

枯草杆菌 JSIM-1018糖代谢突变株积累 D-核糖研究

邓崇亮 柏建新 许涛 罗先勇

(江苏省微生物研究所 无锡 214063)

摘要 从收集的 *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* 等属菌种中进行 D-核糖产生菌的筛选, 对其中 *Bacillus* SM-18 菌株用紫外线和甲基磺酸乙酯诱变, 选育到莽草酸营养缺陷型突变株 JSIM-1018。发酵产物经物理、化学鉴定为 D-核糖。某些有机氮源如酵母粉、玉米浆、牛肉膏、蛋白胨以及某些芳香族氨基酸对突变株积累 D-核糖有促进作用。在以葡萄糖为碳源的培养液中, 摇瓶发酵 D-核糖最高可达 92g/L, 3000L 发酵罐中试 D-核糖最高可达 81.75g/L, 平均在 64g/L 以上, 葡萄糖基本耗尽。

关键词 D-核糖, 糖代谢, 突变株

D-核糖是微生物体内核糖核酸的组成成份, 又是还原型诱导物, 在生理上是十分重要的物质。在工业上是维生素 B₂ 的重要合成原料。近来, D-核糖作为调味品、调味香精等合成原料, 在食品工业方面应用广泛。制造廉价的 D-核糖, 在工业上具有深远的意义。

Simonart 和 Godin 第一次报道了 D-核糖发酵^[1], Suzuki 等报道了一株细菌在高浓度金属如 Mn²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺ 存在时积累 D-核糖^[2]。Sait 和 Sugiyama 报道了 *Pseudomonas* 积累 D-核糖^[3]。在这些报道中所用的微生物都是野生型菌株。1971 年 Sasajima 等报道了一株糖代谢突变株, 在培养液中积累 D-核糖 35mg/ml^[4]。此后, Sasajima 等又报道一突变株, 能积累 D-核糖 72mg/ml^[5]。

从本所保藏以及所内外收集的 *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* 等不同类型的细菌中, 发现三株能积累少量 D-核糖的菌株, 均为 *Bacillus* 属。从中选择一株, 再经诱变选育, 获得一株编号为 JSIM-1018 菌株, 摇瓶试验 D-核糖积累量可达 92mg/ml, 3000L 发酵罐中试, D-核糖积累量最高可达 81.75mg/ml。有关 D-核糖微生物发酵, 国内未见报道。

1 材料和方法

1.1 菌种

三株 *Bacillus* SM-7, SM-8, SM-18。其中 SM-18 菌株 D-核糖积累量最高 6.35mg/ml, 其余二株不足 3mg/ml。

1.2 培养基

斜面培养基、基本培养基、完全培养基成份见文献 [6], 根据需要稍加改动。

种子培养基 (%): 葡萄糖 2, 玉米浆 2, K₂HPO₄ 0.3, KH₂PO₄ 0.1, pH7.0。

发酵培养基 (%): 葡萄糖 20, 玉米浆 2.5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MnSO₄ 0.005, CaCO₃ 2, pH7.0。

种子培养基用 500ml 三角瓶, 装液量 30ml, 1 × 10⁵Pa 灭菌 20min。发酵培养基用 500ml 三角瓶, 装液量 20ml, 1 × 10⁵Pa 灭菌 10min。

1.3 菌种诱变

采用常规方法用甲基磺酸乙酯 (EMS) 或紫外线照射。把在基本培养基上不能生长, 而在含有莽草酸成份的基本培养基上生长的菌落挑

国家科委“八五”攻关项目的部分研究结果。

河南新乡制药厂张强、魏志华、买文超、赵乃渠等同志参加部分工作

1996-11-10 收稿

出,获得莽草酸营养缺陷型。

1.4 发酵试验

1.4.1 摇瓶发酵: 36℃ 往复式摇床(冲程 7cm, 频率 108r/min)培养 24h, 以 10% 的量接入发酵培养基, 38℃ 培养 72h, 测定 D-核糖含量。

1.4.2 发酵罐中试

菌种活化用茄子瓶 5 只, 培养温度同摇瓶发酵。

种子罐系不锈钢制, 标准型罐, 转速 300r/min, 容积 300L, 装液量 200L。发酵罐系不锈钢制, 标准型罐, 转速 180r/min, 六弯叶搅拌二组, 容积 3000L, 装液量 2000L。

发酵风量: 24h 前 1:0.15, 24h 后 1:0.5, 测定 CO₂ 量过高时, 可适当提高通风量。

1.5 测定方法

1.5.1 菌体生长: 用 721 型分光光度计波长 660nm 处光吸收。

1.5.2 D-核糖含量: 把 D-核糖测定的苔黑酚法作了改动, 用铜离子代替铁离子进行催化, 使反应的灵敏度提高一倍以上。

1.5.3 残糖测定: 按照 Washko 和 Rice 的方法。

1.6 纸层析溶剂系统

异丁醇:吡啶:醋酸:水 = 12:6:1:4

苯酚:水 = 4:1

正丁醇:醋酸:水 = 4:1:1

2 结果

2.1 SM-7, SM-8, SM-18 三株菌种发酵产物的鉴定

在收集到的不同种属的细菌中, 发现三株菌 SM-7, SM-8, SM-18, 其发酵液经纸层析分离、显色, 在 D-核糖部位有一明显的紫红色斑点。为了确定积累产物的性质, 对培养液内的产物进行化学提纯和结晶。经化学和物理特性、红外光谱分析, 与标准的 D-核糖一致(表 1)。

发酵液经阴阳离子脱盐、活性炭脱色、浓缩, 配制 10% 酒精溶液, 经氢化、偶合、环合、精制得黄色晶体, 经鉴定为维生素 B₂。因此, SM-7, SM-8, SM-18 三菌株发酵产物为 D-核

糖。

表 1 *Bacillus* 属菌株 SM-7, SM-8, SM-18 发酵产物鉴定

材料	颜色反应	熔点(℃)	Rf 值		
			1	2	3
SM-18	紫红	86-87	0.412	0.641	0.254
SM-8	紫红	86-87	0.415	0.638	0.255
SM-7	紫红	86-87	0.410	0.640	0.256
D-核糖	紫红	86-87	0.408	0.650	0.252

2.2 突变株的遗传标记和 D-核糖产量

用 SM-18 菌株作为出发菌株, 进行诱变选育。经 EMS 处理后, 得到二株莽草酸营养缺陷型 JSIM-1017, JSIM-1018。以后又反复用紫外线诱变处理, D-核糖产量逐步提高。JSIM-1018 突变株培养 72h 后, 积累 D-核糖 55mg/ml, JSIM-1017 积累 D-核糖 35mg/ml, JSIM-1018 突变株发酵液纸层析检查时, 除 D-核糖外, 无其他副产物, 葡萄糖基本耗尽。在工业生产上这是非常有意义的。

2.3 不同氮源对 JSIM-1018 突变株积累 D-核糖的影响

微生物发酵 D-核糖过程中, 除菌种本身特性外, 培养基中的芳香族氨基酸: 酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸的量对 D-核糖发酵至关重要^[7]。这些氨基酸过量时, 发酵形成过多的副产物葡萄糖酸, 造成产物提取时的麻烦。芳香族氨基酸不足, D-核糖积累量过低。所以有机氮源的选择和配比显得特别重要。一些有机氮源如酵母粉、玉米浆、牛肉膏、蛋白胨等以及添加某些芳香族氨基酸、莽草酸对 D-核糖的形成有一定的促进作用(表 2)。酵母粉与玉米浆的适度配

表 2 有机氮源对菌株 JSIM-1018 发酵 D-核糖的影响

有机氮源	D-核糖形成量(mg/ml)		
	0.5%*	1.0%	0.5%+A
酵母粉	68.66	51.78	73.32
玉米浆	52.62	64.44	75.52
酵母膏	44.71	43.33	41.67
牛肉膏	35.66	52.36	40.83
蛋白胨	34.67	42.58	38.71
豆饼水解液	28.67	32.35	28.81

*: 有机氮源浓度

A: 苯丙氨酸 50μg/ml, 莽草酸 50μg/ml 混合液。

比效果更好(表3)。

表3 不同配比的酵母粉 玉米浆对D-核糖发酵的影响

酵母粉(%)	玉米浆(%)	D-核糖(mg/ml)
0.1	1.0	35.18
0.1	1.4	45.25
0.1	1.8	53.37
0.1	2.2	64.13
0.1	2.6	70.25
0.1	3.0	67.43
0.2	1.0	50.48
0.2	1.4	68.35
0.2	1.8	75.85
0.2	2.2	80.82
0.2	2.6	92.98
0.2	3.0	73.32

2.4 JSIM-1018 突变株 D-核糖发酵过程

JSIM-1018突变株在3000L发酵罐中试时,所用的碳源为玉米粉经双酶法制得的酶解糖为主。

发酵初期,菌体繁殖OD增长较快,pH比较稳定,一般在6.6左右,发酵至40h,pH开始下降至6.0直至发酵结束。发酵至18h后葡萄糖消耗较快,开始有少量D-核糖积累。当菌体生长到稳定期(40h左右)D-核糖开始大量积累,发酵到66h,层析纸上葡萄糖斑点已基本消失,只留下一个D-核糖斑点,D-核糖积累81.75g

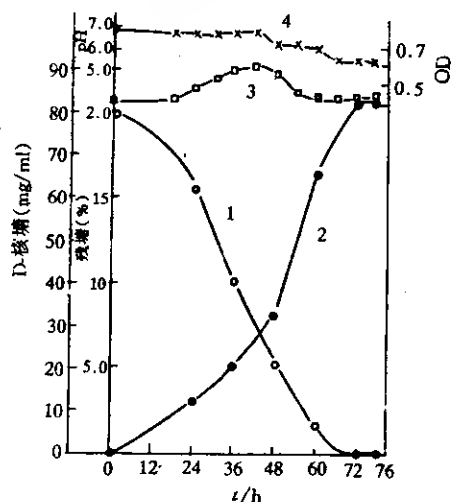


图1 JSIM-1018突变株3000L发酵罐 D-核糖发酵过程

1. 残糖, 2. D-核糖, 3. OD, 4. pH

/L,无别的副产物,毋需再进行除葡萄糖处理。二氧化碳排出量,12h前较少,以后逐渐增多,40h达到最高峰(15%)以后又逐渐减少。3000L发酵罐中试发酵过程与结果见图1,表4。

表4 3000L罐五罐批发酵结果

罐批	碳源类别	糖浓度 (%)	D-核糖 (g/L)	发酵时间 (h)
1	双酶法糖	18.50	81.75	70
2	双酶法糖	18.10	70.75	72
3	酸水解糖	16.30	54.86	78
4	酸水解糖	17.45	53.43	81
5	工业葡萄糖	18.10	60.04	78
平均		17.68	64.16	75.8

2.5 发酵过程中菌体形态

JSIM-1018突变株在300L种子罐和3000L发酵罐的生长、代谢过程中,形态发生十分有趣的变化,菌体分裂过程中排列呈数字型及锁状结构,在显微镜视野里仔细观察,出现阿拉伯数字1~9的各种字型形态。特别在发酵过程中,各种排列的状态会出现周期性的变化。日本学者^[8]通过对D-核糖产生菌细胞表层结构变化的研究指出,细胞形态从杆状变成锁状,数字型结构的形态是缺失转酮醇酶突变株的一种表现型,当从缺失转酮醇酶变异株中分离出回复突变株时,细胞形态仍然回复到杆状形态而失去了锁状、数字型结构的形态特征。JSIM-1018菌株是一株莽草酸营养缺陷型,在发酵过程中的形态特征与文献报道一致。

3 讨论

D-核糖是非常重要的生物物质,它是RNA以及包括许多辅酶在内的核苷衍生物的构成成份。通常核糖与磷酸在体内一起运转,具有十分重要的生理作用。D-核糖可以从天然物中提炼,也可以从D-葡萄糖等物质化学合成。由于D-核糖可以作为维生素B₂的合成原料,因此,微生物发酵法制备的廉价D-核糖在工业上具有极其深远的意义。

本文论述的是微生物发酵法制备D-核糖。我们知道,在生物合成途径中,缺失各种生物合成途径的突变株能在培养基中积累中间代谢产

物,根据这一原理,可以成功地找到一些有用的突变株。D-核糖产生菌是戊糖磷酸化途径非氧化支路上的突变株,用遗传育种方法获得的JSIM-1018糖代谢突变株是一株莽草酸营养缺陷型突变株,其营养要求简单,遗传性能稳定,发酵条件粗放。在培养过程中JSIM-1018突变株对玉米浆没有特殊要求,在一定的培养条件下除D-核糖产物外,无其它副产物。发酵产物单一,有利于后提取。

JSIM-1018突变株在D-核糖发酵过程中,菌体形态从杆状变成数字型,锁状结构形态是菌株缺失转酮醇酶的一种表现型。不少学者^[8]通过对糖代谢突变株细胞表层结构变化的研究后指出:转酮醇酶不仅是糖代谢的酶,而且还是与芳香族氨基酸的合成以及细胞表层结构有关的酶。

JSIM-1018突变株在发酵过程中,D-核糖积累是在微生物充分生长以后,大约发酵40h细胞生长达到稳定期。以后,细胞逐渐老化,

向培养基分泌大量的D-核糖,66~72h达到最大值。

在D-核糖发酵过程中,戊糖磷酸的浓度以及戊糖磷酸单酯酶的性质与D-核糖积累有关,这方面的工作,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Simonart P., Godin P. Bull Soc Chem Belg, 1951, 60: 446.
- [2] Suzuki T, Tanaka N, Tomita F. *et al.* J Gen Appl Microbiology, 1963, 9: 457.
- [3] Saito N, Sugiyama S. Agr Biol Chem, 1966, 30(9): 841~849.
- [4] Sasajima K, Yoneda M. Agr Biol Chem, 1971, 35(4): 509~517.
- [5] 笹島貴一公开特许公报, 1975, 51-79782.
- [6] Sasajima K, Nogami I, Yoneda M. Agr Biol Chem, 1970, 34(3): 381~389.
- [7] 服部喜代次, 公开特许公报, 1976, 51-57884.
- [8] アミノ酸, 核酸集谈会编. 核酸发酵, 日本株式会社讲谈社, 东京, 1976, 190~195.