

磷酸二酯酶抑制剂对枯草芽孢杆菌 发酵环磷腺苷的影响

朱晓宏, 朱晓慧, 魏 薇

(江苏省微生物研究所有限公司, 江苏 无锡 214063)

摘要: 为了提高枯草芽孢杆菌 *Bacillus. subtilis* jsim-1277 的环磷腺苷发酵能力, 试验了磷酸二酯酶同工酶抑制剂对产生环磷腺苷的影响。结果表明: 西马多丁和氨茶碱有良好的促进环磷腺苷生产作用, 在联合使用的最佳条件下, 增产 28%, 达到 9.14 g/L。

关键词: 环磷腺苷; 发酵; 磷酸二酯酶抑制剂

中图分类号: Q 939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)08—0837—04

Effect of Phosphodiesterase Inhibitors on Adenosine-3',5'-Cyclic Monophosphate Production by Fermentation with *Bacillus. subtilis*

ZHU Xiaohong, ZHU Xiaohui, WEI Wei

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

Abstract: In order to improve the accumulation of Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate with *Bacillus. subtilis* jsim-1277, the effects of phosphodiesterase inhibitors were studied. The results showed that Cemadotin and Aminophylline can improve the concentration of Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. Under the optimized conditions, the productivity increased 28%, reaching 9.14 g/L.

Keywords: adenosine-3',5'-cyclic monophosphate, fermentation, phosphodiesterase inhibitor

环磷腺苷具有调节生物体内很多酶催化反应的功能, 体内很多激素的作用也是通过环磷腺苷区进行的, 起着激素媒介物质的作用^[1]。

现已证明环磷腺苷(cAMP)是睾丸甾酮、雌激素、肾上腺激素、甲状腺激素及胎盘激素等许多激素的第二信使。当各种激素与细胞表面作用点接触时, 发动细胞内三磷酸腺苷(ATP)转化成环磷腺苷(cAMP)。细胞内环磷腺苷(cAMP)的浓度变化又引

起了细胞各种代谢的变化。而且环磷腺苷(cAMP)与细胞内蛋白质合成、脂肪分解、类固醇合成均有关系。环磷腺苷(cAMP)与恶性肿瘤、内分泌之间的关系十分密切。在特定条件下, 环磷腺苷(cAMP)对癌细胞具有控制作用, 对冠心病、牛皮癣等有缓解作用。

目前我国, 环磷腺苷(cAMP)主要作为医药品被应用。环磷腺苷(cAMP)在医药上主要作为急

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009075)。

* 通信作者: 朱晓宏(1976—), 男, 江苏无锡人, 助理研究员, 主要从事微生物制药方面的研究。E-mail: xhz_zhu@163.com

性心肌梗塞抢救药并用于冠心病、糖尿病、气喘、牛皮癣等疾病的治疗。

生物代谢途径中,磷酸二酯酶及其同工酶能够使环磷腺苷降解^[2],破坏磷酸二酯酶及其同工酶,成为提高环磷腺苷发酵水平的有效途径。

本研究采用菌种枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* jsim-1277 已经是腺苷酸脱氨酶阴性^[3]减少了磷酸二酯酶活性,作者试验了多种磷酸二酯酶同工酶抑制剂,有效提高了环磷腺苷的发酵水平。

1 材料与方法

1.1 菌种

作者所在研究室筛选育种得到的 *Bacillus subtilis* jsim-1277。该菌株与目前国内鸟苷发酵菌种 *Bacillus subtilis* jsim-G518^[4]相似,同样源自肌苷产生菌 *Bacillus subtilis* jsim-1019。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 葡萄糖 2.0 g/dL,蛋白胨 1.0 g/dL,玉米浆 0.3 g/dL,NaCl 0.3 g/dL;pH 7.0。(固体培养基加琼脂 2 g/dL)

1.2.2 发酵培养基 葡萄糖 6.0 g/dL,尿素 1.0 g/dL,酵母粉 1.0 g/dL,豆饼水解液 0.3 g/dL,K₂HPO₄ 1.0 g/dL,NaF 0.05 g/dL,MgSO₄ 0.1 g/dL;pH 7.0。依据实验需要添加 1,5,10,20,50 mg/L 的酚噻嗪、西马多丁、硫苯唑林、丙苯氮嘌呤、茶碱等磷酸二酯酶抑制剂。

1.3 摇瓶发酵试验

1.3.1 摇瓶种子培养 接一环生长良好的斜面培养物至装有 30 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中培养,旋转式摇床,频率 210 r/min,温度 36 ℃,培养 18 h。

1.3.2 摇瓶发酵培养 将生长良好的种子液接至装有 30 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中培养,接种体积分数 10%,旋转式摇床,频率 210 r/min,温度 36 ℃,培养 72 h 后测定环磷腺苷质量浓度。培养条件与鸟苷发酵条件相似^[5]。

1.4 分析方法

高效液相色谱法。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 0.01 mol/L 四丁基溴化铵,用磷酸调节 pH 值至 4.3)-乙腈(85:15)为流动相,检测波长为 258 nm。标准品溶液 0.2 mg/mL,取 20 μL 注入液相色谱仪,按外标法

以峰面积计算测定。

2 结果与分析

2.1 酚噻嗪的影响

在发酵培养基中添加了 1、5、10、20、50 mg/L 的酚噻嗪,与不添加的常规培养基发酵进行对照,结果见表 1。

表 1 酚噻嗪对环磷腺苷发酵的影响

Table 1 Effect of various concentration of phenothiazine on cAMP accumulation

酚噻嗪 质量浓度/(mg/L)	环磷腺苷 质量浓度/(g/L)	提高比例/%
0(对照)	7.01	
1	2.37	-66.2
5	2.11	-69.9
10	1.08	-84.6
20	0	-100
50	0	-100

酚噻嗪的加入非但没有提高,还大大降低了环磷腺苷的生产能力。发酵过程中,菌自溶时间提前,可能与酚噻嗪对菌种具有毒性有关。

2.2 西马多丁的影响

在发酵培养基中添加了 1、5、10、20、50 mg/L 的西马多丁,与不添加的常规培养基发酵进行对照,结果见表 2。

表 2 西马多丁对环磷腺苷发酵的影响

Table 2 Effect of various concentration of cernadotin on cAMP accumulation

西马多丁质量浓度/ (mg/L)	环磷腺苷质量 浓度/(g/L)	提高比例/%
0(对照)	7.11	
1	7.68	8.0
5	8.25	16.0
10	8.17	14.9
20	6.33	-11.0
50	4.89	-31.2

西马多丁在低浓度可以提高环磷腺苷的生产能力,在 5 mg/L 添加量时,可以提高产量 16%,而添加量过大则反而减产。可能与西马多丁对磷酸二酯酶同工酶的抑制有关。

2.3 硫苯唑林的影响

在发酵培养基中添加了 1、5、10、20、50 mg/L 的硫苯唑林,与不添加的常规培养基发酵进行对照,

结果见表3。

表3 硫苯唑林对环磷腺苷发酵的影响

Table 3 Effect of various concentration of thibenzazoline on cAMP accumulation

硫苯唑林 质量浓度/(mg/L)	环磷腺苷 质量浓度/(g/L)	提高比例/%
0(对照)	6.89	
1	3.67	-46.7
5	1.13	-83.6
10	0	-100
20	0	-100
50	0	-100

硫苯唑林的加入同样没有提高,并大大降低了环磷腺苷的生产能力。发酵过程中,菌自溶时间也提前,可能与硫苯唑林对菌种具有毒性有关。

2.4 丙苯氮嘌呤的影响

在发酵培养基中添加了1、5、10、20、50 mg/L的丙苯氮嘌呤,与不添加的常规培养基发酵进行对照,结果见表4。

表4 丙苯氮嘌呤对环磷腺苷发酵的影响

Table 4 Effect of various concentration of benzene nitrogen purine on cAMP accumulation

丙苯氮嘌呤 质量浓度/(mg/L)	环磷腺苷 质量浓度/(g/L)	提高比例/%
0(对照)	6.79	
1	1.16	-82.9
5	0	-100
10	0	-100
20	0	-100
50	0	-100

丙苯氮嘌呤的加入同样没有提高,并大大降低了环磷腺苷的生产能力。发酵过程中,菌自溶时间提前更明显,可能与丙苯氮嘌呤对菌种具有毒性有关。

2.5 氨茶碱的影响

在发酵培养基中添加了1、5、10、20、50 mg/L的氨茶碱,与不添加的常规培养基发酵进行对照,结果见表5。

氨茶碱可以提高环磷腺苷的生产能力,在5 mg/L添加量时,可以提高产量10.7%,随着添加质量浓度的提高,环磷腺苷增产能力维持在9%~10%左右,可能与氨茶碱对某类磷酸二酯酶同工酶产生

了抑制有关。

表5 氨茶碱对环磷腺苷发酵的影响

Table 5 Effect of various concentration of aminophylline on cAMP accumulation

氨茶碱 质量浓度/(mg/L)	环磷腺苷 质量浓度/(g/L)	提高比例/%
0(对照)	7.04	
1	7.27	3.3
5	7.79	10.7
10	7.69	9.2
20	7.73	9.8
50	7.67	8.9

2.6 西马多丁与氨茶碱联合使用的影响

西马多丁与氨茶碱共同使用,按照之前试验中最佳的3个质量浓度组合,结果见表6。

表6 西马多丁与氨茶碱联用对环磷腺苷发酵的影响

Table 6 Effect of cemadotin combined with aminophylline on cAMP accumulation

西马多丁质量 浓度/(mg/L)	氨茶碱质量 浓度/(mg/L)	环磷腺苷质量 浓度/(g/L)	提高比例/%
0(对照)	0	7.14	
1	1	7.79	9.1
5	1	8.37	17.2
10	1	8.31	16.4
1	5	8.28	16.0
5	5	9.14	28.0
10	5	8.89	24.5
1	10	8.33	16.7
5	10	8.96	25.5
10	10	8.79	23.1

西马多丁和氨茶碱联用,具有提高环磷腺苷的生产能力,且提高能力相互间有加成效果,可能西马多丁和氨茶碱分别抑制的磷酸二酯酶同工酶类别不同,协同减少了菌对自身产物环磷腺苷的降解,实现了增产的效果。

3 结语

环磷腺苷产生菌枯草芽孢杆菌 *Bacillus. subtilis* jsim-1277 能在某些磷酸二酯酶同工酶抑制剂的存在下,提高环磷腺苷的产量。其中西马多丁和氨茶碱联用,最多可以增产28%,达到9.14 g/L,提高非常显著。

参考文献:

- [1] Shandar R R, Zhu J S, Baron A D. Glucosamine infusion in rat smimics the beta-cell dysfunction of non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. **Metabolism**, 1998, 47: 573.
- [2] 王晓英, 吴俊芳, 张均田. 选择性磷酸二酯酶抑制剂研究进展[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(2): 121-124.
WANG Xiaoying, WU Junfang, ZHANG Juntian. Progress in selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2000, 16(2): 121-124. (in Chinese)
- [3] 柏建新, 朱晓宏, 张一平, 等. 肌苷核酸代谢关键酶缺失和形成选育腺苷菌的研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2): 52-56.
BAI Jianxin, ZHU Xiaohong, ZHANG Yiping, et al. Study on the microorganism fermentation of adenosine with mutative strains of lack of or producing some important enzymes in nucleic acid metabolism[J]. **Microbiology**, 2003, 30(2): 52-56. (in Chinese)
- [4] 盛翠, 张一平, 陆茂林. 原生质体紫外诱变选育鸟苷高产菌株[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 279-283.
SHENG Cui, ZHANG Yiping, LU Maolin. Study on breeding up high-yield strain of guanosine by protoplast mutagenesis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 279-283. (in Chinese)
- [5] 杜郭君, 张一平, 王红连, 等. 鸟嘌呤核苷补料发酵条件研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 21-24.
DU Guojun, ZHANG Yiping, WANG Honglian, et al. Studies on feeding condition of guanosine fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(5): 21-24. (in Chinese)

会议信息

会议名称(中文): 第四次国际暨第十三次全国膜生物学学术研讨会

开始日期: 2014-10-10

结束日期: 2014-10-13

所在城市: 云南省大理白族自治州

主办单位: 中国生物物理学会、中国生化与分子生物学会、中国细胞生物学会

联系人: 徐文丽

联系电话: 86-10-64887226

传真: 86-10-64889892

E-MAIL: findwayfrom@163.com

会议网站: http://www.genetics.ac.cn/xsjl/bgyg/201404/t20140425_4100838.html

会议背景介绍: 由中国生物物理学会、中国生化与分子生物学会和中国细胞生物学会联合召开的第四次国际暨第十三次全国膜生物学学术研讨会将于 2014 年 10 月 10 日-13 日在云南大理召开。

征文范围及要求: 下设专题: 内膜系统的动态变化与功能; 跨膜运输; 膜运输异常相关疾病; 膜与细胞生物物理研究的新技术、新方法。

会议名称(中文): 第十一届全国生物多样性科学与保护研讨会

开始日期: 2014-09-23

结束日期: 2014-09-25

所在城市: 河南省开封市

主办单位: 国际生物多样性计划中国委员会

承办单位: 河南大学生命科学学院

[会务组联系方式] 联系人: 黄祥忠 徐学红 联系电话: 010-62836603

传真: 010-82591781

E-MAIL: meeting@escience.cn

会议网站: <http://biodiv11.csp.escience.cn/dct/page/65541>

会议背景介绍: 生物多样性保护和研究工作已经得到全世界的关注和重视, 作为世界上生物多样性最丰富的国家之一, 我国在本领域业已取得重要进展。

继 2010 年国际生物多样性年之后, 联合国宣布 2011-2020 年为国际生物多样性十年, 国家环境保护部正式出版《中国生物多样性保护战略与行动计划》。1994 年以来, 每两年召开一次的全国生物多样性保护与持续利用研讨会已成功举办十届。自 2014 年第 11 届起, 本研讨会正式更名为“全国生物多样性科学与保护研讨会”。由国际生物多样性计划中国委员会、中国科学院生物多样性委员会和有关部门共同组织并举办第十一届全国生物多样性科学与保护研讨会, 诚邀各方借此平台展示中国生物多样性科学与保护的最新研究成果, 开展研讨, 推动中国的生物多样性科学发展, 提出生物多样性保护和可持续利用的建议。