

添加次黄嘌呤或腺嘌呤提高肌苷产量

陈家平

(中山大学)

方展瑞

(广州味精厂)

肌苷生产菌 No. 226 具有将次黄嘌呤转变为肌苷的能力, 添加次黄嘌呤有利于肌苷的积累^[1,2]。腺嘌呤缺陷型的肌苷生产菌株, 在培养液中腺嘌呤的浓度对肌苷积累有显著影响^[3,4]。

我们采用中国科学院上海生物化学研究所等单位选育的枯草芽孢杆菌 7171-9-1 菌株, 进行添加次黄嘌呤或腺嘌呤与酵母粉试验, 现报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 7171-9-1 腺嘌呤缺陷型, 由上海味精厂提供。

(二) 摇瓶试验

500ml 三角瓶装培养液 20ml, 接种量 10% (V/V), 往复式摇床 (90 次/分), 振幅 80 mm, 30—32℃ 培养 60 小时。

1. 添加次黄嘌呤试验: 发酵培养基组成为 (%) : 水解糖 10, 酵母粉 1.7, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5, KCl 0.2, Na_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 尿素 0.3。pH6.8, 120℃ 30 分钟灭菌, 分别添加次黄嘌呤 (%): 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5。

2. 添加腺嘌呤试验: 培养基组成同上但含

(%) : 0.8、1.0、1.2、1.5、1.7、1.9 的酵母粉, 并分别添加 50mg/L 和 100mg/L 的腺嘌呤。

(三) 发酵罐试验

种子罐容积 500L, 发酵罐容积 5000L。

种子罐培养基 (%) : 葡萄糖 2, 酵母粉 2, 蛋白胨 1, 玉米浆 0.5, NaCl 0.25, 尿素 0.2, pH 6.7。发酵罐培养基同摇瓶发酵培养基。

添加次黄嘌呤是在发酵培养基中添加 0.1%, 添加腺嘌呤是在种子培养基中添加 20 mg/L。种龄 16 小时, 接种量 10% (V/V), 发酵温度 32—35℃, 通气量 1:0.14 (V/V), 搅拌转速 170 转/分, 发酵周期 50 小时。

(四) 测定方法

1. 菌体生长: 每隔 6 小时取样, 稀释 10 倍后用 581-G 型光电比色计选 650 nm 波长测定 O. D. 值。

2. 肌苷、次黄嘌呤测定: 采用纸层析, 用 SP500 型紫外分光光度计测定^[5]。

3. 还原糖测定: 费林试剂法。

4. pH 值测定: 每隔 6 小时取样用 25 型酸度计测定。

陈俊民副教授对本文提出宝贵意见, 特此致谢。

结果和讨论

(一) 添加次黄嘌呤对肌苷产量的影响

1. 次黄嘌呤添加量与摇瓶肌苷产量的关系: 添加不同量的次黄嘌呤进行摇瓶试验, 测定肌苷含量结果 (见图 1)。结果表明, 添加 0.1—0.5% 的次黄嘌呤均有利于肌苷积累。但超过 0.2% 并未看出随着添加量增加转化成肌苷会成正比关系而上升。低于 0.1% 的添加量如 0.05%, 虽比对照的肌苷含量略高, 但比不上其他添加量明显。因此我们认为添加次黄嘌呤的量以 0.1% 为宜。

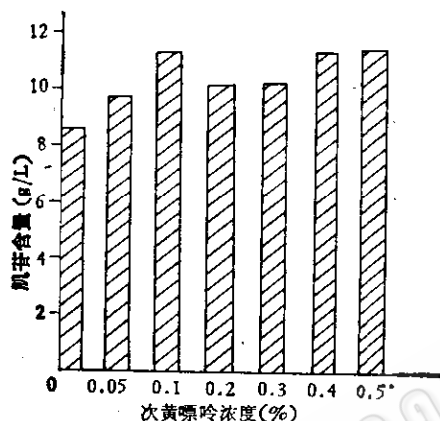


图 1 次黄嘌呤添加量与摇瓶肌苷含量关系

2. 发酵生产添加次黄嘌呤与肌苷产量的关系: 在发酵生产时添加 0.1% 的次黄嘌呤, 发酵结束时测定肌苷含量有明显提高 (见表 1、图 2)。

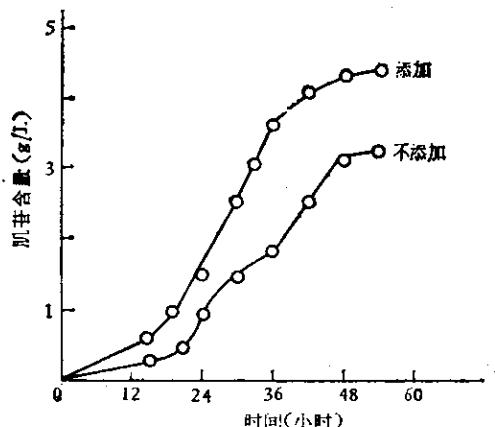


图 2 发酵生产中添加次黄嘌呤对肌苷产量的影响

表 2 酵母粉的不同来源和用量与肌苷含量关系

试验项目		终 pH	残糖(%)	菌体生长 (O.D.)	肌苷含量 (g/L)
不同来源	石硐纸浆酵母	5.5	10.2	0.13	3.0
	江门药用酵母	5.5	5.2	0.36	10.30
江门药用酵母不同用量(%)	0.8	6.2	6.1	0.26	5.10
	1.0	6.1	5.6	0.28	6.40
	1.2	6.0	5.4	0.30	7.20
	1.5	6.0	6.2	0.30	10.16
	1.7	5.6	5.2	0.40	10.91
	1.9	5.8	4.0	0.44	10.70

表 1 结果说明, 不添加的仅 3.17g/L, 而添加的可达 4.15g/L 平均增产达 30%。

(二) 添加腺嘌呤与酵母粉用量对肌苷产量的影响

1. 酵母粉用量对摇瓶肌苷含量的影响: 摇

表 1 发酵生产加入次黄嘌呤对肌苷产量的影响

处 理	批 次	终 pH	残糖(%)	菌体生长 O. D.	次黄嘌呤含量 (g/L)	肌苷含量 (g/L)	肌苷平均含量 (g/L)
对 照	1	5.7	3.8	0.44	0.66	3.51	3.17
	2	6.0	4.0	0.39	0.73	2.83	
	3	6.2	3.3	0.44	0.46	3.33	
	4	6.3	3.5	0.48	0.56	3.20	
	5	6.2	3.6	0.43	0.60	3.00	
添加次黄嘌呤 0.1%	1	5.7	2.9	0.40	0.14	4.14	4.15
	2	6.1	4.2	0.37	0.78	4.21	
	3	5.9	3.2	0.43	0.29	4.00	
	4	5.8	2.2	0.46	0.74	3.75	
	5	6.0	2.3	0.45	0.50	4.65	

瓶试验结果(见表2)。

根据表2的数据,石砚纸浆酵母与江门药用酵母同样以1.7%用量时,纸浆酵母菌体生长差、O.D. 值仅0.13、肌苷仅3g/L。药用酵母菌体生长正常、O.D. 值0.36、肌苷达10.3g/L。在药用酵母的6个不同用量中以1.7%为宜,因1.9%的用量会给提取肌苷造成困难,而1.5%的用量肌苷含量略低。

2. 添加腺嘌呤与药用酵母对摇瓶肌苷含量的影响:通过添加腺嘌呤的摇瓶试验,只有在药用酵母一定用量的情况下,添加腺嘌呤才有增产结果(见表3)。在1.7%药用酵母用量条件下增产较明显,如果把药用酵母用量减少到

1%以下,添加腺嘌呤的量即使增加10倍、肌苷含量仍然很低。

3. 在摇瓶取得稳定的基础上,以1.7%药用酵母用量为配合,在种子罐添加腺嘌呤20mg/L,以不添加为对照,试验结果(见表4)。

通过发酵生产,不添加的5批肌苷平均产量为3.33g/L,而添加的5批平均产量达4.55g/L,平均增产30%左右。而且仅在种子

表3 添加腺嘌呤与酵母粉对摇瓶肌苷含量的影响

江门药用酵母(%)	腺嘌呤添加量(mg/L)	终 pH	残糖(%)	菌体生长 O.D.	肌苷含量(g/L)
1.7	0	5.4	3.8	0.40	9.18
1.9	50	5.4	3.0	0.44	9.74
	100	5.4	4.1	0.35	10.30
1.7	50	5.4	2.5	0.44	11.89
	100	5.4	4.4	0.38	11.95
1.5	50	5.4	3.5	0.40	9.7
	100	5.5	3.5	0.39	10.19
1.2	50	5.5	4.5	0.34	8.88
	100	6.2	5.0	0.33	7.84
1.0	500	6.0	5.5	0.28	6.30
0.8	1000	6.0	6.4	0.24	4.90

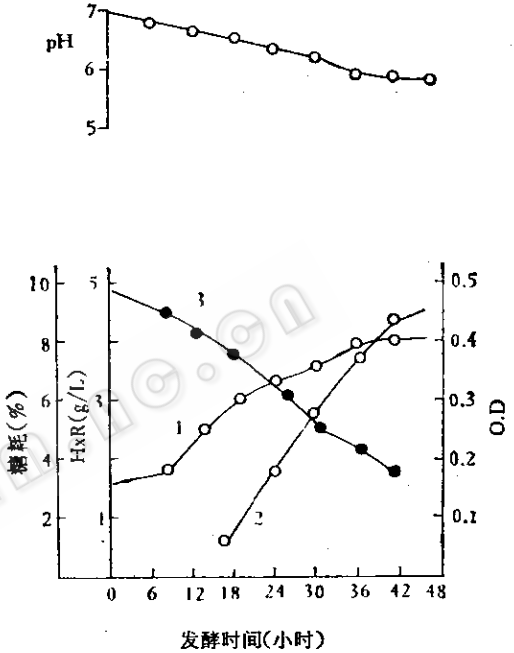


图3 添加腺嘌呤发酵过程变化

1. 为O.D.; 2. 为肌苷产量; 3. 为糖耗。

表4 发酵生产添加腺嘌呤对肌苷产量的影响

处 理	批 次	种 子 罐 培 养		发 酵 罐 生 产				
		终 pH	菌体生长 (O.D.)	终 pH	残糖(%)	菌体生长 O.D.	肌苷产量 (g/L)	平均产量 (g/L)
对 照	1	6.1	0.195	6.0	4.2	0.41	2.66	3.33
	2	6.1	0.26	6.0	4.1	0.39	3.15	
	3	6.2	0.21	6.6	2.4	0.42	3.40	
	4	6.1	0.23	5.7	2.0	0.40	3.79	
	5	6.3	0.23	5.4	2.3	0.41	3.66	
种子罐添加 (20mg/L)	1	6.2	0.42	6.5	2.8	0.45	4.60	4.55
	2	6.1	0.26	6.2	3.1	0.42	4.91	
	3	5.9	0.50	5.4	3.6	0.41	4.25	
	4	6.1	0.30	6.4	3.1	0.43	4.81	
	5	6.5	0.31	6.5	1.6	0.39	4.17	

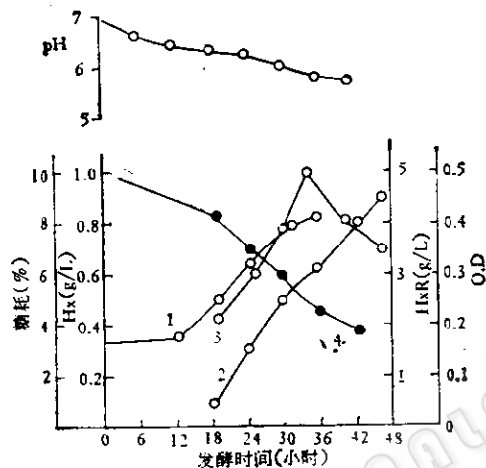


图4 添加次黄嘌呤发酵过程变化

1. 为 O.D.; 2. 为肌苷产量;
3. 为次黄嘌呤; 4. 为糖耗

罐添加, 对生产很有利。在种子罐添加腺嘌呤的主要作用, 可能是使菌体正常的旺盛生长, 而带入的腺嘌呤及种子, 使当代菌在发酵培养基中达亚适量生长, 从而有利于后来肌苷的积累。

(三) 添加次黄嘌呤和在种子罐添加腺嘌呤发酵过程的变化

通过发酵生产试验, 无论添加次黄嘌呤或腺嘌呤, 都能提高肌苷产量。从发酵过程的菌体观察生长粗壮、自溶较少、生长 O.D. 值、pH 变化、糖耗、肌苷积累均表现正常(见图 3、4)。

发酵生产时, 仅在种子罐添加极少量腺嘌呤、其作用能在发酵阶段充分发挥。如果在种子罐添加腺嘌呤的基础上, 又在发酵罐添加次黄嘌呤是否能进一步提高肌苷产量, 这有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ikhuo Nogami, et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 32(2): 144—152, 1968.
- [2] Ken-ichi Sasajima et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 34(3): 381—389, 1970
- [3] I. Shiio and K. Ishii: *J. Biochem.* 69: 339, 1971.
- [4] 王敬全等: *微生物学报*, 17(2): 114—119, 1977.
- [5] 中国科学院上海生物化学研究所等: *微生物学报*, 13(2): 136—141, 1973.