

# 氨基糖苷类抗生素 JI-20A 发酵过程的磷酸盐控制\*

陈剑锋<sup>1\*\*</sup> 邵敬伟<sup>1</sup> 张元兴<sup>2</sup> 陈浩<sup>1</sup> 郭养浩<sup>1</sup>

(福州大学药物生物技术与工程研究所 福州 350002)

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

**摘要** 磷酸盐初始浓度 6.1 mmol/L ~ 9.6 mmol/L 有助于菌体的生长,但抑制氨基糖苷类抗生素 JI-20A 的合成。在产物合成期磷酸盐浓度控制在 1.1 mmol/L 以下可提高碱性磷酸酯酶活力,降低丙酮酸浓度,促进氨基糖苷类抗生素 JI-20A 合成。

**关键词** 抗生素 JI-20A,磷酸盐,发酵,碱性磷酸酯酶,丙酮酸

**中图分类号** :TQ465.2 ; Q815 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)05-0852-04

## Control of Phosphate Concentration on Aminoglycoside Antibiotic JI-20A Fermentation\*

CHEN Jian-Feng<sup>1\*\*</sup> SHAO Jing-Wei<sup>1</sup> ZHANG Yuan-Xing<sup>2</sup> CHEN Hao<sup>1</sup> GUO Yang-Hao<sup>1</sup>

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

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Technology, Shanghai 200237)

**Abstract** It was found that the phosphate concentration effected significantly on the cell growth and the production of aminoglycoside antibiotic JI-20A. Although initial phosphate concentration of 6.1 mmol/L ~ 9.6 mmol/L was beneficial for the cell growth, the production of aminoglycoside antibiotic JI-20A was inhibited. When the phosphate concentration was controlled below 1.1 mmol/L in the biosynthesis phase of aminoglycoside antibiotic JI-20A, high alkaline phosphatase activity and low pyruvic acid concentration were resulted in, and the production of aminoglycoside antibiotic JI-20A was enhanced.

**Key words** Antibiotic JI-20A, Phosphate, Fermentation, Alkaline phosphatase, Pyruvic acid

西索米星(Sisomicin, SISO)、庆大霉素(Gentamicin, GM)和小诺霉素(Micronomicin, MCR)是临床上一类重要的氨基糖苷类抗生素。西索米星是抗生素 JI-20A 的脱羟基化衍生物,庆大霉素 C<sub>1a</sub> 为 JI-20A 的脱氧化衍生物,小诺霉素为 6'-N-甲基庆大霉素 C<sub>1a</sub>, 又称庆大霉素 C<sub>2b</sub>(GM C<sub>2b</sub>)或相模湾霉素(Sagamicin, SGM)。由于 JI-20A 是小单孢菌生物合成西索米星、庆大霉素 C<sub>1a</sub> 和小诺霉素过程中的中间代谢产物,凡是能够产生上述抗生素的菌种,都可能产生抗生素 JI-20A<sup>[1~6]</sup>。

美国的 Testa<sup>[7]</sup>和日本的 Kase<sup>[8]</sup>先后对庆大霉素类抗生素的生物合成途径提出了假设。中国的

陈剑锋博士<sup>[9]</sup>通过对以 *M. inyoensis* F003 为产生菌的西索米星生物合成实验结果的分析,绘制了庆大霉素-西索米星型的假三糖庆大霉素类抗生素的生物合成途径。在此基础上,陈剑锋等人又进一步绘制了以 *M. inyoensis* F002 为产生菌的抗生素 JI-20A 的生物合成途径(见图 1),提出了形成氨基糖苷类抗生素 JI-20A、G-418 和 JI-20B、SISO、GM 及 MCR 等可能的生物合成途径。

磷酸盐会影响很多抗生素的生物合成<sup>[10~12]</sup>。前文已报道<sup>[13]</sup>,磷酸盐对西索米星的生物合成具有明显的双向调控作用,磷酸盐浓度可能是西索米星发酵过程中菌体进行平衡生长的关键因素之一,在

\* 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. C0210007, B9810007)

\*\* 通讯作者 E-mail: jfchen@fzu.edu.cn

收稿日期:2006-09-20,修回日期:2006-11-06

磷酸盐浓度高时菌体生长处于平衡状态,西索米星的生物合成被抑制,只有当发酵过程中磷酸盐浓度不足时,西索米星的生物合成才能开始。本研究对

抗生素 JI-20A 发酵过程中磷酸盐浓度的影响进行考察,进而优化抗生素 JI-20A 发酵培养条件。

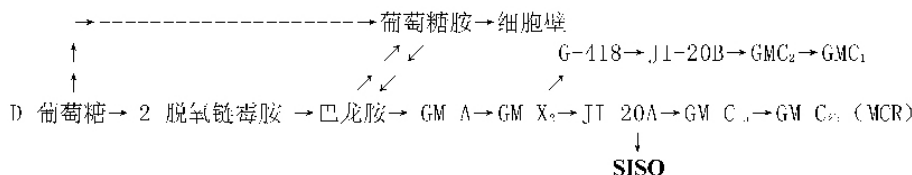


图 1 氨基糖苷类抗生素 JI-20A 可能的生物合成途径

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

实验使用的是伊尼奥小单孢菌(*Micromonospora inyoensis* F002, 为本课题组诱变保存菌种<sup>[1]</sup>, 抗生素 JI-20A 组分可占发酵液中氨基糖苷类抗生素总浓度的 53% 以上)。

### 1.2 培养基与培养条件

斜面、种子、摇瓶和 5 L 罐发酵培养条件同参考文献[1]。

### 1.3 分析方法

菌体浓度( $X$ )和总糖浓度( $St$ )的测定同参考文献[4,9]。抗生素 JI-20A 效价( $P$ )测定采用薄层层析生物显影法和微生物检定法<sup>[1]</sup>, 检定菌为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* CMCC 63202)。丙酮酸浓度测定采用 2,4-二硝基苯肼比色法<sup>[13]</sup>, 测定波长 520 nm。无机磷酸盐浓度( $P_i$ )的测定采用钼蓝比色法<sup>[13]</sup>, 测定波长 660 nm。碱性磷酸酯酶活力(ALP)采用磷酸对硝基苯酚比色法测定<sup>[13]</sup>, 测定波长 405 nm。淀粉水解酶表现活性( $E$ )采用 HPLC 法和酶法测定<sup>[4]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 初始磷酸盐浓度对抗生素 JI-20A 发酵的影响

根据方法 1.2, 仅改变摇瓶发酵培养基中磷酸氢二钾的用量, 其余成分不变, 测定 99 h 发酵结束时的菌体浓度和 JI-20A 效价, 每个样本测定 3 次取均值, 考察初始磷酸盐浓度对抗生素 JI-20A 发酵的影响, 结果见图 2。由图可见, 初始磷酸盐浓度对抗生素 JI-20A 的发酵影响很大。就菌体生长而言, 随着初始磷酸盐浓度的增加, 发酵结束时, 菌体浓度缓慢上升, 于 6.1 mmol/L 时出现菌体浓度最大值

13.2 g/L; 之后, 随着磷酸盐浓度继续增加, 菌体浓度反而迅速下降, 并未出现高浓度的磷酸盐刺激菌体生长的情况。对产物合成而言, 初始磷酸盐浓度从 1.1 mmol/L 升至 6.1 mmol/L, 发酵结束时, 抗生素 JI-20A 浓度显著地升高到最大值 0.57 g/L; 继续增加磷酸盐, JI-20A 浓度反而大幅度下降, 当初始磷酸盐浓度 21.3 mmol/L 时, 抗生素 JI-20A 浓度降至 0.07 g/L。

研究表明, 抗生素 JI-20A 发酵中, 磷酸盐对菌体生长和产物合成产生影响的浓度范围有所区别, 较高初始磷酸盐浓度(如 6.1 mmol/L ~ 9.6 mmol/L)对菌体正常生长影响不大, 但严重抑制 JI-20A 的合成。这与 Obregon<sup>[10]</sup>、陈剑锋<sup>[13]</sup>和杨丽<sup>[14]</sup>等人报道的磷酸盐对西索米星合成的影响有相似之处。

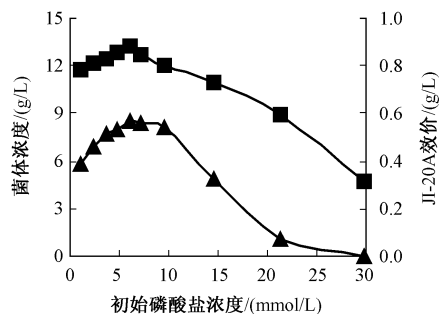


图 2 初始磷酸盐浓度对抗生素 JI-20A 发酵的影响( $X$  ■;  $P$  ▲)

### 2.2 产物合成期控制磷酸盐浓度对抗生素 JI-20A 发酵的影响

在 BIOSTAT B5 型全自动发酵罐上, 根据方法 1.2, 采用初始磷酸盐浓度为 6.0 mmol/L 的发酵培养基, 经过 22 h 发酵后, 通过流加补料磷酸盐或磷酸盐络合物, 分别控制产物合成期(24h ~ 99h)发酵液中磷酸盐浓度为 1.9 mmol/L ~ 2.3 mmol/L (简称高磷发酵)或 0.9 mmol/L ~ 1.1 mmol/L (简称低磷发酵),

进行产物合成期控制磷酸盐浓度的对比实验(见图3),每个样本测定3次取平均值。

研究发现,高磷发酵中,菌体浓度维持在11.0 g/L,为低磷发酵的1.1倍;总糖消耗较大,发酵结束时,残糖浓度为22.8 g/L,低于低磷发酵时34.3 g/L的残糖浓度,但抗生素JI-20A浓度为0.45 g/L,

仅相当于低磷发酵时的78.9%。

高磷发酵过程发酵液中丙酮酸浓度和淀粉水解酶活力均始终高于低磷发酵过程。在产物合成期,高磷发酵时丙酮酸浓度为0.61 g/L~0.66 g/L,约为低磷发酵时的1.2~1.3倍;在产物合成期,高磷发酵时淀粉水解酶活力约为低磷发酵时的2.0倍左右。

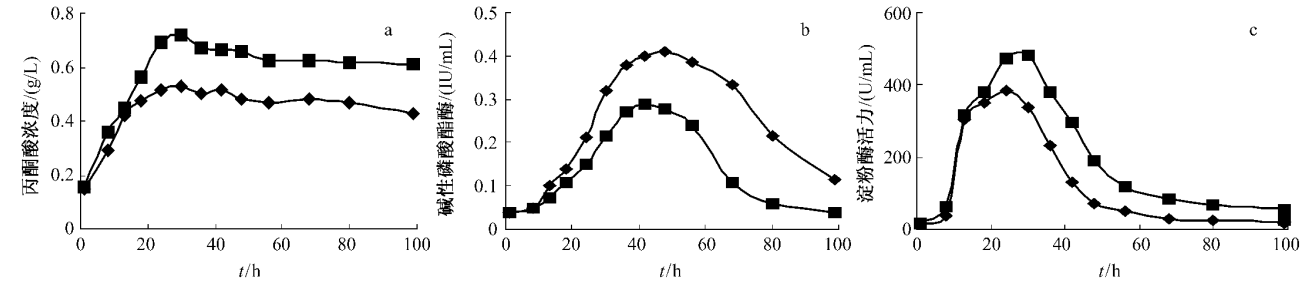


图3 产物合成期控制磷酸盐浓度对丙酮酸浓度(a)、碱性磷酸酯酶活力(b)和淀粉水解酶活力(c)的影响  
(高磷发酵 ■, 低磷发酵 ◆)

高磷发酵和低磷发酵过程中碱性磷酸酯酶活力有相同的变化趋势,均在36h~48h达到最大值,但高磷发酵过程发酵液中碱性磷酸酯酶活力始终低于低磷发酵过程,前者约为后者的70%左右。随着发酵的继续进行,这种差距进一步扩大,当发酵结束时,前者降至后者的1/3左右。

综上所述,对比两种条件下抗生素JI-20A发酵过程的总糖消耗、淀粉水解酶活力、碱性磷酸酯酶活力和丙酮酸累积的变化情况可见,当发酵过程处于高磷发酵条件下,较高浓度的磷酸盐促进了糖类底物的降解,导致发酵过程丙酮酸浓度较高,同时使发酵过程碱性磷酸酯酶活力降低,从而抑制了抗生素JI-20A的合成。因此,在抗生素JI-20A产物合

成期,应控制发酵液中的磷酸盐浓度,避免磷酸盐对抗生素JI-20A生物合成的负面效应。

### 2.3 控制磷酸盐浓度对抗生素JI-20A分批发酵过程微生物代谢特征的影响

在BIOSTAT B5型全自动发酵罐上,根据方法1.2,发酵培养基中初始磷酸盐浓度为6.0 mmol/L,进行低磷发酵和高磷发酵的抗生素JI-20A分批发酵验证实验,两种发酵过程的微生物代谢特征分别见图4a和图4b。由图可见,菌体的生长、总糖的消耗和磷酸盐的消耗在最初的8h~22h内迅速增加,当开始测到抗生素JI-20A产物时,发酵液中的磷酸盐浓度已降至0.10 mmol/L以下,说明抗生素JI-20A的合成是在培养基中磷酸盐浓度接近耗尽时才开始的。

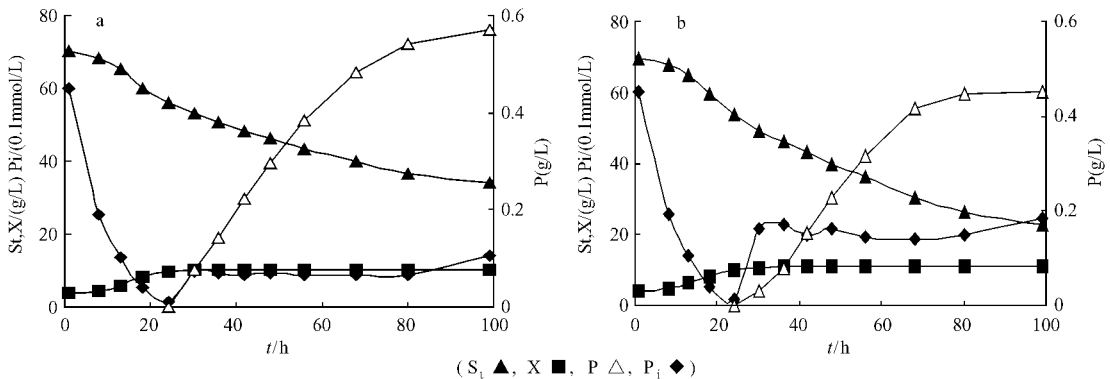


图4 低磷时JI-20A分批发酵过程的微生物代谢特征

对比两种条件下抗生素JI-20A分批发酵过程的微生物代谢特征可见,在产物合成期磷酸盐浓度若能始终控制在1.1 mmol/L以下,将有助于抗生素

JI-20A发酵过程的正常进行,发酵结束时JI-20A效价较高,否则发酵过程仍处于菌体生长状态,发酵结束时JI-20A效价相对较低。

### 3 讨论

研究表明,与前文<sup>[13]</sup>报道的磷酸盐对西索米星生物合成的影响情况相似,磷酸盐对氨基糖苷类抗生素 JI-20A 的生物合成也具有双向调节作用,也存在着高浓度抑制菌体生长和产物合成,而低浓度刺激菌体生长和促进产物合成的双重作用。初始磷酸盐浓度 6.1 mmol/L ~ 9.6 mmol/L 虽有助于刺激菌体的生长和缩短发酵过程的迟滞期,却严重抑制抗生素 JI-20A 的合成。在发酵过程中,更高浓度的磷酸盐并不能进一步刺激菌体生长,反而对菌体生长产生抑制作用。

磷酸盐对抗生素 JI-20A 菌体生长的这种影响作用,可能是由于生长阶段菌体的胞内碱性磷酸酯酶活力发生变化,以及改变了糖类底物的代谢情况和胞外淀粉酶活力大小,干扰了菌体的初级代谢、破坏了菌体正常的生长平衡的综合结果。

一般地,葡萄糖进入细胞后的代谢过程要经过 EMP 途径形成丙酮酸,然后才能进入 TCA 循环形成各种结构的有机酸和氨基酸类中间代谢产物、以及发酵过程所需的各种酶和 ATP,满足抗生素 JI-20A 产生菌的菌体生长和生物合成。随着培养基中磷酸盐浓度的增加,HMS 途径中碱性磷酸酯酶活力逐渐下降,导致氢供体 NADPH 合成代谢受阻和 ATP 的累积,影响丙酮酸的累积,改变胞外营养物质的解离度和胞膜通透性,从而干扰了菌体的初级代谢,最终影响到菌体的正常生长<sup>[10,11]</sup>。

在产物合成期,流加磷酸盐对抗生素 JI-20A 的生物合成存在抑制作用。初步推测,可能与发酵过程中碱性磷酸酯酶活力受磷酸盐的调节有关。过量的磷酸盐将抑制碱性磷酸酯酶的活力和改变葡萄糖代谢在 HMS 途径与 EMP 途径的通量分配,使氢供体 NADPH 的合成代谢受阻而成为抗生素合成

中的限制因子,从而影响了脱氧青蟹肌醇形成 2-DOS 的顺利进行,这种现象与氨基糖苷类抗生素的生物合成往往受到磷酸盐的反馈调节的情况是一致的<sup>[10~12]</sup>。

因此,在进行氨基糖苷类抗生素 JI-20A 的发酵时,应该分段控制发酵液中的磷酸盐浓度。既要考虑到菌体生长的最大化,又要兼顾到产物比合成速率的最优化。可以选择磷酸盐浓度低的培养基来降低产物合成期发酵液的磷酸盐浓度,或通过流加补料方式,控制产物合成期发酵液中的磷酸盐浓度在 1.1 mmol/L 以下,避免高浓度的磷酸盐对抗生素 JI-20A 产物合成的抑制作用。

### 参考文献

- [1] 陈剑锋,张元兴,郭养浩,等. 微生物学通报,2002,29(4):28~33.
- [2] Berdy J, Jeri M. Process Biochem, 1990, 21:93~100.
- [3] Kim D H, Suh J H, Ju J Y, et al. FEMS Microbiol Lett, 1998, 166(1):9~13.
- [4] 陈剑锋,张元兴,郭养浩,等. 过程工程学报,2005,5(4):430~433.
- [5] 郑卫,卓锦明,程元荣,等. 中国抗生素杂志,2002,27(10):592~595.
- [6] 杨丽,刘亦凡,周清莲,等. 微生物学通报,2000,27(4):257~260.
- [7] Testa R T, Tilley B C. J Antibiotics, 1975, 28:573~579.
- [8] Kase H, Odakura Y, Nakayama K. J Antibiotics, 1982, 35:1~9.
- [9] 陈剑锋,王航,张元兴,等. 微生物学通报,2006,33(3):85~90.
- [10] Obregon A M, Escalante L, Gonzalez R. J Antibiotics, 1994, 47(12):1442~1446.
- [11] Martin J F. Adv Biochem Eng, 1977, 6:105~123.
- [12] 武兵元译. 国外医药-抗生素分册,1992,13:326~330.
- [13] 陈剑锋,张元兴,郭养浩,等. 中国抗生素杂志,2002,27(8):452~455.
- [14] 杨丽,王莲芬. 微生物学通报,2000,27(5):356~359.