

费氏链霉菌中子辐射诱变菌株对新霉素的生物转化

马林^{1,2} 达娃³ 刘运^{1,2} 史冠莹^{1,2} 杨茜^{1,2} 杨从军^{1,2} 杨凌云^{1,2} 张新刚^{1,2}
陶科^{1,2*} 侯太平^{1,2*}

(1. 四川大学生命科学学院 四川 成都 610064)

(2. 四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610064)

(3. 西藏高原生物研究所 西藏 拉萨 850001)

摘要: 对新霉素产生菌费氏链霉菌进行中子辐射诱变和突变株筛选, 获得不产新霉素的突变株。以突变株为转化菌种, 以新霉素为底物, 对转化发酵液进行高效液相色谱分析, 研究了不同转化条件对新霉素转化的影响。结果表明, 底物浓度、底物添加时间、底物添加方式、接种量、培养基装量、转化时间、碳源、氮源、pH、温度对新霉素转化具有不同程度的影响。以转化条件优化参数进行转化大量培养, 转化液经 4 步离子交换层析进行分离纯化, 薄层层析检测纯化样品为单一斑点。采用薄层生物自显影对获得的 4 个转化产物分离样品做生物活性检测, 发现 4 个样品对金黄色葡萄球菌和姜青枯假单胞杆菌都具有抑制活性, 1 个样品对大白菜软腐病菌具有明显的抑制活性。
关键词: 新霉素, 生物转化, 辐射诱变, 费氏链霉菌, 离子交换层析, 抑菌活性

Biotransformation of Neomycin by Mutational Strain of *Streptomyces fradiae* Mutagenized with Neutron Radiation

MA Lin^{1,2} DA Wa³ LIU Yun^{1,2} SHI Guan-Ying^{1,2} YANG Qian^{1,2}
YANG Cong-Jun^{1,2} YANG Ling-Yun^{1,2} ZHANG Xin-Gang^{1,2} TAO Ke^{1,2*}
HOU Tai-Ping^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(3. Tibet Institute of Plateau Biology, Lhasa, Tibet 850001, China)

Abstract: A mutant of neomycin-producer *Streptomyces fradiae* was obtained from cultures mutagenized with neutron radiation. Utilizing the mutational strain which can not produce neomycin in normal culture, the biotransformation of neomycin was studied at different conversion conditions. The analysis results of fermentation broth by high performance liquid chromatography showed that the culture conditions such as the concentration of substrate, adding time of substrate, adding method of substrate, inoculation amount, the volume of medium, transformation time, carbon sources, nitrogen sources, pH of media and tempera-

ture had different influence on neomycin transformation. The transformation products of neomycin were isolated from a large scale fermentation broth by ion exchange chromatography and identified by thin layer chromatography. The antibacterial activity of four purified samples against *Staphylococcus aureus*, *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas solanacarum* were tested by bioautographic analysis. All four samples showed obvious inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas solanacarum*, but only one sample had inhibitory effect against *Erwinia carotovora*.

Keywords: Neomycin, Biotransformation, Irradiation mutagenesis, *Streptomyces fradiae*, Ion exchange chromatography, Antibacterial activity

生物转化是应用微生物、动植物细胞、酶等生物体系对外源化合物进行合成与结构修饰,是活性化合物结构衍生的重要手段之一。相对于化学合成,生物转化具有反应条件温和、污染小、成本低、副产物少等优点,并具有很高的立体选择性、区域选择性和基团选择性,能完成一些用化学方法难以进行的反应^[1]。以抗生素作底物进行微生物转化,常用的转化方式包括用抗生素产生菌或其突变株直接发酵、用静息细胞转化、用细胞提取物转化以及酶转化等。氨基糖苷类抗生素的微生物转化在20世纪七八十年代曾经是一个研究热点,人们通过对西索米星、庆大霉素、卡那霉素、核糖霉素等的转化,获得了一些有价值的新的抗生素衍生物,对于解决细菌耐药性问题起到了一定的作用^[2-6]。突变生物转化是氨基糖苷类抗生素结构修饰所采用的常见方法,转化机制包括独需型突变株转化、营养缺陷型突变株转化、突变抑制和静息基因激活等^[7]。

新霉素是由费氏链霉菌产生的水溶性碱性氨基糖苷类抗生素,对革兰氏阴性菌、阳性菌及结核杆菌等具有广泛的抗菌作用^[8]。有关新霉素的生物转化研究较少,Shier等通过突变生物合成,以链霉胺及其类似物作底物进行转化获得了4个新霉素衍生物^[9],Majumdar等研究了从新霉素中间代谢物(新霉素磷酸化物)到新霉素的转化^[10],但以新霉素作底物进行生物转化未见报道。有报道表明对费氏链霉菌进行紫外与微波复合诱变可以提高所产新霉素的效价,但没有获得新霉素的结构修饰物^[11]。近年来,由于对费氏链霉菌合成新霉素基因簇的了解,使得通过遗传工程改造新霉素产生菌从而获得新的抗生素成为可能^[12-13]。本研究对新霉素进行突变生物转化,目的在于获得具有生物活性的新霉素结构修饰物,为新霉素的应用提供可供选择的候选化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

硫酸新霉素由四川长征制药厂提供,纯度98%。费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)、大白菜软腐病菌(*Erwinia carotovora*)和姜青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacarum*)由四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室保存。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由四川省抗生素研究所提供。阳离子交换树脂(Amberlite FPC3500和Amberlite CG50)和阴离子交换树脂(Amberlite FPA90Cl)为美国Rohm Haas公司产品。硼酸、巯基乙醇、邻苯二甲醛(OPA)、异丙醇、氯仿、甲醇、氨水(25%)、2,3,5-氯代三苯基四氮唑(TCC)、茚三酮等化学试剂均为分析纯。

主要仪器:高效液相色谱仪(日本岛津,LC-6AD二元泵,SPD-M20A二极管阵列检测器),高速冷冻离心机(德国Sigma公司,3K15型),空气浴振荡摇床(哈尔滨东联电子技术有限公司,HZQ-C型)。

1.2 费氏链霉菌的诱变处理与突变株筛选

取3只培养7d的试管斜面,分别用10 mL pH 7.0的磷酸缓冲液洗下孢子,合并至灭菌的100 mL三角瓶中,摇床振荡30 min,离心(4000 r/min)弃上清。用2 mL无菌水重悬孢子,加入8 mL高氏液体培养基,振荡培养3 h使孢子萌发。取萌发的孢子悬液0.5 mL加入到小试管(1.0 cm × 7.5 cm)中,重复4管,在四川大学720研究所用加速器中子辐射源照射处理4 h(辐射剂量400 Gy)。将辐射处理后的孢子悬液及未经辐射处理的对照,采用10倍稀释法涂板至高氏培养基,培养3 d后挑取单菌落转至新的高氏培养基平板,再培养3 d后采用琼脂块法进行初筛,以金黄色葡萄球菌为指示菌检测抑菌活性,筛选无抑菌圈的菌落作为突变菌株,初筛重复进行3次。将初筛获得的突变株进行

摇瓶发酵复筛(高氏培养基, 30 mL 体积), 培养 7 d 后采用牛津杯法测定发酵液抑菌活性, 以出发菌株为对照。

1.3 培养基及培养条件

1.3.1 斜面培养基(高氏 1 号): 每 1000 mL 培养基含可溶性淀粉 20 g, 硝酸钾 1 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钠 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g。pH 自然。

1.3.2 种子培养基与转化培养基: 均为高氏 1 号培养基。费氏链霉菌诱变菌株在斜面培养基活化 72 h 后接入种子培养基培养 48 h, 然后取种子培养基菌液 2.5 mL 加入到转化培养基中。除不同碳源及不同氮源转化试验外, 其余转化试验所用培养基均采用高氏 1 号。

1.3.3 培养条件: 斜面活化培养温度为 36°C, 种子培养及转化培养在空气浴摇床中进行, 摇床转速 150 r/min, 培养温度 36°C。

1.4 新霉素转化培养

1.4.1 新霉素母液配制: 将硫酸新霉素用去离子水溶解, 配制成 60 g/L 的新霉素母液。

1.4.2 转化培养基础参数: 以高氏 1 号培养基为基本培养基, 250 mL 三角瓶培养基装量 100 mL, 新霉素底物浓度为 600 mg/L, 接种费氏链霉菌诱变菌株 72 h 后加入新霉素, 自然 pH, 空气浴摇床振荡培养, 转速 150 r/min, 培养温度 36°C。

1.4.3 单因素转化试验: 除新霉素不同添加量试验以相应浓度的新霉素水溶液作对照外, 其余转化试验均以 600 mg/L 的新霉素水溶液作对照, 每一试验的不同处理均设 3 个重复。以新霉素主成分峰(新霉素 B)的峰面积变化计算相对转化率。采用 DPS 7.05 软件对数据进行统计分析处理, 以最小显著差异法(LSD)作不同处理间的多重比较。

(1) 不同底物浓度试验: 菌种接入转化培养基 72 h 后添加新霉素, 底物浓度分别为 150、300、450、600 和 900 mg/L。(2) 新霉素不同添加时间试验: 添加新霉素浓度均为 600 mg/L, 加入时间分别为接种当时(0 h)以及接种后 24、48、72 和 96 h。(3) 新霉素不同添加方式试验: 100 mL 培养基中加入新霉素总量均为 60 mg, 设 6 个处理, 即: A) 接种 48 h 后加入 30 mg, 接种 72 h 后再加入 30 mg; B) 接种 48 h 后加入 20 mg, 接种 72 h 后再加入 40 mg; C) 接种 72 h

后一次性加入 60 mg; D) 接种 72 h 后加入 30 mg, 接种 96 h 后再加入 30 mg; E) 接种 72 h 后加入 20 mg, 接种 96 h 后再加入 40 mg; F) 分别在接种 48、72 和 96 h 后各加入 20 mg; (4) 不同碳源转化试验: 将高氏培养基可溶性淀粉用量调整为 15 g/L, 同时分别加入葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、甘露糖和甘露醇, 加入量均为 5 g/L, 其余成分不变。以高氏 1 号培养基为对照(淀粉用量 20 g/L)。(5) 不同氮源转化试验: 除硝酸钾对照外, 以含等量 N 的 5 种氨基酸代替硝酸钾(甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、天冬氨酸和谷氨酸每 1000 mL 培养基用量分别为 0.743、0.723、1.792、1.317 和 1.455 g), 其余成分不变。(6) 不同接种量转化试验: 斜面活化后的菌种接入高氏液体培养基培养 48 h, 菌液经灭菌双层纱布过滤除去菌球。转化培养基中分别加入含菌滤液 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL。(7) 不同培养基装量转化试验: 培养基装量设 6 个处理, 即 25、50、75、100、125 和 150 mL。(8) 不同转化时间试验: 设 6 个处理, 分别在加入新霉素底物后 12、24、48、72、96 和 120 h 结束转化。(9) 培养基不同 pH 转化试验: 设 5 个处理, 分别为 6.5、6.8、7.1、7.4 和 7.7。(10) 不同温度转化试验: 设 3 个处理, 即 32°C、36°C 和 40°C。

1.5 转化培养液的高效液相色谱检测

1.5.1 转化培养液预处理: 发酵液经离心后(10000 r/min, 10°C, 10 min), 再经减压抽滤, 将澄清滤液定容到 100 mL (培养基装量试验定容至相应体积)。

1.5.2 HPLC 检测: 参考李峰等的方法进行 OPA 柱前衍生化反应^[14]。色谱条件: 反相 C₁₈ 柱(5 μm 粒径, 150 mm × 4.6 mm ID), 流动相为甲醇水溶液(甲醇: 水 = 65 : 35), 柱温 30°C, 进样量 10 μL, 流速 1 mL/min, 检测波长 280 nm。

1.6 转化产物的分离纯化

1.6.1 新霉素转化大量培养: 根据转化培养优化参数进行大量培养, 转化培养液总量为 3 L, 转化新霉素底物量为 1.8 g。即: 500 mL 三角瓶装入 200 mL 转化培养基(高氏 1 号), 菌种液体培养 48 h 后, 按 2.5% 比例将菌液接种至转化培养基, 继续培养 72 h 后按 600 mg/L 浓度加入硫酸新霉素, 再培养 120 h 后结束转化。

1.6.2 转化产物的分离纯化: 通过 4 个步骤对转化

液进行离子交换柱层析分离纯化。(1) 弱酸性阳离子交换树脂 FPC3500 (原 Amberlite IRC50) 初步纯化: 柱规格 3.5 cm × 40 cm; 转化液经离心和减压抽滤, 调节 pH 至 7.5, 上样体积 500 mL, 上样流速 1 B.V/h, 弃掉上样流出液及水洗液; 以 0.25–2 mol/L 氨水梯度洗脱, 分部收集洗脱液, 每管 20 mL, 减压浓缩洗脱液至小体积; TLC 检测, 展开剂为氯仿-甲醇-氨水(2:3:2), 以 2.5% 茚三酮乙醇液喷雾, 在 110°C 下显色, 合并含转化产物部分。(2) 阴离子交换树脂 FPA90Cl 脱色: 将含转化产物的分离液加去离子水稀释, 减压抽滤除去不溶物, 调节 pH 至中性, 上样后收集水洗流出液, 浓缩至干。(3) 弱酸性阳离子交换树脂 Amberlite CG50 中柱纯化: 柱规格为 2 cm × 30 cm, 将脱色后的浓缩物用去离子水溶解, 调节 pH 至 7.5, 上样体积 200 mL, 上样流速 1 B.V/h; 以 0.05–0.5 mol/L 氨水梯度洗脱, 分部收集洗脱液, 每管 10 mL, 减压浓缩洗脱液至小体积, TLC 检测, 展开剂及显色方法同(1)。(4) 弱酸性阳离子交换树脂 Amberlite CG50 小柱再次纯化: 柱规格为 1 cm × 30 cm, 将第(3)步分离到含转化产物的浓缩样品用去离子水溶解, 调节 pH 至 7.5, 上样体积 100 mL, 上样流速 0.5 B.V/h; 以 0.01–0.2 mol/L 氨水梯度洗脱, 分部收集洗脱液, 每管 6 mL, 减压浓缩后进行 HPTLC 检测, 展开剂及显色方法同(1)。

1.7 转化产物活性测试

采用薄层生物自显影(TLCB)方法测试转化产物的活性, 参考 Salisbury 等的方法并加以改进^[15]。新霉素对照和纯化样品均配制成 500 mg/L 浓度, 薄层板点样后以氯仿-甲醇-氨水(2:3:2)展开, 充分挥干展开剂。将薄层板正面向上放入 9 cm 直径培养皿, 紫外灭菌 15 min, 倒入混合了供试细菌(金黄色葡萄球菌、大白菜软腐病菌、姜青枯假单胞杆菌)菌液的牛肉膏蛋白胨培养基 15–20 mL, 使培养基完全覆盖住薄层板并防止气泡产生, 培养基凝固后将培养皿翻转放入培养箱, 在 36°C 过夜培养。用 0.2% TTC 对琼脂表面均匀喷雾, 放入培养箱再培养 30 min 后显色并照相。

2 结果与分析

2.1 中子辐射诱变株的筛选

费氏链霉菌孢子悬液经 400 Gy 中子辐射后以涂板法接种至高氏培养基平板, 发现菌种能够生长,

未发生辐射致死现象。将单菌落转接至新的培养基培养, 与未辐射的对照相比, 生长情况也未见有明显差异。突变株筛选的部分结果见图 1。图 1A 和图 1B 分别为第 1 次初筛和第 3 次初筛的结果, 图中箭头所指处为目标突变株琼脂块, 对指示菌金黄色葡萄球菌未显出抑菌圈或抑菌圈不明显。图 1C、图 1D 和图 1E 为摇瓶复筛结果, 结果显示编号为 7 的菌株未显出抑菌圈, 编号为 8、10 和 19 的菌株抑菌圈极小, 而编号为 9、17、18 和 20 的菌株则产生了突变恢复。以后的各项试验均采用编号为 7 的菌株。

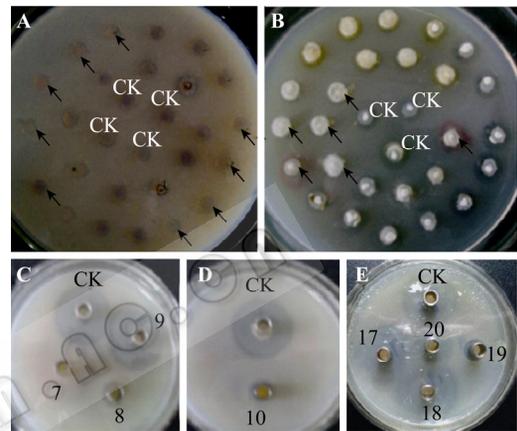


图 1 费氏链霉菌中子辐射诱变株筛选

Fig. 1 Screening of mutants from *Streptomyces fradiae* mutagenized by neutron radiation

注: A: 第 1 次初筛结果; B: 第 3 次初筛结果; C、D、E: 摇瓶复筛结果; CK: 出发菌株(对照); 7–10, 17–20: 诱变株; A、B 中箭头所指为无抑菌圈的突变株。

Note: A: The first primary screening test; B: The third primary screening; C, D and E: Repeated screening by shaking culture; CK: Original strain (the control); 7–10 and 17–20: The mutants. The arrows in A and B show the possible mutants in primary screening.

2.2 转化培养参数对新霉素转化的影响

2.2.1 不同底物浓度对新霉素转化的影响: 不同底物浓度的转化情况见图 2。在 150 mg/L 的低浓度, 新霉素的转化率(包括降解)最高, 300、450 和 600 mg/L 之间差异未达显著水平, 在 900 mg/L 的较高浓度也未使转化率明显下降。虽然低浓度底物更有利于转化, 但考虑到大量培养的转化底物总量及培养效率, 以 600 mg/L 的底物浓度进行转化较为适宜。

2.2.2 新霉素不同添加时间对转化的影响: 接种后 72 h 至 96 h 期间加入新霉素底物更有利于转化, 转化率均在 60% 以上, 接种当时加入底物的转化率最低(21.4%), 见图 3。

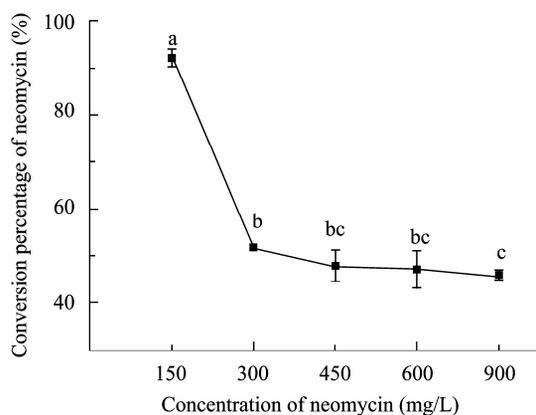


图2 不同底物浓度对新霉素转化的影响

Fig. 2 Effect of different concentration of substrate on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同浓度处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different concentration were not significantly different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

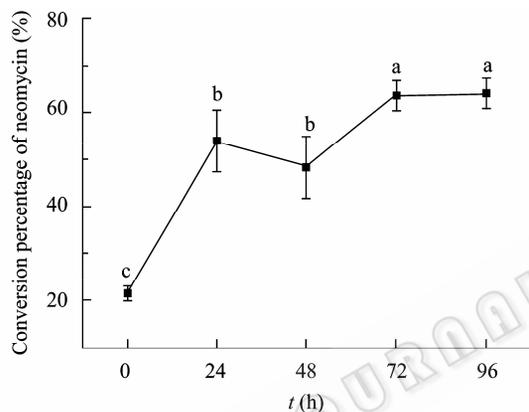


图3 底物加入时间对新霉素转化的影响

Fig. 3 Effect of adding time of substrate on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different time were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

2.2.3 新霉素不同添加方式对转化的影响: 不同底物加入方式对转化率有一定影响(表 1), B、C、E 及 F 4 种底物加入方式的新霉素转化率相当, 未达显著差异, A 和 D 两种方式的转化率略低, 因此, 接种 72 h 后一次性加入底物(方式 C)较为适宜。

2.2.4 不同碳源对转化的影响: 试验了 7 种碳源对新霉素转化的影响, 但以甘露醇作碳源, 转化液衍生化后未检测到除衍生化试剂峰以外的其他峰, 推测甘露醇可能对衍生化有一定影响。其余 6 种碳源的新霉素转化情况见图 4。以半乳糖作碳源的转化率最高(84.4%), 以蔗糖作碳源的转化率最低(52.4%), 淀粉、甘露糖和果糖的转化率相当, 无显著差异。

方式 Method	新霉素加入量及加入时间 Quantity and time of added neomycin	新霉素转化率 Conversion percentage of neomycin (%)
A	30 mg (48 h*) + 30 mg (72 h)	59.8 ± 0.5 b
B	20 mg (48 h) + 40 mg (72 h)	64.1 ± 0.9 a
C	60 mg (72 h)	64.3 ± 1.6 a
D	30 mg (72 h) + 30 mg (96 h)	54.6 ± 2.4 c
E	20 mg (72 h) + 40 mg (96 h)	63.3 ± 0.7 a
F	20 mg (48 h) + 20 mg (72 h) + 20 mg (96 h)	64.9 ± 0.8 a

注: 括弧内数字为接种后的培养时间; 转化率后小写字母相同表示处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Data in parenthesis indicate the time after inoculation. Conversion percentages of neomycin with same letter were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

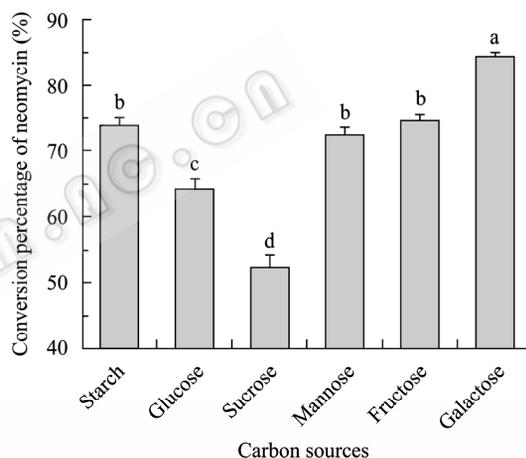


图4 培养基不同碳源对新霉素转化的影响

Fig. 4 Effect of different carbon sources in medium on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different column were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

2.2.5 不同氮源对转化的影响: 不同氨基酸氮源与 KNO_3 对照相比, 对新霉素转化的影响有一定的差异(图 5)。赖氨酸与 KNO_3 相当无显著差异, 以甘氨酸、酪氨酸和天冬氨酸作氮源的新霉素转化率无显著差异, 而谷氨酸作氮源时, 转化率较低(31.7%)。

2.2.6 不同接种量对转化的影响: 图 6 结果表明, 菌液接种量对新霉素转化有明显的影。0.5–2.0 mL 接种量的转化率均较低, 接种量为 2.5 mL 时, 转化率明显升高。

2.2.7 不同培养基装量对转化的影响: 培养基装量可反映溶氧量对转化的影响, 由图 7 结果可见,

250 mL 三角瓶装量 100 mL 培养基的转化率最高, 与其他处理的差异均达到显著水平。

2.2.8 不同转化时间对转化的影响: 图 8 结果表明, 随着转化时间的增加, 转化率显现出升高的趋势。加入新霉素底物 96 h 后检测, 新霉素相对转化率为 60.8%, 120 h 后检测的相对转化率为 67.7%, 即转化培养时间以加入底物后 5 d 为最佳。

2.2.9 培养基不同 pH 对转化的影响: 图 9 结果表明, pH 为 7.4 时转化率最高(69.9%), 其次为 pH 7.1 (培养基自然 pH), 新霉素相对转化率为 68.1%, 这 2

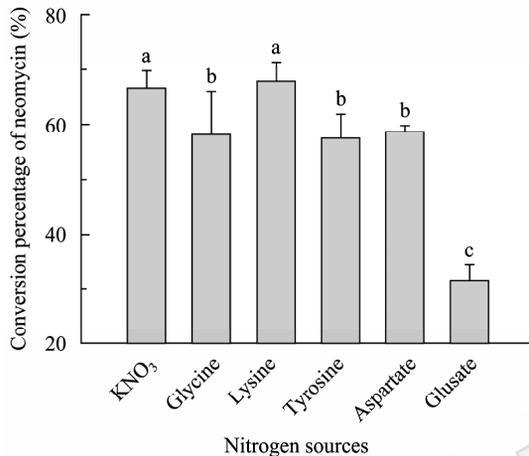


图 5 培养基不同氮源对新霉素转化的影响

Fig. 5 Effect of different nitrogen sources in medium on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different column were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

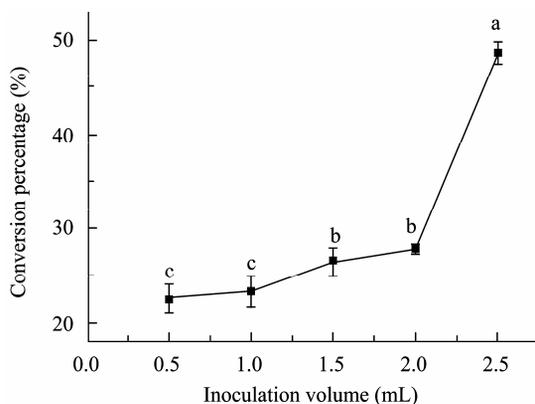


图 6 不同接种量对新霉素转化的影响

Fig. 6 Effect of different inoculation volume on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different inoculation volume were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

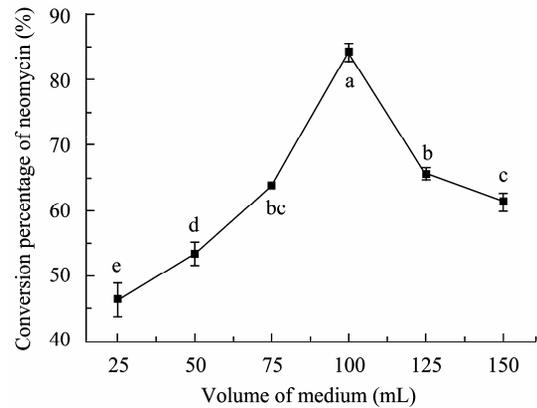


图 7 不同培养基装量对新霉素转化的影响

Fig. 7 Effect of different medium volume on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different volume of medium were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

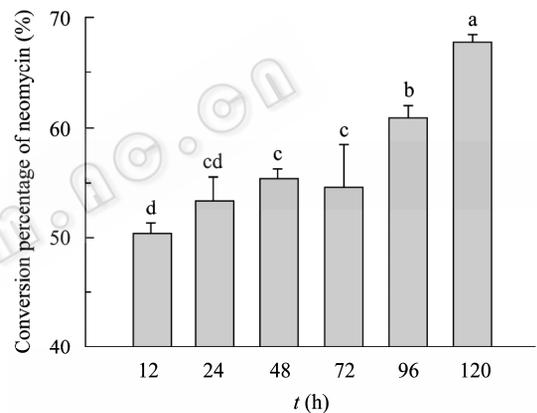


图 8 转化时间对新霉素转化的影响

Fig. 8 Effect of cultural time on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different column were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

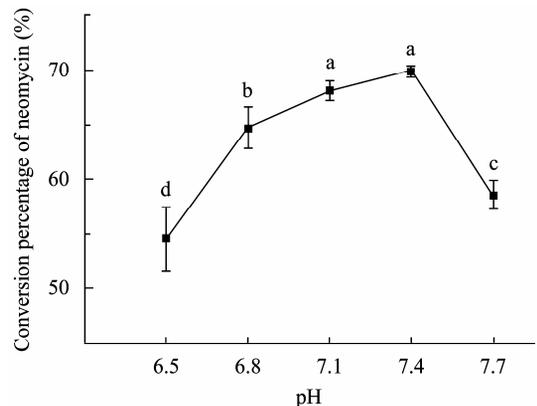


图 9 培养基 pH 对新霉素转化的影响

Fig. 9 Effect of medium pH on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different pH were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

个处理之间的差异未达显著水平, 故进行大量转化培养时, 采用高氏培养基的自然 pH。其他 pH 处理的转化率都相对较低。

2.2.10 不同温度对转化的影响: 图 10 结果表明, 36°C 为转化培养的适宜温度, 新霉素转化率为 62.9%, 该温度更有利于菌株的生长和对底物的代谢转化, 在 32°C 和 40°C 下进行转化培养的转化率都较低。

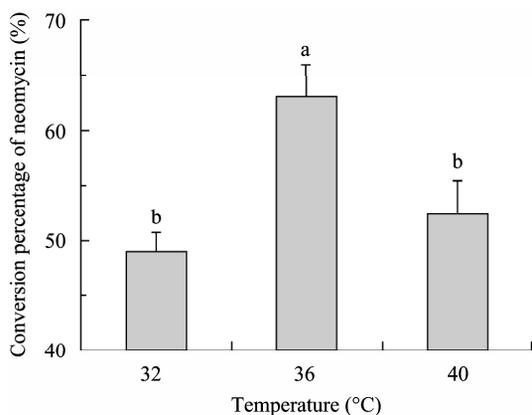


图 10 温度对新霉素转化的影响

Fig. 10 Effect of temperature on neomycin transformation

注: 小写字母相同的数据表示不同处理间差异不显著 ($n = 3$, $P < 0.05$).

Note: Values with same letter at different temperature were not significant different (LSD test, $n = 3$, $P < 0.05$).

2.3 离子交换层析分离新霉素转化产物的 TLC 检测结果

新霉素转化液经离子交换层析分离后的样品 TLC 结果见图 11。经弱酸性阳离子交换树脂 Amberlite FPC3500 初步分离, TLC 检测发现新的转化产物斑点十分明显(图 11A 中斑点 b、c 和 d), 但未与新霉素底物完全分离。经 Amberlite CG50 中柱分离后, 转化产物点更明显, 但产物仍未完全纯化(图 11B 中斑点 e、f 和 g)。经 Amberlite CG50 小柱分离后, 与对照比较, 分离到两个转化产物, 单一斑点表明达到了较高的纯度(图 11C 中斑点 h 和 i)。

2.4 新霉素转化产物的抑菌活性

经薄层生物自显影分析, 表明新霉素转化产物 4 个样品对金黄色葡萄球菌和姜青枯假单胞杆菌都具有活性, 只有 2 号样品对大白菜软腐病菌具有明显的抑制作用(图 12)。在 4 个测试样品中, 3 号样品对金黄色葡萄球菌的抑制活性稍弱(图 12A), 但 4 个样品在 TLC 点样量和浓度基本一致的情况下, 对姜青枯假单胞杆菌的抑制效应都比对照更为明显(图 12C)。从斑点的迁移位置可见, 4 个样品中至少有两个新霉素转化产物(图 12A 中斑点 a 和 b)。

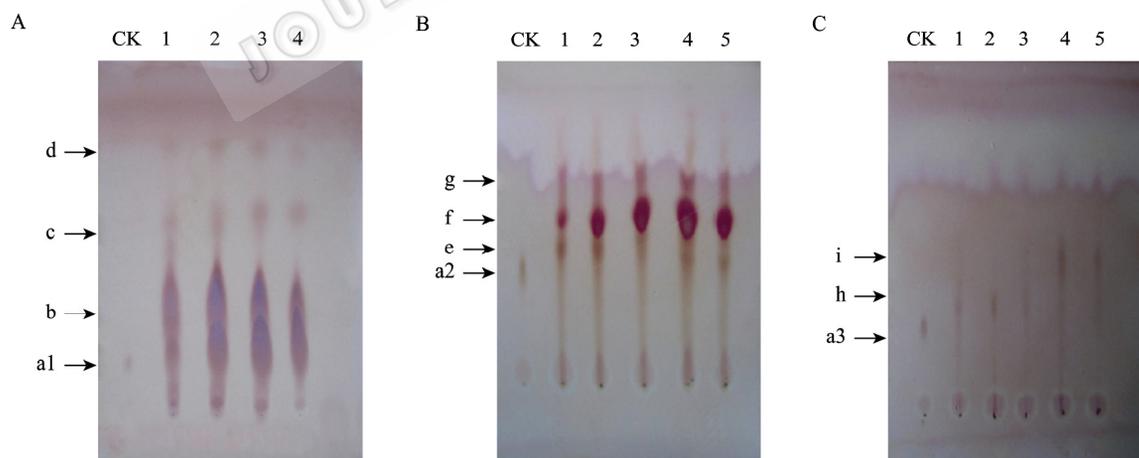


图 11 新霉素转化产物的薄层层析

Fig. 11 Thin layer chromatography of transformed products of neomycin

注: A: 经阳离子交换树脂 Amberlite FPC3500 层析(3.5 cm × 30 cm)分离样品; B: 经阳离子交换树脂 Amberlite CG50 中柱(2.0 cm × 30 cm)层析分离样品; C: 经阳离子交换树脂 Amberlite CG50 小柱(1.0 cm × 30 cm)层析分离样品; CK: 硫酸新霉素对照; 1-5: 柱层析流分; a1、a2、a3: 硫酸新霉素对照点; b-i: 可能的转化产物点。

Note: A: Samples isolated from cation exchange chromatograph with Amberlite FPC3500 (3.5 cm × 30 cm); B: Samples isolated from cation exchange chromatograph with Amberlite CG50 (2.0 cm × 30 cm); C: Samples isolated from cation exchange chromatograph with Amberlite CG50 (1.0 cm × 30 cm); CK: Neomycin sulfate; 1-5: Fractions from chromatography; a1, a2 and a3: Showed the spots of neomycin sulfate; b-i: Represented the possible spots of transformation products.

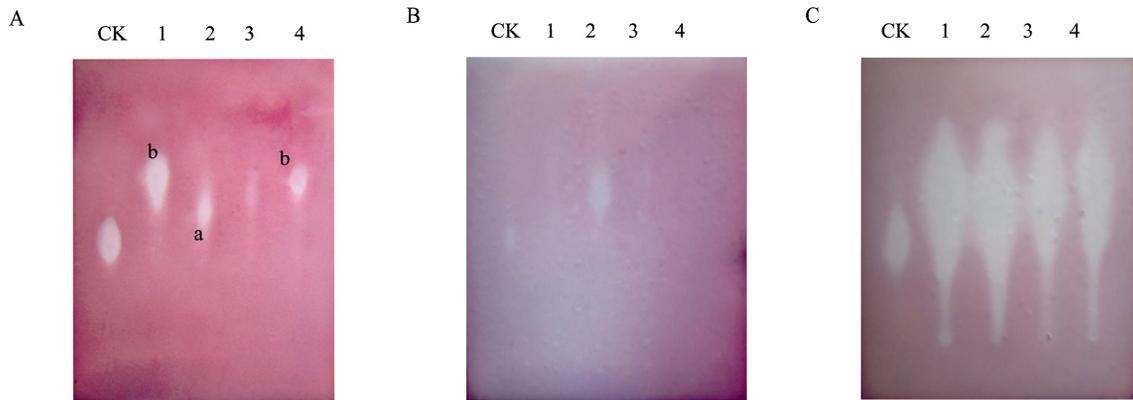


图 12 新霉素转化产物对 3 种细菌抑制活性的薄层自显影

Fig. 12 Bioautography of inhibitory activity against three bacteria by transformed neomycin

注: A: 金黄色葡萄球菌; B: 大白菜软腐病菌; C: 姜青枯假单胞杆菌; CK: 硫酸新霉素对照(500 mg/L); 1-4: 纯化后的新霉素转化产物(500 mg/L); a、b: 转化产物抑菌斑。

Note: A: *Staphylococcus aureus*; B: *Erwinia carotovora*; C: *Pseudomonas solanacarum*; CK: Neomycin sulfate (500 mg/L); 1-4: Purified samples of transformed neomycin (500 mg/L); a,b: Spots of transformed neomycin.

3 讨论

20 世纪 60-80 年代, 抗生素的生物转化曾是应对细菌耐药性问题的一个重要研究方向, 对阐明抗生素合成途径以及获得新的抗生素起到了重要作用。近年来, 随着抗生素筛选技术及基因工程技术的应用, 获得新抗生素的途径更为广泛, 但生物转化应用于抗生素结构修饰仍然为人们所重视^[16-17]。

本研究直接对新霉素转化发酵液进行 HPLC 分析, 各转化处理与相同浓度新霉素对照相比, 主成分(新霉素 B)的峰面积均明显减少, 推测这可能是由于新霉素主要发生了降解所致, 仅在个别处理能检测到新的峰。在已有的研究文献中, 对氨基糖苷类抗生素生物转化产物的检测都是在对转化发酵液进行分离纯化后进行^[2-6,9-10,18], 未见有对转化发酵液直接作 TLC 或 HPLC 分析而检测到转化产物的报道。本研究采用高氏 1 号培养基而不是其他营养成分更丰富的培养基作为转化培养基, 主要是发现酵母膏、牛肉粉、蛋白胨等有机成分对新霉素的 OPA 衍生化反应会产生干扰, 导致 HPLC 分析时无法检测到新霉素及其转化产物。李峰等报道采用 OPA 衍生化方法测定了新霉素发酵液样品, 但未提及发酵液的成分组成^[14]。

试验结果表明不同转化条件对新霉素的转化(降解)具有不同程度的影响, 其中底物浓度、底物添加时间、接种量、培养基装量、转化时间、pH 和温

度对转化(降解)的影响相对更为明显。底物浓度在 600 mg/L 时既不会对菌株生长造成抑制, 也能达到较高的转化率。底物在菌株培养 3-4 d 后加入更有利于转化, 主要是菌株培养 48 h 后才进入较快速的生长阶段, 而接种当时加入新霉素会抑制菌株的生长。培养基装量在 100 mL 时新霉素的转化率较高, 表明培养液溶氧量对转化的影响较大。转化时间为 96-120 h 的转化率较高, 可能与新霉素先进行降解再发生转化有关。然而, 研究不同抗生素的生物转化所采用的转化时间有较大差异, 如 Kase 等转化西索米星采用 20 h^[2], 而 Cappelletti 等研究核糖霉素转化则采用 120 h^[5]。pH 在 7.1-7.4 以及温度在 36°C 时, 新霉素的相对转化率较大, 主要是与转化新霉素的酶活性有关。氮源和碳源对转化(降解)也有一定影响, 但对新霉素结构修饰是否有影响还需要通过大量转化培养及对发酵液分离纯化后才能确认。本研究仅进行了单因素试验, 不同因素间的相互作用及对新霉素转化的影响还需要通过正交试验进一步加以研究。

研究发现转化产物斑点的迁移距离比对照新霉素更大, 抑菌活性测试结果表明可能有两个转化产物存在, 其极性均比新霉素低, 推测新霉素的氨基或羟基可能发生了氢的取代, 但具体的结构变化还需要通过结构鉴定加以确认。张磊等曾总结了氨基糖苷类抗生素突变生物合成(转化)的 4 种机制^[7], 我们认为独需型突变生物转化的可能性较大, 即突变

株丧失了合成部分前体的能力, 当新霉素作为外源底物加入后, 可能是先发生了降解, 突变株再利用新霉素降解后的前体类似物进行转化。也可能存在营养缺陷型突变生物转化这种机制, 因为加入的新霉素可以作为碳源或氮源被直接利用或经过降解后被利用^[19]。

研究发现分离的 4 个转化产物样品对金黄色葡萄球菌和姜瘟病菌(姜青枯假单孢杆菌)都具有明显的抑制活性, 但只有一个样品对大白菜软腐病菌的抑制活性较明显。我们前期进行盆栽试验发现新霉素对姜瘟病菌和大白菜软腐病菌具有相同的防效^[20], 这可能既与盆栽试验时应用了较大的浓度有关(200 mg/L), 也与新霉素被转化后结构发生了变化有关。薄层生物自显影对于测试转化产物的生物活性较为灵敏, 本研究在文献报道的 TLCB 薄层板接触法的基础上进行了改进, 即直接将点样并展开后的薄层板正面向上置于培养皿中, 灭菌后倒入混菌培养基, 培养基凝固后即可放入培养箱培养后显色。这一改进方法比 Salisbury 等^[15]和 Ramirez 等^[21]的方法都更为简便。

参 考 文 献

- [1] 卢艳花, 王剑文, 魏东芝, 等. 天然药物的生物转化. 北京: 化学工业出版社, 2006: 1-5.
- [2] Kase H, Shimura G, Iida T, *et al.* Biotransformation of sisomicin and verdamicin by *Micromonospora sagamiensis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, **46**(2): 515-522.
- [3] Testa RT, Tilley BC. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: I. Sisomicin. *The Journal of Antibiotics*, 1975, **28**(8): 573-579.
- [4] Testa RT, Tilley BC. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II. Gentamicin. *The Journal of Antibiotics*, 1976, **29**(2): 140-146.
- [5] Cappelletti LM, Spagnoli R. Biological transformation of kanamycin A to amikacin (BBK-8). *The Journal of Antibiotics*, 1983, **36**(3): 328-330.
- [6] Kojima M, Inouye S, Niida T. Bioconversion of ribostamycin (SF-733). I. Isolation and structure of 3 (or 1)-N-carboxymethylribostamycin. *The Journal of Antibiotics*, 1973, **26**(4): 246-248.
- [7] 张磊, 张维娟. 抗生素生物转化——获得新抗生素的生物化学途径. 沈阳药学院学报, 1991, **8**(2): 151-156.
- [8] Waksman SA, Lechevalier HA. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*, 1949, **109**(2830): 305-307.
- [9] Shier WT, Rinehart KLJ, Gottlieb D. Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1969, **63**(1): 198-204.
- [10] Majumdar MK, Majumdar SK. Isolation and characterization of three phosphoamido-neomycins and their conversion into neomycin by *Streptomyces fradiae*. *Biochemistry Journal*, 1970, **120**(2): 271-278.
- [11] 滕慧, 张亚雄. 复合诱变选育新霉素高产菌株的研究. 中国酿造, 2008(13): 37-39.
- [12] Huang F, Haydock SF, Mironenko T, *et al.* The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2005, **3**(8): 1410-1418.
- [13] Huang F, Spittler D, Koorbanally NA, *et al.* Elaboration of neosamine rings in the biosynthesis of neomycin and butirosin. *ChemBioChem*, 2007, **8**(3): 283-288.
- [14] 李锋, 邱小明, 石贤爱, 等. OPA 柱前衍生法测定硫酸新霉素的含量. 福州大学学报: 自然科学版, 2007, **35**(1): 130-132.
- [15] Salisbury CDC, Rigby CE, Chan W. Determination of antibiotic residues in Canadian slaughter animals by thin-layer chromatography-bioautography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, **37**(1): 105-108.
- [16] Mikolasch A, Niedermeyer THJ, Lalk M, *et al.* Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from *Trametes spec.* *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006, **54**(5): 632-638.
- [17] Gandolfi R, Jovetic S, Marinelli F, *et al.* Biotransformations of lipoglycopeptides to obtain novel antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 2007, **60**(4): 265-271.
- [18] Kameda Y, Asano N, Hashimoto T. Microbial glycosidation of validamycins. *The Journal of Antibiotics*, 1978, **31**(9): 936-938.
- [19] Perlman D, Sebek OK. Microbial transformations of antibiotics. *Pure Applied Chemistry*, 1971, **28**(4): 637-648.
- [20] 贺燕, 陶科, 黄晓, 等. 新霉素对植物病原细菌的防效及其急性毒性. 农药, 2008, **47**(4): 297-299.
- [21] Ramirez A, Gutiérrez R, Díaz G, *et al.* High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk. *Journal of Chromatography B*, 2003, **784**(2): 315-322.