

肌苷产生菌枯草杆菌 7171-6-1 菌株的选育*

中国科学院上海生物化学研究所 上海植物生理研究所
上海工业微生物研究所 上海味精厂

本文报告由枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) No. 101 野生型为出发菌株, 经过硫酸二乙酯 (Diethyl Sulfate, DES)、8-氮杂鸟嘌呤 (8-Azaguanine, 8-AG) 处理获得了一株腺嘌呤、硫胺素双重营养缺陷型突变株 7171-6-1, 在以葡萄糖为碳源的发酵培养基中, 经 60—72 小时、30—32℃ 发酵, 肌苷产量达 11.65 克/升。

肌苷即次黄嘌呤核苷, 是具有一定医疗价值的药物, 它可以直接透过细胞膜进入细胞内参与人体代谢, 可用于治疗心脏病、肝病和放射线照射、治疗血吸虫病以及抗癌药物所造成的白血球减少症、中心性视网膜炎、视神经萎缩等疾病^[1-4]。肌苷可以通过微生物法或化学法磷酸化制成 5'-肌苷酸。5'-肌苷酸是食品工业中的助鲜剂^[5]。

利用芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 突变株^[6-11]、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 突变株^[12]、产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) 突变株^[13]、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 突变株^[14] 等发酵法生产肌苷已有报道。本篇报告是以枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) No. 101 野生型为出发菌株, 通过硫酸二乙酯 (Diethyl Sulfate, DES) 诱变处理, 得到腺嘌呤营养缺陷型突变株, 再经 DES、8-氮杂鸟嘌呤 (8-Azaguanine, 8-AG) 等处理, 获得了一株腺嘌呤、硫胺素双重营养缺陷型突变株 7171-6-1。经摇瓶发酵试验, 7171-6-1 菌株能产肌苷 11.65 克/升。

材料和方法

一、诱变剂

硫酸二乙酯 中国科学用品采购供应站试剂加工厂 化学纯。8-氮杂鸟嘌呤 上海试剂总厂化学纯。

二、菌株

枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) No. 101 野生型。

三、培养基

(一)肉汤培养基 葡萄糖 1.0%, 牛肉膏 1.4%, 蛋白胨 0.7%, 酵母膏 0.4%, 用 NaOH 调至 pH 7.0。添加 2.0% 琼脂, 即为肉汤琼脂。

(二)基本培养基 葡萄糖 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, 柠檬酸钠 0.1%, K_2HPO_4 1.4%, KH_2PO_4 0.6%, MgSO_4 0.02%, 自然 pH 6.7。

(三)补充培养基 在基本培养基中补加腺嘌呤 50 微克/毫升。

(四)种子培养基 葡萄糖 2%, 酵母膏 1%, 蛋白胨 1%, 玉米浆 0.5%, NaCl 0.25%, 尿素 0.8%, 用 NaOH 调至 pH 7.0。

(五)发酵培养基 葡萄糖 10%, 纸浆酵母 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5%, CaHPO_4 0.5%, MgSO_4 0.05%, CaCO_3 2% (分别灭菌), 用 NaOH 调至 pH 7.0。

除肉汤培养基在 120℃, 20 分钟灭菌外, 其它培养基均在 115—118℃, 15 分钟灭菌。

四、诱变方法

(一)菌悬浮液制备 将斜面培养 20—24 小

* 在我们的研究工作中始终得到复旦大学遗传研究所、中国科学院微生物研究所同志们的热情指导和具体帮助, 在此谨表示衷心的感谢。

本文 1972 年 4 月 24 日收到。

时的枯草杆菌 No. 101, 接种到盛有 20 毫升肉汤培养基的 250 毫升三角瓶中, 30℃ 振荡培养 18 小时, 取 5 毫升菌液离心, 弃去上清液, 用 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 洗涤一次, 再离心, 弃去上清液, 用手指弹动离心管的下部, 将菌体搅匀, 再加入上述缓冲液 5 毫升, 用平皿记数法测定菌数, 然后制成 5×10^8 个/毫升的菌体悬浮液。

(二) 硫酸二乙酯处理 将 5 毫升 5×10^8 个/毫升的菌体悬浮液倾入盛有 15 毫升 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 的 250 毫升无菌三角瓶中, 并加入 0.2 毫升 DES (V/V=1/100), 摇动使其混合, 于 30℃ 往复式摇床上振荡 30 分钟, 取 1 毫升处理菌液接入肉汤培养基中, 振荡培养 18 小时, 经适当稀释后, 涂肉汤琼脂平皿, 32℃ 培养 24 小时后, 用牙签挑菌和影印法复制, 挑选腺嘌呤缺陷型的单菌落, 然后进行摇瓶发酵, 筛选肌苷产生菌株。

(三) 硫酸二乙酯和 8-氮杂鸟嘌呤的复合处理 将上法所得的营养缺陷型突变株, 再按上法处理后, 制成菌体悬浮液, 取 0.1 毫升适当稀释度的菌体悬浮液用接种棒涂布在含有不同浓度的 8-AG (20、50、200 微克/毫升) 的补充培养基平皿上, 于 32℃ 培养 48 小时, 选取在平皿上生长的菌株, 供筛选用。

(四) 发酵试验

1. 种子: 在 500 毫升三角瓶中盛 50 毫升培养液, 于往复式摇床 (振幅 7.5 厘米, 频率 108 次/分钟) 30—32℃ 振荡培养 18 小时。

2. 发酵: 在 500 毫升三角瓶中盛 20 毫升培养液, 接种量为 5%, 于往复式摇床 (振幅 7.5 厘米, 频率 108 次/分钟) 32℃ 培养 60—72 小时。

(五) 发酵液中肌苷和次黄嘌呤含量的分析

1. 纸层析法: 发酵液离心, 取除去菌体的上清液, 用微量吸管取 20 微升, 点样于 45 厘米 × 10 厘米新华 3 号滤纸上, 并取标准肌苷和次黄嘌呤溶液, 也点样在滤纸上作对照, 在正丁醇: 冰醋酸: 水 (4:1:1) 溶剂中展层后, 在紫外灯下确定斑点位置, 然后算出比移值 (R_f), 肌苷为 0.2, 次黄嘌呤为 0.35, 并将紫外吸收斑点剪下用 0.01N HCl 室温浸泡 2 小时, 测 260 毫微米光密度, 根据 pH 2 260 毫微米的克分子消光系数, 计算求得肌苷和次黄嘌呤的含量。

2. 离子交换分析法: 发酵液离心, 取除去菌

体的上清液 0.2—0.5 毫升, 上 732 号强酸性阳离子 (H^+) 交换树脂 (100 目, 1×8 , 上海树脂厂出品) 柱 (直径: 高 = 1:3), 然后用 0.001N HCl 洗脱, 洗脱液分部收集, 测 260 毫微米光密度, 计算肌苷含量。用 0.1N NaOH 洗脱, 洗脱液分部收集, 测 260 毫微米光密度, 计算次黄嘌呤含量。

实验结果

一、枯草杆菌 7171-6-1 菌株的选育

(一) DES 处理后突变株的获得 枯草杆菌 No. 101 经 DES 处理后, 出现嘌呤缺陷型突变株的百分率, 最高为测定缺陷型总数的 0.69% (表 1)。肌苷产生菌枯草杆菌腺嘌呤缺陷型突变株 No. 34, 就是从用 0.7% (V/V) DES 处理 60 分钟得到的 18 株嘌呤缺陷型中选得的。

表 1 DES 诱变枯草杆菌 No. 101 产生嘌呤缺陷型的百分率

DES 浓度 %(V/V)	处理时间 (小时)	受测定缺陷 型菌株总数	嘌呤缺陷 型株数	百分率 (%)
0.7	1	2619	18	0.69
0.7	2	1940	1	0.05
0.7	24	2716	4	0.14

(二) 硫酸二乙酯和 8-氮杂鸟嘌呤复合处理后突变菌株的肌苷产量 枯草杆菌腺嘌呤缺陷型突变株 No. 34 经单菌分离, 得到 6-1 菌株, 肌苷产量为 1.92 克/升。6-1 菌株先经 1% DES 处理 20 分钟, 再进行不同浓度的 8-AG 处理, 每个浓度分别挑取 60 个在 8-AG 补充培养琼脂上生长的菌落, 并进行发酵比较。结果表明, 经过处理的菌株明显地提高了肌苷的产量 (表 2)。三种不同浓度的处理所得产 2

表 2 DES 和 8-AG 复合处理突变株的肌苷产量变异的株数和幅度

8-AG 浓度 (微克/毫升)	测定菌株数	产肌苷 2 克/升以上 菌株数	肌苷最高产 量 (克/升)
20	60	4	2.2
50	60	3	3.13
200	60	2	2.4

克/升以上肌苷的变异株数和幅度见表 2。

710577 菌株是在含 50 微克/毫升的 8-AG 的平皿上分离出来的突变株,其肌苷产量是 3.13 克/升,次黄嘌呤产量是 1.27 克/升。

(三) 第三次硫酸二乙酯处理和双重营养缺陷型菌株的获得 突变株 710577 再用 DES 处理(条件同前)得到 28 株双重营养缺陷型,用腺嘌呤、硫胺素双重营养缺陷突变株 7171 (710577-12) 进行发酵试验,

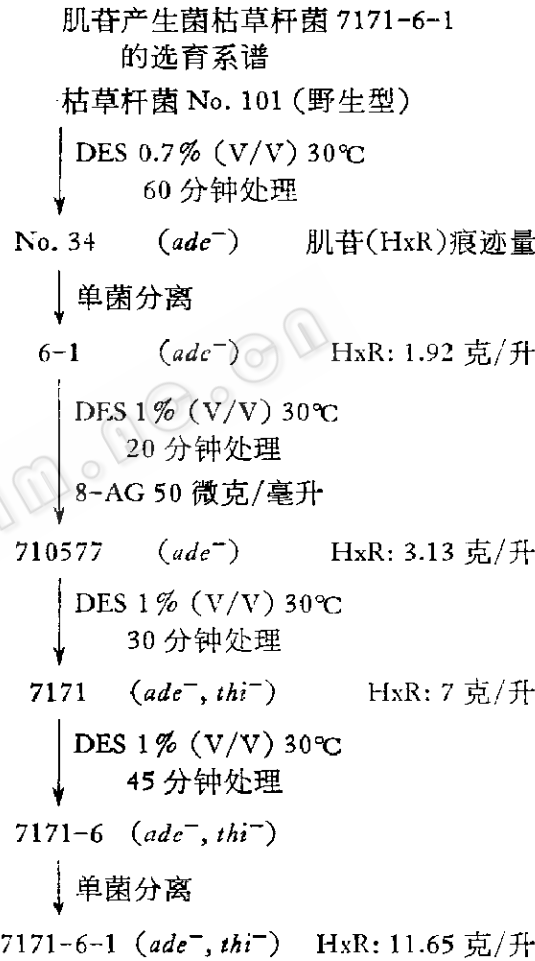
表 3 710577 双重营养缺陷型和肌苷产量的变异

菌 株	营养缺陷型	肌苷产量 (克/升)	次黄嘌呤产量 (克/升)
710577-1	<i>ade⁻, met⁻</i>	—	++
710577-2	<i>ade⁻, met⁻</i>	—	±
710577-3	<i>ade⁻, ?</i>	—	±
710577-4	<i>ade⁻, his⁻</i>	—	++
710577-5	<i>ade⁻, U⁻</i>	—	+
710577-6	<i>ade⁻, ?</i>	—	—
710577-7	<i>ade⁻, V⁻</i>	3.88	3.78
710577-8	<i>ade⁻, ?</i>	2.41	++
710577-9	<i>ade⁻, thi⁻</i>	4.05	2.19
710577-10	<i>ade⁻, ileu⁻</i>	—	+++
710577-11	<i>ade⁻, phe⁻</i>	0.67	+++
710577-12	<i>ade⁻, thi⁻</i>	4.85	1.66
710577-13	<i>ade⁻, ?</i>	—	++
710577-14	<i>ade⁻, ?</i>	—	—
710577-15	<i>ade⁻, met⁻</i>	—	++
710577-16	<i>ade⁻, his⁻</i>	—	±
710577-17	<i>ade⁻, his⁻</i>	1.55	+++
710577	<i>ade⁻,</i>	±	++

- 注 1. 产量的表示———: 鉴定不出, ±: 痕迹量, +: 含量小于 0.5 克/升, ++: 含量小于 1.0 克/升, +++: 含量小于 1.5 克/升。
2. *ade⁻*: 腺嘌呤缺陷型, *met⁻*: 甲硫氨酸缺陷型, *his⁻*: 组氨酸缺陷型, *U⁻*: 尿嘧啶缺陷型, *thi⁻*: 硫胺素缺陷型, *ileu⁻*: 异亮氨酸缺陷型, *Phe⁻*: 苯丙氨酸缺陷型, *V⁻*: 复合维生素缺陷型, ? : 营养需要不明。
3. 种子培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 1%, 玉米浆 0.5%, 尿素 0.2%, 用 NaOH 调至 pH 7.0。
发酵培养基: 葡萄糖 7%, 纸浆酵母粉 1.5%, (NH₄)₂SO₄ 1.5%, CaHPO₄ 1.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05%, CaCO₃ 1.5% (分别灭菌), 用 NaOH 调至 pH 7.0。其他培养条件同前。

肌苷产量提高至 7 克/升。表 3 列举了部分双重营养缺陷型肌苷产量变异情况。

(四) 第四次硫酸二乙酯处理 7171 菌再经 DES 处理, 并进行单菌分离, 得到腺嘌呤、硫胺素双重营养缺陷型的突变株 7171-6-1, 肌苷产量提高至 11.65 克/升。



二、枯草杆菌 7171-6-1 菌株的发酵试验结果

枯草杆菌 7171-6-1 摇瓶发酵试验, 结果图 1 表明, 菌体生长至 24 小时开始产生肌苷和次黄嘌呤, 随着肌苷产量的迅速上升, 糖浓度也明显下降, pH 在 6.0 左右波动。发酵至 60 小时, 肌苷的产量达到高峰, 为 11.65 克/升, 次黄嘌呤为 2.05 克/升。此后, 肌苷产量开始下降, 次黄嘌呤产

量增加，pH 逐渐升高。

三、产物的理化性质

发酵液经分离、提纯、精制后得到肌苷结晶，为白色，针状，略有苦味(图 2)。

用紫外分光光度计、纸层析、柱层析、

红外吸收等方法，测定了发酵制品肌苷的纯度和一些理化性质，并与标准样品肌苷作了比较(表 4，图 3、4、5)，从 R_f 值、熔点、紫外和红外吸收光谱来看，证明二者是完全相同的。

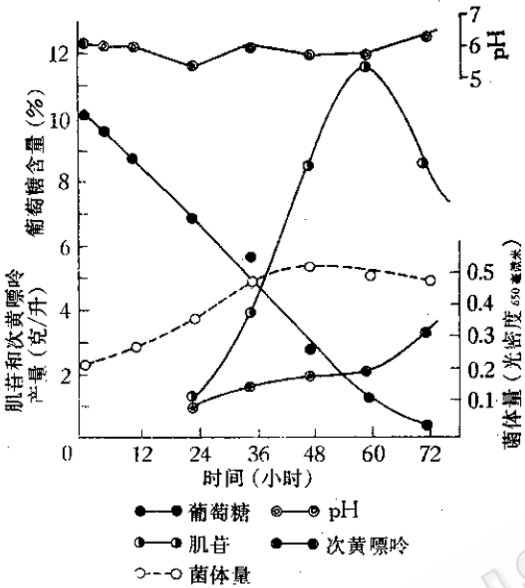


图 1 枯草杆菌 7171-6-1 摇瓶发酵的全过程

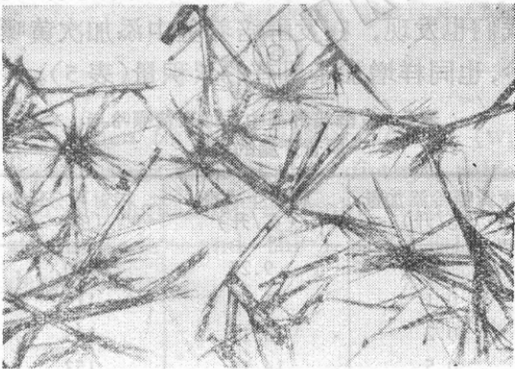


图 2 肌苷的结晶形状

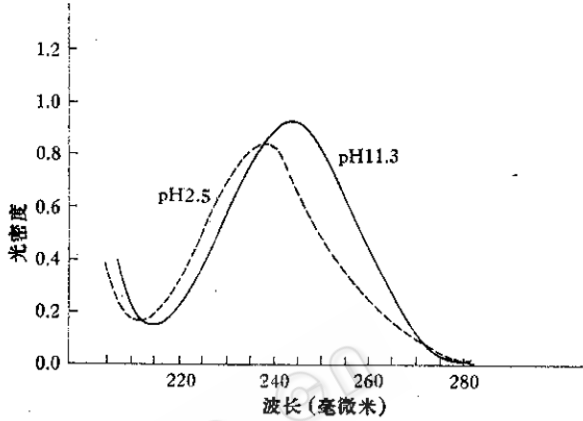


图 3 发酵制品肌苷的紫外吸收光谱用 SP 800 紫外吸收分光光度计测定

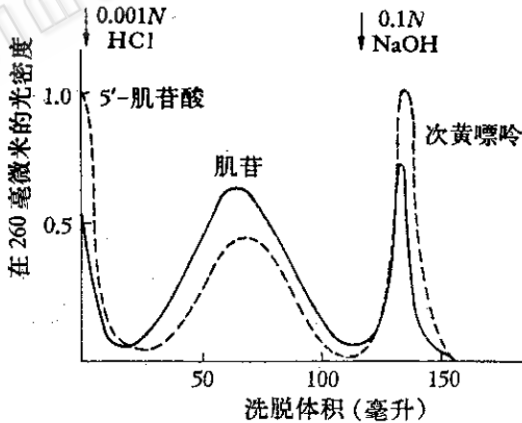


图 4 强酸性阳离子(H⁺)交换树脂柱洗脱分离结果

表 4 发酵制品肌苷的一些理化性质

【鉴定项目】	纯 度	纸 层 析 (R_f 值)				熔 点 ($^{\circ}\text{C}$)			紫 外 吸 收 特 性			
		肌 甘		次黄嘌呤		标准品	标准品 + 样 品	样 品	pH 2.5		pH 11.3	
		标准品	样品	标准品	样品				最高吸收峰	最低吸收峰	最高吸收峰	最低吸收峰
结果	99—99.9%	0.2	0.2	0.35	0.35	218	218	218	248 毫微米	223 毫微米	253 毫微米	224 毫微米

* 用 SP 500 分光光度计测定 样品即发酵制品。

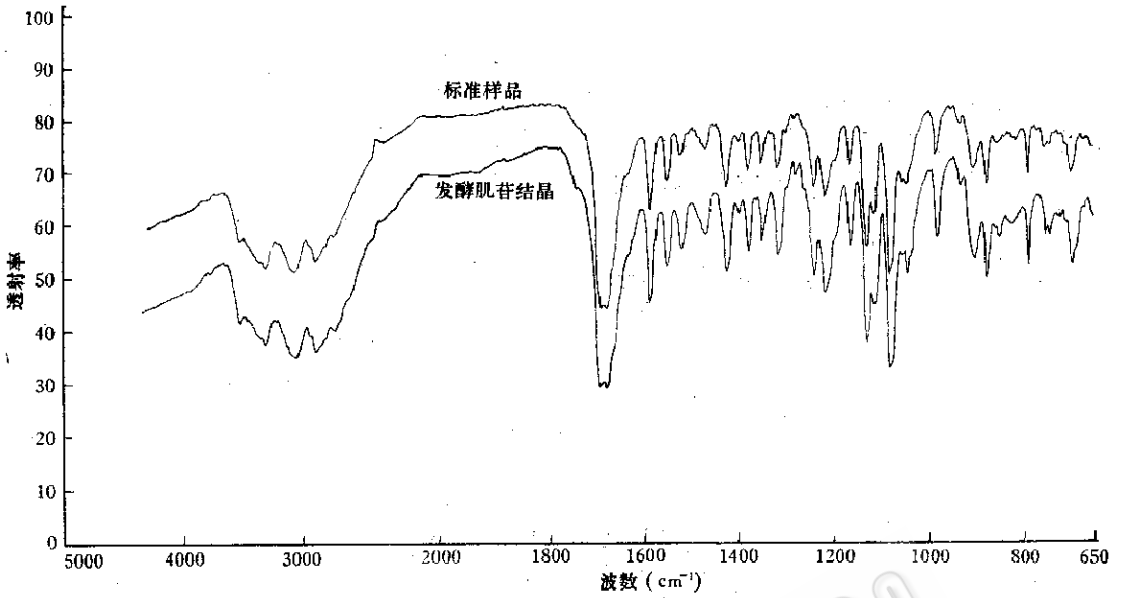


图5 肌苷的红外吸收光谱
用 SP 200 红外吸收光谱仪测定 KCl 压片

讨 论

一、我们用硫酸二乙酯诱变谷氨酸短杆菌时,表明它是有效化学诱变剂。在我们试验条件下营养缺陷型的变异率可达41%,其中嘌呤类营养缺陷型的变异率达2.2%。但在处理枯草杆菌 No. 101 时,所获得的嘌呤类营养缺陷型的百分率仅约0.69%。这说明了不同的菌株对诱变剂的反应是不同的。

二、据青木(R. Aoki)报告,枯草杆菌 No. 2 的腺嘌呤、组氨酸和酪氨酸三重营养缺陷型突变株^[6-8]有效地提高了肌苷产量。我们获得的枯草杆菌 7171-6-1 腺嘌呤、硫胺素双重营养缺陷型突变株,肌苷生产能力亦很强。在实验中我们获得的腺嘌呤与甲硫氨酸或组氨酸的双重营养缺陷型,并不有效地增加肌苷的产量,有的反而失去积累肌苷的能力。这可能是我们获得的突变株,在组氨酸与甲硫氨酸代谢上有差异。对其突变的机制尚不清楚。

三、据笹岛(Ken-ichi Sasajima)等报告,枯草杆菌 No. 102 突变株 G3-46-22-6,除了可以通过全合成途径直接合成肌苷,还可利用外加的次黄嘌呤转化成肌苷^[10]。我们也发现,在发酵培养基中添加次黄嘌呤,也同样增加了肌苷的累积量(表5)。

表5 发酵培养基中添加次黄嘌呤与肌苷产量的关系

次黄嘌呤添加量 (克/升)	肌苷生成量 (克/升)	相对百分比 (%)
0	9.24	100
0.1	11.63	114
0.2	13.17	143
0.5	14.13	153

可见,7171-6-1 突变株除了能全合成肌苷外,兼有使次黄嘌呤转化成肌苷的能力,关于这点还有待用同位素标记等方法来证实。

四、据报道,枯草杆菌 K 菌株的 AMP 脱氨酶阴性,腺嘌呤缺陷型并抗低浓度 8-AG 的突变株有效地提高了肌苷发酵的产量^[15]。我们所获得的枯草杆菌 No. 101 的

腺嘌呤突变株,再经 DES 和 8-AG 复合处理后,肌苷产量也有明显的提高。肌苷产生菌 710577 是在 8-AG 浓度为 50 微克/毫升的平皿上分离出来的。至于 710577 在低浓度 8-AG 处理后,肌苷产量的提高和枯草杆菌 K 抗低浓度 8-AG 抗性菌肌苷产量提高,在机制上究竟有何区别,尚待进一步研究。

参 考 资 料

- [1] Today's Pharmaceuticals in Japan. Iskra Industry Co. Ltd. p. 70, 1968.
- [2] 内田茂美,新药と临床 16(11): 1419, 1967.
- [3] 小山胜一,新药と临床 17(4): 501, 1968.
- [4] 神田耕介,新药と临床 18(3): 385, 1969.

- [5] 国中明等:日本酿造协会杂志 59(8):656, 1964.
- [6] R. Aoki, et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9(4): 387, 1963.
- [7] R. Aoki, et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9(4): 397, 1963.
- [8] R. Aoki, et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9(4): 403, 1963.
- [9] R. Aoki, et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 14(4): 411, 1968.
- [10] Ken-ichi Sasajima, et al.: Agr. Biol. Chem., 34(3): 381, 1970.
- [11] Ikhuo Nogami, et al.: Agr. Biol. Chem., 32(2): 144, 1968.
- [12] 铃木节士: 特许公报, 20713, 1968.
- [13] Akira Furuya, et al.: Appl. Microbiol., 20(2): 263, 1970.
- [14] 奈良高等: 特许公报, 19747, 1972.
- [15] Kenji Ishii and Isamu Shiio: Agr. Biol. Chem., 36(9): 1511, 1972.

STUDIES ON THE SELECTION AND CULTIVATION OF INOSINE PRODUCING STRAIN *BACILLUS SUBTILIS* 7171-6-1

SHANGHAI INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY, ACADEMIA SINICA

SHANGHAI INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY

THE SHANGHAI INSTITUTE OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

THE SHANGHAI VE-TSIN (MONOSODIUM-GLUTAMATE) MANUFACTORY

(Shanghai)

When *Bacillus subtilis* No. 101 (wild type), was treated by diethyl sulfate and 8-Azaguanine, a double auxotrophic strain (ade⁻ and thi⁻), 7171-6-1, was derived.

This mutant was cultivated in glucose medium at 30—32°C, for 60—72 hours, and the yield of inosine reached 11.65 grams per litre.