

抗药性突变肌苷高产菌的选育

徐建林

(江苏省微生物研究所,无锡 214063)

陈彦长

(中国进出口商检技术研究所,北京 100025)

冯培忠

(卫生部药品生物制品检定所,北京 100050)

石四游

(苏州味精总厂研究所,苏州 215004)

摘要 以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 22 为出发菌株,经紫外线诱变,分别获得对链霉素 (Sm)、盐酸羟胺 (Hc)、叠氮化钠 (Sa) 有抗性的突变株,产肌苷均明显高于出发株。其中链霉素抗性突变株 Sm-37-18 产肌苷最高,在最佳发酵条件下,产肌苷达 19.49g/L,较出发株提高 38.4%,发酵周期由 60 小时缩短至 48 小时。

关键词 肌苷;枯草芽孢杆菌;诱变

枯草芽孢杆菌经诱变获得腺嘌呤等缺陷型及 8-氮杂鸟嘌呤等抗性菌株能提高肌苷产量^[1,2],但经诱变获得对抗生素或呼吸抑制剂有抗性的枯草芽孢杆菌能积累更多肌苷,国内外未见报道。我们在这方面进行了尝试性研究,获得了较满意的结果,现报道如下。

材料与方 法

(一) 出发菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 22 系

本文承邓崇亮、曹本昌两副研究员审阅;参加工作的还有盛鸣妹、何惠英两同志,特此致谢。

肌苷产生菌,其遗传标记为腺嘌呤、维生素 B₁ 双重缺陷型,黄嘌呤回复突变,8-氮杂鸟嘌呤、磺胺胍双重抗性 (Ade⁻ VB₁⁻, Xan⁺, 8-AG^r, SG^r), 其摇瓶产肌苷 14.08g/L。

(二) 培养基

基本培养基、完全培养基、斜面培养基所用试剂为常用生化试剂。种子培养基、发酵培养基所用原料为肌苷工业生产原料。

基本培养基(%): 葡萄糖 2, NH₄Cl 0.4, MgSO₄·7H₂O 0.02, KH₂PO₄ 0.4, FeSO₄ 0.001, MnSO₄ 0.0008, 柠檬酸钠 0.05, 谷氨酸 0.1, 腺嘌呤 150mg/L, 维生素 B₁ 3mg/L, 组氨酸 10mg/L, 琼脂 1.8, pH7.0。

完全培养基(%): 葡萄糖 2, 蛋白胨 0.7, 酵母膏 0.4, 牛肉膏 1.4, NaCl 0.25, 琼脂 2, pH 7.0。

斜面培养基(%): 葡萄糖 2, 酵母膏 2, 尿素 0.2, 蛋白胨 1, 玉米浆 0.5, NaCl 0.25, pH 7.0。

发酵培养基(%): 大米水解糖 11, 药用酵母 0.5, 纸浆酵母 0.8, KCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.1, 玉米浆 0.5, Na₂HPO₄ 0.5, 尿素 0.4, (NH₄)₂SO₄ 1.0, pH7.2。

种子培养基装液量为: 50ml/500ml 三角瓶, 发酵培养基装液量为: 20ml/500ml 三角瓶, 均为 120℃ 灭菌 15 分钟。

(三) 诱变方法

常规紫外线诱变。

(四) 培养方法

获得的各种突变株在斜面上活化 24 小时, 接一环于种子培养基中摇瓶培养 16 小时作为种子, 以 10% 接入发酵培养基中摇瓶培养 60 小时, 种子和发酵条件: 冲程为 7.6cm, 转速为 96r/min 的往复式摇床上 34℃ 培养。

(五) 测定方法

1. 菌体生长: 摇瓶种子稀释 10 倍, 用 581 型光电比色计, 在 650nm 波长处测定。

2. 还原糖: 磷钼酸显色法^[3]。

3. 肌苷: 纸层析法^[4]。

结果与讨论

(一) 出发株 22 的抗性预备实验

在基本培养基平皿中添加不同量的药物对出发株 22 做耐药实验, 结果如表 1 所示。为了比较不同药物抗性突变株和同一药物不同浓度抗性突变株的产肌苷能力, 选定抗性浓度分别为: 链霉素 500、1000r/ml, 盐酸羟胺 0.5mg/ml, 叠氮化钠 0.05mg/ml。

(二) 各种抗药性突变株之间的比较

枯草芽孢杆菌 22 经紫外线诱变, 并配合使用链霉素、盐酸羟胺、叠氮化钠等药剂反复处理, 经初筛、复筛和分离纯化后, 分别获得对链

表 1 出发株在含不同药物培养基中的生长情况

链霉素 (r/ml)	10	100	500	1000	1500
生长	+++	++	-	-	-
盐酸羟胺 (mg/ml)	0.01	0.1	0.5	1	5
生长	++	+	-	-	-
叠氮化钠 (mg/ml)	0.005	0.01	0.05	0.1	1
生长	+	+	-	-	-

霉素 500、1000r/ml, 盐酸羟胺 0.5mg/ml, 叠氮化钠 0.05mg/ml 有抗性的突变株 Sm23-5、Sm37-18、Hc56-13 和 Sa31-2。变异菌株的肌苷产量见表 2, 各种抗性突变株的初筛结果归纳为图 1。

表 2 出发株 22 和各种抗性突变株的肌苷产量

菌株	22	Sm23-5	Sm37-18	Hc56-13	Sa31-2
平均产肌苷 (g/L)	14.08	15.6	17.0	15.4	15.1

由图 1 和表 2 结果可知, Sm1000^r 突变株中, 负突变至不产肌苷的有 37 株, 占该类突变株总数的 19.68%, 正突变株产肌苷达 15.5g/L 以上的 1 株, 经分离纯化后, 产肌苷达 17.0g/L, 高于出发株 20.7%, 因此 Sm1000^r 突变株变异幅度最大。其余依次为 Sm500^r、Hc^r、Sa^r 突变株。然而, 正突变率最大的为 Sm500^r 突变株, 其产肌苷大于 14.5g/L 的有 10 株, 占该类突变株总数的 9.71%。其余依次为 Sa^r 突变

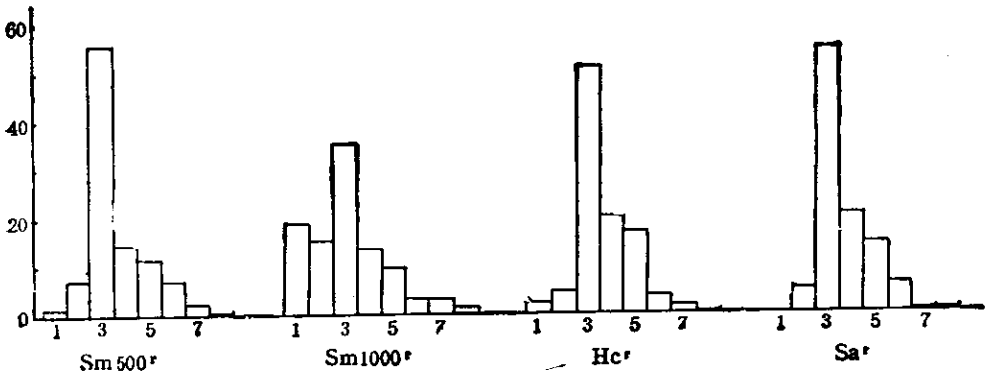


图 1 各种抗性突变株的产肌苷分布图

注：纵坐标表示占同类突变株的百分数，横坐标为产肌苷值 (g/L)，1.不产肌苷，2.8 以下，3.8—13.5，4.13.5—14.0，5.14.0—14.5，6.14.5—15.0，7.15.0—15.5，8.15.5 以上。

株，占总数的 6.25%。Sm1000⁺ 突变株，占总数的 5.51%。Hc⁺ 突变株，占总数的 3.75%。

就链霉素抗性突变株而言，抗性浓度由 500 r/ml 提高至 1000r/ml，产肌苷明显提高。提高盐酸羟胺和叠氮化钠的抗性浓度，是否能获得更高产肌苷的抗性突变株，有待于进一步实验。

(三) 抗性突变株的菌落形态与高产菌株选育的关系

据报道，产肌苷菌经自然分离，在平皿上出现大小两种菌落，极少为小菌落^[4]。枯草芽孢杆菌 22 经 UV 诱变后的菌悬液涂布在含药物的基本培养基平皿上所长出来的菌落亦有两种形态。一种菌落大，边缘为齿轮状，周围薄，中间突起，粗糙，简称为 B 型；另一种菌落小，边缘圆形，简称为 L 型。但长出来的小菌落较多。为此我们对 L 型和 B 型突变株的产肌苷进行了

表 3 不同菌落形态与肌苷积累的关系

菌落形态	菌株总数 (株)	不产肌苷的数目 (株)	产苷 >14.08g/L 的数目 (株)	最大产苷值 (g/L)
L 型	30	7	2	14.6
B 型	30	4	13	15.9

比较，结果如表 3 所示，B 型突变株不产肌苷的少，产肌苷高的多，正突变幅度大，因此挑选 B 型突变株进行筛选更易获得肌苷高产菌。

(四) Sm37-18 的某些特性

1. 突变株 Sm37-18 的产苷稳定性实验：把

Sm37-18 菌株 4℃ 保藏和斜面连续传代，测定其产苷值，结果表明，该菌经 4℃ 保藏 10 周或斜面连续传代 10 次，肌苷产量基本稳定 (表 4、5)。

表 4 冰箱保藏时间对突变株 Sm37-18 肌苷产量的影响

保藏时间(周)	1	4	7	10
平均产肌苷 (g/L)	17.02	16.80	17.28	16.61

表 5 斜面连续性传代对突变株 Sm37-18 肌苷产量的影响

传代次数	1	4	7	10
平均产肌苷 (g/L)	17.31	16.49	17.50	17.08

2. 发酵周期实验：在发酵后期不同时间，测定菌株 22 和 Sm37-18 的肌苷值和 pH，结果如表 6 所示。Sm37-18 发酵 48 小时，产肌苷达最高值。而 22 菌株发酵培养 60 小时，产肌苷才达最高值。Sm37-18 发酵周期短，可降低能耗，减少污染机会，有利于工业化生产。

3. 摇瓶发酵条件对 Sm37-18 产肌苷的影响：实验表明，各种表面活性剂 (如十二烷基硫酸钠，十二烷基苯磺酸钠，新洁尔灭和各种有机溶剂如丙酮、乙醇等) 对 Sm37-18 肌苷积累略有降低，无机氮、纸浆酵母、药用酵母用量与亲株相同。但提高玉米浆用量，起始 pH 及中间流加氢氧化钠调节 pH 对 Sm37-18 产肌苷有明显提高。

由表 7 结果可知，当玉米浆浓度由 1.0%

表6 出发株 22 和突变株 Sm37-18 发酵周期比较

批次	菌株	40h		48h		60h	
		产肌苷(g/L)	pH	产肌苷(g/L)	pH	产肌苷(g/L)	pH
1	22	10.3	6.2	12.5	6.2	14.08	5.4
	Sm37-18	15.2	6.0	17.0	5.4	17.1	5.4
2	22	10.6	6.2	13.1	6.0	14.2	5.4
	Sm37-18	15.4	6.0	16.8	5.4	16.6	5.4

表7 玉米浆浓度对突变株 Sm37-18 积累肌苷的影响

玉米浆(%)	0	0.8	1.0	1.2	1.4
产肌苷(g/L)	6.36	15.39	17.02	18.04	16.5

提高至 1.2% 时,产肌苷提高至 18.04g/L。

提高起始 pH 有利于肌苷积累。当起始 pH 7.2、发酵 24 小时后流加 0.2ml 2mol/L NaOH 溶液调节 pH, 产肌苷达 19.48g/L, 较出发株 22 提高 38.4%。

参 考 文 献

1. 邓崇亮等: 微生物学通报, 15(3): 98—100, 1988。
2. Kenji Ishii et al: *Agr. Biol. chem.*, 36(9): 1511—1522, 1972。
3. 中国科学院微生物研究所: 核苷酸类物质的生产和应用, 第 129 页, 科学出版社, 北京, 1971 年。
4. 中国科学院生物化学研究所等: 微生物学报, 13(2): 136—141, 1973。