

# 枯草杆菌 JSIM-1019 突变株 肌苷发酵研究

研究报告

邓崇亮 徐海

(江苏省微生物研究所,无锡)

**摘要** 以肌苷产生菌枯草杆菌 7171-9-1 为出发菌株,经物理、化学诱变剂连续处理,获得一株腺嘌呤、组氨酸、硫胺素三重营养缺陷型并对 8-氮杂鸟嘌呤、6-巯基嘌呤有双重抗性的突变株 JSIM-1019。在摇瓶和发酵罐试验中,该变异株的肌苷产量显著高于亲株。摇瓶试验产肌苷达 20 g/L,最高可达 24.83g/L。工业生产试验最高达 14.5 g/L,稳定在 12 g/L。发酵周期平均为 43.8 小时。菌株遗传性状稳定。

**关键词** 肌苷,枯草杆菌,诱变育种

我国用发酵法生产肌苷始于 70 年代,中试可达 10g/L<sup>[1,2]</sup>。我们用物理化学诱变剂对肌苷产生菌 7171-9-1 菌株连续诱变,从大量的突变株中,获得大量积累肌苷的 JSIM-1619 菌株。自 1984 年以来,该菌株一直被国内多家工厂应用,生产稳定。现将菌种选育和发酵结果报道如下。

## 材料和方法

### (一) 出发菌株

枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 7171-9-1 系肌苷产生菌,摇瓶产肌苷 8—10g/L。遗传标记为腺嘌呤、硫胺素双重缺陷型 ( $Ade^-$ ,  $Thi^-$ )<sup>[1]</sup>。

### (二) 培养基

斜面培养基,基本培养基,完全培养基成份见文献[1]。

种子培养基(%): 葡萄糖 2.0,蛋白胨 1.0,酵母膏 1.5,玉米浆 0.5, NaCl 0.25, pH 7.0。

发酵培养基(%): 葡萄糖 10,酵母粉(药用) 1.6,豆饼水解液 0.5,  $(NH_4)_2SO_4$  1.1,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1, KCl 0.2,  $CaCO_3$  2.0 (分消), pH 7.0。

种子培养基用 500 ml 三角瓶,装液 30 ml, 120℃ 灭菌 20 分钟。发酵培养基用 500ml 三角瓶装液 20ml, 120℃ 灭菌 10 分钟。

### (三) 菌种诱变

收集在完全培养基上对数生长期的菌体

( $1 \times 10^9$ — $5 \times 10^9$ ), 用 50 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 充分洗涤数次,再在相同的缓冲液中加诱变剂亚硝基胍 (MNNG) 处理<sup>[3]</sup>或紫外线照射。处理过的细胞分别接种到含有 6-巯基嘌呤 (6-MP), 8-氮杂鸟嘌呤 (8-AG) 的培养基上,或按实验要求,拣出新的营养缺陷型。

### (四) 摇瓶发酵试验

获得的各种突变株在斜面上活化 24 小时,接一环于种子培养基,置 33—34℃ 往复摇床培养 18 小时作为种子,以 5% 量接入发酵培养基, 34—35℃ 培养 72 小时,测定肌苷含量。

### (五) 测定方法

1. 残糖: 磷钼酸显色测定<sup>[4]</sup>。
2. 菌体生长: 用 581 型光电比色计,在波长 650nm 处测定。
3. 肌苷: 实验室用电泳测定<sup>[5]</sup>,生产上用 732 型阳离子交换柱测定<sup>[1]</sup>。

## 结果

### (一) 突变菌株的遗传标记及肌苷产量

对出发菌株进行自然分离,挑取肌苷产量较高的单菌落,经亚硝基胍诱变处理,获得一株在含有 200  $\mu$ g/ml 腺嘌呤的基本培养基上不生长的敏感株 MG-A。对 MG-A 突变株用亚硝

本工作得到沈梅生副研究员的指导,特此致谢。参加工作的还有王敏、刘佳二同志。生产性试验在河南省新乡市第二制药厂进行。

基胍和紫外线连续诱变处理,先后获得对6-巯基嘌呤(6-MP)、8-氮杂鸟嘌呤(8-AG)有抗性,生长需要组氨酸的突变株。其选育谱系及遗传标记见图1。变异菌株的肌苷产量见表1。

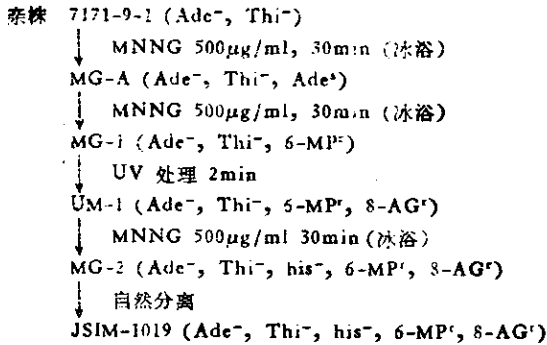


图1 枯草杆菌 JSIM-1019 突变株选育谱系

Ade<sup>-</sup>: 腺嘌呤缺陷型, Thi<sup>-</sup>: 硫胺素缺陷型, his<sup>-</sup>: 组氨酸缺陷型, Ade<sup>s</sup>: 腺嘌呤敏感型, 6-MP<sup>r</sup>: 6-巯基嘌呤抗性, 8-AG<sup>r</sup>: 8-氮杂鸟嘌呤抗性, MNNG: 亚硝基胍, UV: 紫外线

表1 菌株 7171-9-1 和各类突变株的肌苷生成量

菌株	肌苷生成量 (mg/ml)
7171-9-1	9.35
MG-A	9.55
MG-1	13.58
UM-1	16.53
MG-2	18.32
JSIM-1019	24.83

## (二) 突变株 JSIM-1019 产苷稳定性试验

验

在选得突变株 JSIM-1019 后,我们考虑到多次诱变获得的菌株容易发生遗传分离现象,具体表现是往往出现大小不一的菌落,故需从突变株中纯化获得遗传性稳定的单菌落。为此,我们进行自然分离。分离时,平皿上绝大多数为大菌落。经摇瓶试验,大菌落的肌苷产量明显高于小菌落(表2)。

表2 JSIM-1019 突变株大小菌落积累的肌苷

菌落类别	挑取菌落数	平均产肌苷 (mg/ml)	大小菌落产肌苷比率(%)
大菌落	50	19.24	100
小菌落	30	13.85	72

把 JSIM-1019 突变株斜面连续传代和冰

箱 4℃ 保藏不同时间,测定其肌苷产量,结果列于表3。

表3 冰箱 4℃ 保藏时间对肌苷产量的影响

4℃ 保藏时间 (天)	产肌苷量 (mg/ml)	
	摇瓶发酵	7000L 罐发酵
2	19.15	12.32
11	18.45	11.69
30	18.32	12.47
60	18.73	10.84

表4 斜面连续传代对肌苷积累的影响

传代数	肌苷 (mg/ml)
2	19.76
3	18.87
4	18.52
5	19.31
6	18.89
7	19.81
8	18.90
9	20.17
10	20.12
11	18.27
12	18.84
13	18.03
14	18.78

从表3,4结果可看出,该菌经4℃保藏60天,或斜面连续转接14次,肌苷产量未见降低。

## (三) 摇瓶发酵试验

1. 为了使新菌种用于发酵生产,在摇瓶条

表5 不同浓度葡萄糖和水解糖对突变株 JSIM-1019 肌苷积累的影响

肌苷 (mg/ml) \ 糖类别 \ 浓度 (%)	浓度 (%)				
	5	7	10	12	15
葡萄糖	10.85	15.23	19.45	20.89	15.04
水解糖	10.34	14.75	21.84	18.13	14.66

表6 不同酵母粉量对突变株 JSIM-1019 积累肌苷的影响

酵母粉 (%) \ 肌苷 (mg/ml)	酵母粉 (%)			
	1.4	1.5	1.6	1.7
肌苷 (mg/ml)	17.32	19.49	21.76	16.10
	17.85	19.03	21.17	16.23
	18.17	18.86	20.56	17.03

件下进行了发酵工艺的摸索：葡萄糖和淀粉水解糖的最适浓度，氮源选择，通气量的改变对肌苷积累的影响。结果列于表5、6、7。

表7 不同玉米浆浓度对突变株 JSIM-1019 积累肌苷的影响

玉米浆(%)	0.3	0.4	0.5	0.6
肌苷 (mg/ml)	16.83	17.87	20.15	19.76
	16.72	18.16	19.83	18.89
	17.15	18.10	20.23	17.52

结果表明，糖、酵母粉、玉米浆的用量分别为10%，1.6%和0.5%时，肌苷产量最高。

2. 不同时间提高通气量对肌苷产量的影响：用500ml三角瓶，装液量为30ml，分别于24，30，60小时提高通气量。结果表明，24小时开始提高通气量产肌苷效果最佳。此结果与 Ayaak Ishizaki<sup>[6]</sup> 的结果基本一致(表8)。

表8 提高通气量的时间对肌苷积累的影响

提高通气的时间 (h)	肌 苷 (mg/ml)
24	22.55
30	18.25
60	12.34
通气量不变	17.15

#### (四) 7000 L 发酵罐生产性试验

在摇瓶试验中，发酵条件与亲株7171-9-1相同，突变株的产苷量明显提高，因而有必要进行放大试验。采用标准型铁制发酵罐，容积7000

表9 7000L 罐连续五罐发酵结果

罐批	初糖 (%)	残糖 (%)	肌苷 (mg/ml)	次黄嘌呤 (mg/ml)	发酵时间 (h)
1	8.2	2.34	11.09	—	45
2	8.2	2.40	14.50	—	43
3	9.0	2.14	12.69	1.50	43
4	8.18	1.84	10.02	1.27	42
5	8.72	2.54	11.80	1.32	46
平均	8.46	2.25	12.02	1.36	43.8

L，定容5000L，转速160 r/min。通气量24小时前1:0.15 (V/V)，24小时后1:0.18 (V/V)。发酵温度，24小时前33—34℃，24小时后35—36℃。罐压1 kg/cm<sup>2</sup>，接种量8%。表9是肌苷连续发酵五罐的结果。发酵过程见图2。

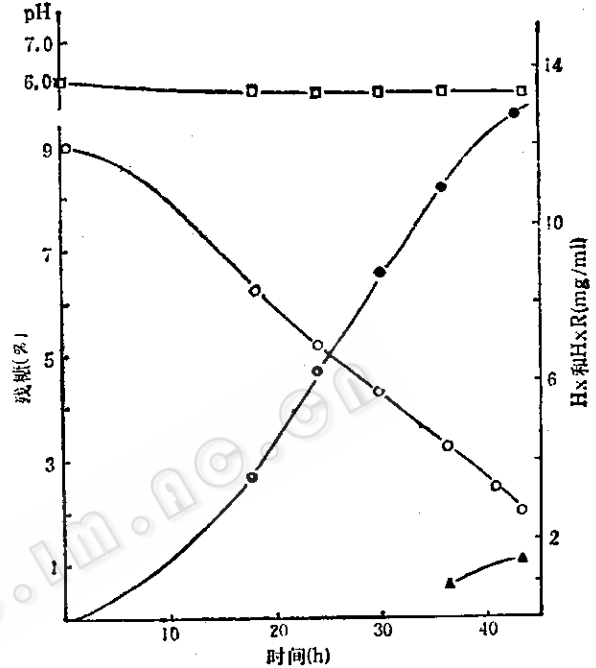


图2 JSIM-1019 菌株7000L 罐肌苷发酵过程  
●—● 肌苷，▲—▲ 次黄嘌呤，○—○ 残糖，□—□ pH

#### 参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生化所等：微生物学报，13(2):136—141。
- [2] 王景玉等：微生物学通报，10(6): 254—257, 1983。
- [3] Hiroshi Matsui et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 42(3): 637—641 1978。
- [4] 中国科学院微生物研究所：核苷酸类物质的生产和应用，科学出版社，北京，129页，1971。
- [5] Haruo Momose et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15: 399—411, 1969。
- [6] Ayaaki Ishizaki et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 37(1): 107—113, 1973。