

利用枯草芽孢杆菌发酵生产环磷腺苷的工业化试验

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: 为了实现环磷腺苷的发酵生产, 对一株枯草芽孢杆菌 *Bacillus. subtilis* jsim-1277 在摇瓶、自控罐、20 M³ 发酵罐上的发酵条件进行了试验。结果表明, 最适宜发酵条件是 pH 6.7, 且添加 K₂HPO₄ 1.0 g/dL, NaF 0.05 g/dL; 在摇瓶、自控罐、大型发酵罐产苷分别为 7.17、6.01、7.10 g/L。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 环磷腺苷; 发酵条件

中图分类号: Q 939.97 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)11—1228—04

Process of 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 prepare the adenosine-3',5'-cyclic monophosphate by fermentation, the ferment conditions of *Bacillus. subtilis* jsim-1277 were studied in shake flask, auto fermentor, and 20 M³ fermentor. The results showed that the optimal conditions for the fermentation were identified as follow: pH at 6.7, the optimal concentration of K₂HPO₄ was 1.0 g/dL, the optimal concentration of NaF was 0.05 g/dL. Under the optimized fermentation conditions, the productivity in shake flask, auto fermentor, or 20 M³ fermentor was 7.17, 6.01, 7.10 g/L, respectively.

Keywords: *Bacillus subtilis*, adenosine-3',5'-cyclic monophosphate, fermentation

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)。细胞内环磷腺苷的浓度变化又引起了细胞各种代谢的变化。而且环磷腺苷与细胞内蛋白质

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, 环磷腺苷主要作为医药品被应用。环磷腺苷在医药上主要作为急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。

目前国内环磷腺苷的生产方法全是化学合成

收稿日期: 2013-11-12

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009075)。

作者简介: 朱晓宏(1976—), 男, 江苏无锡人, 理学学士, 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

方法^[2]。包括:

1) 碱性水解法:David lipkin 等人在 1959 年曾用碱性水解的工艺方法制得了环磷腺苷。此法主要是利用三磷酸腺苷(ATP)100 °C时在氢氧化钡强碱水溶液中水解并关环制得环磷腺苷。

2) 活性酯类法:河北大学韩文炎和屠宛蓉在 1986 年报道了环磷腺苷的改进合成工艺方法。5-腺苷酸、4-吗啡啉-N,N-二环己基脒和金属钠在乙二醇单甲醚溶剂中反应,合成了环磷腺苷。

3)DCC 脱水法^[3]:M.Smith 等在 1961 年用 5-腺苷酸和 4-吗啡啉-N,N-二环己基脒在吡啶溶剂中,用 DCC 作脱水剂进行脱水反应,使 5-腺苷酸发生内酯化反应,产物的收率可达 80%。

4) 三氯氧磷法:1989 年,Genieser 等报道了腺苷与三氯氧磷反应得到腺苷的合成工艺路线。中间体腺苷二氯磷酸酯不经过分离,加碱环化得到环磷腺苷。此法原料容易得到,反应条件温和适中,但收率偏低(49%)。

但以上方法全都属于化学合成方法,反应所需原料都具有毒性和污染,且工业化生产过于昂贵。

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 0.1g/dL,pH 7.0。

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 °C,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 °C,培养 72 h 后测定环磷腺苷质量浓度。

1.4 自控发酵罐试验

自控发酵罐,容量 30 L,温度、转速、溶氧、补料、灭菌均自控。种子用摇瓶培养,培养时间 18 h,接种体积分数 10%。发酵液装量 21 L,121 °C灭菌 15 min,温控 36 °C,通气搅拌^[5]。

1.5 20 M³ 环磷腺苷发酵试验

标准型不锈钢发酵罐,二组六弯型搅拌,转速可调,容量 20 M³,装液 14 M³,pH、溶氧在线显示,液氨调节 pH 装置。标准型不锈钢种子罐,六弯型搅拌转速可调,容量 2 M³,装液 1.4 M³,pH、溶氧在线显示。

1.6 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 氟化钠(NaF)质量浓度对发酵的影响

发酵培养基中添加不同质量浓度的腺苷酸环化酶促进剂 NaF,环磷腺苷的发酵水平见表 1。

表 1 NaF 质量浓度对环磷腺苷发酵的影响

Table 1 Effect of various concentration of NaF on cAMP accumulation

氟化钠质量浓度/(g/dL)	环磷腺苷发酵单位/(g/L)
0	4.34
0.025	6.53
0.050	7.11
0.075	7.06
0.100	6.94
0.125	7.01
0.150	6.95
0.175	6.48
0.200	6.52

NaF 作为一种腺苷酸环化酶促进剂,适当添加可促使产品积累,0.05 g/dL 是合适的。

2.2 磷酸氢二钾(K₂HPO₄)质量浓度对发酵的影响

发酵培养基中添加不同质量浓度的 K₂HPO₄,环磷腺苷的发酵水平见表 2。

表 2 K_2HPO_4 对环磷腺苷发酵的影响

Table 2 Effect of various concentration of K_2HPO_4 on cAMP accumulation

磷酸氢二钾质量浓度/(g/dL)	环磷腺苷发酵单位/(g/L)
0.2	2.13
0.4	4.11
0.6	5.76
0.8	6.54
1.0	7.17
1.2	7.15
1.4	6.78
1.6	7.08
1.8	6.74
2.0	6.78

Bacillus subtilis jsim-1277 积累环磷腺苷不同于其原始菌株 *Bacillus subtilis* jsim-X-13-4。后者积累腺苷,不需要额外提供磷酸^[9];而前者需要提供磷酸盐以生成环磷酸基团。从实验可知, K_2HPO_4 在 1 g/dL 以下时,质量浓度升高,产酸能力也升高;而质量浓度更高时,产酸能力不再提高,分析 1 g/dL K_2HPO_4 已能提供生产足够的磷酸基团。过高的磷酸盐质量浓度会增加提取的压力,故选择 1 g/dL K_2HPO_4 最为合适。

2.3 pH 对发酵的影响

自动罐发酵过程中 pH 自然下降后,用液氨或氨水控制不同 pH,环磷腺苷产量见表 3。

表 3 不同 pH 对环磷腺苷发酵的影响

Table 3 Effect of various pH on cAMP accumulation

pH 值	环磷腺苷发酵单位/(g/L)
6.0	5.13
6.2	5.43
6.5	5.55
6.7	6.01
6.9	5.68

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] 申艳红, 张文升, 刘启宾, 等. 环磷腺苷的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2004; 35(3): 132. SHEN Yanhong, ZHANG Wensheng, LIU Qibin, et al. Synthesis of adenosine cyclophospha [J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2004, 35(3): 132. (in Chinese)
- [3] Borden R K, Smith M. Nucleoside synthesis III. Preparation of nucleoside 3', 5'-cyclic phosphate in strong base [J]. *J Org Chem*, 1966, 31: 3247-3258.

通过试验知道, pH 6.7 适合环磷腺苷的积累。

2.4 20 M³ 环磷腺苷发酵

种子罐 2 M³, 装液 1.4 M³, 配料按材料与方法所述。种子液灭菌后调 pH 7.0, 接入 3 只茄子瓶斜面, 温度 36 ℃, 风量 1:0.3, 培养过程中不控制 pH。培养至 18 h 左右, pH 降至 6.0 左右, 镜检无杂菌, 且大部分已断裂, 即移种至发酵罐。

发酵罐 20 M³, 装液 14 M³, 配料按材料与方法所述。灭菌后用液氨调 pH 7.0。培养温度 36 ℃, 种子接入发酵后, 起始风量设置为 1:0.25, 在 12 h 内逐步增至最大, 为 1:0.8。发酵过程中不断取样检测产物积累量。发酵到后期, pH 有上升趋势, 溶氧急速增加, 环磷腺苷不再增长, 则放罐。

表 4 20 M³ 发酵罐中环磷腺苷发酵状况

Table 4 ccAMP fermentation in 20 M³ fermentor

罐批	环磷腺苷质量浓度/(mg/mL)	发酵时间/h
1	5.53	66
2	6.06	63
3	7.10	63
4	5.97	60
5	6.45	60
平均	6.20	62

20 M³ 发酵罐 5 批次平均生产环磷腺苷 6.2 g/L, 平均发酵周期 62 h。菌种生产能力稳定。

3 结语

经改造的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* jsim-1277 具有良好环磷腺苷生产能力, 在最佳 pH 6.7 条件下, 以葡萄糖为碳源、尿素、酵母粉、豆饼水解液为复合氮源, 添以 1 g/dL 的 K_2HPO_4 和 0.05 g/dL 的 NaF, 能生产环磷腺苷 6~7 g/L, 发酵周期 60 h 略多, 有较好的工业化价值。

- [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)
- [6] 柏建新,朱晓宏,张一平,等. 肌苷菌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)

科技信息

加拿大批准焦磷酸三钠作为食品添加剂使用

据加拿大卫生部消息,加拿大卫生部发布公告,批准焦磷酸三钠(Trisodium Pyrophosphate)作为食品添加剂使用,并于2014年8月21日生效。具体使用要求如下:

编号	添加剂	允许使用的产品	用途	最大用量及其他条件
T.5	焦磷酸三钠	冻蛤蚌、冻螃蟹、冻鱼片、冻龙虾、冻鱼糜、冻虾	减少加工损失和解冻流出液	和三磷酸钠一起使用,以磷酸氢二钠计算总磷酸盐不超过0.5%

[信息来源]厦门WTO工作站. 加拿大批准焦磷酸三钠作为食品添加剂使用 [EB/OL]. (2014-9-17). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=47328>

北京大学陈鹏课题组发展新一代蛋白质光交联探针

点特异性的蛋白质光交联探针已经成为研究活细胞内蛋白质-蛋白质相互作用的关键工具。北京大学陈鹏课题组长期致力于发展基于遗传密码子拓展的蛋白质光交联技术。在之前的工作中他们设计了高效的光敏感非天然氨基酸交联探针(DiZPK),能够广泛地用于捕捉活细胞内的蛋白-蛋白相互作用。

最近,在上述工作的基础之上,该课题组发展了“可切割”的新一代光交联探针 DiZSeK。与原有探针相比,新一代的探针在高效捕捉蛋白相互作用的同时,其骨架中所含的硒原子能够在过氧化氢氧化条件下断裂,从而实现光交联获得的“诱饵蛋白-靶标蛋白”复合物的分离。进一步的,他们发展了能够与靶标蛋白上产生的次硒酸基团发生特异反应的捕获试剂,实现了对靶标蛋白的特异标记和富集。上述新技术的发展,使他们在后续二维凝胶电泳实验中有效去除了诱饵蛋白的干扰,完成了对特定蛋白的全细胞靶标蛋白的质谱分析与鉴定。新一代“可切割型”光交联探针的开发,将有力地推动基于蛋白质光交联技术的蛋白质组学研究。该工作近日在美国化学会志上发表(Lin SX, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, DOI10.1021/ja504371w),并被美国化学会的官方杂志“Chemical & Engineering News”以 News of the Week 的形式进行了报道。

[信息来源]北京大学化学与分子工程学院. 陈鹏课题组发展新一代蛋白质光交联探针 [EB/OL]. (2014-8-25). <http://www.chem.pku.edu.cn/news.php?id=4411>