

文章编号:1673-1689(2005)05-0021-04

鸟嘌呤核苷补料发酵条件研究

杜郭君, 张一平, 王红连, 朱晓宏, 柏建新, 邓崇亮

(江苏省微生物研究所有限公司, 江苏 无锡 214063)

摘要: 采用新菌株 *Bacillus subtilis* JSIM-518, 在 22 L 自控发酵罐上进行不同补料方式和所补原料的发酵研究. 酵母粉连续补料, 对鸟苷积累不甚明显, 应用指数函数补料方式, 匀速补入 RNA 和腺嘌呤物质, 添加速率 K 值显得非常关键, 当 $K=0.16$ 时积累鸟苷最高, 积累质量浓度为 34.14 g/L, 高于和低于此值时, 鸟苷的积累量都呈递减的趋势.

关键词: 鸟苷; 发酵; 函数补料; 连续补料

中图分类号: TQ 924

文献标识码: A

Studies on Feeding Condition of Guanosine Fermentation

DU Guo-jun, ZHANG Yi-ping, WANG Hong-lian, ZHU Xiao-hong,

BAI Jian-xin, DENG Chong-liang

(Jiangsu Microbiology Research Institute Co., Ltd, Wuxi 214063, China)

Abstract: With the stain of guanosine producer, *Bacillus subtilis* JSIM-518, the feeding conditions was studied on a 22-liter auto-fermentor by using various supplement nutrients and feeding ways. The guanosine production did not change by the continuous feeding yeast powder. By the exponentially feeding with RNA or adenine, the highest concentration of guanosine reached 34.14 g/L when setting an optimal constant K at 0.16. When a higher or lower K was selceted, the guanosine concentration decreased.

Key words: guanosine; fermentation; function feeding; continuous feeding

鸟嘌呤核苷(简称鸟苷)在医药工业上的主要用途是作为合成三氮唑核苷、无环鸟苷的中间体. 鸟苷大量应用于食品工业上, 是呈味核苷酸鸟苷酸二钠的主要原料, 与肌苷酸二钠混合简称 I+G, 具有十分广阔的市场.

国内外有关微生物生产鸟苷已有很多研究^[1,2], Hiroshi Matsui 等^[3,4]报道从肌苷产生菌株 *Bacillus subtilis* 分别诱变出蛋氨酸亚砷、磺胺胍、德夸菌素等的抗性菌株 MG-1, 在生产罐上产鸟苷. 嘌呤类碱基对鸟苷产生菌关键酶的抑制以及抗性

药物对酶作用机制等等作了详细研究^[5]. 我国从 20 世纪 80 年代就开始鸟嘌呤核苷类产品的研究工作^[6]. 柏建新等以一株肌苷产生菌为亲株诱变获得产鸟苷的菌种, 鸟苷产量超过 20 g/L^[7,8]. 作者着重对该菌株不同补料成分和不同补料方式的发酵过程优化研究.

1 材料与方法

1.1 菌种

鸟苷产生新菌株编号 JSIM-518, 菌株遗传标

收稿日期: 2004-09-16; 修回日期: 2004-12-16.

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2004BA713B05-09)资助课题.

作者简介: 杜郭君(1977-), 男, 江苏宜兴人, 研究实习员, 工学学士.

记: Ade⁻、His⁻、Thi⁻、Dea⁻、GMPred⁻。

1.2 培养基

斜面培养基、种子培养基、发酵培养基的制备参见文献[8]。

1.3 分析方法

pH 测定: 用 pH 计测定; 还原糖测定: 斐林氏定糖法; 生长 OD 值测定: 种子样品稀释 20 倍, 发酵液稀释 80 倍, 用 721 分光光度计, 在波长 660 nm 处测定光密度值(OD); 溶氧测定: 溶氧电极在线测定相对值; 鸟苷含量测定^[8]。

1.4 发酵试验

斜面种子经 24 h 活化培养后接入摇瓶种子培养基中, 往复式摇床 108 r/min, 37 ℃ 下培养 9 h, 接种量以 10% 接入 22 L 发酵罐(C15-3, Braun)中, 发酵培养基总体积 15 L。用氨水控制 pH 于 6.5, 37 ℃ 培养 54 h 左右。pH 值、溶氧、转速、温度、补料、灭菌等均自动控制。

2 结果与讨论

2.1 酵母粉连续补料对鸟苷积累的影响

酵母粉是鸟苷产生菌的腺嘌呤源, 也是鸟苷发酵重要氮源。在自控罐中, 发酵 10 h 后开始按表 1 的 3 种方式进行酵母粉连续补料, 至 20 h 补完。结果发现无论补料与否, 鸟苷积累无明显差别。原因可能是酵母粉本身类似缓释物质, 只有当酵母粉被鸟苷产生菌分解利用后才能获得所需嘌呤类物质, 即使酵母粉一次投入, 未被菌体利用部分, 其碱基类物质不会释放到培养基内, 因此酵母粉的量对鸟苷发酵无明显影响。

表 1 酵母粉连续补料方案及发酵结果

Tab. 1 The result of continuous feeding of yeast powder

试验方案	底料酵母粉质量分数/%	补料酵母粉质量分数/%	鸟苷质量浓度/(mg/mL)	糖转化率/%
1	1.6	0	27.45	22.88
2	0.8	0.8	26.84	22.37
3	0.6	1.0	27.66	23.05

2.2 RNA 补料对鸟苷积累的影响

用 RNA 代替酵母粉作为鸟苷产生菌的腺嘌呤源, RNA 自发酵 10 h 向自控罐中匀速补料, 至 20 h。补料方式及发酵结果见表 2。

表 2 显示, RNA 补料鸟苷的积累量明显高于对照, 最高增幅为 51.69%, 但鸟苷产量稍低于酵母粉的结果。RNA 作为腺嘌呤源和酵母粉相比, 显然更易被菌体利用。这可能是补料时间与用量掌握不

佳, 不能说明 RNA 作用不如酵母粉。表 2 中鸟苷积累量随底料中的 RNA 减少而增加, 这可能与培养基中腺嘌呤物质过量有关。鸟苷发酵是典型代谢控制发酵, *B. subtilis* JSIM-518 菌株是一株典型的生化突变株, 完全丧失合成腺嘌呤能力的腺嘌呤营养缺陷型, 缺失 SAMP 合成酶和 GMP 还原酶, 其生长必须加入外源腺嘌呤, 否则不能生长。因此, 用腺嘌呤限量来控制鸟苷发酵变得非常重要。腺嘌呤过量, 突变株会象原养型(Prototroph)那样, 动用代谢反馈抑制和阻遏机制而不积累中间代谢产物, 如 AMP、GMP 强烈抑制、阻遏核酸代谢途径上的第一个酶 PRPP 转酰胺酶, 以及 SAMP 裂解酶、IMP 转甲酰胺酶等等, 鸟苷不可能积累。腺嘌呤限量在亚适量水平, 最大限度解除或减弱腺嘌呤对代谢途径关键酶的抑制和阻遏, 才能过量积累鸟苷^[10]。因此补料过程中用量和补料时间, 显得更为重要。

表 2 RNA 补料发酵结果

Tab. 2 The results of feeding RNA

试验方案	底料 RNA 质量分数/%	补料 RNA 质量分数/%	鸟苷质量浓度/(mg/ml)	糖转化率/%
1	0.30	0	16.52	13.77
2	0.15	0.15	19.65	16.38
3	0.10	0.20	22.38	18.65
4	0.05	0.25	25.06	20.88

2.3 指数函数式补料试验

鸟苷产生菌是一株腺嘌呤营养缺陷型突变株, 必须在不明显抑制菌体生长的范围内, 尽量降低培养基中腺嘌呤的浓度。通过限制腺嘌呤的添加量, 使细胞内的主要控制因子腺嘌呤类碱基, 保持在不能引起反馈调节的浓度, 从而有利于鸟苷的积累。这个浓度应该是随着培养时间而变化, 细胞繁殖增多, 添加物的浓度随着变大。日本学者^[11]认为添加速率是微生物培养时间的指数函数关系, 即 $F(t) = F(0)\exp(kt)$ ($k \neq 0$); $\{F(t) = F(0) \times e^{(kt)}\}$; $F(t)$ 为添加开始后某个时间 t 时的添加速度; $F(0)$ 为添加开始时 ($t = 0$) 的添加速度; k 为常数。 Ad_{in} 为添加开始时发酵液中腺嘌呤的物质的量; 至时间 t_{end} 时所加含腺嘌呤物质总量为 Ad_{total} 以下式表示:

$$Ad_{total} = \frac{F(0)}{k} \{ \exp(kt_{end}) - 1 \} + Ad_{in}$$

用 RNA 作为腺嘌呤类添加物, 总量为 0.3%, 发酵 0 h 添加 0.03%, 其余 0.27% RNA 按 $F(t) = F(0) \times e^{(kt)}$ 计算出每小时添加的量。第一次添加时间根据菌体情况而定, 一般控制在整个发酵过程中菌体生长 OD₆₆₀ 为最高数的 1/5 时, 发酵时间约为 8

h 添加,以后每小时添加一次,直至添加完毕.

k 值分别设为 0.04、0.06、0.08、0.12、0.16、0.18、0.20,然后进行试验.添加方式(以 $k=0.12$ 为例)见表 3.

表 3 $k=0.12$ 时腺嘌呤类添加物 RNA 的添加方式
Tab. 3 The results of feeding RNA as adenine resource when k was set at 0.12

补料 时间	补料 质量分数/%	补料 体积/mL	补料 质量/g
8	0.003 382	5.073 736	0.507 374
9	0.003 814	5.720 621	0.572 062
10	0.004 300	6.449 982	0.644 998
11	0.004 848	7.272 335	0.727 233
12	0.005 466	8.199 535	0.819 953
13	0.006 163	9.244 949	0.924 495
14	0.006 949	10.423 65	1.042 365
15	0.007 835	11.752 63	1.175 263
16	0.008 834	13.251 06	1.325 106
17	0.009 960	14.940 53	1.494 053
18	0.011 230	16.845 40	1.684 540
19	0.012 662	18.993 13	1.899 313
20	0.014 276	21.414 70	2.141 470
21	0.016 097	24.145 00	2.414 500
22	0.018 149	27.223 41	2.722 341
23	0.020 463	30.694 31	3.069 431
24	0.023 072	34.607 74	3.460 774
25	0.026 013	39.020 12	3.902 012
26	0.029 330	43.995 06	4.399 506
27	0.037 155	55.732 50	5.573 250
合计	0.27	405.000 4	40.500 04

表 4 是根据不同的添加速率,即不同的 K 值计算出每次添加的 RNA 量的试验得出的鸟苷发酵结果.

表 4 RNA 不同添加速率对鸟苷积累的影响
Tab. 4 The effect of various feeding speed of RNA on guanosine accumulation

试验	RNA 添加 速率 k	补料 次数	添加完成 时间/h	鸟苷质量浓度/ (mg/mL)
对照	RNA 一次加入	0	0	16.52
1	0.04	39	47	17.73
2	0.06	31	39	23.05
3	0.08	26	32	28.53
4	0.12	20	28	32.55
5	0.16	17	25	34.14
6	0.18	15	23	29.67
7	0.20	14	22	27.46

结果显示, RNA 不同的添加速率对鸟苷的积累影响很大,试验 5 所提供的速率符合腺嘌呤缺陷

型细胞在生长和代谢中所需的腺嘌呤物质的动态平衡,即这个浓度不引起代谢的反馈抑制和阻遏,对菌体的生长也无明显抑制,所以积累的鸟苷明显高于别的添加速率.

2.4 腺嘌呤指数函数补料对鸟苷积累的影响

考虑到实际应用中 RNA 的价格问题,每吨发酵液 RNA 用量 3 kg,成本 300 元以上,20 t 发酵罐则每罐批 RNA 成本需要 5 000 元.改为直接用腺嘌呤,确定总质量分数为 0.03%,即每吨发酵液用量 300 g,成本在 100 元以内,20 t 发酵罐每罐批腺嘌呤成本控制在 1500 元左右.并根据 RNA 实验中采用的最适 K 值 0.16 进行试验.方式见表 5,腺嘌呤指数函数补料 3 次试验结果见表 6.

表 5 $K=0.16$ 时腺嘌呤补料方式
Tab. 5 The results of feeding adenine when setting K at 0.16

补料 时间/h	补料质量分数/ %	补料 体积/mL	补料 质量/g
0~7(底料中)	0.003 00	45.00	0.450 0
8	0.000 35	5.28	0.052 8
9	0.000 41	6.20	0.061 2
10	0.000 49	7.27	0.072 7
11	0.000 57	8.53	0.085 3
12	0.000 67	10.01	0.100 1
13	0.000 78	11.75	0.117 5
14	0.000 92	13.79	0.137 9
15	0.001 08	16.18	0.161 8
16	0.001 27	18.99	0.189 9
17	0.001 49	22.29	0.222 9
18	0.001 74	26.16	0.261 6
19	0.002 05	30.69	0.306 9
20	0.002 40	36.02	0.360 2
21	0.002 82	42.27	0.420 0
22	0.003 31	49.60	0.496 0
23	0.003 88	58.21	0.582 1
24	0.002 78	41.73	0.417 33
合计	0.027	405	4.05

表 6 腺嘌呤补料发酵鸟苷试验结果
Tab. 6 The results of guanosine fermentatin by feeding adenine

罐批	腺嘌呤添加 速率/ K	补料 次数	补料完成 时间/h	鸟苷质量浓度/ (mg/mL)
对照	一次性加入	0	0	15.68
1	0.16	17	25	33.38
2	0.16	17	25	34.55
3	0.16	17	25	34.71

3 结 论

对鸟苷产生菌 *B. subtilis* JSIM-518 突变株发酵进行连续补料和函数补料试验,发现酵母粉和 RNA 发酵补料有不同的结果. 酵母粉补料对鸟苷积累无明显差别. RNA 补料与一次性补入对鸟苷的积累有明显提高,提高幅度最高为 51.69%,但鸟苷积累低于酵母粉发酵,可能是 RNA 补料时间与用量掌握不佳.

采用函数补料方式,补入原料为 RNA 和腺嘌呤,发现原料的添加速率 K 对鸟苷的积累非常重要, RNA 添加速率 $K=0.04$,鸟苷积累量为 17.73 mg/mL, $K=0.16$ 时鸟苷积累量为 34.14 mg/mL,增加近 1 倍,低于或高于此 K 值均呈下降趋势.用腺嘌呤代替 RNA 进行函数补料发酵鸟苷,鸟苷产量略有提高,且降低了成本. 函数补料是提高代谢调控型发酵产率的一种有效方式.

参考文献:

[1] I Nogami, M Kida, T Iijima, *et al.* Study of the Fermentative Production of Purine Derivatives[J]. *Agr Biol Chem*, 1968, 32:144.

[2] M Kida, M Yoneda. Purine nucleoside accumulation pattern[J]. *J Biochem*, 1969, 66:487.

[3] H Matsui, K Sato, H Enei, *et al.* Production of guanosine by sulfaguanidine resistant mutants of *Bacillus subtilis*[J]. *Agr Biol Chem*, 1978, 42(2):637—641.

[4] 松井裕. 用枯草杆菌变异株生产鸟苷的研究[J]. 日本农艺化学会志, 1984, 58(2):175—180.

[5] Hiroshi Matsui, K Sato, H Enei, *et al.* Guanosine production and purine nucleotide biosynthetic enzymes in guanosine-producing mutants of *Bacillus subtilis*[J]. *Arg Biol Chem*, 1979, 43(6):1317—1323.

[6] 陈学旺, 邓崇亮, 王梦鹤, 等. 鸟苷酸产生菌的选育[J]. 工业微生物, 1982(2):10—13.

[7] 柏建新, 邓崇亮. 产鸟苷的枯草杆菌缺失 GMP 还原酶突变株的选育[J]. 生物技术, 1997, 7(3):25—28.

[8] 柏建新, 朱晓宏, 张一平, 等. 从一株肌苷菌选育出高产鸟苷菌株的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(5):19—24.

[9] 汤生荣, 王景玉, 刘志河. 利用补料分批培养技术提高鸟苷产量[J]. 工业微生物, 1992, 22(2):5—10.

[10] A H Rose. Primary Products of Metabolism[M]. London, England Academic Press INC, 1978. 187—208.

[11] Y Sumino, Koji Sonoi, M Doi. Method of producing guanosine by fermentation [P]. UK Patent Application; GB2101131A.

(责任编辑:朱 明)

刊 物 更 名 启 事

经国家新闻出版总署批准,《无锡轻工大学学报》正式更名为《食品与生物技术学报》。

《食品与生物技术学报》(双月刊)是教育部主管、江南大学主办的专业性学术期刊,主要刊发食品科学与工程,食品营养学,粮食、油脂及植物蛋白工程,制糖工程、农产品及水产品加工与贮藏,微生物发酵,生物制药工程等专业最新科研成果(新理论、新方法、新技术)的学术论文、试验报告、反映学科前沿研究动态的高质量综述文章,同时兼发动物营养与饲料工程、环境生物技术等方面的最新研究成果。本刊为全国中文核心期刊,中国科技核心期刊,中国期刊方阵双效期刊,目前被美国化学文摘(CA)等国内外 10 余家著名检索系统收录。

本刊读者对象:相关领域的专业技术人员,高等院校师生,科研院所、企事业单位的专业管理人员等。欢迎投稿、订阅、刊登广告。

《食品与生物技术学报》,A4(大 16K)开本,112 页,每册定价 12.00 元,全年 6 期 72.00 元;本刊邮发代号:29—79,全国各地邮局均可订阅。