

促甲基化因子对西索米星发酵的影响*

陈剑锋¹ 王 航¹ 张元兴² 郭养浩^{1**} 陈 浩¹

(福州大学药物生物技术与工程研究所 福州 350002)¹

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)²

摘要: 研究发现, 发酵培养基中添加 2.0 ~ 3.0 g/L 蛋氨酸或 7.5 ~ 10.0 mg/L 氯化钴可明显促进西索米星的合成。蛋氨酸的添加时机和添加方式对西索米星产物合成的作用明显不同。在产物合成中前期 (30 ~ 48 h) 添加蛋氨酸的效果最佳。当发酵液中蛋氨酸初始浓度为 0.656 g/L 时, 与在产物合成初期一次性添加相比, 1.5 g/L 蛋氨酸在产物合成初期、中期和后期均分成 3 次添加的效果更优, 当发酵至 91 h 结束时, 发酵液中西索米星浓度可达 0.70 g/L。

关键词: 西索米星, 蛋氨酸, 氯化钴, 发酵, 甲基化

中图分类号: TQ465.2; Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0085-06

Effect of Methylation Factors on Sisomicin Fermentation*

CHEN Jian-Feng¹ WANG Hang¹ ZHANG Yuan-Xing²

GUO Yang-Hao^{1**} CHEN Hao¹

(Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002)¹

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China Univ. Sci. Technol., Shanghai 200237)²

Abstract: It was found that the supplementation with some components in medium was significant to sisomicin production. Sisomicin biosynthesis was stimulated by 2.0 ~ 3.0 g/L methionine or 7.5 ~ 10.0 mg/L cobaltous chloride. The effect of different supplementation time and mode of methionine on sisomicin biosynthesis was obvious dissimilarity. The best supplementation time of methionine was in the former to middle stage (30 ~ 48 h) of sisomicin biosynthesis. While 0.656 g/L of initial methionine concentration in the ferment broth, compared with one-off supplementation of 1.5 g/L methionine in the former stage of sisomicin biosynthesis, the effect of supplementing 0.5 g/L methionine each time in the former, middle and latter stage on sisomicin fermentation was better, sisomicin concentration would reach 0.70 g/L in 91 h.

Key words: Sisomicin, Methionine, Cobaltous chloride, Fermentation, Methylation

西索米星 (sisomicin, 简称 SISO) 是一种重要的含有双键的水溶性、多元弱碱性氨基糖苷类抗生素^[1,2], 属庆大霉素-西索米星型的假三糖庆大霉素类抗生素, 为庆大霉素 C_{1a} (简称 GMC_{1a}) 的去氢衍生物, 是半合成针剂奈替米星的原料。中国生产的西索米星约占世界市场的 80%。随着这几年国内外市场对奈替米星和西索米星需求的逐渐旺盛, 目前国内西索米星生产工艺较为落后的矛盾越来越突出。

从西索米星生物合成途径^[3]可见, 西索米星与其它庆大霉素类抗生素的生物合成途径很相似。在进行西索米星生产工艺研究时, 可借鉴庆大霉素类抗生素的发酵工艺

*福建省科技三项基金项目 (No. K20011)

福建省自然科学基金项目 (No. B9810007, 00210007)

**通讯作者 Tel: 13950493380, E-mail: jfchen@fzu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-03, 修回日期: 2005-12-15

优化和发酵过程控制的研究方法和思路。由于 4" C 位甲基化是生成西索米星前体物质庆大霉素 X₂ (简称 GMX₂) 和抗生素 II-20A 的重要步骤, 因此, 加快甲基化反应速率有助于提高西索米星前体物质的积累。本工作对重要的促甲基化因子氯化钴和蛋氨酸的影响进行研究, 探讨其对菌体生长和产物合成的影响, 进而优化西索米星发酵培养条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

实验中使用的伊尼奥小单孢菌 (*Micromonospora inyoensis*) F003 为本课题组采用低产生菌株经诱变保存的菌种, 西索米星组分最多时可占发酵液中抗生素总浓度的 90%。发酵 115 h 时, 该出发菌株的生物总效价 ≤ 500 U/mL, 当以纯组分计, 发酵液中西索米星浓度最高可达 0.38 g/L。

1.2 培养基与培养条件

斜面、种子、摇瓶和 5 L 罐发酵培养条件以及 30 m³ 工业罐发酵生产条件同参考文献[4]。全氨基酸分析实验专用培养基: 麦芽糖, 复合氮源 (包括黄豆饼粉、蛋白胨和酵母粉等) 水煮滤液, 玉米浆, 复合无机盐, 蛋氨酸和氯化钴; 控制消后 pH 7.0 ~ 7.2, 接种量 15% ~ 20%, 32℃, 240 r/min 摇瓶发酵至 84 ~ 90 h 结束, 500 mL 三角瓶中装液 50 mL。

1.3 分析方法

菌体浓度 (X) 和总糖浓度 (S) 的测定同参考文献[4]。西索米星 (P) 和庆大霉素测定采用 HPLC 法^[5]。氨基酸分析采用日立 835-50 型氨基酸分析仪茚三酮法测定 (福建省农业科学院测试中心), 标准蛋白, 2619 阳离子树脂柱 (150 mm × 2.6 mm, 8μm 粒径), 柱温 98℃, 流动相为柠檬酸缓冲液, 流速 0.225 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 氯化钴用量对西索米星发酵的影响

在 BIOSTAT B5 型全自动发酵罐上, 仅改变摇瓶发酵培养基中氯化钴用量, 其余成分不变, 测定发酵 96 h 结束时的菌体浓度和产物浓度 (表 1), 每个测定点平行取样 3 次, 求均值 (下文同此)。从表可见, 氯化钴对西索米星发酵的影响明显。当外加氯化钴用量小于 7.5 g/L 时, 提高氯化钴浓度有助于西索米星的合成, 发酵液中西索米星组分的比例也较高, 但未见菌体浓度明显增加。当外加氯化钴用量高于 20.0 g/L 时, 菌体易发生自溶, 发酵 60 ~ 72 h 菌体活性迅速衰退, 发酵结束时西索米星产物浓度较低, 但杂质庆大霉素 GMC_{1a} 和 GMC_{2b} 的比例高达 16% 以上。实验中未检测到其它庆大霉素 C 组分。因此, 选择发酵培养基中氯化钴用量为 7.5 g/L 用于后续研究。

表 1 氯化钴用量对西索米星发酵的影响

Cobaltous chloride concentration (mg/L)	0	5.0	7.5	10.0	15.0	20.0
Sisomicin concentration (g/L)	0.41	0.56	0.60	0.60	0.53	0.46
Biomass (g/L)	10.9	10.5	10.7	10.7	9.6	8.6

注: 每个测定点平行取样 3 次, 求均值 (下文同此)

2.2 西索米星分批发酵过程蛋氨酸的变化趋势

前文已报道^[6,7]，在 30m³ 工业生产罐上，对西索米星的前体物质-抗生素 JI-20A 的发酵液进行取样，分析不同时期发酵液中氨基酸组成的变化。研究发现，在抗生素 JI-20A 分批发酵过程，不同种类的氨基酸的消耗速率明显不同。菌体生长阶段，Met、Phe 和 Arg 等氨基酸的消耗较快。产物合成阶段，Met 的消耗速率依然较大，但原先在菌体生长阶段消耗较快的 Phe 和 Arg 此时的消耗速率有所减慢。鉴于蛋氨酸在西索米星的前体物质-抗生素 JI-20A 发酵过程的高消耗状态，及其在庆大霉素属抗生素发酵过程中作为甲基化辅助因子的特殊作用^[8]，我们重点考察发酵培养基中蛋氨酸（Met）对西索米星发酵的影响。

图 1 所示为在 BIOSTAT B5 型全自动发酵罐上，初始蛋氨酸浓度为 0.656 g/L 的西索米星分批发酵过程微生物代谢特性曲线。从图可见，菌体生长阶段，蛋氨酸的消耗较慢，但是蛋氨酸的比消耗速率 Q_{met} 与菌体的比生长速率 μ_x 以及总糖比消耗速率 Q_s 基本上有着相似的变化趋势，说明此时蛋氨酸可能只是作为菌体生长的一种普通氨基酸成分被消耗掉而已，并未真正起到甲基化因子的特殊作用。产物合成后期，蛋氨酸的消耗较慢，可能是与菌体内产物合成酶的活性降低有关。产物合成初期和中期，蛋氨酸的消耗很快，而且蛋氨酸的比消耗速率 Q_{met} 与西索米星的比合成速率 Q_p 有着相同的变化趋势，说明此时蛋氨酸可能主要是作为甲基供体参与了抗生素的生物合成。

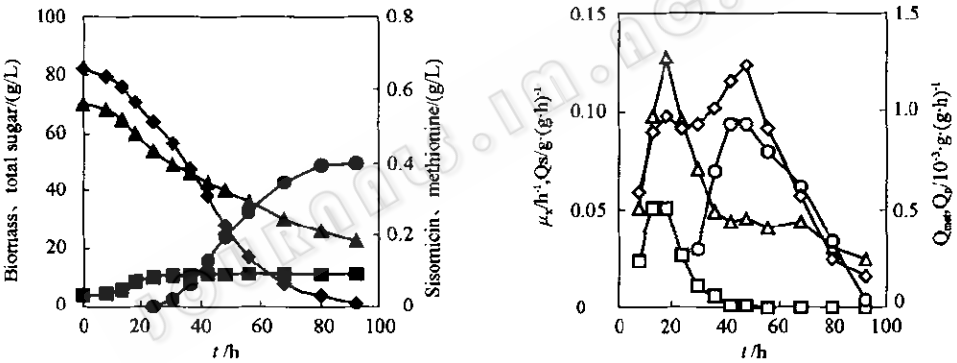


图 1 初始蛋氨酸浓度为 0.656 g/L 的西索米星分批发酵过程微生物代谢特性曲线
—▲ S, —■ X, —● P, —◆ Met —□ μ_x , —△ Q_s , —○ Q_p , —◇ Q_{met}

2.3 初始蛋氨酸浓度对西索米星发酵的影响

当发酵培养基不外加蛋氨酸时，经测定可知，发酵液中初始蛋氨酸浓度为 0.15 g/L。在此基础上，定量添加蛋氨酸，改变摇瓶发酵培养基中蛋氨酸的初始浓度，其余成分不变，测定 91 h 发酵结束时的菌体浓度和产物浓度，考察蛋氨酸初始浓度对西索米星发酵的影响。从表 2 可见，随着初始蛋氨酸浓度的增加，未见菌体浓度明显变化，但发酵结束时产物浓度缓慢上升，于 2.65 ~3.65 g/L 时出现最大值 0.58 g/L，为不添加蛋氨酸时的 2 倍。当继续增加蛋氨酸浓度，西索米星产物浓度反而明显下降。说明发酵培养基中蛋氨酸初始浓度较低时，适当提高蛋氨酸浓度有助于西索米星的产物合成。

表 2 蛋氨酸初始浓度对西索米星发酵的影响

Methionine concentration (g/L)	0.15	0.65	1.65	2.65	3.65	4.65
Sisinicin concentration (g/L)	0.29	0.39	0.51	0.58	0.58	0.52
Biomass (g/L)	10.3	10.6	10.8	11.0	11.1	11.0

2.4 蛋氨酸的添加时机对西索米星发酵的影响

据方法 2.2，发酵液中初始蛋氨酸浓度为 0.15 g/L，分别于接种后 6 h、32 h、50 h 和 66 h 时一次性加入 1.0 g/L 蛋氨酸，继续摇瓶培养至相同的发酵总周期（92 h），测定产物浓度和菌体浓度，考察不同发酵时期添加蛋氨酸对西索米星产物合成的影响。从表 3 可见，不另外添加蛋氨酸时，发酵结束时西索米星浓度和菌体浓度分别为 0.26 g/L 和 11.7 g/L。与不添加蛋氨酸的对照组相比，蛋氨酸的添加时期对发酵结束时菌体浓度未产生明显影响，但使产物浓度显著提高，其增幅大小依序为产物合成中期 > 产物合成初期 > 产物合成后期 > 菌体生长期。与对照组比较，在产物合成中前期（32 ~ 50 h）添加蛋氨酸，每添加 1.0 g 蛋氨酸新增西索米星产物量可达 0.36 g 以上。

表 3 蛋氨酸添加时机对西索米星发酵的影响

Supplementation time (h)	不添加	6	32	50	66
Sisomicin concentration (g/L)	0.26	0.42	0.62	0.63	0.42
Biomass (g/L)	11.7	11.7	11.8	11.9	12.1

2.5 蛋氨酸的添加方式对西索米星发酵的影响

据方法 2.2，在 BIOSTAT B5 型全自动发酵罐上，初始蛋氨酸浓度为 0.66 g/L，考察不添加蛋氨酸（见图 1）、发酵 31 h 时一次性添加 1.5 g/L 蛋氨酸（图 2a）、分别于发酵 30 h、48 h 和 65 h 时各加入 0.5 g/L 蛋氨酸（图 2b）等 3 种添加方式对西索米星发酵的影响。从图可见，与不添加蛋氨酸时 0.40 g/L 的西索米星浓度相比，不论以何种方式添加蛋氨酸，均能明显促进西索米星产物合成。1.5 g/L 蛋氨酸于产物合成初期一次性添加，发酵结束时可提高西索米星产物量达 44.5%，1.5 g/L 蛋氨酸若在产物合成初期、中期和后期均分成 3 次添加，将更有利于西索米星的产物合成，发酵结束时可提高发酵液中西索米星浓度达 76.3%。

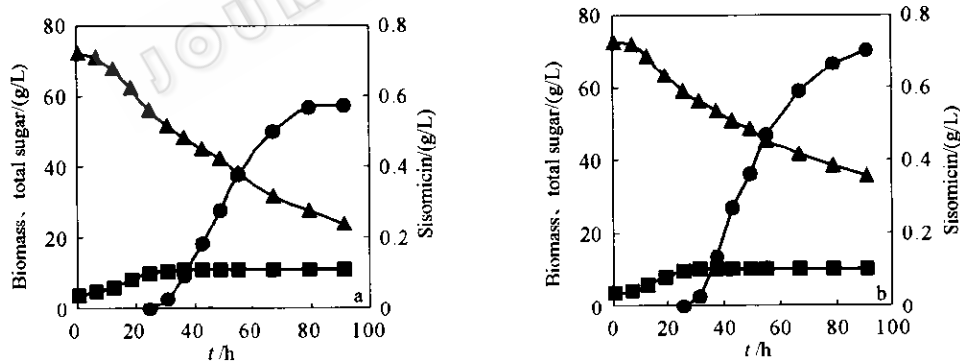


图 2 蛋氨酸的添加方式对西索米星发酵的影响

—▲— S, —■— X, —●— P

3 讨论

本工作在充分解读了大量国内外文献后，综合设计了西索米星生物合成的可能途径（图 3）。从图可见，西索米星的杂质多为其合成途径中的前体物质或支路产物，GMX₂是这个途径中最后一个共同的中间体，西索米星、威大霉素和庆大霉素 C 组分等几种不同抗生素均能由此中间体形成。在该生物合成途径中，不但存在庆大霉素 A

(GMA) 发生 4''C 位甲基化生成 GMX_2 的步骤, 也存在旁路代谢途径中 GMX_2 发生 6'C 位甲基化生成副产物威大霉素 (VDM) 和庆大霉素 C_1 、 C_2 和 C_{2a} 组分的步骤, 作为 4''C 位和 6'C 位甲基化的辅助因子, 微量元素钴离子不但影响西索米星生物合成主代谢途径中 GMA 发生 4''C 位甲基化, 而且也会影响旁路代谢途径中的 6'C 位甲基化, 生成副产物庆大霉素 C 组分 (主要为 GMC_1 和 GMC_2 等), 这势必影响西索米星的合成效率。

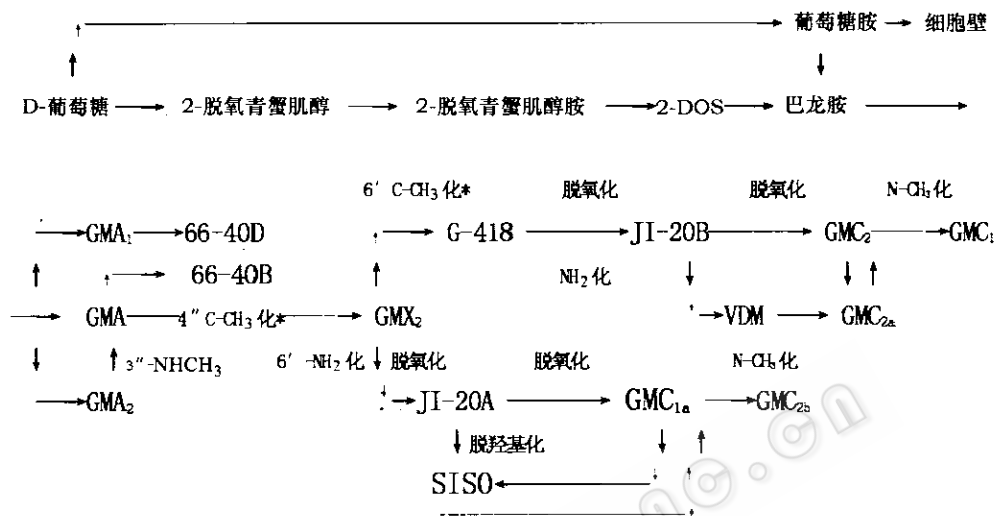


图 3 西索米星可能的生物合成途径

* 表示需要促甲基化因子的过程

Lee 等^[8,9] 采用同位素示踪的方法, 研究了 $\text{CH}_3\text{-L-Met}$ 在庆大霉素属抗生素生物合成中的作用, 认为蛋氨酸是庆大霉素和西索米星的甲基源, 西索米星生物转化成 GMC_{2b} 的机理涉及到西索米星 6'-N 的甲基化和 4', 5' 位的还原反应, 蛋氨酸有关成分加入这两种抗生素中的比例与该属各组分所含甲基数目有关。杨 丽等^[10] 在采用橄榄星孢小单孢菌 DM-59 进行西索米星生物合成的影响因素研究中发现, 蛋氨酸能明显促进西索米星的合成, 较合适的浓度为 0.1%。赵 敏等^[11] 在对国产庆大霉素产生菌进行诱变筛选获得 JIM-401 菌株 (主产物为 GMC_{1a} 和 GMC_{2b}) 的研究中, 认为与庆大霉素发酵相同, 在发酵过程中添加 Co^{2+} 能促进 GMC_{2b} 的生物合成, 在一定的浓度范围内, 发酵效价随着 Co^{2+} 浓度的增加而上升, 但在不加 Co^{2+} 或 Co^{2+} 浓度很低的情况下抗生素含量明显减少, 推测 JIM-401 菌株为 GM-SISO 生物合成途径中在 6'-C-甲基化位置发生阻断的障碍突变株, Co^{2+} 激活了 4''-C-甲基化活性, 使之积累较多的 GMC_{1a} 。

根据以上分析和本文氯化钴对西索米星发酵的影响实验初步结果, 可初步推测实验所用菌株 *M. inyoensis* F003 可能为 GM-SISO 生物合成途径中在 6'-C-甲基化位置发生阻断的障碍突变株, 适量的钴离子激活了 4''-C-甲基化活性, 使之积累较多的 GMX_2 和西索米星。从蛋氨酸添加时间对西索米星合成的影响结果, 可以初步推测在菌体生长阶段, 蛋氨酸可能只是简单地作为一种氨基酸被消耗掉, 没有真正起到甲基化因子的特殊作用。在产物合成初期和中期, 菌体内产物合成酶形成, 菌体也开始合成西索米星及其它抗生素中间产物, 此时蛋氨酸主要是作为甲基供体参与了抗生素的生物合成, 加速了 GMX_2 的生成速率。在产物合成后期添加蛋氨酸的效果不理想, 是与菌体内产物合成酶的活性降低有关。

4 结论

发酵初始培养基中氯化钴浓度 $7.5 \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 有助于西索米星的合成, 发酵结束时西索米星浓度最高可达 0.60 g/L 。发酵液中蛋氨酸初始浓度为 0.15 g/L 时, 在产物合成中前期添加 1.0 g/L 的蛋氨酸能明显促进西索米星的合成, 这是与蛋氨酸加快庆大霉素 A 的甲基化反应速率有关。当发酵液中蛋氨酸初始浓度为 0.66 g/L 时, 与不添加蛋氨酸相比, 在产物合成期添加 1.5 g/L 的蛋氨酸能明显促进西索米星的产物合成; 与在产物合成初期一次性添加相比, 在产物合成初期、中期和后期均分成 3 次添加的增幅更大。发酵 91 h 结束时, 发酵液中西索米星浓度可达 0.70 g/L 。

参考文献

- [1] Berdy J, Jeri M. *Process Biochem*, 1986, **26** (6): 93 ~ 100.
- [2] Kim D H, Suh J H, Ju J Y, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **166**: 9 ~ 13.
- [3] 褚志义. 生物合成药理学. 北京: 化学工业出版社, 2000. 608 ~ 617.
- [4] 陈剑锋, 张元兴, 郭养浩, 等. 过程工程学报, 2005, **5** (4): 430 ~ 433.
- [5] 陈珠灵, 阮奇, 张星. 中国抗生素杂志, 2002, **27** (5): 313 ~ 314.
- [6] 陈剑锋, 许礼林, 郭养浩, 等. 福州大学学报, 2002, **30** (增刊): 766 ~ 768.
- [7] 陈剑锋, 张元兴, 郭养浩, 等. 微生物学通报 2002, **29** (4): 28 ~ 33.
- [8] Lee B K, Testa R T, Wagman G H. *J Antibiot*, 1973, **26**: 728 ~ 731.
- [9] Lee B K, Bailey J V, Condon R G, *et al.* *Antimicrob Agents Chemother*, 1977, **12**: 335 ~ 338.
- [10] 杨丽, 王莲芬. 微生物学通报, 2000, **27** (5): 356 ~ 359.
- [11] 赵敏, 范瑾, 柏建新. 中国抗生素杂志, 1984, **9** (2): 90 ~ 93.