

林肯链霉菌合成林可霉素代谢调节的研究

金 睿* 杨蕴刘 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 在摇瓶条件下研究了葡萄糖、铵盐、磷酸盐对林肯链霉菌产生菌林肯链霉菌的生长及林可霉素生物合成的影响。发酵过程中林可霉素的合成主要发生在菌体生长期,逐渐下降。使用 6% 的葡萄糖未发现通常所说的“葡萄糖效应”。0.2% 铵盐有利于细胞生长,但 0.8% NH_4^+ 对林可霉素的生物合成具有抑制作用。发酵 48h 后补加 0.6% NH_4^+ ,对林可霉素的生成没有显著影响。0.05%~0.1% 磷酸盐对林可霉素合成具有较强的抑制作用。并就磷酸盐对菌体由初级代谢转向次级代谢的作用作了初步考察。

关键词 林肯链霉菌,林可霉素,调节,葡萄糖,铵盐,磷酸盐
学科分类号 Q936

抗生素是微生物的重要次级代谢产物。在阐明了微生物初级代谢调节机制的基础上,次级代谢调控的研究也日益受到重视^[1]。初级代谢对次级代谢有着调节作用。

碳源是发酵过程中合成菌体及抗生素的能量和碳素来源。氮源是用来构成菌体的蛋白质、核酸等含氮物质,以及抗生素等含氮代谢产物的。葡萄糖、 NH_4^+ 是微生物易利用的碳源和氮源,能促进细胞的生长和繁殖。但浓度过高会产生葡萄糖效应和铵阻遏效应,对抗生素的生物合成具有抑制作用^[2~5]。

高浓度的磷酸盐能刺激微生物的生长繁殖,但抑制抗生素的生物合成^[6~9]。磷酸盐的这一作用揭示了初级代谢和次级代谢间的相互关系。我们对林可霉素发酵中葡萄糖、铵盐、磷酸盐如何影响细胞生长和抗生素生产的过程作了研究,并对其结果进行了讨论。

1 材料与方 法

1.1 菌种

林肯链霉菌(*Streptomyces lincolnensis*)Z-512,为华东理工大学惠赠,经中国科学院上海植物生理研究所微生物室多次诱变所获得的林可霉素高产菌株。

1.2 培养基

参见文献[10],培养基中葡萄糖、铵盐和磷酸盐用过滤法除菌,用量根据各试验要求而增减。28℃ 发酵 144h,不同培养时间取样,做各种测定。

本研究得到国家自然科学基金和“863”计划资助。

* 现在南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室做博士后,南京 210093。

收稿日期:1996-10-24,修回日期:1997-07-10。

1.3 生理测定

1.3.1 林可霉素效价的测定：用杯碟法生物测定^[11]，以藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) 为鉴定菌，Lincomycin 为标准 (Sigma)。

1.3.2 菌体生长的测定：干重称量法，准确吸取 5ml 发酵液，用布氏漏斗抽滤后，用蒸馏水充分洗涤菌体，将覆盖菌体的滤纸于 80℃ 烘干至恒重 (滤纸抽滤前先称重)。

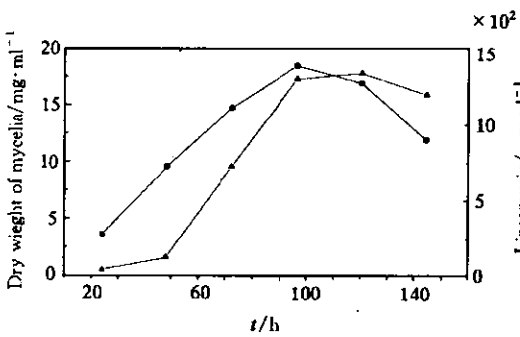


图 1 林肯链霉菌生长期与林可霉素合成期的关系
Fig. 1 Relationship between the phases of *Streptomyces lincolnensis* growth and lincomycin biosynthesis

●—● Dry weight of mycelia
▲—▲ Lincomycin

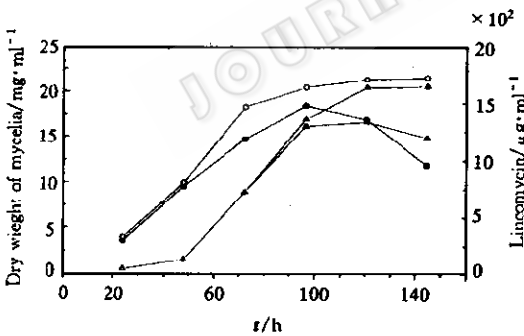


图 2 葡萄糖浓度对菌体生长和林可霉素合成的影响

Fig. 2 Effects of glucose concentration on growth and lincomycin production

Solid: 3% glucose; ○, ●: Cell
Open: 6% glucose; △, ▲: Lincomycin

1.3.3 磷的测定：采用钼酸铵法^[12]。

2 结果与讨论

2.1 林肯链霉菌生长期与林可霉素合成期的关系

当培养基内糖、氮和磷消耗到一定程度时，菌体生长速度逐渐减慢，这时与次级代谢物合成有关的一些酶的活性较高，并开始积累次级代谢物。在培养过程中，定时取样，分别测定林可霉素效价及菌体生长情况 (图 1)。林可霉素的合成开始于菌体生长期，其对数期 (48-96h) 仅比菌体对数生长期 (24-72h) 推迟 24h，且随着菌体生长期的结束逐渐下降。

2.2 葡萄糖对林可霉素的影响

葡萄糖浓度过低对菌体的生长显然不利，而浓度过高又会产生葡萄糖效应，减少抗生素的产量。在我们的实验中没有发现这种现象 (图 2)，用 6% 葡萄糖时，林可霉素的合成并没有受到抑制，反而较 3% 葡萄糖有所提高。这是由于高浓度的葡萄糖为菌体的生长提供了丰富的碳素和能量来源，从而为林可霉素的生物合成在数量和质量上提供了良好保障。

2.3 铵盐 (NH₄⁺) 对林肯链霉菌生长及林可霉素合成的影响

分别以 0.2% 和 0.8% 的 (NH₄)₂SO₄ 作氮源，每隔 24h 取样，观察发酵过程中 NH₄⁺ 对菌体生长及林可霉素合成的影响 (图 3)。结果表明高浓度 NH₄⁺ 可促进菌体生长，但对林可霉素的合成具有明显的抑制作用，其产量仅相当于低 NH₄⁺ 时的 58%。

可见，林肯链霉菌合成林可霉素的能力受 NH₄⁺ 的调节。限制 NH₄⁺ 浓度，可使发酵单位提高。

在发酵 48h 补加 0.6% (NH₄)₂SO₄, 对林可霉素的合成没有明显的影响(图 4)。看来, NH₄⁺ 对林可霉素生物合成的抑制作用主要发生在发酵前期的菌体生长期, 而在抗生素合成开始后没有抑制作用。因而推测 NH₄⁺ 并不是直接抑制抗生素合成酶的活力, 而是在早期影响抗生素合成途径中某一个关键酶的合成。在吸水链霉菌井冈变种合成井冈霉素^[13]、*Streptomyces clavuligerus* 合成头孢菌素^[14]、以及地中海诺卡氏菌合成力复霉素^[15]的过程中也存在这种现象。迄今为止, 除个别例外^[16, 17], 多种抗生素的生物合成受过量 NH₄⁺ 的抑制, 称之为氮阻遏^[14, 18]。

2.4 磷酸盐对林可霉素发酵的影响

在发酵培养基中加入不同浓度的 KH₂PO₄, 每隔 24h 取样, 观察磷酸盐对菌体生长及林可霉素生物合成的影响。结果(图 5)表明: 溶磷含量下降时, 林可霉素才开始产生。磷酸盐含量为 0% 和 0.025% 的发酵培养基中溶磷于 48h 耗尽, 生产期于 48h 开始。而高磷(0.05%, 0.75% 和 0.1%) 发酵培养基中溶磷分别于 72h 和 96h 耗尽, 林可霉素延至此时才开始合成。

从图 5B 可以看到, 加入 0.025% KH₂PO₄ 对林可霉素合成最为有利(相对效价设为 100%)。随着 KH₂PO₄ 含量的加大, 林可霉素合成量显著降低(含量为 0.1% 时, 144h 相对效价仅为 40.4%), 但菌丝生长量增大。说明高磷有利于蛋白质合成, 延长了生长期, 由于后期营养贫乏, 影响了林可霉素的合成。不加 KH₂PO₄ 的发酵, 菌体生长慢, 菌丝量少, 最终效价不高, 相对效价为 88.4%。可见, 林肯链霉菌合成林可霉素的能力受无机磷的调节。

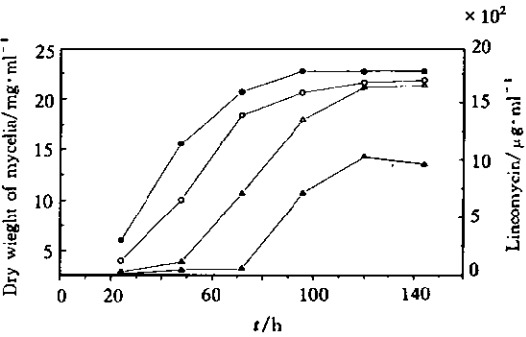


图 3 NH₄⁺ 浓度对菌体生长和林可霉素合成的影响

Fig. 3 Effects of ammonium concentration on growth and lincomycin production
Open: 0.2% (NH₄)₂SO₄; ○, ●: Cell
Solid: 0.8% (NH₄)₂SO₄; △, ▲: Lincomycin

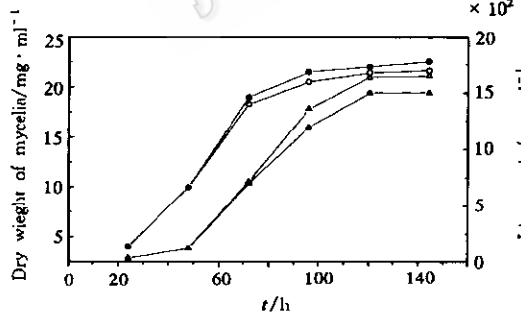


图 4 发酵 48h 补加 NH₄⁺ 对菌体生长和林可霉素合成的影响

Fig. 4 Effects of ammonium added at 48h in the course of fermentation on growth and lincomycin production
Open: Control; ○, ●: Cell; △, ▲: Lincomycin
Solid: Mycelia with ammonium added

2.5 补磷的时间对菌体生长和抗生素合成的影响

林可霉素发酵过程中, 分别于 24, 48 和 72h 补加 0.075% KH₂PO₄, 发现不同时间加入 PO₄⁻, 均能促进菌丝生长, 但对抗生素产量的影响则不同(图 6)。在 24h 抗生素合成期前补加, 磷酸盐将抑制林可霉素的合成, 而在抗生素生产期开始后的 48、72h 补入, 则几乎不影响林可霉素的生物合成。

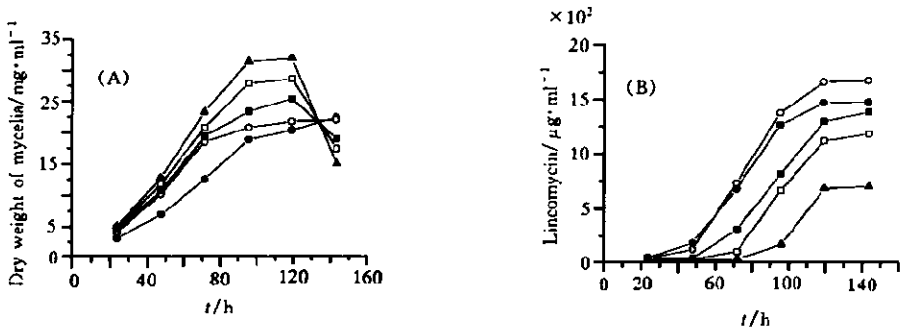


图 5 磷酸盐浓度对菌体生长和林可霉素合成的影响

Fig. 5 Effects of phosphate concentration on growth and lincomycin production

Phosphate concentration: ●—● 0%; ○—○ 0.025%;
 ■—■ 0.05%; □—□ 0.075%; ▲—▲ 0.1%
 (A) Growth of mycelia
 (B) Lincomycin production

上述结果表明, PO_4^- 对林肯链霉菌的初级代谢(生长)转向次级代谢(抗生素生物合成)具有较强的抑制作用, PO_4^- 的耗尽引发了次级代谢的开始,

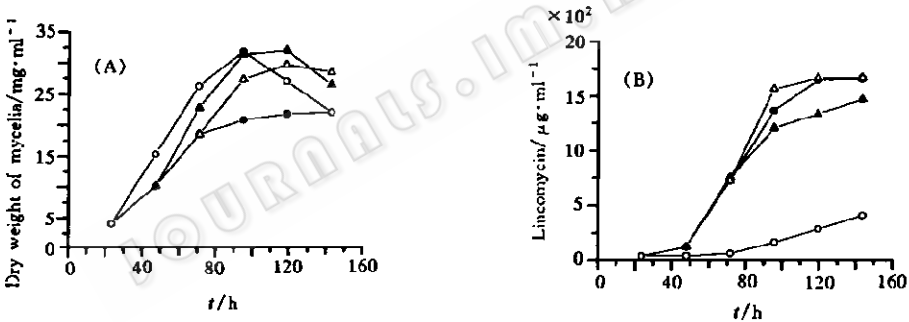


图 6 磷酸盐加入时间对菌体生长和林可霉素合成的影响

Fig. 6 Effects of time of phosphate adding on growth and lincomycin production

●—● Control ○—○ 24h ▲—▲ 48h △—△ 72h

然而, 林可霉素合成开始后补加 PO_4^- 的实验结果与杀念珠菌素的发酵情况^[19]不同, 不是在任何时间补入磷酸盐均使次级代谢逆转为初级代谢, 而是一方面促使菌丝继续生长, 同时林可霉素继续合成不受影响。这是否可以解释为 PO_4^- 抑制林可霉素合成是因为阻遏了与林可霉素合成有关的酶(关键酶)的合成。 PO_4^- 对于已具有活性的关键酶无抑制作用, 而是阻遏关键酶的再合成。至于 PO_4^- 是否是阻遏关键酶的直接效应物抑或影响胞内环腺苷酸的水平, 从而改变了初级代谢向次级代谢的转化等等问题, 尚有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Drew S W, Demain A L. *Ann Rev Microbiol*, 1977, **31**:343~356.
- 2 Gallo M, Katz E. *J Bacteriol*, 1972, **109**:659~667.
- 3 Matsumura M. *J Ferment Technol*, 1978, **56**:345~353.
- 4 Martin J F. *Trend in Biotechnology*, 1985, **3**:39~44.
- 5 Flores M E. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, **26**:191~194.
- 6 Martin J F. *Ann Rev Microbiol*, 1977, **31**:13~38.
- 7 Weinberg E D. *Dev Ind Microbiol*, 1974, **15**:70~81.
- 8 Mardry N. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1979, **7**:365~370.
- 9 Wu-Trong K. *Antimicrob Ag Chemother*, 1981, **19**:209~212.
- 10 金 蓉, 焦瑞身. *中国科学(C辑)*, 1998, **28**(1):生 282
- 11 范秀容, 沈 萍. *微生物学实验*, 北京:高等教育出版社, 1980
- 12 北京大学生物系生物化学教研室. *生物化学实验指导*, 北京:高等教育出版社, 1979, pp. 203~205
- 13 夏天辉, 焦瑞身. *抗生素*, 1986, **11**:439~443
- 14 Aharonowitz Y. *Ann Rev Microbiol*, 1980, **34**:209~233
- 15 刁 蓉, 焦瑞身. *微生物学报*, 1991, **31**:206~212
- 16 Inoue S. *J Ferment Technol*, 1983, **61**:7~12
- 17 Grafe U. *Z Allg Mikrobiol*, 1977, **201**~209
- 18 Lara F. In: *Abstracts of 6th International Fermentation Symposium on Yeast*, 1980, pp. 17
- 19 Liu C M. *Antimicrob Ag Chemother*, 1975, **7**:196~202

Studies on the Metabolic Regulation of Biosynthesis of Lincomycin by *Streptomyces lincolnensis*

Jin Zhe Yang Yunliu Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Effects of glucose, ammonium and phosphate on cell growth and lincomycin biosynthesis in fermentation complex medium containing different levels 0.8% of glucose, ammonium or phosphate were studied in batch cultures of *Streptomyces lincolnensis*. In these fermentations the antibiotic biosynthesis was maximal during growth and always declined at the end of the growth phase. In the experiment it was noticed that the final titers of lincomycin were not inhibited by glucose at concentrations of up to 3%. It was found that both phosphate and ammonium salts, while required for cell growth, had negative effects on antibiotic production. High levels 0.8% of ammonium and phosphate inhibit lincomycin formation and increase mycelia growth. During the course of fermentation addition of ammonium or phosphate to the medium at any time led to an increase in mycelial growth. In addition, no inhibition on lincomycin biosynthesis was observed when the supplement of ammonium or phosphate was made during the idiophase, i. e. after 48 hours of fermentation, but not at 24 hours. The earlier the addition of ammonium or phosphate, the more severe the inhibitory effect was.

Key words *Streptomyces lincolnensis*, lincomycin, regulation, glucose, ammonium, phosphate