

脲对棒状链霉菌棒酸合成的影响

戴西达^{1Δ} 向四海^{2Δ} 赵友宝² 高强^{1*} 杨克迁^{2*}

- (1. 天津科技大学 生物工程学院 工业微生物教育部重点实验室
工业酶国家工程实验室 天津 300457)
(2. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 【目的】棒酸(Clavulanic acid)是棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)产生的β-内酰胺酶抑制剂,其合成过程中产生副产物脲,旨在探讨脲对棒酸合成的影响。【方法】通过发酵过程中脲和铵盐添加实验、阻断脲酶活性以及pH梯度实验研究脲对棒酸合成影响。【结果】脲添加实验结果表明:低浓度脲降低棒酸产量,当添加脲浓度达到20 mmol/L时,完全抑制棒酸合成。由于脲酶可以把脲水解为铵离子,导致铵离子浓度及pH提高,因此,通过阻断棒状链霉菌脲酶活性,可以更准确地反映脲对棒酸合成的影响。结果发现,脲酶敲除株发酵液中脲大量积累,浓度高达10 mmol/L,但棒酸产量没有明显降低,说明在该浓度下脲自身并不能抑制棒酸合成。添加脲降低野生菌棒酸产量,可能是脲被水解为铵离子或其引起的pH变化所致。而棒酸发酵液添加铵盐的结果显示铵离子对棒酸产量没有抑制作用;另外,pH梯度实验证实不同pH对棒酸产量影响较大。【结论】排除了脲和铵离子对棒酸合成的抑制作用,证实了脲酶水解脲导致pH提高是脲添加导致野生菌棒酸产量降低的真正原因,为进一步阐明棒酸合成调控机制提供了根据。

关键词: 棒酸, 脲, 脲酶, 棒状链霉菌

基金项目: 国家973计划项目(No. 2007CB714305, 2011CB707401); 天津市滨海新区自主创新重大项目(No. 2011-BK120014); 天津市自然科学基金重点项目(No. 08JCZDJ15100)

^Δ对本文贡献相同

*通讯作者: 高强: Tel: 86-22-60601599; 信箱: gaoqiang@tust.edu.cn

杨克迁: Tel: 86-10-64807459; 信箱: yangkq@im.ac.cn

收稿日期: 2011-11-17; 接受日期: 2011-12-19

Effect of urea on clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*

DAI Xi-Da^{1Δ} XIANG Si-Hai^{2Δ} ZHAO You-Bao²
GAO Qiang^{1*} YANG Ke-Qian^{2*}

- (1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, National Engineering Laboratory for Industry Enzyme, Tianjin 300457, China)
(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Objective] Clavulanic acid (CA) is a β -lactamase inhibitor produced by *Streptomyces clavuligerus*. Since urea is a byproduct of CA biosynthesis, we investigated the potential inhibitory effect of urea on CA biosynthesis. [Methods] We designed urea addition, ammonium addition, urease inactivation and pH gradient experiments to research effect of urea on CA production. [Results] Addition of urea inhibited CA production in the wild type, and the production was completely abolished when the concentration of urea reached 20 mmol/L. To prevent urea hydrolysis, the genes encoding urease were disrupted and the corresponding mutant was analyzed: which accumulated higher concentration of urea, reaching 10mmol/L, but this did not inhibit CA production. Therefore, urea itself was excluded as the factor inhibiting CA biosynthesis. So the inhibitory effect of urea on CA production in the wild type may be due to the elevated ammonium concentration or pH resulting from urea hydrolysis by urease. To test these possibilities, ammonium salt were added in the fermentation medium, which showed no inhibitory effect on CA production. Furthermore, the gradient experiment of pH confirmed that different pH had a large influence for CA production. [Conclusion] pH increase due to urea hydrolysis was identified as the real reason to inhibit CA production in the wild type strain. This study laid the foundation for further elucidation of the regulatory mechanisms controlling CA biosynthesis in *S. clavuligerus*.

Keywords: Clavulanic acid, Urea, Urease, *Streptomyces clavuligerus*

棒酸(Clavulanic acid, CA)是棒状链霉菌 *S. clavuligerus* 产生的次级代谢产物之一, 具有 β -内酰胺酶抑制活性, 临床上与阿莫西林等青霉素类药物配合使用, 广泛用于抵抗青霉素耐药菌^[1], 因此棒酸发酵生产具有重要的经济和社会价值。

铵盐是微生物发酵中常用的氮源之一, 但当铵盐作为速效氮源用于微生物抗生素发酵时, 抗生素产率往往较低^[2-3]。Valentine 等^[4]报道了当培养基中铵离子水平较低时有利于棒酸的合成,

浓度超过 50 mg/L 则抑制棒酸合成。另外 pH 对棒酸的合成也有显著影响。Lee 等^[5]研究不同初始 pH 条件下棒酸产量的变化, 发现 pH 为 7.0 时产量最高, 随着 pH 提高, 棒酸产量明显下降。

另外, 如图 1 所示, 棒酸生物合成途径中, PAH (Proclavaminic acid amidinohydrolase, EC 3.5.3.22)水解胍基前克拉维胺酸产生 1 分子脲^[1]。鉴于脲是棒酸合成的副产物, 本研究推测脲可能抑制棒酸的合成, 并首次研究和报道了脲对棒酸合成的影响及其可能的抑制机制。

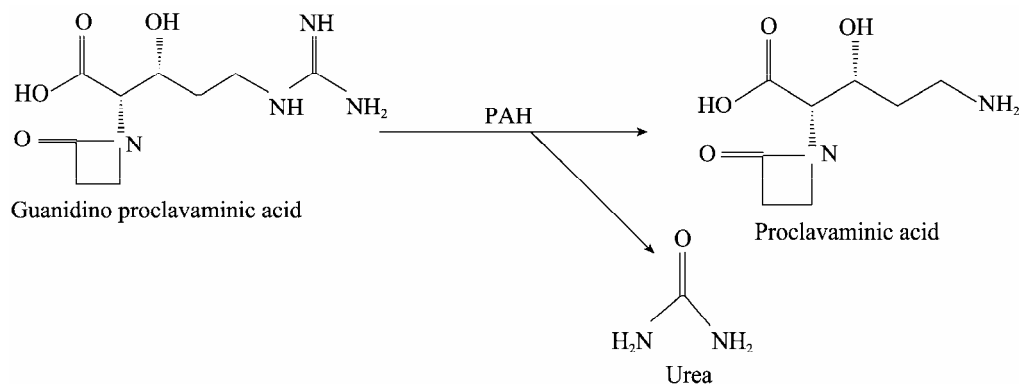


图1 PAH催化胍基前克拉维胺酸水解产生脲

Fig. 1 Production of urea in the catalytic reaction of Proclavaminic acid amidinohydrolase

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒: 野生型棒状链霉菌 *S. clavuligerus* NRRL3585 和大肠杆菌 ET12567/pUZ8002^[6] 本实验室保存。大肠杆菌 JM109 购自于 Invitrogen 公司。

pGHCN 为本实验常用的链霉菌基因敲除质粒, 含接合转移起始位点(*RK2 oriT*)、硫链丝菌素抗性基因(*tsr*)、卡那霉素抗性基因(*neo*)和氨苄青霉素抗性基因(*bla*)。

1.1.2 试剂: 所有化学试剂均购自于 Sigma 公司。DNA Marker 和各种酶均购于 TaKaRa 公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Biomed 公司。铵离子检测试剂 A 为苯酚(10 g/L)与亚硝基铁氰化钠(50 mg/L)的混合液, 避光保存; 试剂 B 为氢氧化钠(5 g/L)与次氯酸钠(8.4 mL/L)的混和液, 避光保存。

1.2 实验方法

1.2.1 棒酸发酵及检测: 采用 250 mL 的摇瓶发酵, 菌株接种于 YD 固体培养基^[7], 30 °C 培养 7 d 使其产生孢子, 刮下约 4 cm² 孢子接种于种子培养基(2% 豆粉, 1% 糊精, 1.5% 甘油, 0.6% KH₂PO₄, 0.8% MOPS, pH 7.2), 28 °C、250 r/min 培养 48 h, 再以 5% 接种量接种发酵培养基(成分与种子培养

基一致), 28 °C、250 r/min 培养 3 d。

(1) 脲添加实验: 野生菌株发酵 48 h 后, 分别补加终浓度为 5、10、20 mmol/L 的脲, 以不添加脲作为对照, 继续发酵 24 h, 检测棒酸产量^[7]、发酵液中铵离子浓度及 pH。

(2) 铵盐添加实验: 野生菌株发酵 48 h 后分别添加终浓度为 1、5、10 mmol/L 的硫酸铵, 以不添加硫酸铵为对照, 继续发酵 24 h, 检测棒酸产量及发酵液 pH。

(3) pH 梯度实验: 野生菌株发酵 48 h 后, 分别调节发酵液 pH 为 6.5、7.5、8.5, 继续培养 24 h, 检测棒酸产量。

1.2.2 铵离子含量检测: 采用苯酚-次氯酸法^[8]检测铵离子。向待测液中加入 5 mL 试剂 A 混匀, 再加入 5 mL 试剂 B 充分混匀。37 °C 水浴 15 min 后检测 OD₆₂₅。

1.2.3 脲酶活性分析及脲浓度检测: (1) 脲酶活性分析。将发酵液 4 °C、12 000×g 离心 10 min 收集菌体, 用 10 mmol/L MOPS 缓冲液(pH 7.0)清洗菌体 3 次。超声破碎后离心, 上清为粗酶液。取 1 mL 粗酶液加入 0.5 mL 5 mmol/L 脲, 另取 1 mL 粗酶液加入 0.5 mL MOPS 缓冲液用于检测本底铵离子含量^[8]。35 °C 反应 30 min, 分别检测 OD₆₂₅。用两者之差 ΔOD₆₂₅ 表示脲酶活性。

(2) 脲浓度检测。取 1 mL 发酵液上清添加 50 μ L 脲酶(32 mg/mL), 另取 1 mL 添加 50 μ L MOPS 用于检测本底铵离子含量, 35 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 分别检测 OD_{625} , 用两者差值 ΔOD_{625} 转换脲的含量。

1.2.4 PCR 引物设计: PCR 扩增引物序列见表 1, 设计 UF-S 和 UF-A 引物扩增 *ureF* 上游同源臂, 正向引物 UF-S 5'端加 *Nhe* I 酶识别位点(下划线), 反向引物 UF-A 5'端加 *Mfe* I 酶识别位点(下划线)。

设计 DA-S 和 DA-A 引物扩增 *ureA* 下游同源臂, 正向引物 DA-S 5'端加 *Sac* I 酶识别位点(下划线), 反向引物 DA-A 5'端加 *Spe* I 酶识别位点(下划线)。

设计 Amp-S/A 和 Uyz-S/A 两对引物验证脲酶突变株。引物 Amp-S 和 Amp-A 在 pGHCN 质粒的 *bla* 基因上设计, PCR 产物大小为 963 bp; 正向引物 Uyz-S 在 *ureA* 下游同源臂上设计, 反向引物 Uyz-A 在 *ureF* 上游同源臂上设计, 以野生型基因组为模板时, PCR 扩增产物大小为 3 699 bp。

表 1 实验中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequence 5'→3'	大小 Size (bp)
UF-S	AGGT <u>GCTAG</u> CCCCGGACTCGACGAGGATCAGAT	33
UF-A	ACGCAAT <u>TGGGCTTC</u> GCCCTACCGCTGGA	29
DA-S	TGCT <u>GAGCTC</u> ACGTTAGAGCGGGAGTTTTCCAC	34
DA-A	GCGT <u>ACTAGT</u> GCAGATCCACCACGGCGAGATA	32
Amp-S	GGAACCCCTATTTGTTTA	18
Amp-A	ACTGATTAAGCATTGGTAA	19
Uyz-S	GGGGCCGTTTCGGTCTCA	18
Uyz-A	TCGGACGAAGCCTCGGGTA	19

1.2.5 脲酶敲除质粒 pUFDA 的构建: 以棒状链霉菌野生菌基因组为模板, 以 UF-S 和 UF-A 为引物(表 1), PCR 扩增 *ureF* (SCLAV_0521)上游同源臂, 用 *Nhe* I 与 *Mfe* I 双酶切后电泳回收约 1.5 kb 目的片段, 再将其克隆至相同双酶切的 pGHCN 质粒上, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中构建重组质粒, 并提质粒测序鉴定, 得到重组质粒 pUF。

再以棒状链霉菌野生株基因组为模板, 以 DA-S 和 DA-A 为引物(表 1), PCR 扩增 *ureA* (SCLAV_0524)下游同源臂, 用 *Sac* I 和 *Spe* I 双酶切, 电泳回收约 1.5 kb 目的片段, 再将其克隆至同样双酶切的 pUF 质粒上, 转化至 *E. coli* JM109 感受态中构建重组质粒, 提质粒进行测序

鉴定, 获得重组质粒 pUFDA。

1.2.6 脲酶活性缺失株构建: 通过同源双交换的方式将 *neo* 基因替换脲酶 1 编码基因 *ureC-ureB-ureA* (SCLAV_0522 到 SCLAV_0524)及辅蛋白编码基因 *ureF* (SCLAV_0521), 以期完全阻断脲酶活性(图 2)。

将 pUFDA 质粒转化至 *E. coli* ET12567/pUZ8002 感受态细胞中^[9], 再与棒状链霉菌野生菌孢子接合转移^[6], 两者结合后涂布至 AS1 培养基(含 0.2%酵母提取物、0.02% L-丙氨酸、0.02% L-精氨酸、0.05% L-天冬酰胺、0.5%可溶性淀粉、0.25% NaCl、1% Na₂SO₄、0.2% MgCl₂·6H₂O、2% 琼脂粉, 灭菌后补加 10 mmol/L MgCl₂), 30 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后涂茶啉酮酸(12.5 mg/L)和硫链丝菌素

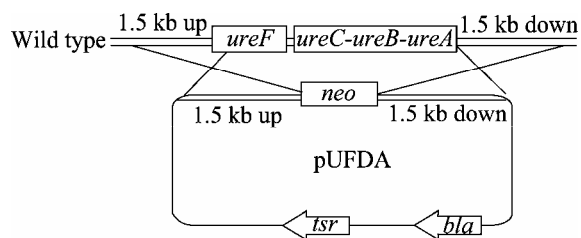


图 2 脲酶 1 编码基因 *ureCBA* 及 *ureF* 敲除示意图
Fig. 2 Disruption of *ureF* and *ureCBA* on *S. clavuligerus* chromosome

注: *neo*、*tsr* 及 *bla* 分别为卡那霉素抗性基因、硫链丝菌素抗性基因及氨苄青霉素抗性基因。

Note: *neo*: Kanamycin resistance gene; *tsr*: thiostrepton resistance gene; *bla*: Ampicillin resistance gene.

(Tsn, 25 mg/L)培养数天。挑选单克隆于含卡那霉素(Kana, 25 mg/L)的 YD 平板上传 3 代后, 在 YD 平板上对单克隆分别进行 Kana (25 mg/L)和 Tsn (25 mg/L)抗性检测, 挑选 Kana^RTsn^S突变株。并对 Kana^RTsn^S突变株提基因组^[6], 以突变株基因组为模板, 采用 Amp-S/A 及 Uyz-S/A 两对引物(表 1)对突变株进行 PCR 验证。

2 结果

2.1 脲添加对野生菌株 *S. clavuligerus* NRRL 3585 合成棒酸的影响

以不添加脲作为对照, 野生菌株发酵液添加不同浓度脲对棒酸产量、铵离子浓度及 pH 影响如图 3 所示。结果表明: 随着脲浓度的增加, 棒酸产量逐渐减少, 当脲浓度达到 20 mmol/L 时, 几乎不产棒酸, 生物量检测发现脲添加几乎不影响生物量(数据未显示)。同时, 发酵液最终 pH 随脲浓度增加而增大, 当脲浓度达到 20 mmol/L 时, pH 达 8.5 左右, 比不添加脲的 pH 高约 0.7。铵离子含量也随脲浓度增加而增大, 最高铵离子含量比不添加脲时提高近 3.5 倍。因此脲添加导致棒酸产量降低也可能是铵离子浓度升高, 或者脲被脲酶水解后 pH 增大所致。为此我们进行了进一步分析。

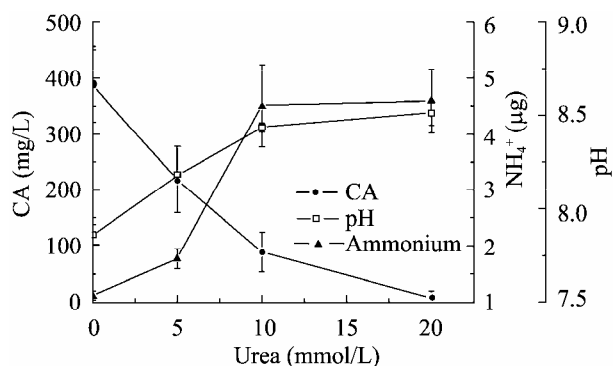


图 3 脲添加对野生菌株棒酸产量、发酵液中铵离子浓度及 pH 的影响

Fig. 3 Ammonium concentration, pH changes and clavulanic acid production in the culture of wild type with different urea concentration

2.2 棒状链霉菌脲酶敲除株的构建及发酵液检测

2.2.1 脲酶敲除株 *S. clavuligerus*/ Δ *ureFCBA* 的构建: 首先我们通过阻断脲酶活性, 避免脲转化成铵离子及引起 pH 的变化, 从而积累脲的方式考察脲是否直接抑制棒酸合成。

脲酶基因敲除实验中得到 4 株 Tsn^SKana^R突变株, 以突变株基因组为模板, 用 Amp-S/A、Uyz-S/A 两对引物(表 1)分别对突变株进行 PCR 验证。

Amp-S 和 Amp-A 引物扩增结果见图 4A, 对照质粒 pGHCN 出现 963 bp 条带, 而 1-4 号突变株无条带, 说明突变株中无 *bla* 基因, 质粒丢失。引物 Uyz-S 和 Uyz-A 验证时, 以野生型基因组为模板扩增片段大小为 3 699 bp, 如果 *neo* 成功替换目标基因, 则以突变株基因组为模板扩增片段大小为 1.5 kb。结果如图 4B 所示, 野生型与 1-4 号突变株条带大小均与预期结果一致, 表明目的脲酶相关基因被有效敲除。获得的突变株命名为 *S. clavuligerus*/ Δ *ureFCBA*。

2.2.2 脲酶敲除株 *S. clavuligerus*/ Δ *ureFCBA* 脲酶活性与棒酸产量检测: 发酵脲酶敲除株和野生菌, 72 h 取样检测发酵液脲酶活性及棒酸产量。

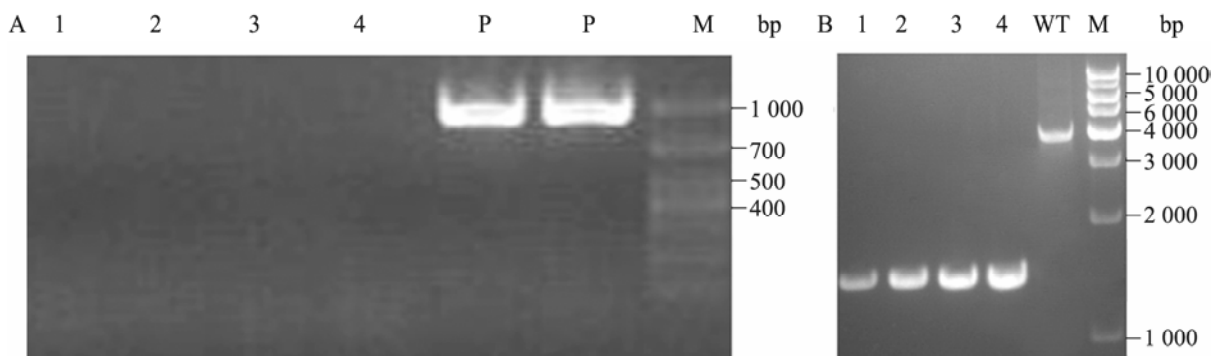


图 4 PCR 验证脲酶敲除株

Fig. 4 Confirmation of *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA mutants by PCR

注: A: 引物 Amp-S/A PCR 产物; B: 引物 Uyz-S/A PCR 产物; 1-4: 1-4 号突变株; WT: 野生型; P: pGHCN 质粒。

Note: A: PCR products with Amp-S/A; B: PCR products with Uyz-S/A; 1-4: Mutants; WT: Wild type; M: Marker.

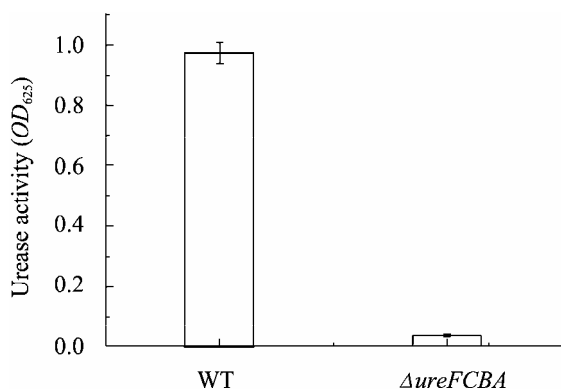


图 5 脲酶敲除株发酵液脲酶活性检测

Fig. 5 Activities of urease in the culture of *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA mutant

注: WT: 野生菌; Δ ureFCBA: *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA.

Note: WT: Wild type; Δ ureFCBA: *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA.

脲酶活性检测结果如图 5 所示。结果表明: 与野生型粗酶液不同, 脲酶敲除株粗酶液无法将脲转变成铵离子, 说明敲除株的脲酶活性被完全阻断。

发酵液棒酸产量检测结果如图 6A 所示, 脲酶敲除株与野生菌棒酸产量没有显著影响。两者发酵液 pH 也没有显著差异(数据未显示), 但发酵液中脲积累量显著差异, 野生菌基本没有积累脲, 而脲酶敲除株积累脲浓度达到 10 mmol/L (图 6B)。如此高的脲浓度并没有导致棒酸产量降低, 说明脲本身并不直接影响棒酸合成。

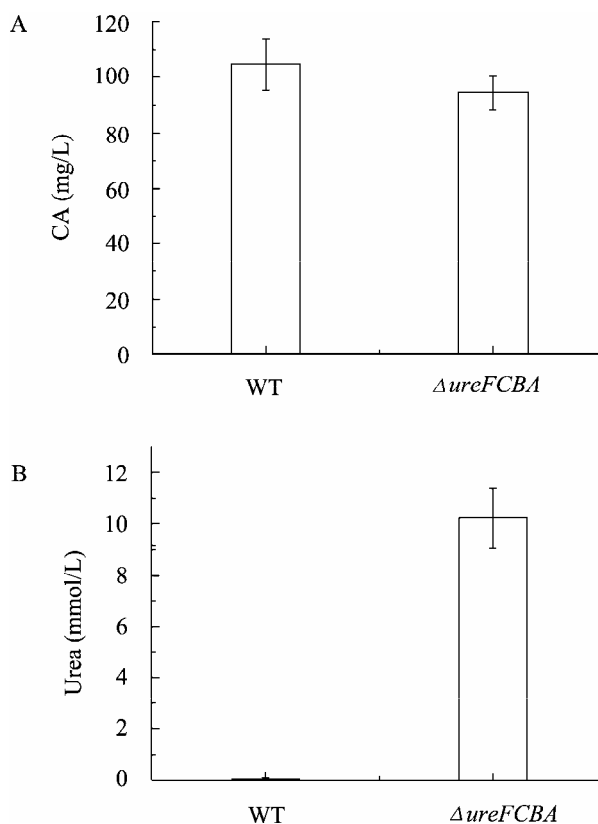


图 6 脲酶敲除株发酵液中棒酸产量及脲浓度检测
Fig. 6 Detection of clavulanic acid production and urea concentration in the culture broth of *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA

注: WT: 野生菌; Δ ureFCBA: *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA.

Note: WT: Wild type; Δ ureFCBA: *S. clavuligerus*/ Δ ureFCBA.

2.3 铵盐添加对棒酸产量影响

以上实验说明, 脲并不直接影响棒酸合成, 野生菌中添加脲导致棒酸产量降低, 是通过脲酶水解产生铵离子或脲水解后导致 pH 升高所致。

因此, 我们考察了发酵液中铵离子含量对棒酸产量的影响。以不添加硫酸铵为对照, 野生株发酵液中添加不同浓度硫酸铵对棒酸产量影响结果如图 7 所示。1–10 mmol/L 硫酸铵(与 1–10 mmol/L 脲等当量)对棒酸产量不但没有抑制作用, 反而略有促进。另外, 硫酸铵添加对 72 h 后的发酵液 pH 值无显著影响(数据未显示)。

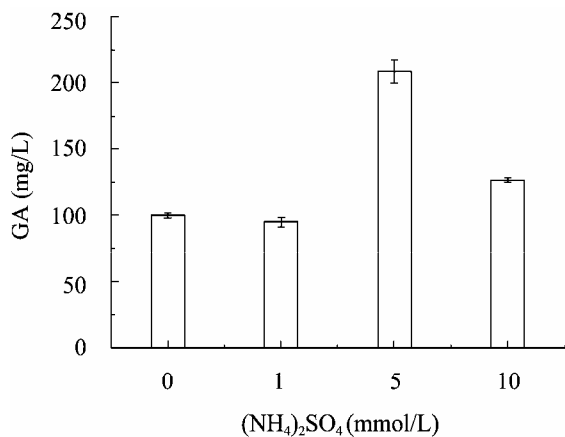


图 7 不同浓度硫酸铵对棒酸产量的影响
Fig. 7 Effect of different concentration of ammonium sulfate on the production of clavulanic acid

2.4 pH 对棒酸产量影响

以上实验证实脲、铵自身并不抑制棒酸的合成。为了证实脲添加抑制棒酸合成是脲添加导致 pH 变化所致, 考察了野生菌株发酵培养 48 h, 分别调节发酵液 pH 至 6.5、7.5、8.5, 继续培养 24 h 取样检测棒酸产量变化。结果如图 8 所示, 表明: 棒酸合成对 pH 相当敏感, pH 为 7.5 时棒酸产量最高, pH 增大为 8.5 或降低为 6.5 时均抑制棒酸的合成, 证实了 pH 为影响棒酸合成的重要因素。因此, pH 增大是脲添加导致野生型棒酸产量降低的真正原因。

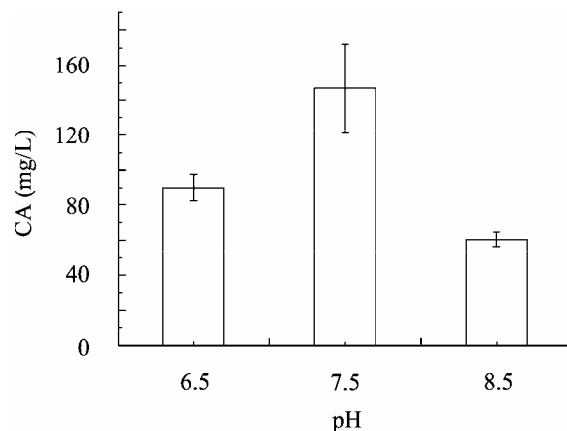


图 8 不同 pH 对野生菌株棒酸产量影响
Fig. 8 Clavulanic acid production in the culture of wild type with different pH

3 讨论

氮源经常阻遏抗生素生物合成相关的酶, 从而影响抗生素合成^[10]。棒酸合成过程中, PAH 催化中间体胍基前克拉维胺酸水解形成前克拉维胺酸和副产物脲^[1], 我们因此推测脲可能反馈抑制棒酸的合成。脲添加实验也初步说明添加 5–20 mmol/L 脲明显抑制甚至彻底阻断野生菌合成棒酸。但在脲酶作用下, 脲添加同时伴随铵离子浓度升高及 pH 增高(图 3), 因此不能确定脲自身为影响棒酸合成的真正因素。脲添加导致棒酸产量下降可能有 3 个因素: (1) 脲自身直接抑制棒酸的合成; (2) 脲水解成铵离子, 高浓度的铵离子抑制棒酸的合成; (3) 脲被脲酶水解导致发酵液 pH 升高, 间接抑制棒酸的合成。

本研究首先通过阻断脲酶活性, 使脲在无法转化成铵离子, 也无法影响发酵液 pH 但脲积累的条件下, 探究脲自身对棒酸产量的影响。结果显示脲酶缺失株发酵液中高浓度脲积累并没有导致棒酸产量下降, 说明脲自身不能直接抑制棒酸的合成。通过进一步排除铵离子的影响以及 pH 梯度实验证实 pH 对棒酸产量的影响。我们最终确定, 脲是通过脲酶水解导致 pH 升高, 最终抑

制了棒酸合成。前人已经报道^[5], 棒酸发酵中初始 pH 高于 7.0 时对棒酸产量有明显的抑制, pH 与产量呈明显的负相关。

发酵液 pH 影响棒酸产量的具体机制一直是人们研究的焦点之一, 其中一个确切的机制是 high pH 直接促进棒酸降解。发酵液中的棒酸极不稳定^[1], Haginaka 等^[11]研究不同 pH 对棒酸稳定性影响, 发现棒酸在 pH 为 6.2–7.0 的范围内最稳定, 在碱性条件下, 降解加速^[12]。本研究中脲添加导致 pH 最高达 8.5 左右, 此时棒酸被急剧降解, 导致产量下降。本研究从脲及脲酶敲除的角度证实了相关研究结果, 为进一步阐明 pH 影响棒酸合成的机制奠定了基础。

研究显示^[13], 一般脲酶的最适 pH 为 5.0 左右, pH 为 7.0 以上的碱性环境使脲酶活性显著降低, 因此 pH 影响棒酸产量的另一途径可能是通过抑制脲酶活性积累脲, 从而抑制棒酸合成。然而本研究结果排除了这种可能性, 进一步明确了 pH 影响棒酸产量的机制。脲酶在棒状链霉菌中存在两个拷贝, 第一个拷贝从 SCLAV_0522 到 SCLAV_0534; 第二个拷贝从 SCLAV_4473 到 SCLAV_4474, 分别称为脲酶 1 和脲酶 2。脲酶 1 由完整的 α 、 β 、 λ 3 个亚基组成, 分别由 *ureC*、*ureB*、*ureA* 编码, 其上游存在脲酶活性必需的辅蛋白编码基因 *ureD*、*ureG*、*ureF*。脲酶 2 由双功能的 β/λ 亚基和 α 亚基组成, 其附近没有辅蛋白编码基因。Lee 等^[14]敲除 *Klebsiella aerogenes* 的 *ureD*、*ureF* 或 *ureG* 导致脲酶活性完全缺失, 说明 *ureD*、*ureF* 与 *urgG* 基因为脲酶活性关键基因。本研究中, 脲酶活性阻断时为避免脲酶 2 互补脲酶 1 的功能, 采取了将脲酶 1 的 *ureCBA* 核心基因连同必需辅蛋白编码基因 *ureF* 一起敲除, 结果成功阻断脲酶活性, 也初步证实了在棒状链霉菌中, *ureF* 编码的蛋白是脲酶活性必需的辅蛋白。

Valentine 等^[4]报道了当培养基中脲和铵离子

水平较低时有利于棒酸的合成, 高浓度铵离子抑制棒酸合成, 这与本研究结果并不完全相符。本研究添加不同浓度硫酸铵对棒酸合成没有抑制作用。这可能跟两者采用的培养基氮源组分的差异有关: 前者为大豆蛋白质, 本研究为豆粉。

参 考 文 献

- [1] Saudagar PS, Survase SA, Singhal RS. Clavulanic acid: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(4): 335–351.
- [2] Braña AF, Wolfe S, Demain AL. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1985, 31(8): 736–743.
- [3] Romero J, Liras P, Martin JF. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, 20(5): 318–325.
- [4] Valentine BP, Jeffkins PA, Holms WH, et al. Process for the fermentative preparation of clavam derivatives whereby the levels of ammonia and urea in the fermentation medium are kept low[P]: US, 5985624. Aug 26, 1997.
- [5] Lee SD, Park SW, Oh KK, et al. Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34(5): 370–375.
- [6] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. *Practical Streptomyces Genetics*[M]. England: Crowes Norwich, 2000: 249–250.
- [7] Xiang SH, Li J, Yin H, et al. Application of a double-reporter-guided mutant selection method to improve clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4/5): 310–318.
- [8] Weatherb MW. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia[J]. *Analytical Chemistry*, 1967, 39(8): 971–973.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *分子克隆实验指南*[M]. 黄培堂, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 54.
- [10] Aharonowitz Y. Nitrogen metabolite regulation of

- antibiotic biosynthesis[J]. Annual Review of Microbiology, 1980, 34(1): 209-233.
- [11] Haginaka J, Nakagawa T, Uno T. Stability of clavulanic acid in aqueous solutions[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1981, 29(11): 3334-3341.
- [12] Bersanettia PA, Almeida RMRG, Barbozac M, et al. Kinetic studies on clavulanic acid degradation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 23(1): 31-36.
- [13] Sissons CH, Perinpanayagam HER, Hancock EM, et al. pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*[J]. Journal of Dental Research, 1990, 69(5): 1131-1137.
- [14] Lee MH, Mulrooney SB, Renner MJ, et al. *Klebsiella aerogenes* urease gene cluster: sequence of ureD and demonstration that four accessory genes (*ureD*, *ureE*, *ureF*, and *ureG*) are involved in nickel metallocenter biosynthesis[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(13): 4324-4330.

2012 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表 (2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	生物发酵床养殖技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	3月	80	广东深圳	刘雪 蓝江林 059187308117
2	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专委会委员会议暨学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	4月 20-22日	150	重庆	饶贤才 023-68752240
3	第12届中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	5月 28-31日	200	日本	金城 010-64807425
4	第三届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	5月底6月初	150	安徽黄山	吕相征 lvxz@cnis.gov.cn
5	中日国际病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	6月 11-12日	100	日本札幌	梁华 010-58900644
6	微生物生物安全专业委员会成立大会暨学术讨论会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	6月	60	北京	谢清 010-64806013
7	第九届全国微生物学青年学者学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7月	180	湖北武汉	何正国 hezhen-guo@mail.hzau.edu.cn
8	第四届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十三届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7月	300	贵州贵阳	刘作易 liuzuoyi@yahoo.com.cn
9	EV71等新疫苗质量研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	7月	200	待定	徐苗 李冠民 01067095438
10	第三届全国农业生物资源与环境调控学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7-8月	120	内蒙古呼伦贝尔盟	张国良 付卫东 01082109570
11	第四届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	8月	200	山东济南	李越中 lilab@sdu.edu.cn
12	病原微生物功能基因组及其致病机制	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8月	200	福建福州	汪世华 0591-87984471