAIN S. MYCAROFACIENS 1748

Wang Yiguang Xiao Chungling Gong Limin Liu Royin

(Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS, Beijing 100050)

A stable mutant No. 68 was obtained by treatment of *S. mycarofaciens* 1748 spores at high temperature. The electromicroscopic examination has shown that the mutant No. 68 and parent strain 1748 both have the spore chains of the spiratype. The spores of both strain are cylindrical in shape. The only difference is that the spores of the mutant No. 68 are of smooth surface, but the 1748 are of thorny. The physiological characteristics of both strains are also very similar with slight differences in utilization of few carbon sources and in cultural characters in few medium. Feeding experiment has shown that the mutant No. 68 was blocked in the fo-

rmation of the macrolide lactone in the midecamycin biosynthetic pathway. This suggested that the mutant No. 68 might be a polyketide synthase genes deficient mutant. The ability of the mutant No. 68 to convert spiramycin into 4''-propionylspiramycin indicated that the mutant No. 68 contained the midecamycin 4''-propionyltransferase and could be used for microbial bioconversion of spiramycin into 4''-propionylspiramycin.

## Key words

Midecamycin; Propionylspiramycin; Polyketide deficient mutant