

文章编号:1673-1689(2009)03-0429-04

前体对金褐霉素生物合成的影响

魏杰¹, 孟宪军*²

(1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 在发酵液中分别加入乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠、乙醇、正丙醇、正丁醇作为前体, 进行前体的种类选择、加入量及加入时间的优化实验。结果表明, 乙醇是比乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠、正丙醇、正丁醇更佳的金褐霉素合成前体, 正丙醇、正丁醇对金褐霉素生物合成无明显促进作用。在发酵24 h时向发酵培养基中添加体积分数0.2%的乙醇, 金褐霉素产量与不添加前体相比, 抑菌直径增加26 mm, 具有较好的应用价值。

关键词: 金褐霉素; 金褐链霉菌; 发酵; 前体

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Effect of Precursor on Aureofuscin Biosynthesis

WEI Jie¹, MENG Xian-jun*²

(1. College Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. School of Food Science, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract: This study was to increase the productivity of *Aureofuscin* biosynthesis by adding precursor. the sodium acetate, sodium propionate, sodium butyrate, alcohol, ethanol and n-butanol was fed to the broth, series of experiments including the selection of suitable precursor, the optimum concentration and adding time of the precursor were conducted. The results indicated that the alcohol is a more suitable precursor than sodium acetate, sodium propionate, sodium butyrate, n-propanol. Ethanol and n-butanol have little effect on *Aureofuscin* biosynthesis. Compared to that of basal condition without any addition of precursor, 0.2% alcohol fed into the broth at 24 h of cultivation, the fermentation bacteriostasis increased diameter was 26 mm at the end of 72 h cultivation.

Key words: Aureofuscin, *Streptomyces aureofuscus*, fermentation, precursor

金褐霉素(Aureofuscin)是链霉菌新种——金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus*, n. sp)产生的一种四烯大环内酯类抗真菌抗生素,其化学结构与

国外文献报道的纳他霉素(Natamycin)结构相似。早期研究表明,金褐霉素对霉菌、多种酵母菌及丝状真菌有很强的抗菌作用,但不抗细菌,临床上用

收稿日期:2008-05-15

作者简介:魏杰(1977-)女,辽宁抚顺人,微生物学博士研究生,讲师。Email:weij41177@sina.com。

* 通讯作者:孟宪军(1960-),男,辽宁沈阳人,工学博士,教授,博士生导师,主要从事果蔬加工方面的研究。

Email:mengxjsy@126.com。

于治疗真菌性角膜炎,其疗效优于两性霉素 B,同时对一些真菌引起的皮肤病及霉菌性阴道炎等也有很好的疗效。早在 1975 年发现金褐霉素时只作了早期化学结构和初步药效试验,一直未作深入研究和进行产业化开发^[1-3]。由于未作高产菌种选育和分离提取工艺的深入研究,发酵单位和提取收率都不高,难以达到产业化开发的要求^[4-6]。

前体对抗生素的生物合成起着重要作用,一定条件下可以控制菌体合成次级代谢产物的方向并增加其产量。鉴于金褐霉素与纳他霉素有着相似的化学结构和生物活性,而在纳他霉素的生物合成中,其内酯环的形成是以乙酸为起始单位、丙二酸为延续单位通过聚酮途径缩合而成^[7],提示纳他霉素生物合成的重要前体是短链脂肪酸。因此作者选择乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠、乙醇、正丙醇、正丁醇进行前体添加实验,期望通过前体的添加提高生物合成金褐霉素的产量。

1 材料与方 法

1.1 菌种

金褐链霉菌(*Streptomyces aureofuscus* n. sp)由沈阳农业大学食品学院实验室保存。黑根霉(*Rhizopus nigricans*)由辽宁大学生命科学院微生物实验室提供。

1.2 培养基

种子培养基(组分 g/dL):葡萄糖 2,玉米淀粉 1.5,黄豆粉 1,蛋白胨 0.3,玉米浆 1,酵母粉 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $NaCl$ 0.4, $CaCO_3$ 0.6; pH 值自然。

发酵培养基(组分 g/dL):葡萄糖 4,玉米淀粉 2,蛋白胨 0.3,黄豆粉 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 0.6。

指示菌培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,琼脂 10 g,水 1 L,灭菌前调 pH 至 6.5。

1.3 摇瓶发酵实验

将斜面活化好的菌种用挖块法接种于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,29 ℃、220 r/min 摇床培养 40 h,使菌体处于迅速生长期。然后以体积分数 10% 的接种量接种种子液到装液量为 50 mL 的 250 mL 三角瓶中,29 ℃、220 r/min 摇床发酵 72 h。

1.4 金褐霉素生物检测标准曲线的制作

精密称取金褐霉素标准品 25 mg,用少量二甲基甲酰胺(DMF)溶解,转移入容量瓶中,然后加 70% 正丙醇定容,配成浓度为 1 000 $\mu g/mL$ 金褐霉

素标准母液,再用 pH 6.0 磷酸缓冲液稀释成质量浓度分别为 20、30、40、50、60、70、80 $\mu g/mL$ 的溶液。测定抑菌圈,以抑菌圈直径作纵坐标,金褐霉素质量浓度的对数值作横坐标作图。

1.5 生物活性检测

将加入不同前体的发酵培养基摇瓶发酵 72 h,取摇瓶发酵液。用牛津杯放入含黑根霉作指示菌的 SDA 平板上,用形成的抑菌圈直径来表示其相对活性大小。

1.6 菌体干重测定

取 10 mL 发酵液于预先称重的离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,再加入 10 mL 去离子水洗涤、沉淀两次,离心弃上清液,将下层沉淀放在 80 ℃ 的烘箱内烘至恒重,再减去管重即为菌体干重。

2 结果与分析

2.1 前体种类对金褐霉素生物合成的影响

大环内酯类抗生素的合成是由乙酸、丙酸、丁酸等简单的有机酸开始,因此向发酵培养基中添加适量的前体,通过代谢调控,就有可能促进金褐霉素的合成。作者分别在发酵培养基中加入体积分数 0.1 g/dL 的乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠、乙醇、正丙醇及正丁醇进行发酵实验,以不加前体的普通发酵培养基为对照,发酵 72 h 后测定发酵液中金褐霉素的质量浓度及菌体干重,结果见表 1。从表 1 可以看出,添加体积分数 0.1% 的正丙醇和正丁醇对金褐霉素产量及菌体干重无明显影响;添加乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠及乙醇能不同程度地提高金褐霉素产量,其中以乙醇为前体时得到的金褐霉素最高,抑菌直径达到 27 mm,比不加前体提高 7 mm。根据这一结果,在实验中选择乙醇为前体进行前体加量及加入时间的优化实验。

表 1 前体种类对金褐霉素生物合成的影响

Tab. 1 Effects of different precursors on Aureofuscin biosynthesis

因素	菌体干重/ (mg/mL)	抑菌直径/ mm
对照	6	20
乙酸钠	15	26
丙酸钠	16	25
丁酸钠	12	22
乙醇	20	27
正丙醇	17	21
正丁醇	32	0

2.2 不同乙醇体积分数对纳他霉素生物合成的影响

分别向发酵培养基中添加体积分数 0、0.05%、0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% 的乙醇,发酵 72 h 后取样测定金褐霉素产量,结果见表 2。

表 2 不同乙醇体积分数对金褐霉素生物合成的影响

体积分数/%	抑菌直径/mm	菌体干重/(mg/mL)
0	20	6
0.05	22	12
0.1	27	20
0.2	45	37
0.4	42	35
0.6	41	30
0.8	40	27
1.0	42	29

从表 2 可以看出,当发酵培养基中乙醇的体积分数从 0 增加到 0.2% 时,金褐霉素产量及菌体干重持续上升,但当乙醇体积分数超过 0.2% 时,菌体干重降低,金褐霉素产量也逐渐下降。这可能是因为乙醇体积分数过高,由于乙酸根的消耗导致培养基的酸性增强,抑制菌体生长,影响了金褐霉素的合成,降低了金褐霉素产量。另一方面也有可能因为高体积分数的乙醇对金褐霉素的合成产生底物抑制作用,导致金褐霉素产量下降^[8]。因此确定前体乙醇的最佳体积分数为 0.2%,此时抑菌直径达到 45 mm,比不加前体提高 39 mm。最佳抑菌效果见图 1。

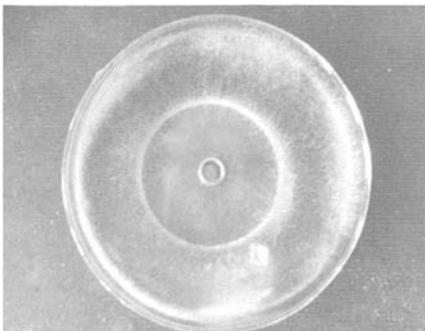


图 1 金褐霉素抑菌效果图

Fig. 1 The bacteriostasis effect figure of *Aureofuscin*

2.3 前体加入时间对金褐霉素生物合成的影响

在发酵培养的第 0、24、36、48、60、72 小时,向发酵培养基中加入体积分数 0.2% 的乙醇,以不加乙醇的发酵培养基为对照,发酵 84 h 后测定金褐霉素产量,结果见表 3。从表 3 可知,72 h 之前添加乙醇,金褐霉素产量均比对照有所提高,其中 24 h 时加入乙醇抑菌效果最好,金褐霉素产量最高,抑菌直径达到 46 mm,略高于 0 h 加入乙醇的产量,与不加前体时相比提高了 26 mm,24 h 之后加入乙醇抑菌效果在逐渐下降。其原因可能因为 0 h 加入的乙醇部分作为细胞生长的碳源被消耗掉,而 24 h 加入的乙醇大部分作为次级代谢的前体直接转化为乙酰 CoA 来参与金褐霉素的生物合成^[8-9]。发酵培养 72 h 后加入乙醇对菌体干重及金褐霉素产量均无太大影响,这可能是由于激活乙酸的酶系均在 72 h 之前达到酶活顶峰,之后酶的比活力迅速下降,也可能因为此时加入的乙醇大部分还未来得及转化,发酵已经结束,乙醇利用不充分。

表 3 前体加入时间对金褐霉素生物合成的影响

Tab. 3 Effects of different alcohol feeding time on *Aureofuscin* biosynthesis

加入时间/h	抑菌直径/mm	菌体干重/(mg/mL)
对照	20	6
0	43	37
24	46	45
36	40	36
48	39	34
60	31	27
72	23	21

3 结 语

在大环内酯类抗生素生物合成中,内酯环的形成是限制性因素,内酯环一般是由一些低级脂肪酸聚合而成的。在发酵过程中补加限制性前体,往往能明显提高抗生素的发酵效价。该研究表明,乙醇对金褐霉素生物合成的促进作用优于乙酸钠、丙酸钠、丁酸钠、正丙醇,是较适宜的前体;乙醇的最佳作用体积分数为 0.2%,最佳加入时间为发酵培养第 24 小时。于发酵培养 24 h 时向发酵培养基中添加体积分数 0.2% 的乙醇,抑菌效果最好,抑菌直径达到 46 mm,与不添加前体相比增加了 26 mm。

参考文献(References):

- [1] 上海药物研究所金褐霉素研究小组. 一种新的抗真菌的抗生素——金褐霉素[J]. 微生物学报, 1975, 15(3): 180—187.
Institute of Pharmaceutical Research in Shang Hai. Aureofuscin—original antimycotic antibiotic [J]. *Microbiol Journal*, 1975, 15(3): 180—187. (in Chinese)
- [2] 王菊芳, 吴晖. 前体物质对阿维菌素生物合成的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2002, 30(5): 16.
WANG Ju-fang, WU Hui. Effect of precursor on the avermectins biosynthesis [J]. *Journal of South China University of Technology: Natural Science*, 2002, 30(5): 16. (in Chinese)
- [3] Basilio J C, Debasilio M Z, Chlericattic, et al. Characterization and contron of thread mould in cheese[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 32(6): 419—423.
- [4] 王富金, 武济民. 金褐霉素微生物检定法[J]. 抗生素, 1980, 5(5): 25—26.
WANG Fu-jin, WU Ji-min. Aureofuscin biological standardization [J]. *Antibiotic*, 1980, 5(5): 25—26. (in Chinese)
- [5] 范德彰, 蔡松年. 金褐霉素治疗真菌性角膜溃疡——实验研究及 248 例临床疗效观察[J]. 中华眼科杂志, 1985, 21(5): 257—259.
FAN De-zhang, CAI Song-nian. Aureofuscin cure mycotic corneal ulcer——empirical study and 248 clinical curative effect view [J]. *China Ophthalmology Journal*, 1985, 21(5): 257—259. (in Chinese)
- [6] Enshasy H A, Farid M A. Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis* [J]. *Basic Microbial*, 2000, 40(5): 333—342.
- [7] Aparicio J F, Clina A J, Ceballos E, et al. The biosynthetic gene cluster for the 26—member edringpolyene macrolide pimarcin [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(15): 101—133.
- [8] 顾觉奋, 朗天戈. 丙酸盐对大环内酯类抗生素 M-90 生物合成的调控[J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(2): 136.
GU Jue-fen, LANG Tian-ge. Regulation of propionate to biosynthesis of macrolide antibiotic M-90 [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 1998, 23(2): 136. (in Chinese)

(责任编辑: 李春丽)

《江南大学学报(自然科学版)》

征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版)》(双月刊)是由教育部主管、江南大学(国家“211工程”重点建设高校)主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文,同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的专家、学者,在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为 A4 开本, 128 页, 每册订价 8.00 元; 全年共 6 期, 48.00 元; 本刊邮发代号: 28—189, 全国各地邮局均可订阅, 亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

邮编: 214122

电子邮箱: xbzrxx@jiangnan.edu.cn

地址: 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

电话: 0510—85913519

《江南大学学报(自然科学版)》编辑部