

肌苷生产菌301菌株的研究*

王景玉 王国民 雷肇祖 沈国良 陈宝英 史颖 王伟民 吴菊芬

(上海市工业微生物研究所)

我们以 7171-9-1 菌为出发菌株,经选育得到一个新菌株——枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*) 301。该菌株经中型扩大试验,已在新市味精厂和佳木斯前进制药厂试生产中应用,现报道如下。

材 料 和 方 法

一、出发菌株

枯草芽孢杆菌 (*B. Subtilis*) 7171-9-1。

二、诱变剂

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (简写 MNNG)

三、培养基

1. 肉汤培养基、基本培养基、种子培养基组成均同前报道^[1]。

2. 发酵培养基(%)：葡萄糖 10，纸浆酵母 0.8，工业药用酵母 0.8， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5，KCl 0.2，豆饼水解液 0.5， CaCO_3 2 (分消)，尿素 0.2。pH 7.0。120℃，20 分钟灭菌。

四、诱变方法

按常规方法,将 7171-9-1 菌体悬浮于 0.05 M Tris 缓冲液 (pH 6.0) 中,加 300 r/ml 的 MNNG, 37℃ 处理 30 分钟。

五、营养标记鉴定

用生理盐水洗涤活化菌体后,取 0.2ml 悬浮液倒入基本培养基平板,一组不加其它物质,另一组在平板的一边加少量的腺嘌呤,另一边加少量的硫胺素,37℃ 培养 2 天观察。

六、核苷降解酶活力的测定

根据 Aoki 的方法^[2],用生理盐水洗涤活化菌体二次,反应混合液含 0.25ml 菌体悬浮液,0.25 ml 10mM HxR, 0.25 ml 2M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8), 0.25ml 20 μM MgCl_2 , 37℃ 保温 120 分钟,每隔 30 分钟取样 50 μl 点样,40% 硫酸铵溶剂中展层 15 小时。

* 承复旦大学任大明同志和中国科学院生物化学研究所王昌才同志指导。文中所用缩写符号为: PRPP: 5 磷酸核糖焦磷酸; IMP: 肌苷酸; HxR: 肌苷; Hx: 次黄嘌呤。中型试验数据由试生产单位提供。

七、5'核苷酸酶活力的测定

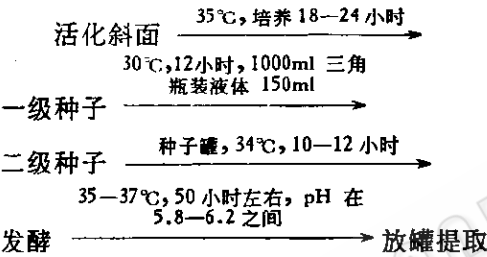
根据 Fujimoto 的方法^[3]并稍作修改,活化菌体用生理盐水洗涤二次,反应混合液含 0.25 ml 菌体悬浮液,0.25ml30μM 巴比妥钠缓冲液(pH7.0),0.25ml7.5mM5' 肌苷酸,37℃ 保温 30 分钟,取 0 分与 30 分钟的样品,点样 50μl 展层 15 小时。

八、发酵试验

1.种子:在 20×200mm 试管中装 10ml 种子培养基,接种后于往复式摇床(振幅 7cm,频率 120 次/分),30℃ 振荡培养 18 小时。

2.发酵:在 500ml 三角瓶中盛 20ml 培养液,接种量 5%(V/V),于往复式摇床 36℃ 培养 72 小时。

九、中型试验发酵工艺流程及条件



十、分析方法

- 1.纸层析:除改用 40% 硫酸铵溶剂展层外,其它参照前报^[1]。
- 2.离子交换分析法:见前报^[1]。

结果与讨论

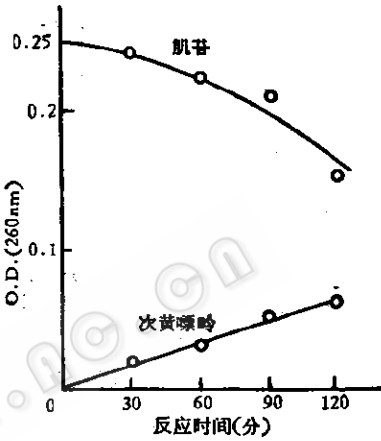
一、301 菌株的营养标记

将 7171-9-1 菌经 MNNG 诱变后,经摇瓶发酵筛选,证明 301 菌株肌苷产量最高。对 301 菌和出发菌株分别进行营养标记的鉴定,说明出发菌是腺嘌呤和硫胺素的双缺陷型菌,301

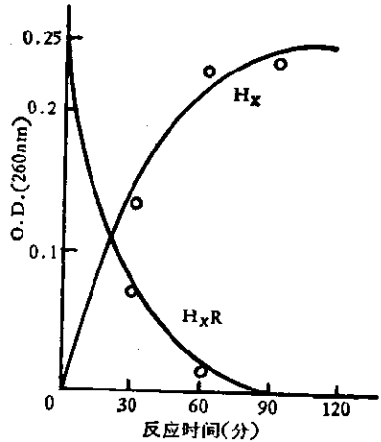
菌是腺嘌呤单缺陷型菌。因此 301 菌是经诱变后获得的一株新菌。具体见表 1。

二、301 菌的肌苷降解能力

根据对枯草杆菌嘌呤核苷酸生物合成途径的研究^[4,5],对 301 菌和 7171-9-1 菌对肌苷的降解能力进行比较。结果说明在 Tris 缓冲液中 7171-9-1 菌的肌苷降解能力比 301 菌强得多(见图 1a, b)。



(a, 301 菌)



(b, 9-1 菌)

图 1 二株菌对肌苷的降解能力

三、二株菌对肌苷酸的降解

试验结果说明,301 菌将肌苷酸降解成一定量的肌苷,而 9-1 菌却将肌苷酸降解成次黄嘌呤,进一步证明了 9-1 菌降解肌苷的能力很强。

图 2 表明,301 菌是腺嘌呤单缺陷型菌,但

表 1 7171-9-1 菌与 301 菌的生长谱

菌株号	7171-9-1	301
生长结果		
培养基		
基本培养基	不生长	不生长
加腺嘌呤和硫胺素的基本培养基	在加腺嘌呤和硫胺素之间的地方长菌	只在加腺嘌呤的地方长菌

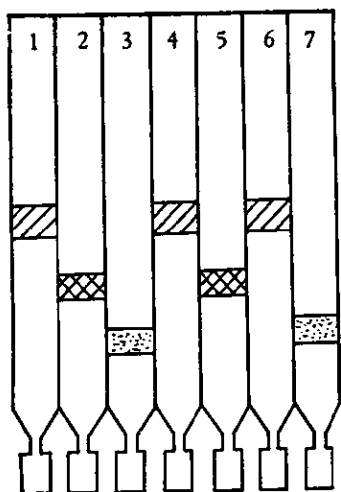


图2 二株菌降解肌苷酸的图谱

图中1为IMP标准品;2为HxR标准品;3为Hx标准品;4为301菌反应液0分钟样品;5为301菌反应后样品;6为9-1菌反应液0分钟样品;7为9-1菌反应后样品。

它使肌苷的产量提高一倍。这是由于7171-9-1菌的肌苷降解能力比301菌的强,它可将IMP降解后的肌苷继续降解为次黄嘌呤,而301菌的肌苷降解能力弱,因此301菌比9-1菌容易积累肌苷。根据Ishii,K.,等报道^[6],抗8-杂氮鸟嘌呤突变体能消除AMP对PRPP转酰胺酶,S-AMP裂解酶及IMP合成酶的阻遏作用,进而提高肌苷产量。301菌是否亦属抗-8杂氮鸟嘌呤的突变体还有待进一步证实。

四、301菌的稳定性

将4℃冰箱中保藏2个月和5个月的斜面,转接至第13代后活化接种至摇瓶发酵,肌苷产量在17g/L左右。经新市味精厂和前进制药厂试生产,8个月来肌苷产量始终在10g/L以上。

五、301菌摇瓶发酵的结果

将第11代的活化斜面(30℃,24小时),接入种子培养基培养(30℃,18小时)。培养好后将菌液以5%接种量接入发酵培养基,36℃培养。测定项目及发酵结果见图3。

结果表明,肌苷产量在发酵60小时最高。菌体生长浊度36小时最高。pH值48小时后

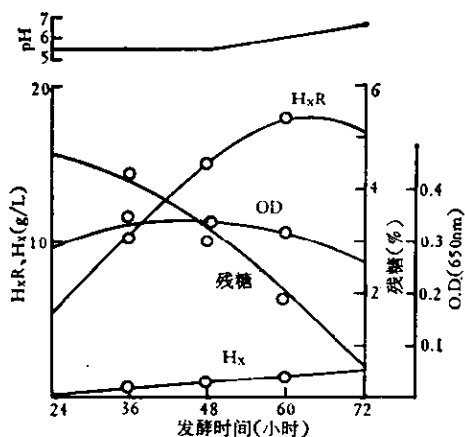


图3 摇瓶发酵结果

逐渐上升。

六、二株菌实验室发酵水平的比较

将二株菌分别按前述发酵条件进行试验,结果9-1菌肌苷产量为8.5g/L,301菌为17.8g/L。

七、16L玻璃罐和中型试验的发酵水平

16L玻璃罐定容12L,接种量5%,种龄18小时,罐温36℃,罐压0.6kg/cm²,通气量1:0.5(V/V),搅拌转速616转/分。用NaOH控制发酵液pH在5.8—6.2,经多罐重复发酵66小时肌苷产量达12.5g/L。

500L罐定容350L,二级种子罐为50L罐,34℃培养8—10小时,其他条件同玻璃罐。发酵50小时左右肌苷产量在10g/L以上,66小时可达13.7g/L。

将301菌和9-1菌分别用工业葡萄糖作碳源进行1700L罐的试验,定容1200L,条件同500L罐。结果301菌的肌苷产量可达14g/L,9-1菌为6.8g/L。

通过中试以后,301菌在8000L和15000L罐中进行试生产,肌苷产量均在10g/L左右。为了更广泛的适应工业化生产的要求,用水解糖在8000L罐内进行发酵试验,发酵42和54小时肌苷产量分别为8.8g/L和11.3g/L。试验证明水解糖可用作肌苷发酵的生产。

参 考 文 献

- 【1】 中国科学院生物化学研究所、中国科学院上海植物生理研究所、上海市工业微生物研究所、上海味精厂：微生物学报，**13**(2)：136--141，1973。
- 【2】 Aoki, R.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**(4)：387—396, 1963.
- 【3】 Fujimoto, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**(3)：249—259, 1965.
- 【4】 Nishikawa, H.: *J. Biochemistry*, **63**(2)：149—155, 1968.
- 【5】 Matsui, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **43**(6)：1317—1323, 1979.
- 【6】 Ishii, K.: *ibid*: **36**(9)：1511—1522, 1972.