

## 肌苷产生菌枯草芽孢杆菌 B<sub>5</sub> 菌株的选育和发酵条件

王敖全 程光胜 李逢英

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1. 用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 腺嘌呤营养缺陷型 (ade<sup>-</sup>) No 18 经 1 次亚硝基胍 (MNNG)。诱变处理及 2 次单菌落分离, 获得了能利用酶法制造葡萄糖 3 次结晶母液, 发酵生产肌苷的变异菌株 B<sub>5</sub>。在适宜条件下, 摇瓶肌苷产量在 7.0 克/升以上。2. 不同来源的酵母粉及其在培养基中的含量, 对肌苷产量均有显著影响。在所试验的酵母粉中, 以北京光华木材厂生产的圆酵母最好, 在种子和发酵培养基中的适合用量分别为 1.0—1.4% 和 1.2—1.4%。3. 在发酵过程中, 次黄嘌呤的积聚和肌苷积聚有着明显的消长关系。4. 枯草芽孢杆菌 B<sub>5</sub> 菌株具有很强的分段合成肌苷的能力, 当添加 0.3% 次黄嘌呤时, 可获得高于对照 93.3% 的肌苷产量, 但转化率以添加 0.1% 次黄嘌呤时为最高。

应用微生物发酵生产肌苷, 一般是以葡萄糖或淀粉水解糖为碳源<sup>[1-4]</sup>。从综合利用的观点出发, 我们进行了以酶法制造葡萄糖 3 次结晶母液为碳源 (下称固化三母液) 发酵生产肌苷的优良菌株的诱变及发酵条件试验。

### 材料和方法

#### (一) 出发菌株

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) AS 1.377 的腺嘌呤营养缺陷型 (ade<sup>-</sup>) No 18 (用 DES 诱变获得), 在以葡萄糖为碳源时, 能产生少量次黄嘌呤和痕迹量肌苷。以固化三母液作碳源 (含还原糖 68%) 时, 则不产肌苷和次黄嘌呤。

#### (二) 培养基及培养条件

1. 诱变使用的基础培养基: 同前报<sup>[2]</sup>。

2. 种子培养基: 葡萄糖 2%, 酵母粉 1.4%, NaCl 0.25%, 尿素 0.2%, 用 5 N NaOH 调 pH 至 7.0。种子装液量为 250 毫升三角瓶装 20 毫升。

3. 发酵试验基础培养基: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.5%, KCl 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 0.1%, CaCl<sub>2</sub> 0.01%。碳源和氮源分别在结果部分详细叙述。灭菌前以 5 N NaOH 调 pH 7.2。除发酵全过程试验用 500 毫升三角瓶装 20 毫升培养液进行外, 其余均以 200 毫升三角瓶装液 10 毫升, 8 磅 20 分钟灭菌。以上均用工业原料配制。

4. 种子培养条件: 除种龄及种量试验外, 均置 200 次/分旋转摇床上, 34℃ 培养 16—20 小时。

5. 发酵培养条件: 接种量为发酵液体积的 5—10%, 在 200 次/分旋转摇床上, 34℃ 培养 72—96 小时。肌苷和次黄嘌呤测定方法同前报<sup>[2]</sup>。培养基中还原糖含量用斐林定糖法测定。

### 结果与讨论

#### 一、肌苷产生菌的获得

离心收集处于对数生长期的 No 18 菌株, 以 pH 6.0 三羟甲基氨基甲烷-马来酸

本文于 1975 年 11 月 5 日收到。

缓冲液(下称 Tris 缓冲液)洗涤 2 次,洗涤细胞悬浮于同一缓冲液中,细胞浓度为  $10^8$  个/毫升左右。取一定量的菌液,以 pH 6.0 Tris 缓冲液配制的亚硝基胍(MNNG)溶液,在  $30^{\circ}\text{C}$  处理 30 分钟(MNNG 最终浓度为 500 微克/毫升)。将处理菌体适当稀释后,涂布于完全培养基平皿。置  $34^{\circ}\text{C}$  恒温箱培养 48 小时后出现明显大小菌落。以灭菌牙签随机挑取单菌落,在补加腺嘌呤及补加腺嘌呤和 300 微克/毫升 8-杂氮鸟嘌呤的两种平皿上进行复制。 $34^{\circ}\text{C}$  培养 36 小时。挑取在补加了腺嘌呤和 8-杂氮鸟嘌呤的培养基上生长微弱的菌株进行发酵试验。从进行复制的 886 个单菌中,有 12 株是腺嘌呤和维生素  $\text{B}_1$  ( $\text{ade}^-$ ,  $\text{thi}^-$ ) 的两重营养缺陷型,并且在以葡萄糖为碳源发酵时,产肌苷 1 克/升以上(突变率为 13.5%)。其中菌株 18-20 产肌苷可达 8 克/升。进而用固化三母液为碳源的发酵培养基,对 18-12 继两次单菌落分离所得菌株进行了筛选,获得了  $\text{B}_5$  菌株。以固化三母液为碳源时,在适宜条件下产肌苷可达 7 克/升以上。选育程序如下:枯草芽孢杆菌 No 18 ( $\text{ade}^-$ )  $\xrightarrow{\text{MNNG}}$  18-12 ( $\text{ade}^-$ ,  $\text{thi}^-$ )  $\xrightarrow{\text{单菌落分离}}$   $\text{B}_5$  ( $\text{ade}^-$ ,  $\text{thi}^-$ )。

二、肌苷产生菌株B<sub>5</sub>的发酵条件

(一) 酵母粉及其用量对肌苷产量的影响

我们以固化三母液为碳源,选用 7 种不同来源的酵母粉(种子和发酵培养基中酵母粉含量均为 1%)比较了它们对产肌苷的影响。由表 1 可以看出,酵母粉不同来源对肌苷产量影响很大。在本试验条件下,以北京光华木材厂生产的圆酵母最佳。为了找到以固化三母液为碳源时所选用的圆酵母的适合用量,我们进行了种子

表 1 不同来源酵母粉对 B<sub>5</sub> 菌株肌苷产量的影响

酵母粉来源	肌苷 (克/升)	次黄嘌呤 (克/升)
圆酵母(北京光华木材厂出)	4.46	2.88
“570”(本所)	2.94	0.82
面包酵母(天津)	2.08	2.14
田村酵母(北京田村腐乳厂)	1.94	2.13
清河酵母(北京清河粉丝厂)	1.41	2.75
纸浆酵母(东北)	1.04	2.13
“首啤”酵母(北京啤酒厂)	0	1.69

注:基础培养基补加固化三母液 8% ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5%, 尿素 0.4%,  $34^{\circ}\text{C}$  旋转摇床培养 72 小时。

表 2 种子和发酵培养基中酵母粉含量对 B<sub>5</sub> 菌株肌苷产量的影响

肌苷(克/升) 种子培养基中 酵母粉(%)	发酵培养基中 酵母粉(%)				
	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
1.0	2.87	3.93	4.04	6.32	2.78
1.2	2.96	4.80	4.25	4.99	2.62
1.4	3.27	3.80	4.48	5.65	3.43
1.6	0.89	4.40	2.92	2.58	2.58
1.8	0.46	2.53	1.71	1.18	1.18

注:除酵母粉含量按表加入外,其余同表 1。

和发酵培养基中不同酵母粉含量对肌苷产量影响的配合试验。结果(表 2)说明,酵母粉含量对肌苷产量影响显著,种子和发酵培养基中酵母粉含量分别为 1.0—1.4% 和 1.2—1.4% 时肌苷产量为高。

(二) 氮源试验

1. 尿素: 在肌苷发酵中常采用  $\text{CaCO}_3$  来维持适合于肌苷积聚的 pH。考虑到工业生产上使用  $\text{CaCO}_3$  可能会造成一些麻烦,如堵塞管道,不利于肌苷提取等,我们用尿素代替  $\text{CaCO}_3$  进行了试验。从图 1 可见,在用 10% 的固化三母液和 1.5% ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的条件下,以 0.25% 的尿素量最适,肌苷产量可达 7.25 克/升,终 pH5.4。
2. 铵盐: 为了找到发酵积聚肌苷的适宜无机氮源种类和它们的用量,试验了生产上常用的 3 种铵盐  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 。由结果(图 2)可见,在

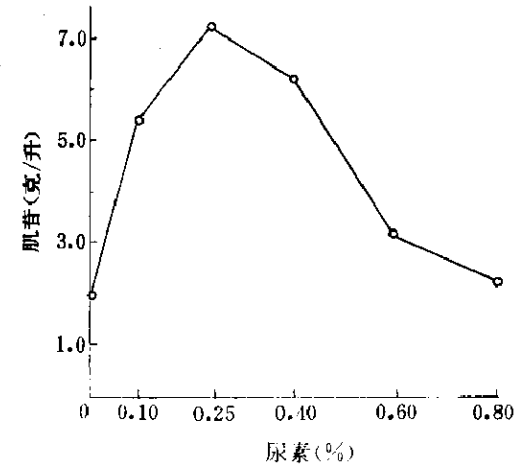


图1 尿素用量对 B<sub>5</sub> 菌株肌苷产量的影响

试验条件下, 3 种铵盐对肌苷积聚的影响较一致。NH<sub>4</sub>Cl 和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 最适用量为 0.5—1.0%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为 0.5—1.5%。

(三) 碳源试验

1. B<sub>5</sub> 在不同碳源中的肌苷产量: 对玉米淀粉水解糖, 葡萄糖, 蔗糖, 可溶性淀粉, 麦芽糖等 5 种碳源进行了试验, 其浓度均为 10%, 加到补充有 1.4% 酵母粉, 1.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25% 尿素, 0.4% 玉米浆的基础培养基中进行发酵。结果(表 3)表明, 所选择的几种碳源都能为 B<sub>5</sub> 菌株利用。其

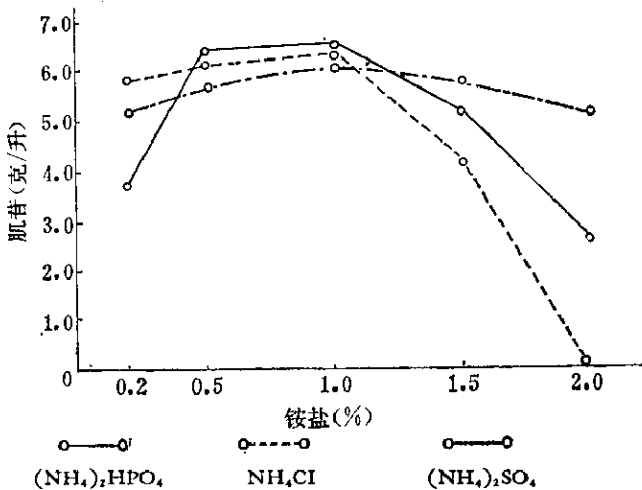


图2 不同铵盐及其含量对 B<sub>5</sub> 菌株肌苷产量的影响

注: 除铵盐和其含量按图 3 指出加入尿素用量为 0.25% 外, 其余同表 2。

表 3 对 B<sub>5</sub> 菌株不同碳源产肌苷比较

碳 源	终 pH	肌苷(克/升)
葡 萄 糖	6.4	5.89
麦 芽 糖	”	1.68
水 解 糖	6.0	4.18
蔗 糖	5.4	5.73
可溶性淀粉	7.0	0.57
固化三母液	5.8	5.37

中蔗糖, 葡萄糖与固化三母液肌苷产量水平接近。玉米淀粉水解糖稍次。

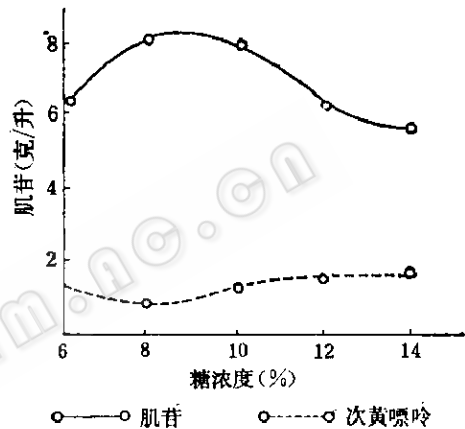


图3 固化三母液浓度对 B<sub>5</sub> 菌株肌苷产量的影响

2. 固化三母液浓度对肌苷产量的影响  
由图 3 可以看出, 当培养基中所含固化三母液为 8% 时, 肌苷产量最高, 在 8 克/升以上, 并且当肌苷产量最高时, 次黄嘌呤产量较低。

(四) 种龄及种量试验

为保证用于接种的种菌的生理特性的一致性, 用冰箱保存菌种直接接种。种子液在旋转摇床上, 34℃ 分别培养 10、12、16、20 和 24 小时, 然后接种发酵培养基, 种量分别为 1%、5%、10% 和 20%, 培养 72 小时测定结果(表 4)证明, 在上述试验条件下种龄及种量对肌苷产量均无明显影响。肌苷产量大都在 8 克/升左右。

表 4 B<sub>5</sub> 菌株种龄及种量对肌苷产量的影响

肌苷(克/升) 种龄(小时)	种量(%)			
	1	5	10	20
10	6.70	7.79	8.19	7.87
12	7.80	7.93	7.94	7.38
16	7.37	7.27	6.46	7.39
20	8.28	7.34	7.72	7.15
24	7.91	7.30	7.81	2.33

表 5 连续斜面转管对 B<sub>5</sub> 菌株肌苷产量的影响

连续斜面转管数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
肌苷产量(克/升)	6.60	8.23	7.92	7.95	7.92	7.16	7.51	8.44	6.97	7.47

(六) 由次黄嘌呤分段合成 (Salvage synthesis) 试验

枯草芽孢杆菌能将外部添加的次黄嘌呤分段合成为肌苷<sup>[5,6]</sup>, 在我们以前的工作中也观察到了这种现象。对 B<sub>5</sub> 菌株在以固化三母液为碳源时, 对分段合成肌苷的能力也进行了试验。结果列于表 6。表明 B<sub>5</sub> 菌株具有很强的分段合成肌苷的能力。添加的次黄嘌呤的浓度对分段合成有一定影响, 添加 0.3% 时, 可以获得最高的肌苷产量, 比对照提高 93.3%。从添加次黄嘌呤的利用率来看, 则以添加 0.1% 时转化率为最高。添加次黄嘌呤低于 0.3% 时, 转化

表 6 添加不同量的次黄嘌呤对 B<sub>5</sub> 菌株分段合成肌苷的比较

添加的次黄嘌呤(%)	终 pH	肌 苷(克/升)	次黄嘌呤(克/升)	转化率(%)
0	5.4	7.80	0.73	0
0.1	5.8	11.04	1.07	241
0.2	5.8	11.97	1.13	131
0.3	5.8	13.81	1.05	106
0.5	5.8	13.50	1.21	63.9
0.7	5.8	13.17	1.21	41.9

注: 基础培养基补加 1.4% 酵母粉, 8% 固化三母液, 1.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25% 尿素, 次黄嘌呤按表加入。其余同前表。

(五) 连续斜面转管对肌苷产量的影响

为观察肌苷产生菌 B<sub>5</sub> 在斜面培养基转管过程中产肌苷能力的稳定性, 我们在完全斜面培养基上连续转管 10 次 (每次 34℃ 培养 24 小时), 以条件试验中所得最适条件进行发酵试验; 测定了每转管 1 次后肌苷产量。从结果(表 5) 看, 转管对肌苷产量并无明显影响。

率\*超过百分之百(表 6)。对此我们尚不清楚其原因, 推测可能是添加次黄嘌呤的量低时促进了肌苷的全合成。

三、肌苷发酵的全过程

为了解肌苷发酵的全过程, 对肌苷的形成, 肌苷和次黄嘌呤的相互消长, 耗糖, pH 变化等进行了分析。从结果(图 4) 看出, 培养 24 小时后, 开始有次黄嘌呤积聚, 48 小时次黄嘌呤达最高水平, 此后肌苷开始急剧增加, 次黄嘌呤逐渐减少。培养 96 小时后肌苷积聚达最高水平, 次黄嘌呤下降至最低水平。此后肌苷略有下降, 而次黄嘌呤略有上升。这就清楚表明, 在发酵过程中, 肌苷与次黄嘌呤间存在着相互消长的关系。

在培养 36 小时后, 活菌数增长至最高水平, 在培养 48 小时至 72 小时, 是肌苷以最大速率积聚期间, 活菌数却显著减少, 这是否与细胞部分自溶, 肌苷或与肌苷合成有关的酶系向细胞外泄出有关呢? 对此有待深入研究。

\* 转化率 =  $\frac{\text{肌苷总量 (mM)} - 29\text{mM (对照)}}{\text{消耗掉的次黄嘌呤 (mM)}} \times 100$

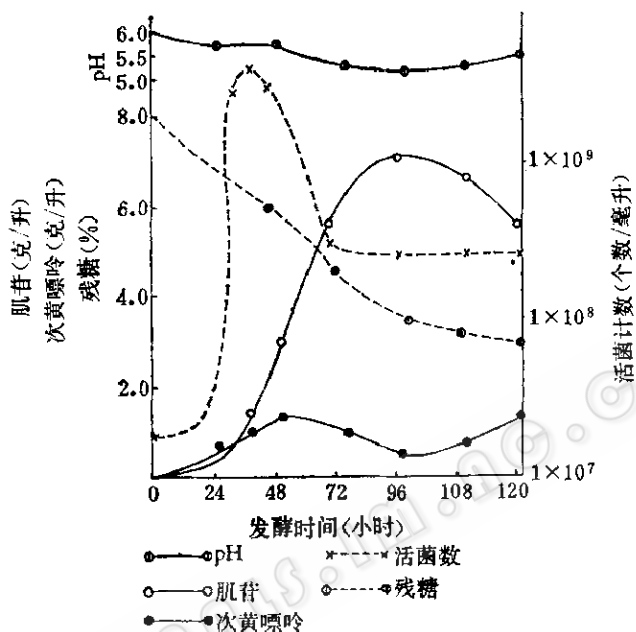


图4 肌苷发酵全过程

在 500 毫升三角瓶中装入 20 毫升补加了 8% 固化三母液, 1.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.4% 酵母粉, 0.25% 尿素的基础培养基, 以 5% 的种量, 在旋转摇床上 34℃ 培养不同时间后测定肌苷, 次黄嘌呤, 残糖, 终 pH 及活菌数量。

### 参 考 资 料

- [1] 中国科学院生物化学研究所等: 微生物学报, 13(2): 136—141, 1973 年。
- [2] 中国科学院微生物研究所肌苷组: 微生物育种学术讨论论文集(研究工作报告), 73—78 页, 科学出版社, 1974 年。

- [3] Aoki, R. et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 9(4): 387, 1963.
- [4] Sasajima, Ken-ich, et al.: Agr. Biom. Chem., 34 (3): 381—389, 1970.
- [5] Yamanoi, A. et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 11 (4): 339—353, 1965.
- [6] Kanamitsu, O.: Agr. Biol. Chem., 34 (9): 1424—1426, 1970.

## SELECTION OF THE INOSINE-PRODUCING STRAIN B<sub>5</sub> OF *BACILLUS SUBTILIS* AND ITS FERMENTATION CONDITIONS

Wang Aoquan, Cheng Guangsheng, Li Fengying

(*Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing*)

A desirable inosine-producing strain of *Bacillus subtilis* B<sub>5</sub> capable of utilizing Hydrol (mother liquor after thrice crystallization of enzymic converted dextrose) was obtained by treating an auxotrophic strain No. 18 (ade<sup>-</sup>) with MNNG followed by repeated single colony selection. Under favorable conditions, strain B<sub>5</sub> (ade<sup>-</sup>, thi<sup>-</sup>) produced more than 7.0 g/l of inosine in shake culture.

Yeast powder from different manufacturers and the amount used in the media exerted significant effect on inosine production. The yeast powder produced

by Kuanhwa Timber Mill was most satisfactory, its optimal amount for seed medium and fermentation medium being 1.0—1.4% and 1.2—1.4% respectively.

In the course of fermentation, a conspicuous pattern of quantitative shift from hypoxanthine to inosine was observed.

Strain B<sub>5</sub> possessed very high capability of "salvage" synthesis of inosine; an increase of 93.3% of inosine over check was obtained when 0.3% of hypoxanthine was added, but the highest conversion rate was attended with the addition of 0.1% of hypoxanthine.