

肌苷菌核酸代谢关键酶缺失和形成选育腺苷菌的研究*

柏建新 朱晓宏 张一平 王红连 邓崇亮

(江苏省微生物研究所 无锡 214063)

摘要:以肌苷产生菌 *Bacillus Subtilis* JSIM-1019 为出发菌株, 根据 *B. subtilis* 核酸代谢理论设计不同筛选模型, 用物理、化学诱变剂对亲株进行诱变处理, 先后有序地获得不同关键酶的缺失或回复即特殊的营养缺陷型以及抗某些代谢类似物的突变株, 解除终产物对代谢物的抑制和阻遏, 获得了几株黄嘌呤营养缺陷型并对 8 氮鸟嘌呤具有抗性的突变株 X-13 等, 获得的突变株经单菌分离后得到 X-13-4, 36℃ 培养 72h 在培养基中最高积累 12.43g/L 腺苷。

关键词:腺苷, 黄嘌呤, 腺苷酸脱氢酶, 鸟苷酸还原酶, 肌苷酸脱氢酶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0052-05

STUDY ON THE MICROORGANISM FERMENTATION OF ADENOSINE WITH MUTATIVE STRAINS OF LACK OF OR PRODUCING SOME IMPORTANT ENZYMES IN NUCLEIC ACID METABOLISM

BAI Jian-Xin ZHU Xiao-Hong ZHANG Yi-Ping WANG Hong-Lian DENG Chong-Liang

(Jiang su Institute of Microbiology, Wuxi 214063)

Abstract: According to the theory of nucleic acid metabolism, the different select models were designed. By means of physical and chemical derived to the production of inosine. *Bacillus Subtilis* JSIM-1019, we have got the mutative strains of auxotroph of different component, the mutative strains lacking of relating enzyme, the mutative strains resisting some metabolic analog in turn. Restrain of the production to metabolite has been relieved. Two mutative strains of auxotroph xanthine, X-13 and so on were obtained. And it also has resistance to 8-azaguanine. After the mutative strains had been separated into the single strain respectively, we got X-13-4 the maximum accumulation of adenosine reaches 12.43g/L in substratum cultivated for 72 hours at 36℃.

Key words: Adenosine, Xanthine, AMP deaminase, GMP reductase, IMP dehydrogenase

腺苷可用于冠状血管障碍、狭心症、动脉硬化症及高血压症等疾病的治疗。腺苷还是合成三磷酸腺苷(ATP)的主要原料, 而 ATP 已被广泛应用于治疗心不全、脑动脉硬化及肌肉萎缩症。一步法发酵腺苷始于 1968 年, 小西真八等^[1]使用枯草杆菌的异亮氨酸缺陷型在含有异亮氨酸 0.03% 的培养基中积累 1.26g/L 的腺苷; 1971 年 Haneda 等^[2]由枯草杆菌诱变得一株肌苷产生菌, 再诱变得缺失 AMP 脱氢酶的黄嘌呤缺陷型菌株, 可积累腺苷 12~16g/L, 这些菌株生产腺苷时很不稳定, 常有异常发酵。国内腺苷生产方法主要从酵母中提取 RNA 后, 降解获得; 也有人用肌苷为原料化学合成腺苷, 但成本均较高。我国每年所需 ATP 大部分依赖进口, 腺苷实现发酵法生产对于我国医药、发酵工业具有较大的推动作用。

腺苷产生菌必须具备几个条件: (1) 缺损肌苷酸脱氢酶, 这是避免肌苷酸代谢为黄苷酸的必要条件, 从而保证了肌苷酸向腺苷酸的代谢; (2) 缺损腺苷酸脱氢酶, 这

* 江苏省社会发展资助项目 (No. BS97080)

作者还有: 杜郭君, 罗先勇

收稿日期: 2002-05-09, 修回日期: 2002-08-09

是避免腺苷酸再次代谢为肌苷酸的必要条件；(3) 必须具有很强活性的琥珀酰腺苷酸合成酶和琥珀酰腺苷酸水解酶。根据代谢控制原理，从缺损腺苷酸脱氨酶的枯草杆菌变异获得的黄嘌呤缺陷型即可实现，但是事实上直接由亲株变异获得的菌株只能积累少量的腺苷，完全不适应工业化的要求^[3]。为此我们采取了迂回的方式。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

选育腺苷产生菌的出发菌株采用我们实验室选育成功的肌苷产生菌 *Bacillus Subtilis* JSIM-1019，菌株的遗传标记：腺嘌呤、组氨酸、硫氨酸三重营养缺陷型 (Ade⁻, His⁻, Thi⁻)^[4]。这一菌株是肌苷生产菌株，经不断选育后，菌株产肌苷性能稳定，肌苷产量高，至今仍然在全国肌苷工厂的生产中应用^[5]。该菌株代谢途径见图 1。

1.2 腺苷产生菌选育技术路线

以肌苷产生菌为出发菌株选育腺苷产生菌技术路线是：A. 缺损 AMP 脱氨酶，从而阻断 AMP 到 IMP 代谢途径。B. 恢复 SAMP 合成酶，从而连通 IMP 到 AMP 代谢通路。C. 缺损 IMP 脱氢酶，从而阻断 IMP 到 XMP 的代谢途径，使代谢流向 IMP 到 AMP。为了实现第三步，必须经 C1. 缺损 AICAR 转甲酰酶或 IMP 环化脱水酶，从而阻断 AICAR 到 IMP 的代谢；C2. 缺损 GMP 还原酶，从而阻断 GMP 到 IMP 的代谢；C3. C1 是为了 C2 服务的，此时需要恢复 C1 中缺损的酶，恢复 AICAR 到 IMP 的代谢。C4. 缺损 IMP 脱氢酶，从而阻断 IMP 到 XMP 的代谢途径，使代谢流向 IMP 到 AMP。

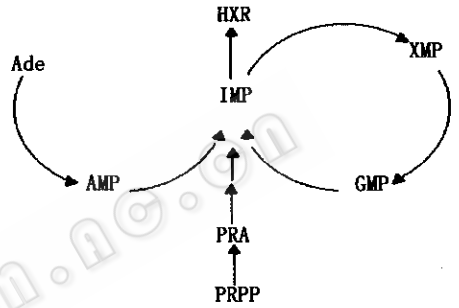


图 1 肌苷产生菌 *Bacillus Subtilis* JSIM-1019 代谢途径

1.3 培养基和培养方法

1.3.1 基本培养基：参见文献 [4]。培养过程中根据实验要求补充腺嘌呤、黄嘌呤或其他成分。

1.3.2 种子培养基：葡萄糖 10g，酵母膏 5g，蛋白胨 5g，牛肉膏 5g，氯化钠 2g，定容至 1L，pH 7.2。在 500mL 三角瓶中装 30mL 种子液， 1×10^5 Pa 灭菌 10min，种子培养 18h，培养温度 34℃，往复式摇床振幅 7cm，频率 108r/min。

1.3.3 发酵培养基：葡萄糖 100g，酵母膏 4g，酵母粉 8g，玉米浆 4g， K_2HPO_4 2g， $MgSO_4$ 0.5g， $MnCl_2$ 0.01g， $FeSO_4$ 0.01g，KCl 2g， $CaCO_3$ 20g， NH_4Cl 20g，定容至 1L，pH 7.0~7.2。在 500mL 三角瓶中装 20mL 发酵液， 1×10^5 Pa 灭菌 10min，种子接种量为 10%，培养温度为 36℃，发酵培养时间 72h，往复式摇床振幅 7cm，频率 108r/min。

1.4 诱变方法

在斜面培养基上，将培养生长 24h 的菌种，接种到收集细胞培养基中，培养 6~8h 后，用 50 mmol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 缓冲液 (pH 7.0) 将细胞洗涤 2~3 次后，稀释成浓度为 10^8 ~ 10^9 /mL 细胞，制成菌悬液，用紫外线、氯化锂或甲基磺酸乙酯、亚硝基胍等诱变剂单独或相间、连续对菌株按不同要求进行处理^[6]，根据所要求获得的不同突变株，

接种到按实验要求设计的补充不同成分的基本培养基上, 30℃培养 2~5d 后, 检出所需要的突变株。

1.5 分析方法

1.5.1 纸层析溶剂系统定性鉴定: I 正丁醇:醋酸:水 = 4:1:1, II 正丙醇: NH_4OH :水 = 20:12:3, III 饱和硫酸铵:异丙醇:1N 醋酸钠 = 40:1:9

1.5.2 电泳定性鉴定: I 0.05mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH3.5), II 10% 醋酸。样品点正极, 电压 500V, 时间 2h。

1.5.3 腺苷定量测定: 培养液在沸水浴中加热 15min, 3,000 r/min 离心 20min, 点样, 点样量 5 μL , 10% 醋酸缓冲液 500V 电泳 2h, 在紫外层析灯下出现紫外荧光斑点, 用 5mL 0.1N HCl 浸出后, 然后用 753 型紫外分光光度计 (上海分析仪器厂) 在 260nm 处测定洗脱液的 OD 值, 计算腺苷含量。

2 结果与分析

2.1 突变株的检出

2.1.1 缺失腺嘌呤脱氨酶活性突变株的获得: 腺苷产生菌的获得, 必须先阻断 AMP 流向 IMP, 即获得缺失腺嘌呤脱氨酶 (Deam) 活性突变株。该酶有一特性是可以解除 8 氮杂鸟嘌呤 (8AG) 毒害。当用化学、物理诱变剂处理 JSIM-1019 肌苷产生菌, 筛选在含有 8AG 的培养基上不能生长的突变株, 就获得了腺嘌呤脱氨酶阴性的遗传特性。该突变株为 JSIM-A-23, 遗传标记为 (Ade^- , His^- , Thi^- , Deam^-), 肌苷积累量没有变化。

2.1.2 琥珀酰腺苷酸 (SAMP) 合成酶活性恢复突变株的获得: 腺苷产生菌应有 IMP 代谢流向 AMP 的能力, 而 JSIM-A-23 是一株缺失 SAMP 合成酶的菌株 (腺嘌呤缺陷型) 这条途径已被阻断, 要恢复 IMP 到 AMP 的代谢途径, 即恢复 SAMP 合成酶活性, 必须得到腺嘌呤回复突变株 (原原型 Ade^+)。JSIM-A-23 经诱变后涂布于基本培养基上, 挑选长出的单菌落。该突变株 JSIM-2-10 遗传标记为 (Ade^+ , His^- , Thi^- , Deam^-), 不再积累肌苷。

2.1.3 缺失肌苷酸 (IMP) 合成酶活性突变株的获得: 阻断 IMP 代谢流向 GMP 即可获得腺苷。但是因为 GMP 还原酶存在, 实现这一步的营养筛选无法直接设计, 采用基本培养基和添加黄嘌呤的基本培养基双平板来挑选很容易出现嘌呤缺陷的干扰, 是通过一些曲折的方式, 即先依次选育出缺失 IMP 合成酶、GMP 还原酶活性的突变株。将 JSIM-2-10 诱变后, 涂布在完全培养基上, 培养 48h 后, 用双平板法进行筛选。挑出在添加 50mg/L 次黄嘌呤 (Hx) 的基本培养基上能生长而在不含 Hx 的基本培养基上不能生长的菌落。该突变株为 JSIM-1-3, 遗传标记为 (Hx^- , His^- , Thi^- , Deam^-)。该菌株不积累肌苷, 但有紫外吸收物质产生, 经初步鉴定, 为 AICAr。

2.1.4 缺失 GMP 还原酶 (GMPred) 活性突变株获得: 具有 GMPred 的次黄嘌呤缺陷型 (非精确嘌呤缺陷型) 在含有鸟嘌呤的基本培养基上生长很好, 而缺失 GMPred 的次黄嘌呤突变株在这样的培养基上不能生长, 它只有在含有次黄嘌呤或同时含有腺嘌呤加鸟嘌呤的培养基上才能生长。JSIM-1-3 菌株经诱变后, 挑出在含有次黄嘌呤的基本培养基上能够生长而在含有鸟嘌呤的基本培养基上不能生长的突变株。该菌株 JSIM-A-10 经鉴定无 GMPred 活性, 遗传标记 (Hx^- , His^- , Thi^- , Deam^- , GMPred^-)。该菌株仍然积累 AICAr。

2.1.5 肌苷酸合成酶活性恢复突变株的获得: 将 JSIM-A-10 菌株经诱变后, 涂布于基本培养基上, 挑出长出的单菌落。选育出遗传标记为次黄嘌呤回复突变的 JSIM-A-10-10 突变菌株 (Hx^+)。经检验 JSIM-A-10-10 菌株 IMP 合成酶活性恢复, 并且丧失积累 AICAr 的能力, 遗传标记为 (Hx^+ , His^- , Thi^- , $Deam^-$, $GMPred^-$)。

2.1.6 缺失肌苷酸 (IMP) 脱氢酶活性突变株的获得: 为了得到腺苷产生菌, 应从头切断代谢流中右边的环, 即选育黄嘌呤 (Xan) 营养缺陷型突变株, 也就是缺失 IMP 脱氢酶活性的菌株。将 JSIM-A-10-10 经诱变后涂布于添加 xan 的基本培养基上, 挑选不能在含有 xan 的基本培养基长出的菌落。所得菌株 JSIM-X-11 分纯后经摇瓶试验, 腺苷产量为 8g/L。该菌株遗传标记 (Xan^- , His^- , Thi^- , $Deam^-$, $GMPred^-$), 代谢途径见图 2。

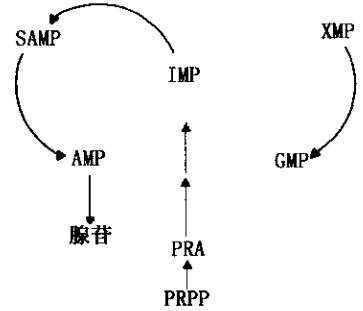


图 2 腺苷产生菌 *Bacillus subtilis* JSIM-X-11 代谢途径

2.1.7 8-氮杂鸟嘌呤抗性突变株的获得: 将 JSIM-X-11 菌株经诱变后, 涂布于含有 50mg/L 的 8AG 基本培养基上^[7], 挑出能够生长的单菌落, 遗传标记 (Xan^- , His^- , Thi^- , $8AG^r$, $Deam^-$, $GMPred^-$)。再经摇瓶发酵筛选, 得到 JSIM-X-13-4 菌株, 腺苷产量达到 12.43g/L, 没有肌苷、鸟苷等副产物的积累。该菌株部分解除了 AMP 对代谢流的反馈抑制。

2.2 紫外吸收物质的鉴定

2.2.1 3种不同溶剂系统纸层析鉴定: 在 3 种不同溶剂系统中对发酵产物进行纸层析鉴定, 3 批发酵主要产物的平均 R_f 值与腺苷标准样品一致。发酵液提取样品在 3 种不同溶剂系统纸层析鉴定结果见表 1。

表 1 发酵液提取样品纸层析紫外吸收斑点 R_f 值

溶剂系统	R_f 值			
	发酵样品		标准样品	
	斑点 I	斑点 II	腺苷	腺嘌呤
溶剂 I	0.41	0.56	0.42	0.55
溶剂 II	0.73	0.60	0.73	0.61
溶剂 III	0.18	0.12	0.17	0.12

2.2.2 不同 pH 缓冲液电泳紫外吸收斑点的泳动距离: 发酵液提取样品和腺苷标准样品在不同 pH 缓冲液中电泳 2h, 电压 500V, 3 批发酵液提取样品的电泳紫外吸收斑点平均泳动距离与腺苷标准样品一致, 结果见表 2。

表 2 发酵液提取样品电泳紫外吸收斑点泳动距离

电泳缓冲液	泳动距离 (cm)			
	发酵样品		标准样品	
	斑点 I	斑点 II	腺苷	腺嘌呤
缓冲液 I	7.1	11.5	7.0	11.7
缓冲液 II	11	15.3	11	15.5

2.2.3 紫外吸收光密度值: 3 批发酵液提取样品和腺苷标准样品紫外吸收光密度平均比值测定结果见表 3。

2.2.4 发酵产物紫外光谱分析: 发酵液提取样品和腺苷标准样品 pH 均为 2.0。样品经测定后, 其紫外光谱与腺苷标准样品一致。根据以上这些实验以及微生物核酸代谢途径理论, 从 X-13 菌株发酵液分离到的产物被鉴定为

表 3 紫外吸收光密度值 (pH 2)

名称	比值		
	250/260	280/260	290/260
腺苷标准品	0.84	0.215	0.03
样品	0.84	0.213	0.035

腺苷^[7,8]。紫外测定结果见图3。

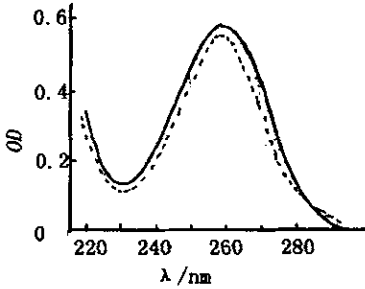


图3 发酵液提取样品和腺苷标准样品紫外光谱
实线为标样腺苷，虚线为发酵产物

2.3 黄嘌呤缺陷型积累腺嘌呤类物质

在我们的工作中，以肌苷产生菌 JSIM-1019 作为出发菌株，用物理、化学诱变剂对亲株进行诱变处理后，得到一系列突变子，然后再对突变子遗传性能进行累加性选育，从我们实验室获得了一批黄嘌呤营养缺陷型突变株。将黄嘌呤营养缺陷型突变株接种在种子培养基中，34℃培养 18 h，然后以 10% 接种量接种到发酵培养基中，36℃培养 72 h 后，在发酵培养基中积累腺苷和少量腺嘌呤。最高能产腺苷 12.43g/L。各突变株 3 批重复试验平均产苷结果见表 4。

3 讨论

自然界中没有发现能够直接产生腺苷的菌种，但是运用核酸代谢调控理论，采用诱变育种的方法，是可以使突变株的核酸代谢流向积累腺苷的方向，从而积累腺苷。对积累腺苷的产生菌来说，最重要的遗传特性是丧失 AMP 脱氢酶活性、丧失 IMP 脱氢酶活性^[9]和保持 SAMP 合成酶的活性。根据我们以往的工作，由亲株直接诱变得到的 IMP 脱氢酶活性缺失的菌株，不是只能积累微量的腺苷，就是极易回复突变，很快丢失产腺苷的能力。而经过我们有目的地阻断或回复代谢过程中的某些关键酶，

表 4 黄嘌呤缺陷型菌株积累腺嘌呤类物质

菌株	产物 (g/L)	
	腺苷	腺嘌呤
X-1	2.80	0.15
X-2	2.99	0.86
X-3	4.67	0.45
X-4	5.05	0.77
X-5	2.24	0.62
X-6	3.74	0.58
X-7	4.11	0.62
X-8	4.30	0.73
X-11	8.00	0.43
X-13	9.01	0.48
X-13-4	12.43	0.47
X-13-7	11.59	0.59

逐步有序地获得多种营养缺陷型突变株，最终得到了腺苷高产菌。获得的黄嘌呤营养缺陷型突变株 X-13-4 菌株经摇瓶发酵后，积累较多腺苷且遗传稳定。有关腺苷的工业化生产的研究正在进行。

参考文献

[1] 小西真八. *Amino Acid and Nucleic Acid*, 1968, 18 (15) .
 [2] Katsuji H. *Agric Biol Chem*, 1971, 32 (12): 1906~1912.
 [3] 小松谦一. 特许公报. 1972, 24, 155.
 [4] 邓崇亮, 徐海. 微生物学通报, 1988, 15 (3): 98~100.
 [5] 柏建新, 邓崇亮, 钱养钊, 等. 工业微生物, 1997, 27 (3): 11~15.
 [6] Hiroshi M. *Arg Biol Chem*, 1978, 42 (3): 636~641.
 [7] Haneda K, Komatsu K, Kodaira R, *et al.* *Ibid*, 1972, 36: 1453.
 [8] Haneda K, Hirano A, Kodaria R, *et al.* *Ibid*, 1971, 35: 12.
 [9] 羽田胜二. 特许公报. 1972, 50, 394.