

甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、蛋氨酸 在棘孢小单孢菌中的作用

管玉霞¹, 张洪秀², 罗泓¹, 唐翠¹

(1. 福州大学生物科学与工程学院, 福建福州 350002; 2. 山东省环境保护科学研究设计院, 山东济南 250013)

摘要:在棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)突变株(Fzu-707)产生小诺霉素的过程中, 运用正交设计筛选小诺霉素(Micronomicin, MCR)生物合成促进剂——氨基酸。经摇瓶实验证明在原培养基中添加一定量的甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、蛋氨酸有利于生物合成小诺霉素, 在旋转摇床上220 r/min 36 °C培养, 发酵时间由原工艺144 h缩短到104 h, 产量($\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$)较对照可增加20%左右, 产素率($\text{u} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)提高60%左右。

关键词:小诺霉素; 摇瓶发酵; 产素率; 氨基酸

中图分类号:R978.1+2 **文献标识码:**A

Action of glycine, lysine, tyrosine and methionine in *Micromonospora echinospora*

GUAN Yu-xia¹, ZHANG Hong-xiu², LUO Hong¹, TANG Cui¹

(1. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China;

2. Shandong Academy of Environmental Science, Jinan 250013, China)

Abstract: The promoters (amino acids) were screened out by the orthogonal design in the course of biosynthesis micronomicin from the mutant strain (Fzu-707) of *Micromonospora echinospora*. Certain amount of glycine, lysine, tyrosine and methionine was added to the original medium in a flask on the rotary shaker 220 r/min and incubated at 36 °C. It was propitious to biosynthesize micronomicin in cells of *Micromonospora echinospora*. The fermentation time was shortened from 144 h to 104 h, the yield of micronomicin ($\text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$) was increased about 20% compared with the control group and the production rate of micronomicin was increased about 60%.

Key words: micronomicin; fermentation in flask; production rate; amino acids

0 引言

随着人类治病用药量不断增大, 致病菌对抗生素的耐药性和抗生素本身的毒副作用日渐凸显, 人类的健康受到严重威胁, 于是新型抗耐药、低毒副作用抗生素备受关注。

棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)产生的小诺霉素(Micronomicin, MCR)即庆大霉素(Gentamicin, GM)的C_{2b}组分(GM-C_{2b})主要用于治疗细菌, 特别是G⁻菌感染, 如由绿脓杆菌、变形杆菌、沙门氏菌引起的疾病, 而且对耐卡那霉素等药物的大肠杆菌、荚膜杆菌、肠道细菌等球菌也有效; 其

对耳、肾毒性低,并对庆大霉素耐药菌有抗菌作用,是一种广谱、高效、低毒副作用的氨基糖苷类抗生素。

小诺霉素即庆大霉素 C_{2b} 组分,其结构特点是在庆大霉素 C_{1a} 组分的 6'-N 位置上引入一个甲基,所以更具有抗菌谱广、生物活性高、毒副作用低等优势,因此小诺霉素在临床上更具有应用前景。其产生菌——棘孢小单孢菌于 1975 年由日本协和发酵公司首次从土壤中分离得到^[1]。目前,国内小诺霉素的产生菌均是庆大霉素产生菌——棘孢小单孢菌诱变育种的突变株。

近几十年来国内外普遍存在发酵生产周期长、产率低、成本高的问题。这种现状一方面是由菌种遗传性状所决定,所以大部分研究工作注重在菌种改造上^[2,3];另一方面发酵培养条件还不够完善(国外采用微机控制发酵,所以产量较高),于是,前人做了一些发酵条件探索工作:孙克俭等人将均匀设计应用到发酵条件研究中^[4],以期得到较合适的培养环境;杨丽等人对发酵条件如培养基成分、温度和溶氧等做了有益的探索^[5]。但将甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、蛋氨酸几种氨基酸应用到小诺霉素产生菌——棘孢小单孢菌发酵过程中尚未见报道。本工作获国家发明专利,并应用于庆大霉素产生菌——绛红色小单孢菌生产中。本研究探讨几种氨基酸在小诺霉素产生菌——棘孢小单孢菌突变株(Fzu-707)发酵过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株

棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)突变株(Fzu-707)。

1.2 培养基成分

原工艺:黄豆饼粉 2.5%,淀粉 4.5%,葡萄糖 0.5%,蛋白胨 0.5%, $CaCO_3$ 0.4%, $MnSO_4$ 10 μg /100 mL, $CoCl_2$ 100 μg /d;自来水配制 pH7.3。

新方法:原工艺培养基成分+甘氨酸+赖氨酸+酪氨酸+蛋氨酸。

1.3 培养基配制

250 mL 摇瓶,装量 30 mL,1.1 kg/cm²(121 $^{\circ}C$)活蒸汽灭菌 30 min,冷却备用。

1.4 接种培养

无菌挖块取斜面孢子约 0.7 cm \times 0.5 cm 于摇瓶内,置摇床机上 220 r/min,36 $^{\circ}C$ 条件下用原工艺

培养 144 h;新方法培养 104 h。

1.5 收获

从摇床机上取下发酵摇瓶,编号登记,记录发酵液外观、色泽、粘稠、pH 和涂片并进行显微镜观察。在不断摇动下用浓硫酸酸化至 pH1.5~2.0,放置 45 min(期间再摇 2 次),过滤入各相应编号试管中,每支 10~15 mL,组分检测和生测效价。

1.6 组分检测

高效液相色谱。

1.7 效价测定

按照《中国药典》2005 版,抗生素微生物检定法(附录 XI A)进行。

2 结果与讨论

2.1 不同氨基酸对棘孢小单孢菌突变株(Fzu-707)生物合成小诺霉素的影响

在培养基中添加 6 种氨基酸(做过预实验),进行 $L_9(3^6)$ 正交设计实验筛选,考察其对产小诺霉素的影响。评价指标为庆大霉素 C_{2b} 组分(小诺霉素)85%以上和生测效价越高越好。

通过正交设计实验(重复 3 次,取平均值,下同)认为 G(甘氨酸)、M(蛋氨酸)、Y(酪氨酸)、K(赖氨酸)是影响产素的主要因素。

其优水平分别为 G(0.008 g \cdot L⁻¹)、M(0.15 g \cdot L⁻¹)、Y(0.2 g \cdot L⁻¹)、K(0.4 g \cdot L⁻¹)。

其结果是庆大霉素 C_{2b} 组分 87.8%,对照为 85.2%,提高了 3.1%;生测效价 1 367 u \cdot mL⁻¹,对照为 1 250 u \cdot mL⁻¹,提高了 9.4%。

2.2 培养基成分最佳配方配比

在其他培养基成分不变情况下添加几种氨基酸,通过正交设计实验并进行方差分析确定氨基酸最佳配比为 G(0.008 g \cdot L⁻¹)、M(0.15 g \cdot L⁻¹)、Y(0.2 g \cdot L⁻¹)、K(0.4 g \cdot L⁻¹),在摇瓶中发酵时间均为 144 h,期间取样观察菌丝形态,其平均结果见表 1。

实验证明棘孢小单孢菌突变株(Fzu-707)在产素过程中,在原培养基配方基础上,添加氨基酸 G、M、Y、K 对小诺霉素生物合成有促进作用。分析其原因可能有的氨基酸作为小诺霉素前体物^[6,7],有的可能是关键酶的组成部分,有利于激活该酶的活性^[8,9];也许有的氨基酸在细胞膜通透性方面有一定作用^[10],从而加速了菌体代谢,有利于微生物细胞生物合成小诺霉素。

表 1 几种氨基酸对棘孢小单孢菌突变株(Fzu-707)代谢的影响

Tab. 1 Effect of some amino acids on metabolism of *Micromonospora echinospora*

	发酵液颜色	pH	菌丝形态	粘度	生测效价 ($u \cdot mL^{-1}$)	生测效价提高 /%	C _{2b} 组分 /%	C _{2b} 组分提高 /%
原工艺	绛红	7.5	纤细	稀	1 250	100	85.2	100
新方法	深绛红	8.0	粗壮	稠	1 375	110	87.8	103.1

表 2 36 °C 时不同发酵时间对产素的影响

Tab. 2 Effect of different fermentation time on producing micromonicin for *Micromonospora echinospora* at 36 °C

	发酵单位/($u \cdot mL^{-1}$)				产素率 ($u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)	C _{2b} 组分 /%
	96 h	104 h	112 h	144 h		
原工艺	1 113	1 197	1 203	1 250	8.7(144 h)	85.2(144 h)
新方法	1 280	1 406	1 390	1 375	13.5(104 h)	87.8(104 h)
新方法/原工艺(%)	115	117.5	115.5	110	155	103.1

2.3 不同发酵时间对产素的影响

确定了培养基最佳配方配比后,考察在不同发酵时间过程中这几种氨基酸对棘孢小单孢菌突变株(Fzu-707)生物合成小诺霉素的影响。

表 2 说明这几种氨基酸对棘孢小单孢菌生物合成小诺霉素有明显促进作用。随着时间的推移,原工艺发酵单位缓慢增加,104 h 产素 $1\ 197\ u \cdot mL^{-1}$, 产素率为 $11.5\ u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$, 144 h 产素 $1\ 250\ u \cdot mL^{-1}$, 产素率为 $8.7\ u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$; 而新方法 104 h 产素最高 $1\ 406\ u \cdot mL^{-1}$, 产素率为 $13.5\ u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$, 比原工艺分别提高了 17.5%(104 h) 和 55%(144 h); 而棘孢小单孢菌产生 C_{2b} 组分却不受时间的影响, 尽管新方法比原工艺缩短了 40 h, 但 C_{2b} 组分即小诺霉素达 87.8%, 比原工艺高出 3.1%。这表明一方面菌种生物合成能力强, 另一方面说明新方法有利于微生物细胞代谢, 促进生物合成向所需抗生素方向转化。说明新方法中的几种氨基酸在发酵过程中激活了微生物细胞内的各种酶, 特别是初级代谢的关键酶, 于是缩短了微生物细胞的适应期, 提早进入对数期, 提前产生抗生素, 所以 104 h 达到最高值。从表 2 可以清楚看出新方法在 104 h 后, 效价逐渐降低, 说明当微生物细胞到了生产后期, 进入衰亡期时则要准确掌握时间及时收获,

否则细胞衰亡时释放的各种酶不仅解体细胞, 而且同样降解抗生素。

2.4 不同温度对产素的影响

在培养基配方、配比和发酵时间确定后, 考查不同温度对棘孢小单孢菌产素的影响, 其结果表明, 在微生物发酵培养过程中, 菌体生长、代谢、产素等生化反应的酶活性受多种因素影响, 其中最适温度是一个重要因素。在三角摇瓶培养过程中, 棘孢小单孢菌产生小诺霉素的最适温度为 36 °C (表 3), 即在此温度条件下微生物细胞生长、产素的酶活性最高, 有利于生物合成。

2.5 培养基 pH 对产素的影响

在培养基最佳配方配比、最适温度不变, 原工艺 144 h、新方法 104 h 放瓶情况下, 考察培养基 pH 对产素的影响, 其结果如表 4。

新方法在原工艺培养基基础上添加促进剂——氨基酸, 并在培养基消毒后、接种前用 NaOH 调 pH 至 7.2 (根据庆大霉素产生菌——绛红色小单孢菌新方法培养基最适 pH 经验), 有利于棘孢小单孢菌的代谢。说明在这几种氨基酸存在条件下, pH 中性偏高, 进一步加速了棘孢小单孢菌菌体的生长、繁殖, 于是促使微生物细胞迅速进入初级代谢继而更早转为次级代谢, 发酵周期由原工艺 144 h 缩短到

表 3 不同温度对棘孢小单孢菌产素的影响

Tab. 3 Effect of different temperature on producing micromonicin for *Micromonospora echinospora*

	发酵单位/($u \cdot mL^{-1}$)			不同温度下产素比较/%	
	34 °C	36 °C	38 °C	36 °C/34 °C	36 °C/38 °C
原工艺(144 h)	1 198	1 243	1 173	104	106
新方法(104 h)	1 318	1 410	1 313	107	107.4
新老方法比值/%	110	113.4	112	102.9	101.4

表 4 36 °C 时培养基 pH 对产素的影响

Tab. 4 Effect of medium pH on producing micronomicin for *Micromonospora echinospora* at 36 °C

	PH	发酵单位/($u \cdot mL^{-1}$)				产素率 /($u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)	C ₂₆ 组分 /%
		96 h	104 h	112 h	144 h		
原工艺	6.7	1 113	1 197	1 203	1 250	8.7 (144 h)	85.2(144 h)
新方法	7.2	1 307	1 432	1 395	1 375	13.8(104 h)	87.8(104 h)
新方法/原工艺(%)		117	120	116	110	159	103.1

104 h, 产素率($u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)进一步提高到 60% (13.8/8.7)左右。

以上实验结果表明,在棘孢小单孢菌产生小诺霉素过程中,添加一定量的蛋氨酸、赖氨酸、酪氨酸、甘氨酸对于产素菌无论是生长、繁殖还是次级代谢都有促进作用.新方法所用的蛋氨酸(甲硫氨酸)无论对于原核细胞还是真核细胞的代谢都是重要的中间代谢物质.在生物体中蛋氨酸(甲硫氨酸)通过 5-腺苷甲硫氨酸合成酶消耗 ATP(三磷酸腺苷),使甲硫氨酸腺苷化而合成腺苷甲硫氨酸(SAM).SAM 是生物体内最重要的甲基供体^[11,12],在生命活动过程中,使细胞内许多重要物质如核酸、蛋白质、脂类、碳水化合物等首先进行甲基化,进而参与众多生化反应.还有人报道蛋氨酸除了参与细胞一系列生化反应新陈代谢外,似乎还是小诺霉素的甲基供体^[6,7].

赖氨酸结构中含有两个氨基,ε-碳原子上的-NH₂具有强碱性,化学性质活泼,易与代谢过程中的化合物尤其是碳水化合物形成化学键.因此,赖氨酸具有重要的生物功能,特别在细胞代谢中:①参与机体蛋白质合成,生成酶蛋白,并提高碱性磷酸酶、蛋白酶和脂肪酶比活力以及 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力;②它是几个生酮生糖氨基酸之一,当缺乏碳水化合物时,它可被分解成葡萄糖或酮体,参与碳循环,提供生命活动的能量;③参与脂肪代谢,是脂代谢酶的前体.当赖氨酸过量时,它的非氮蛋白进入三羧酸循环而产生 ATP、水和二氧化碳。

培养基中蛋氨酸(甲硫氨酸)则在细胞生化反应中进行甲基化,与赖氨酸两者相互依存、相互促进,相得益彰^[13,14].所以,当发酵培养基中适当增加一定量的蛋氨酸、赖氨酸有利于微生物细胞的新陈代谢,促进菌体生长,繁殖和产素。

蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)是生物体内一组催化酪氨酸残基磷酸化的酶,使底物蛋白活化,并参与细胞的信号转导,促使细胞进行生化反应.受体型蛋白酪氨酸激酶是一种

跨膜 PTK,是跨膜蛋白,可见酪氨酸的存在,有利于膜蛋白催化活性,对细胞新陈代谢起促进作用^[15,16].

甘氨酸蛋白质(Glycine-rich protein, GRP),是结构简单、富含甘氨酸的高度重复序列组成的蛋白质^[17].通常分为两大类:一类具有信号肽序列,一类具有 RNA 结合序列^[18].甘氨酸蛋白质(GRP)对植物细胞的生长、分化、细胞识别、调节细胞之间及细胞与外界环境之间的物质交流有重要的作用^[19,20].有关甘氨酸的促分泌机制,也有报道甘氨酸可干扰细胞壁肽聚糖层的合成,引起细胞壁结构发生改变,导致了各种蛋白质、包括酶的释放^[21].

分析在培养基中添加氨基酸后其在微生物细胞内的作用机理除上述作用外还包括:①氨基酸脱去氨基后形成的碳骨架通过特定的代谢途径进入 TCA 循环,增加了 TCA 循环的代谢通量,从而提高了细胞的能量水平,促进了细胞生长和代谢产物合成.因此小单孢菌菌丝粗壮,细胞染色深,发酵液粘稠,缩短了生长期,提前进入产素期;②由于氨基酸是一种两性离子,具有调节胞内生理 pH 的功能,并能促使 pH 最大限度地满足细胞生理功能的需要.本研究证明新方法 pH 明显高于原工艺,pH 偏碱性更有利于棘孢小单孢菌细胞的生长和产素;③氨基酸通过特定代谢途径产生目的代谢途径中所需的辅酶或中间代谢物包括前体物;④抑制或激活相关代谢途径中关键酶的活性,促进目的代谢产物产量的提高,促使在整个发酵过程中细胞代谢旺盛,发酵周期缩短,产素率($u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)得到明显提高。

3 结论

在棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)突变株(Fzu-707)产生小诺霉素过程中,在原摇瓶培养基中添加一定量的甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、蛋氨酸并调节培养基 pH 值到偏碱性,在三角摇瓶中 36 °C 培养,有利于棘孢小单孢菌的生长、繁殖和分泌小诺霉素,发酵时间由原 144 h 缩短到 104 h;产素率($u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$)较对照提高了 60% (13.8

$u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}/8.7 u \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$);生测效价较原工艺提高了20%左右($1\ 432 u \cdot mL^{-1}/1\ 197 u \cdot mL^{-1}$).今后要继续完善发酵工艺,特别是探索更有效的抗生素生物合成促进剂,以达到成本低,效率高,质量好地生产小诺霉素的目的.

参考文献(References)

- [1] Egan R. The characteristics of MCR generated by *M. sagamiensis* var *nonreducans*[J]. *Antibiot*, 1975, 28(1):29-34.
- [2] 王锦,段学辉,黎俊,等.利用抗自身代谢物特性进行小诺霉素高产菌种选育[J].*南昌大学学报(工科版)*, 2006,28(2):111-114.
- [3] 赵敏,谢凤龙,汪洁,等.小诺霉素产生菌棘孢小单孢菌突变菌株生质体形成、再生及融合的研究[J].*中国抗生素杂志*,1995,20(1):10-16.
- [4] 孙克俭,谢凤龙,赵敏.均匀设计在小诺米星发酵中的应用[J].*中国抗生素杂志*,1996,21(2):153-160.
- [5] 杨丽,刘亦凡,周清莲,等.小诺霉素单组分菌种选育及发酵条件研究[J].*微生物学通报*,2000,27(4):257-260.
- [6] 陈贵斌,牛晋阳,张建勇,等.抗生素AGPM生物合成途径的初步研究[J].*微生物学通报*,2003,30(5):32-37.
- [7] Bormann C, Kalmanczhelyi A, Sussmuth R, et al. Production of nikkomycins Bx and Bz by mutasynthesis with genetically engineered *Streptomyces tendae* T01 [J]. *J Antibiot*, 1999, 52(2): 102-108.
- [8] 胡景,储炬,湛颀.前体氨基酸对 avermectin 生物合成的影响[J].*中国抗生素杂志*,2004,29(7):388-396.
- [9] Olano C, Lomovskaya N, Fonstein L, et al. A two-plasmid system for the glycosylation of polyketide antibiotics: Bioconversion of epsilon-rhodomyconone to rhodomycin D[J]. *Chem Biol*, 1999, (6):845-855.
- [10] Nephrol D. C7 nutrition and malnutrition (T498-T530)[J]. *Transplant*, 2003,(18): 439.
- [11] 项昱红,莫晓燕,詹谷雨. S-腺苷甲硫氨酸的制备与药理作用[J]. *西北药学杂志*,1999,14(1):38-39.
- [12] Finkelstein J D. Methionine metabolism in mammals [J]. *J Nutr Biochem*,1990,1(5):228-237.
- [13] 杜婷婷,黄秋花.组蛋白赖氨酸甲基化在表观遗传调控中的作用[J].*遗传*,2007,29:390.
- [14] Morillon A, Karabetsou N, Nair A, et al. Dynamic lysinemethylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription [J]. *Mol Cell*, 2005, 18(6): 723-734.
- [15] 成军. 肿瘤相关基因[M]. 北京:北京医科大学出版社,1999:29-60.
- [16] 张忠东,成军,钟彦伟,等.乙型和丙型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响[J].*世界华人消化杂志*,2003,11(7):1 027-1 030.
- [17] 陈万利,刘宗旨,李文华.植物富含甘氨酸蛋白质(GRP)及其基因研究进展[J].*东北农业大学学报*,2005,316(4):512-519.
- [18] Sachetto-Martins G, Franco L O, de Oliveira D E. Plant Glycine-rich protein: A family or just proteins with a common motif [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1 492: 1-14.
- [19] Cassab G I. Plant cell wall proteins [J]. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol*,1998,49:281-309.
- [20] Showalter A M. Structure and function of plant cell wall proteins [J]. *Plant Cell*, 1993,5:9-23.
- [21] 夏东翔,汪美先. L-异亮氨酸和甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌邻苯二酚 2,3-双加氧酶的作用[J].*微生物学报*,1994,34(1):37-44.