

文章编号:1673-1689(2009)02-0279-05

原生质体紫外诱变选育鸟苷高产菌株

盛翠¹, 张一平², 陆茂林^{*1,2}

(1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省微生物研究所有限公司, 江苏 无锡 214063)

摘要:以一株鸟苷产生菌 *Bacillus subtilis* JSIM-G518 为出发菌株, 采用原生质体紫外诱变的方法, 选育具有核苷水解酶缺失, 磺胺胍, 德夸菌素、狭霉素 C 等抗性的突变株, 摇瓶的鸟苷产量达到 24.0 g/L, 比出发菌株提高了 30%。该突变株遗传性状稳定, 连续传代 10 次, 仍维持较高的鸟苷产量。

关键词: 鸟苷; 枯草芽孢杆菌; 原生质体; 诱变育种

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Study on Breeding up High-yield Strain of Guanosine by Protoplast Mutagenesis

SHENG Cui¹, ZHANG Yi-ping², LU Mao-lin^{*1,2}

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Institute of Microbiology Co., Ltd, Wuxi 214063, China)

Abstract: In this study, *Bacillus subtilis* JSIM-G518 was used as the parent strain to breed a high guanosine production strain. Under the optimum conditions of formation and regeneration of protoplasts, the protoplasts of *Bacillus subtilis* JSIM-G518 were prepared. A resistant mutant strain which have lack-nucleoside hydrolyase (NHase), sulfaguanidine (SG), decoyinine (Dec), psicofuranine (Psi) was obtained by UV irradiation of protoplasts. The production of guanosine was 24 g/L, was higher 30% than that of the parent strain. Further experiment confirms that *Bacillus subtilis* JSIM-GU-124-19 is a stable strain.

Key words: guanosine, *Bacillus subtilis*, protoplast, induced breeding

鸟苷作为多用途的核苷, 是抗病毒药物三氮唑核苷、无环鸟苷和食品增鲜剂 5'-鸟苷酸的合成原料, 在食品和医药工业中起着不可估量的作用^[1]。早在 20 世纪 60 年代, 日本就大规模开展了发酵法生产鸟苷的研究, 并取得了一系列成就, 进入了工业化生产规模。我国对鸟嘌呤系化合物的研究始于 20 世纪 80 年代^[2]。随着国内鸟苷市场需求量激增^[3], 随着越来越多的企业进入生产三氮唑核苷、

无环鸟苷和 5'-鸟苷酸发酵法生产鸟苷的研究也得到更广泛的重视。作者所用的出发菌株是作者所在实验室经紫外线诱变和化学诱变处理获得的突变株, 如果再重复使用常规诱变法来提高菌株的产苷能力, 将会受到较大的限制。70 年代以来, 原生质体技术迅速发展, 已成为工业微生物菌种选育的一种重要手段, 并取得了很大的成效。对原生质体直接进行诱变处理, 较一般常规诱变方法效果好, 且能在较

收稿日期: 2008-01-10

* 通讯作者: 陆茂林(1961-), 男, 安徽铜陵人, 研究员, 主要从事微生物制药方面的研究。Email: lumaolin@jsim.cn

短时间内较大幅度地提高菌种的变异率。利用原生质体技术选育鸟苷高产菌,国内还少有研究。

通过分析枯草芽孢杆菌的嘌呤生物合成途径及其代谢调控机制^[4]可知,鸟苷在核苷水解酶的作用下进一步代谢成为鸟嘌呤,致使鸟苷的产量降低。为了阻断发酵过程中所积累的鸟苷分解成鸟嘌呤,从而使得代谢产物单一,提高鸟苷的产量,利于发酵产物鸟苷的分离,所以选育完全缺失或部分缺失核苷水解酶活性的突变株对鸟苷发酵生产是非常有意义的。同时为了提高GMP合成酶和IMP脱氢酶的活力,解除AMP对SAMP裂解酶的反馈抑制^[5],还增加了磺胺胍,德夸菌素、狭霉素C等抗性,得到的突变株用于鸟苷的生产,其产量远高于出发菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌种 *Bacillus subtilis* JSIM-G518。

1.1.2 主要培养基

1) 斜面培养基:见文献[6]。

2) 基本培养基(g/dL):葡萄糖 0.5,柠檬酸钠 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.6, K_2HPO_4 1.4, MgSO_4 0.02, MnSO_4 0.001, FeSO_4 0.001, 琼脂 2.0;腺嘌呤 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 组氨酸 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, VB_1 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.2。

3) 再生基本补充培养基:见文献[6]。

4) 高渗完全培养基:见文献[6]。在斜面培养基集中加入蔗糖 0.5 mol/L; MgCl_2 20 mmol/L; 顺丁烯二酸 20 mmol/L。

5) 无糖基本培养基(g/dL): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, KH_2PO_4 0.6, K_2HPO_4 1.4, MgSO_4 0.02, MnSO_4 0.001, FeSO_4 0.001, 谷氨酸钠 0.1, 腺嘌呤 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 鸟苷 10.0 mg/mL, 组氨酸 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; VB_1 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 琼脂 2.0, pH 7.2。

6) 种子培养基(g/dL):葡萄糖 2.0, 酵母膏 1.0, 蛋白胨 1.0, 玉米浆 1.0, 尿素 0.2, 氯化钠 0.25; pH 7.2。

7) 发酵培养基(g/dL):葡萄糖 10.0, 酵母粉 1.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5, MgSO_4 0.4, KH_2PO_4 0.2, CaCl_2 0.2, CaCO_3 2.0; 玉米浆 1.7 mL/dL; pH 7.0~7.2。

1.1.3 主要试剂

1) 0.1 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液; 高渗缓冲液(于 0.1 mol/L、pH 6.0 磷酸缓冲液中加入 0.5 mol/L 蔗糖); 原生质体稳定液(SMM 缓冲液)^[7];

酶试剂的配制见文献[7]。

1.2 实验方法

1.2.1 最小抑制质量浓度的选择 配制含不同质量浓度药物的平板,将出发菌株的菌悬液稀释到合适的质量浓度后涂布于药物平板。将涂菌平板置于培养箱内培养 3 d,选择完全抑制鸟苷产生菌生长的最小药物质量浓度。

1.2.2 原生质体的制备 见文献[5]。

1.2.3 原生质体的再生 见文献[5]。

1.2.4 原生质体诱变 将原生质体悬浮于培养皿内进行紫外诱变,诱变条件为:紫外灯功率 15 W,照射距离 30 cm。照射至所需时间后,离心,用 SMM 缓冲液适当浓缩,系列稀释适当浓度,然后涂于再生基本补充培养基的平板上。同时,以非诱变再生平板为对照,进行致死率的测定^[7]。

计算原生质体的致死率:原生质体致死率=

$$\frac{D-E}{D} \times 100\%$$

其中:D为再生培养基平板上菌落数;E为诱变处理后再生培养基平板上菌落数。

1.2.5 核苷水解酶活力丧失突变株的筛选 将再生平板上长出的菌落用灭过菌的牙签分别对应点接于基本培养基和无糖基本培养基上,32 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,挑出在基本培养基上生长而在无糖基本培养基上不生长的菌落,即为核苷水解酶活力完全或部分丧失的突变株,然后进行摇瓶发酵筛选。

1.2.6 鸟苷抗性突变株的筛选 将上述突变株进行诱变,将再生平板上长出的菌落用灭过菌的牙签对应点接于含有抗性药物的基本培养基上,32 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,挑出在抗性基本培养基上生长的菌株,进行摇瓶发酵筛选^[8]。

1.2.7 分析方法 见文献[6]。

2 结果与分析

2.1 原生质体的形成及再生

在对 *Bacillus subtilis* JSIM-G518 的生长曲线进行测定后知,鸟苷产生菌的延迟期很短,在 2 h 左右就开始进入对数期,9 h 左右对数期结束。所以,选择生长 6 h 的菌种进行原生质体的制备。

2.1.1 酶质量浓度的确定 如图 1 所示,原生质体形成率随酶质量浓度增加而提高,但再生率则呈下降趋势。当溶菌酶质量浓度在 1.2~2.8 mg/mL 范围内,原生质体形成率明显升高,但在 2.8~3.6 mg/mL 范围,原生质体形成率不随酶质量浓度提高而大幅度提高,且再生率明显下降。因此采用

2.4 mg/mL 的酶浓度,此时原生质体形成率为 90.0%,再生率为 20.4%。

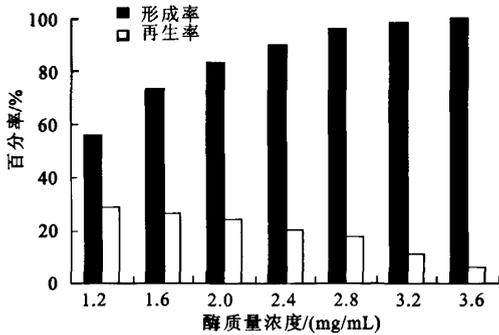


图 1 酶质量浓度对原生质体形成率和再生率的影响
Fig.1 Effect of different enzyme decomposing thickness on the formation and regeneration of the protoplast

2.1.2 酶解温度的确定 从图 2 可知,在 32~38℃ 范围内,原生质体形成率随酶解温度的升高而增高,但温度超过 40℃ 时,形成率下降,这可能是由于较高温度使酶钝化失活所致。温度对再生率影响也很大,在 32~42℃ 时再生率显著下降,因此以 36℃ 为最佳温度,此时形成率为 93.7%,再生率为 18.3%。

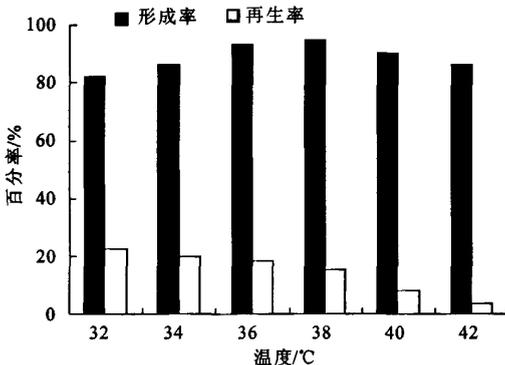


图 2 酶解温度对原生质体形成率和再生率的影响
Fig.2 Effect of different enzyme decomposing temperature on the formation and regeneration of the protoplast

2.2 紫外线对 JSIM-G518 原生质体的诱变效应

向原生质体悬液中加入 0.3 g/dL LiCl 后,立即在紫外光下照射 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 min,分别取样进行系列稀释,在再生基本培养基上避光培养,结果见图 3。从致死率与诱变剂量的关系中可以看出,随着诱变剂量的增加,致死率也增加,但并不呈现明显的正比关系。

根据上述试验结果可知,采用紫外线和 LiCl 复合处理 1.75 min 较合适,此时该菌原生质体诱变存活率为 30% 左右。

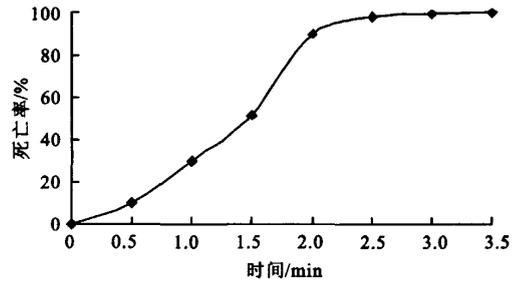


图 3 紫外线照射不同时间对原生质体致死率的影响
Fig.3 Effect of UV irradiation time on the death rate of the protoplast

2.3 缺失核苷水解酶活性突变株的获得

鸟苷产生菌 JSIM-G518 在发酵过程中积累嘌呤碱基以及大量的鸟苷。这种现象主要是由于菌株自身的核苷水解酶所引起的,即菌株本身利用鸟苷水解后的核糖部分为能源产生了鸟嘌呤。以鸟苷为惟一碳源的补充培养基是作为鉴别核苷水解酶缺失菌株一种良好的手段。如果菌株有核苷水解酶存在,能将鸟苷水解成鸟嘌呤和核糖,菌体以核糖为碳源生长,反之,鸟苷则不能利用,菌体将无法生长。出发菌株能够在以葡萄糖、鸟苷为惟一碳源的基本培养基上生长,而突变株不能在以鸟苷为惟一碳源的基本培养基上生长,或者在液体培养基中生长极其微弱,不降解鸟苷,因而在发酵培养基中鸟苷积累,鸟嘌呤很少或没有。

将再生平板上长出的菌落用灭过菌的牙签分别对应点接于基本培养基和无糖基本培养基上,32℃ 培养 3 d,挑出在基本培养基上生长而在无糖基本培养基上不生长的菌落,即为核苷水解酶活力部分丧失的突变株,共挑出 5 株菌株,然而在培养 6 d 后在无糖基本培养基上 1、2、4 号有轻微生长,3、5 号则无,出发菌株在两种培养基上培养 3 d 后均能长出,由此说明突变株完全或部分缺失核苷水解酶活性^[9],摇瓶发酵结果见表 1。

表 1 核苷水解酶活性完全或部分缺失的突变菌株的摇瓶发酵结果

Tab.1 Results of mutants of the excretion-nucleoside hydrolyase

菌株编号	OD ₂₆₀	GR/(g/L)
出发菌株	0.376	18.131
突变株 1	0.282	13.598
突变株 2	0.412	19.867
突变株 3	0.317	15.286
突变株 4	0.452	21.795
突变株 5	0.425	20.494

由表 1 可知,突变株 4 鸟苷产量明显高于其他菌株,得到突变菌株 JSIM-GU, 鸟苷产量达到 21.0 g/L 以上。将出发菌株 JSIM-G518 和突变菌株 JSIM-GU 的发酵液,以丙酮:氨水:正丙醇(体积比为 2:5:6)为展开剂进行薄层层析,发现出发菌株 JSIM-G518 的发酵液中含有少量的鸟嘌呤,而在突变菌株 JSIM-GU 中,由于核苷水解酶的缺失则无鸟嘌呤的产生。

2.4 磺胺胍抗性突变株的获得

将 JSIM-GU 诱变,涂布于含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磺胺胍的基本培养基上,挑出能够生长的单菌落。摇瓶初筛得到的较 JSIM-GU 鸟苷产量高的 8 株目的突变株进行摇瓶复筛实验,每株菌做 3 瓶,36 $^{\circ}\text{C}$,100 r/min 振荡培养 72 h,结果见表 2。

表 2 磺胺胍抗性突变株的的摇瓶发酵结果

Tab. 2 Guanosine production from different SG^r mutants

菌株编号	OD ₂₆₀	GR/(g/L)
GU	0.447	21.554
GU-12	0.398	19.192
GU-38	0.389	18.758
GU-54	0.453	21.843
GU-72	0.434	20.927
GU-102	0.448	21.602
GU-124	0.475	22.905
GU-146	0.404	19.481
GU-178	0.465	22.422

经摇瓶发酵筛选,选育到 JSIM-GU-124 菌株,增加了磺胺胍抗性标记。

2.5 德夸菌素抗性突变株的获得

将 JSIM-GU-124 进行诱变后涂布,挑出在含 0.7 mg/mL 德夸菌素的抗性平板上长出的单菌落。通过对所挑出的 150 株菌株的摇瓶发酵结果进行分析知,增加德夸菌素抗性的菌株本身的产苷能力和出发菌株相差不大^[10]。

2.6 狭霉素 C 抗性突变株的获得

将 JSIM-GU-124 进行诱变,涂布于含 0.3 mg/mL 狭霉素 C 的基本培养基上,挑出能够生长的单菌落^[10]。经摇瓶初筛得到的较 JSIM-GU-124 鸟苷产量高的 5 株目的突变株进行摇瓶复筛实验,结果见表 3。

经摇瓶发酵筛选,选育到 JSIM-GU-124-19 菌株,增加了狭霉素 C 抗性标记。

表 3 狭霉素 C 抗性突变株的摇瓶发酵结果

Tab. 3 Guanosine production of various Psi^r mutants

菌株编号	OD ₂₆₀	GR/(g/L)
GU-124	0.483	23.290
GU-124-15	0.505	24.351
GU-124-19	0.508	24.495
GU-124-74	0.488	23.531
GU-124-79	0.495	23.869
GU-124-95	0.455	21.940

2.7 目的菌株遗传稳定性测定

为了观察鸟苷产生菌突变株 JSIM-GU-124-19 的遗传稳定性,进行了菌种传代产苷性能试验。将突变株 JSIM-GU-124-19 连续传代 10 次后制备菌悬液,涂布鸟苷基本补充培养基平板,32 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 后随机挑取 10 个单菌落于鸟苷斜面上,然后进行摇瓶试验,比较不同单菌落的产鸟苷能力,结果见表 4。

表 4 突变株 JSIM-GU-124-19 的遗传稳定性

Tab. 4 Hereditary stability of *Bacillus subtilis* JSIM-GU-124-19

单菌落	OD ₂₆₀	GR/(g/L)
1	0.503	24.255
2	0.529	25.508
3	0.480	23.145
4	0.511	24.640
5	0.494	23.821
6	0.497	23.965
7	0.474	22.856
8	0.501	24.158
9	0.500	24.110
10	0.506	24.340

随机挑取的 10 个单菌落,其产鸟苷能力与传代前菌株相比无显著差异,表明突变株 JSIM-GU-124-19 遗传性质稳定。

2.8 鸟苷产生菌诱变谱系及菌株的遗传标记

以 JSIM-1019 为出发菌株,采用原生质体紫外诱变的方法,根据代谢调控发酵原理,依次赋予其 NHase⁻,SG^r,Psi^r 等遗传标记,最后获得一株鸟苷高产菌株 JSIM-GU-124-19,其诱变谱系如下:

菌株	鸟苷产量
JSIM-1019(Ade ⁻ , His ⁻ , Thi ⁻)	0 g/L
↓	
JSIM-G-518(Ade ⁻ , His ⁻ , Thi ⁻ , Deam ⁻ , GMP ^{red} , MSO ['])	18.0 g/L
↓	
JSIM-GU(Ade ⁻ , His ⁻ , Thi ⁻ , Deam ⁻ , GMP ^{red} , MSO ['] , NHase ⁻)	21.7 g/L
↓	
JSIM-GU-124(Ade ⁻ , His ⁻ , Thi ⁻ , Deam ⁻ , GMP ^{red} , MSO ['] , NHase ⁻ , SG ['])	22.9 g/L
↓	
JSIM-GU-124-19(Ade ⁻ , His ⁻ , Thi ⁻ , Deam ⁻ , GMP ^{red} , MSO ['] , NHase ⁻ , SG ['] , Psi ['])	24.5 g/L

3 结 语

通过对酶解浓度、温度分析,确定 JSIM-G518 原生质体形成率与再生率较高的最佳条件:溶菌酶终质量浓度控制在 2.8 mg/mL,酶解温度 36 °C 的水浴中处理 40 min。对 JSIM-G518 原生质体直接进行紫外诱变处理,方法简单、效果好,能在较短时间内较大幅度提高菌种的生产能力、改善菌种性

能。本实验的出发菌株 JSIM-G518 并未缺失核苷水解酶,所以纸电泳测定鸟苷含量时混有了鸟嘌呤,使得鸟苷实际产量降低。为了进一步提高该菌株的生产性能,作者以原生质体的紫外诱变方式,获得了核苷水解酶缺失的突变株,阻止了鸟苷代谢为鸟嘌呤,并进一步获得了磺胺胍、德夸菌素、狄霉素 C 的抗性突变株,解除了终产物的抑制和阻遏,使鸟苷产量达到 24.0 g/L。

参考文献(References):

- [1] 袁福山. 核苷类抗病毒药物的研究进展[J]. 中国医药情报, 1995, 1(3): 186—188.
YU Fu-shan. Progress of nucleosides as antiviral agents[J]. *Pharmacy Information China*, 1995, 1(3): 186—188. (in Chinese)
- [2] 蔡显鹏, 储炬, 庄英萍, 等. 芽孢杆菌生产嘌呤核苷研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 10.
CAI Xian-peng, CHU Ju, ZHUANG Ying-ping, et al. Progress on manufacturing purine nucleoside with *Bacillus genus* [J]. *China Biotechnology*, 2002, 22(5): 10. (in Chinese)
- [3] 周昌平, 王健, 陈宁. 鸟嘌呤核苷高产菌的育种策略[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 20—23.
ZHOU Chang-ping, WANG Jian, CHEN Ning. The strategy for breeding of guanosine producing mutant[J]. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(5): 20—23. (in Chinese)
- [4] Zhang Bei, Wang Jian, Chen Ning. Pathway analysis for production of guanosine by *Bacillus subtilis*[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2005, 38.
- [5] 孙占敏, 张克旭, 陈宁. 胞苷产生菌的选育[J]. 现代食品科技, 2006, 22: 36—40.
SUN Zhan-min, ZHANG Ke-xu, CHEN Ning. Breeding *Bacillus subtilis* mutants producing cytidine[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22. (in Chinese)
- [6] 柏建新, 杜郭君, 王红连, 等. 鸟嘌呤核苷工艺条件优化研究[J]. 发酵科技通讯, 2005, 34: 11—15.
BAI Jian-xin, DU Guo-jun, WANG Hong-lian, et al. Study on optimization of guanosine fermentation [J]. *Fajiao Keji Tongxun*, 2005, 34: 11—15. (in Chinese)
- [7] 张蓓. 鸟苷产生菌的原生质体诱变育种及其发酵条件的研究[J]. 天津微生物, 1994(1): 32.
ZHANG Bei. Studies on the protoplast mutation of guanosine producing strain and the optimization of fermentation condition[J]. *Tianjin Microorganism*, 1994(1): 32. (in Chinese)
- [8] 武改红, 周昌平, 王健, 等. 鸟苷生产菌的诱变育种及摇瓶发酵条件优化[J]. 天津科技大学学报, 2004, 19(4): 70—73.
WU Gai-hong, ZHOU Chang-ping, WANG Jian, et al. The breeding of strain for guanosine production and the optimum of fermentation condition[J]. *Journal of Tianjin University of Science and Technology*, 2004, 19(4): 70—73. (in Chinese)
- [9] 徐海, 钱卫, 徐慧. 肌苷产生菌中降低核苷水解酶的研究[J]. 生物技术, 1996, 6(5): 28—30.
XU Hai, QIAN Wei, XU Hui. Study on reducing nucleoside-hydrolyzing activity in an inosine-producing strain[J]. *Biotechnology*, 1996, 6(5): 28—30. (in Chinese)
- [10] Sauer U, Cameron D C, Baily J E. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides, riboflavin, and folic acid[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 59(2): 227—238.

(责任编辑:李春丽)