

鸟苷发酵的优化研究*

陈双喜¹ 蔡显鹏¹ 王仲石² 储 炬^{1**} 庄英萍¹ 张嗣良¹

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)¹

(广东肇庆星湖生物科技股份有限公司 肇庆 526060)²

摘要:以鸟苷产生菌 *Bacillus subtilis* AJ2066 为生产菌株,采用 50L 自控发酵罐与摇瓶培养相结合的联动优化方法对鸟苷发酵进行了研究。谷氨酸钠对鸟苷发酵比较重要,培养基中加入 1% 的谷氨酸钠可使 50L 罐最终产苷达 31.49g/L。次黄嘌呤(Hx)作为前体可以直接用于鸟苷合成,发酵后期加入 0.2% 的 Hx,可使 50L 罐最终产苷达 33.24g/L。

关键词: 鸟苷, 发酵, 联动优化

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0065-05

STUDY ON OPTIMIZATION OF GUANOSINE FERMENTATION*

CHEN Shuang-Xi¹ CAI Xian-Peng¹ WANG Zhong-Shi² CHU Ju¹ ZHUANG Ying-Ping¹ ZHANG Si-Liang¹

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237)¹

(Star Lake Bioscience Co, Inc, Zhaoqing, Guangdong province 526060)²

Abstract: *Bacillus subtilis* AJ2066 was used to yield guanosine. The optimization of guanosine fermentation was studied by means of flask coupled with 50L auto-controlled fermentor. Monosodium glutamate is important to guanosine fermentation. The yield reached 31.49g/L in 50L fermentor with the medium supplemented with 1% monosodium glutamate. Hypoxanthine (Hx) can be used to synthesize guanosine directly as precursor. The yield reached 33.24g/L in 50L fermentor by supplementing 0.2% hypoxanthine during final stage of fermentation.

Key words: Guanosine, Fermentation, Coupled-optimization

鸟苷即鸟嘌呤核苷,可作为抗病毒的药物三氮唑核苷、无环鸟苷、鸟三磷(GTP)和食品增鲜剂 5'-鸟苷酸的合成原料,是一种具有重要价值的核苷,其应用前景十分广阔。随着越来越多的企业进入生产三氮唑核苷、无环鸟苷和 5'-鸟苷酸的行列,国内鸟

* 上海市曙光计划资助项目 (No.01SG28)

** 联系人 E-mail: jachu@oulcne.sh.cn

收稿日期: 2001-07-19, 修回日期: 2001-11-10

苷的市场需求将激增。因而鸟苷生产的优化研究具有重要的意义^[1-2]。

传统的发酵过程研究由于摇瓶与发酵罐上培养基的不同及两者在传质、供氧、控制条件上的巨大差异直接导致了摇瓶结果在发酵罐上的难以再现,这也成为限制发酵过程优化与放大的瓶颈问题。本文利用由国家生化工程技术研究中心(上海)开发研制的国内最先进的50L自动控制发酵罐,通过发酵罐与摇瓶培养联动优化的方法,对鸟苷发酵过程进行了动态优化研究,在50L罐上产率达到国内最高水平。

1 材料与方法

1.1 菌种

由广东肇庆星湖生物科技股份有限公司提供的 *Bacillus subtilis* AJ2066。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基:参见文献[1]。

1.2.2 发酵培养基:参见文献[2]。

1.3 分析方法

1.3.1 OD测定:样品稀释20倍,于581型分光光度计测定波长650nm。

1.3.2 葡萄糖测定:葡萄糖分析仪SBA-40B型(山东省科学院生物研究所)。

1.3.3 鸟苷测定:纸层析法^[1]。

1.3.4 排气O₂浓度测定:CY-101磁压力氧气体分析仪器。

1.3.5 排气CO₂浓度测定:GXH-101红外线气体分析仪器。

1.3.6 FUS-50L自动控制发酵罐除了常规温度、搅拌转速、消泡、pH、溶解氧浓度等测量外,还配备了发酵液体积、高精度补料量测量与控制,高精度空气流量与罐压电信号测量与控制,并与尾气CO₂和O₂分析仪连接,能够对14个以上在线参数进行检测或控制。此外,通过BIORADAR软件,可以将离线参数输入计算机进行数据处理,由此可进一步得到发酵过程优化与放大所必需的各种代谢流特征或工程特征的间接参数,如摄氧率(OUR)、CO₂释放率(CER)、呼吸熵(RQ)、体积氧传递系数(K_{la})等。

1.4 种子培养和发酵方法

1.4.1 摇瓶种子培养:250mL锥形瓶中培养基装量20mL,37℃,100r/min,培养6h。

1.4.2 摇瓶发酵培养:500mL锥形瓶中培养基装量20mL,接种量2mL,培养60h,37℃,100r/min。从50L罐上无菌取样,每个500mL锥形瓶中装20mL发酵液,37℃,100r/min,培养至60h。放瓶时恢复原体积测定鸟苷。

1.4.3 50L自控罐发酵培养:发酵液装量30L,接种量8%,37℃,通气搅拌培养。定时取样测定残余葡萄糖含量,鸟苷含量等参数。

2 结果与讨论

采用FUS-50L型自控发酵罐与摇瓶联动优化的方法,研究了谷氨酸钠、次黄嘌呤对于鸟苷合成的影响。

2.1 谷氨酸钠的作用

谷氨酸对于菌体生长和鸟苷合成均有重要作用。一方面,用于构建菌体自身的组成部分,如细胞壁等成分^[5],参与菌体的生理代谢活动;另一方面,是合成鸟苷的前

体之一，用于构建嘌呤环上第3、9的N^[3]。

2.1.1 罐上无菌取样进行摇瓶培养：50L罐发酵过程中不同时间无菌取样，加入不同浓度谷氨酸钠进行摇瓶培养，以考察其对鸟苷合成的影响，结果见表1。

从结果可以看出，发酵过程中前期加入谷氨酸钠有利于促进鸟苷生成，但加量大小对产苷的影响不大。同时可以看出加入谷氨酸钠的时间越早，对于产苷增加的程度越大。鸟苷的合成属于

表1 不同时间补加不同浓度谷氨酸钠对鸟苷产量的影响

	10h	20h	30h	40h	50h
0	7.21	11.33	13.52	17.47	16.8
1%	9.93	13.88	13.78	16.26	16.43
2%	9.87	12.82	14.85	15.56	15.87
3%	9.84	12.18	14.20	15.12	16.30
产苷平均增幅	37%	14%	6%	-10%	-4%

初级代谢，和菌体的生长相关联，谷氨酸有利于菌体的合成，因而对产苷有促进作用。发酵后期，菌体能够通过自身的代谢合成谷氨酸用于构建鸟苷，而不需外源的谷氨酸；如果后期加入外源谷氨酸，还可能会形成某种反馈抑制的因素，从而抑制产苷。

由此可见，谷氨酸钠主要用于前期构建菌体，促进菌体生长，进而促进鸟苷的合成。据此，我们考虑在原培养基配比中加入一定量的谷氨酸钠进行实验。

2.1.2 罐上培养：原培养基中不含有谷氨酸钠，其发酵过程曲线如图1所示，后期菌体的呼吸情况往往会发生变化：OUR、CER逐渐下降，RQ逐渐上升，表明菌体的代谢途径发生了变化。与之相应，鸟苷的合成速率开始降低，呈弯曲状的菌体也逐渐增多。因而，菌体的呼吸情况与产苷的速率、菌体形态等是密切相关的。

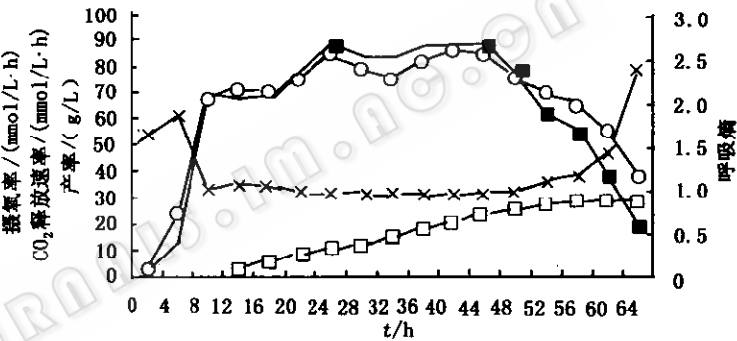


图1 对照培养基鸟苷发酵过程的产苷和呼吸曲线
—□—产率，—■—摄氧率，
—○—CO₂释放率，×—呼吸商

根据上述的结果，我们在原培养基中加入1%谷氨酸钠于50L罐上进行发酵培养，观察过程的变化，以考察谷氨酸钠对菌体代谢的影响，结果见图2。

从图2可以看出，培养基中加入谷氨酸钠后使得菌体的过程呼吸曲线发生变化：OUR、CER下降以及RQ上升的时间由44h推迟到了60h。与之相应，原来后期鸟苷合成速率下降的情况得到了较大的改观（见图3），镜检看到变形菌体的比例也大大减小。同时，发酵培养过程中的糖耗和氨耗也表现出了不同的情况，使用原培养基的发酵过程中表现出糖耗较快，消耗氨水较多的现象；而且培养过程起泡时间相对较早且泡沫较多，过程中需流加泡敌消除泡沫。

谷氨酸钠能够促进前期菌体的生长，从而使得整个过程菌体浓度（OD）较高（图3）。鸟苷是初级代谢产物，较高的菌体浓度对产苷是有利的。谷氨酸是用于构建菌体的物质之一，没有谷氨酸的培养基在发酵前期必须从葡萄糖分解开始从头合成谷氨酸以用于菌体生长，因而表现出耗糖较快；同时，在从葡萄糖分解合成菌体成分的过程

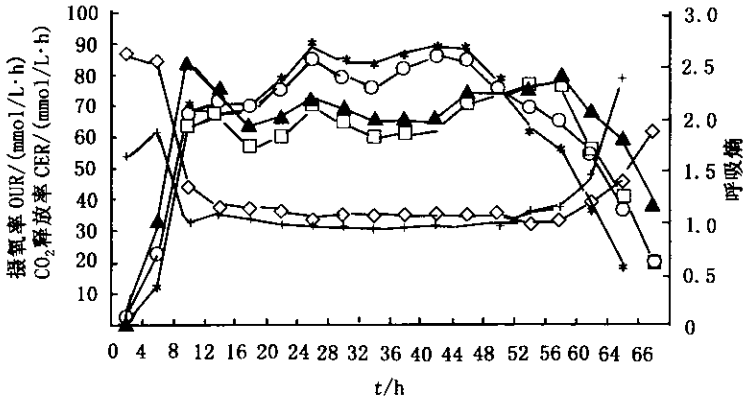


图 2 培养基中加入谷氨酸钠与原培养基的过程呼吸曲线对照

—□—添加谷氨酸钠的摄氧率, —▲—添加谷氨酸钠的 CO₂ 释放速率,
—●—不添加谷氨酸钠的摄氧率, —○—不添加谷氨酸钠的 CO₂ 释放速率,
—◇—添加谷氨酸钠的呼吸熵, + 不添加谷氨酸钠的呼吸熵

中由于大量细胞酶系的合成和分泌, 这些蛋白物质的存在引起培养基起泡提前且起泡较多。在合成谷氨酸的过程中, 形成了许多有机酸类的中间代谢物, 因而需要较多的氨水以维持一定的 pH 环境。

可见, 培养基中加入谷氨酸钠后, 罐上的结果和摇瓶得出的结论是一致的。过程产苷比较稳定, 放罐产率可以达到 31.49g/L。

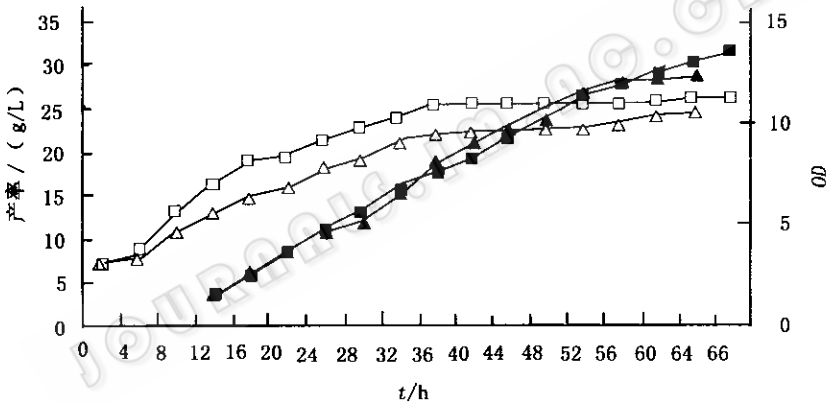


图 3 培养基中加入谷氨酸钠与原培养基的产苷和光密度的对照

—■—添加谷氨酸钠的产率, —▲—不添加谷氨酸钠的产率, —□—添加谷氨酸钠的光密度,
—△—不添加谷氨酸钠的光密度

2.2 次黄嘌呤 (Hx) 的作用

Hx 可以通过补救途径, 直接提供嘌呤环以合成鸟苷, 即 $Hx \rightarrow IMP \rightarrow XMP \rightarrow GMP \rightarrow GR$ 途径^[3,4,6-9]。理论产率为 1g/L 的 Hx 可以合成约 2g/L 的鸟苷。

2.2.1 罐上无菌取样进行摇瓶培养: 50L 罐发酵过程中不同时间无菌取样, 加入不同

浓度 Hx 进行摇瓶培养, 以考察 Hx 对鸟苷合成的影响, 结果见表 2。

表 2 不同时间补加不同浓度 Hx 对鸟苷产量的影响

	10h	20h	30h	40h	50h
0	5.38	11.47	19.57	23.89	29.22
0.1%	5.82	11.97	20.85	26.86	31.02
0.2%	6.17	13.5	23.75	29.08	31.86
0.3%	6.16	16.66	23.73	31.35	31.76

从结果可以看出, 发酵过程中 30h 时以后加入 0.2% ~ 0.3% Hx 有利于提高鸟苷产量, 其中以后期加入情况下最终产苷最高, 可达 31.86g/L。

我们根据上述结果, 考虑在发酵

中后期添加适量 Hx 以提高鸟苷的合成。

2.2.2 罐上培养: 在培养基中加入谷氨酸钠的基础上, 根据摇瓶得出的结果, 在罐上从 40h 开始到 48h 补加 2g/L 的次黄嘌呤, 结果见图 4。

从图 4 以看出, 补加次黄的罐批在 40~52h 产苷速率明显高于其他阶段, 从而带动后期产苷, 最终产苷可以达到 33.24g/L, 增加约 3.4g/L, 与理论产率基本一致。

3 结论

发酵罐与摇瓶联动优化是一种较好的发酵研究方法, 可以用来进一步进行过程优化。谷氨酸钠对于鸟苷发酵比较重要。可以在底料中适量添加以促进菌体生长, 进一步促进鸟苷的合成; 同时也可以推迟起泡敌时间, 减少泡沫的数量。加入 1% 谷氨酸钠的培养基在 50L 自控罐上的最终产苷可以达到 31.49g/L。次黄嘌呤是鸟苷合成的一种直接前体, 后期加入 0.2%~0.3% 的 Hx 能够明显提高鸟苷产量。在 50L 自控罐上后期补加 0.2% 的 Hx, 最终产苷可以达到 33.24g/L。

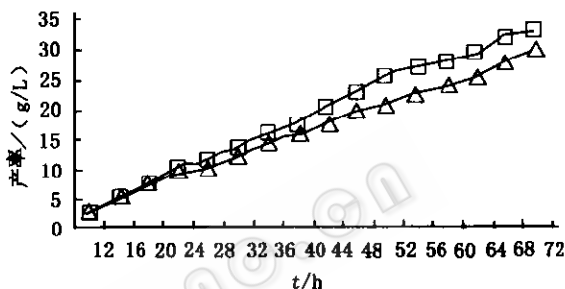


图 4 补加次黄对产苷的作用

—□—添加次黄的产率, —△—不添加次黄的产率

参考文献

- [1] 汤生荣, 黄卫红, 侯左荣. 工业微生物, 1998, 4: 11~15.
- [2] 汤生荣, 王景玉, 刘志河, 等. 工业微生物, 1992, 2: 5~10.
- [3] 张克旭, 陈 宁, 张 蓓, 等. 代谢控制发酵. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 354~359.
- [4] 乔宾福. 工业微生物, 1998, 1: 22~27.
- [5] 无锡轻工大学. 微生物学. 北京: 中国轻工业出版社, 1997. 35~36.
- [6] Akio Yamanoi, Yoshiteru Hirose, Mikio Aoki, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 1965, 11 (4): 339~353.
- [7] Ikue Nogami, Makoto Kida, Teiji Iijima, *et al.* Agr Biol Chem, 1968, 32 (2): 144~152.
- [8] Ken-ichi Komatsu, Ryoji Kodaira. J Gen Appl Microbil, 1973, 19: 263~271.
- [9] Kenji Ishii, Isamu Shio. Agr Biol Chem, 1968, 37 (2): 287~300.