

L-缬氨酸对环孢菌素形成的影响

赵德修

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

环孢菌素的生物合成路线受添加外源氨基酸影响。Kobel 和 Traber^[1]报道过,添加与环孢菌素形成有关的特殊氨基酸可以提高环孢菌素某组分所占的比例。如 DL-氨基丁酸能够提高环孢菌素 A 的产量,而抑制其它环孢菌素组分产生。本文报道添加 L-和 DL-缬氨酸对环孢菌素的主要成分环孢菌素 A 形成的影响。

1 材料和方法

1.1 菌种

实验采用低产量的菌种(*Tolyocladium inflatum*)DSM 63544^[2]。

1.2 培养基

斜面培养:使用 M1 培养基^[2]。种子培养基 MY 培养基^[2]。发酵培养:使用 M2^[2]和 AG 培养基(g/L): Sorbose 20, KH₂PO₄ 10, KCl 5, Bacto-Casamino 10, pH5.5, 蒸馏水 1L。

1.3 培养条件

1.3.1 斜面培养:在 M1 斜面培养基上,27℃ 培养 7~8d。

1.3.2 种子培养:将斜面孢子 10⁷^[3]接种到含有 50ml M2 培养基的三角瓶内,于旋转摇床上培养,转速为 250r/min,27℃ 培养 3d。

1.3.3 发酵培养:接 10% 的接种量,接种于 M2 或 AG 培养基中,发酵培养与种子培养条件相同。

1.4 菌丝增殖量测定

取 6ml 的发酵培养液用 Fitrack 389 滤纸过滤得到菌丝体。在 105℃ 恒温至干燥后称细胞干重。

1.5 环孢菌素测定

吸取 100ml 发酵培养液,离心后得到的菌丝体用蒸馏水洗二次,取 5g 菌丝体用甲醇提取,甲醇提取液在真空下除去溶剂至干燥。然后溶于 2ml 乙醇里,过滤后的滤液用高压液相色谱做等分试样测定。高压液相色谱条件:高压液相色谱(Spectraphysics, San cose CA, USA)。色谱柱:3.3mm × 50mm, SGXC, SUM;流动相:ACN(氨基己腈)/H₂O = 65/35;流速:1ml/min;柱温:60c, 进样:20μl;检测波长:UV-275nm;标准品:环孢菌素 A, B 和 C, G 分别是 Kobel H.(Switzerland)和 Bern M.(Repubic czech)赠送的。

2 结果和讨论

L-缬氨酸在二种培养基中对环孢菌素 A 生产都有明显的促进效果。结果如图 1 所示,在添加有 L-缬氨酸 M2 合成培养基(I),发酵第九天环孢菌素 A 的产量为 680μg/g DCM(干细胞重量),未添加 L-缬氨酸(IV)的产量为 24μg/g DCM,该氨基酸使环孢菌素 A 的产量提高 27 倍。L-缬氨酸对环孢菌素 A 形成有明显促进作用。同时也可以看出,在添加 L-缬氨酸的发酵中,环孢菌素 A 主要是在第 7~12d 形成,其形成的时间比较集中,相反地,在未添加 L-缬氨酸的发酵中看不到环孢菌素形成的高峰期。从现有的数据表明,环孢菌素形成时细胞数减少,相对菌体的生长时间,该药物形成的时间比较集中,这与次

此项研究工作是在捷克科学院微生物研究所(UNESCO C.). Zdenek Rehacek 教授指导下进行的。

本文于 1995 年 3 月 25 日收到。

生代谢物的形成模型是一致的。从环孢菌素 A 的形成和培养物生长速率和环孢菌素 A 形成的强度是同步进行, 在环孢菌素 A 合成速率提高与细胞生长速率基本上是稳定, 但细胞繁殖减速(见图 1)

L-缬氨酸添加到 AG 培养基里效果比在 M2 培养基中稍差一些, 但也能提高环孢菌素 A 的产量如表 1 所示。特别是在发酵的第 10d 可以使该药物的产量提高 3.4 倍, 同时轻度抑制了环孢菌素 B、C 和 G 的形成(见表 1)

L-和 DL-缬氨酸对真菌培养物的生长速率没有明显地影响。在发酵过程中前三天是加速生长。然后指数生长期开始, 细胞以匀一的最大速度成倍增长。7d 后保持了一个相对稳定的细胞干重量阶段。实验结果表明(图 2)温度(27℃, 24℃)时 L-或 DL-缬氨酸提高环孢菌素 A 合成和降解能力没有明显影响。

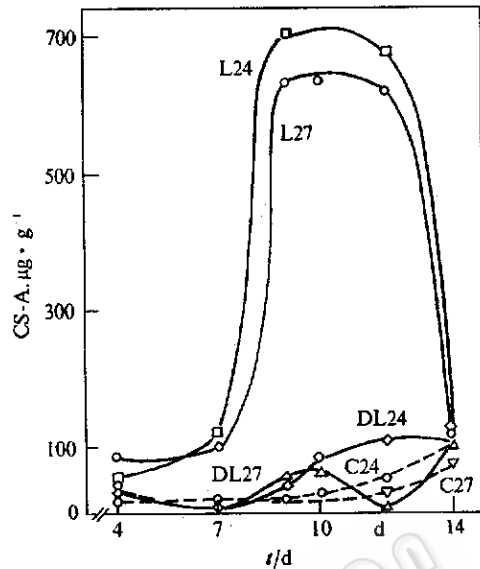


图 1 在不同温度下 L-和 DL-缬氨酸对环孢菌素 A 生产率的影响
数字(24, 27℃)代表温度, C: CK, L-缬氨酸; DL-缬氨酸

表 1 L-缬氨酸对环孢菌素形成的影响

t/d	Medium	Cyclosporin/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$			
		A	B	C	G
5	AG	3.7	0.4	0.1	1.9
	AG-Val	3.3	0.1	1	0.4
8	AG	12.6	0.3	2.3	0.5
	AG-Val	22.5	0.7	1.2	0.4
9	AG	14.6	0.9	1.1	2.7
	AG-Val	26.4	0.3	2.3	0.8
10	AG	11	2.1	2.7	1.6
	AG-Val	37	1.0	2.2	1.2
12	AG	15.4	2.8	2.9	0.5
	AG-Val	31.3	0.2	0.6	0.9

注: L-缬氨酸添加量为 4g/L

在发酵过程中菌丝蛋白的变化有二个阶段(图 1), 在发酵的第 5~7d, 环孢菌素 A 的形成与菌丝蛋白量成反比。而在发酵的后期, 菌丝蛋白和环孢菌素 A 产量的提高是同步进行。

我们的研究结果与 Traber 等人^[5]的报道是一致的。如本文中的外源 L-缬氨酸对提高环孢菌素的形成有很大影响, 而 DL-缬氨酸则几乎没有这种影响, 这些结果进一步为真核生物中肽的生物合成具有很低的专一性提供了据。

参 考 文 献

[1] Kobel H, Traber R. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1982, 14: 237~240.
 [2] Zhao D X, Beran M, Kozova J *et al.* Folia Microbiol, 1991, 36(36): 549~556.
 [3] Isaac C E, Jones A, Pickard M A. Antimicrob Agents Chemother, 1990, 34: 121.

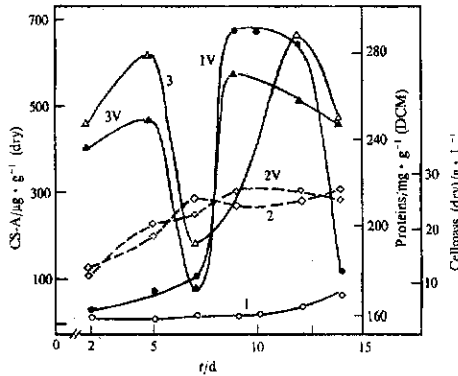


图2 缬氨酸对真菌(*T. inflatum*)生长速率和环孢菌素A生产率蛋白质的影响

- 1(不加), 1V(加L-缬氨酸)的环孢菌素A的产率
 2(不加), 2V(加L-缬氨酸)的干细胞量
 3(不加)3V(加L-缬氨酸)的蛋白质含量

[4] Bulock J D. The Biosynthesis of Natural Products. An introduction to secondary metabolism. McGraw-Mill, London 1965.

[5] Traber R H, Kobel H, Kobel H. J Antibiot, 1989, 42: 491 ~ 597.

Effect of L-valine on Cyclosporin Formation by *Tolypocladium Inflatum*

Zhao Dexiu

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

Abstract Externally supplemented L-valine enhanced yield of cyclosporin A by 27 times and slightly inhibited formation of cyclosporin B, C, and G in synthetic medium. This amino acid was not among variable effecting the growth rate of the culture. L-valine appear attractive for evolving feeding strategies that could lead to increase of final cyclosporin A titer. In contrast, effect of L-valine on production of cyclosporin A is more than of DL-valine.

Key words Cyclosporin, L-valine, *tolypocladium inflatum*

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deep sense of gratitude to Dr. Zdenek Rehacek, DSc., my Ph. D. Supervisor, Head of Laboratory of Metabolism of Microbial Eukaryotes and Director of the Course UNESCO-ROSTE, for his able guidance and continuous willingness to discuss, argue about, and constructively criticizing this work. My sincere thanks are extended to Dr. M. Flieger and Ing. M. Beran for their concern, cooperation and valuable help in this work.