

产氨短杆菌 *B₁₋₁₅₋₁₅* 分段合成法制造 5'-肌苷酸及其它核苷酸类物质

上海市工业微生物研究所 上海汽水厂

(上海)

产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) *B₁₋₁₅₋₁₅* 为野生型,需生物素,对 Mn^{++} 不敏感菌株,它具有“分段合成”核苷酸的能力,将外源核酸碱基转变为相应的核苷酸类物质。

在 30℃ 摇床培养 3 天后,加入 0.3—0.5% 的次黄嘌呤继续培养 2 天,可产生 5'-IMP 12—16 克/升。发酵的适宜条件为:培养基分别灭菌前的 pH, 糖镁液为 5.7 (自然 pH), 磷酸液为 7.0; 发酵过程中补加尿素控制 pH 6.7—7.0, 尿素总量 0.7% 左右; 玉米浆用量 3—4%; Mn^{++} 50—100 微克/升。

在 30℃ 培养 2 天,补加 0.4% 尿素和 0.4% 次黄嘌呤,提高温度至 37℃ 培养,可缩短发酵周期至 2.5 天,5'-IMP 产量为 9.54 克/升。

发酵法制造 5'-肌苷酸的研究^[1] 成功以后,利用微生物制造核苷酸类物质的研究日益发展。其中,利用沙顿小球菌 (*Micrococcus sodonensis*)、柠檬色节杆菌 (*Arthrobacter citreus*)、产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*)、嗜昆虫短杆菌 (*Brevibacterium insectiphilum*) 等在发酵过程中添加核酸碱基,可以合成相应的核苷酸类物质,故称分段合成法 (“Salvage synthesis”)。例如,由次黄嘌呤生成 5'-IMP*, 由鸟嘌呤生成 GMP、GDP 和 GTP, 由腺嘌呤生成 AMP、ADP 和 ATP, 由尿嘧啶生成 UMP, 由腺嘌呤、半胱氨酸和泛酸生成 CoA, 由腺嘌呤和菸酸生成 CoI 等^[2-7]。

本文报道产氨短杆菌 *B₁₋₁₅₋₁₅* 在发酵过程中添加不同核酸碱基,能分段合成 5'-IMP、5'-AMP (ADP 和 ATP)、5'-UMP、6-az-UMP、5-F-UMP、CoI 和 CoA。并重点探讨了 5'-IMP 的发酵条件。

材料和方法

一、菌种: 产氨短杆菌 (*B. ammoniagenes*)

B₁₋₁₅₋₁₅ 野生生物素缺陷型**。

二、培养基成分(%)

1. 斜面培养基: 葡萄糖 3, 酵母膏 1, 蛋白胨 1, 氯化钠 0.3, 琼脂 2, pH 7.0。
2. 种子培养基: 葡萄糖 3, 酵母膏 1, 蛋白胨 1, 氯化钠 0.3, 尿素 0.2, pH 7.0。
3. 发酵培养基: 葡萄糖 10, 硫酸镁 1 (分开灭菌), 玉米浆 3, 蛋白胨 1, 磷酸二氢钾 1, 磷酸氢二钾 1, 氯化钙 0.01, pH 7.0, 尿素 0.7 (分开灭菌), 次黄嘌呤 0.5 (分开灭菌)。

培养基用自来水配制后,于 121℃ 灭菌 20 分

本文于 1976 年 12 月 8 日收到。

* 缩写说明:

Hx: 次黄嘌呤。5'-IMP: 5'-肌苷酸。

G: 鸟嘌呤。5'-GMP、GDP 和 GTP: 5'-鸟苷酸、鸟苷二磷酸和鸟苷三磷酸。

A: 腺嘌呤。CoI: 辅酶 I。CoA: 辅酶 A。

5'-AMP、ADP 和 ATP: 5'-腺苷酸、腺苷二磷酸和腺苷三磷酸。

U: 尿嘧啶。5'-UMP: 5'-尿嘧啶核苷酸。

5'-F-UMP: 5'-氟尿嘧啶核苷酸。

6-az-UMP: 6-氮杂尿嘧啶核苷酸。

5'-I-UMP: 5'-碘尿嘧啶核苷酸。

R-5-P: 核糖-5-磷酸。

PRPP: 5'-磷酸核糖焦磷酸。

** 由中国科学院微生物研究所提供,本所保藏。

钟备用。

三、培养条件

1. 斜面培养: 接种后在 30℃ 培养 2 天, 放入冰箱(4℃)保藏备用。
2. 种子培养: 250 毫升锥形瓶内盛种子培养液 25 毫升, 接种斜面上刚长好的菌苔一环后, 于往复式摇床(振幅 7 厘米, 频率 120 次/分) 30℃ 振荡培养 16 小时。
3. 发酵试验: 500 毫升锥形瓶内盛发酵液 40 毫升, 接种量 2.5%, 于往复式摇床(同前), 30℃, 振荡培养 3 天后添加核酸碱基和 0.4% 尿素, 继续培养 2 天。

四、测定方法

1. 5'-IMP: 用纸层析法、紫外吸收法、5'-磷法和柱层析法等^[1]。
2. CoA: 用磺胺法^[9]。
3. CoI: 用纸层析法和紫外吸收法^[1], 荧光法^[11]和醇脱氢酶法^[10]等。
4. 5'-AMP: 用纸层析法, 纸电泳法和紫外吸收法等。

5. 5'-F-UMP 和 6-az-UMP: 用纸层析法和紫外吸收法^[12]。

6. 5'-UMP: 用纸层析法和紫外吸收法^[13]。

7. 菌体生长量(光密度 650 毫微米): 发酵液稀释 10 倍后, 在 581 型光电比色计以 65 号滤光片测定。

实验结果

一、菌的生长条件

1. 生长因子和促进生长因子的选择:

研究菌的营养要求是为了掌握和控制菌体生长量, 并寻找工业生产的最适培养基。经生长谱试验^[14], 产氨短杆菌 $B_{1-15-15}$ 为生物素缺陷型。在不同的生物素浓度下, 菌体生长量不等。生物素含量在 5 微克/升以上, 有利于菌的生长。氨基酸有促进生长的作用。其中, 异亮氨酸效果最显著(表 1)。

表 1 生物素和异亮氨酸对生长影响 (培养一天)

添 加 物	M.M*	M.M + 生物素(微克/升)					M.M + 生物素 15 微克/升	
		0.5	1.0	5.0	10	15	混合氨基酸 ^[15]	异亮氨酸 10 毫克/升
光 密 度 650 毫微米	无生长	0.09	0.12	0.18	0.174	0.182	0.32	0.28

* M.M(基本培养基)成份(%): 葡萄糖 3, 磷酸氢二钾 0.3, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸镁 0.1, 氯化钙 0.01, 尿素 0.2, 硫酸亚铁 0.001, 硫酸锰 0.001, pH7.0。

表 2 起始 pH 和尿素对菌体生长的影响*

起始 pH		5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
项 目	最终 pH	8.0	7.6	7.0	6.8	6.6	6.6	6.6	7.2	7.5
	光密度 650 毫微米	0.11	0.16	0.26	0.29	0.31	0.31	0.33	0.27	0.19
无尿素	最终 pH	5.5	5.8	6.2	6.6	6.7	6.6	6.8	6.6	7.0
	光密度 650 毫微米				0.04	0.05	0.12	0.16	0.19	0.12

* 培养 12 小时后测定光密度。

2. 起始 pH 和尿素对菌体生长的影响:

在添加尿素和无尿素的种子培养基中, 起始 pH 不同, 菌体的生长量不同。在有尿素

的种子培养基中, 若起始 pH 低, 则菌体生长慢; 起始 pH 高, 则菌体生长快, 最适生长起始 pH7—9。在无尿素的种子培养基中,

起始 pH 要求偏高,即使在最适生长 pH 的条件下,菌体生长量也比添加尿素的少(表 2)。

3. 培养温度对菌体生长的影响: 将接

种后的种子培养基,在不同的温度下振荡培养 15 小时,测定菌体的生长量(表 3),表明最适生长温度为 37℃,超过 42℃ 不能生长。

表 3 温度对生长的影响 (培养 15 小时)

培养温度(℃)	30	33	37	42	50
最终 pH	6.5	6.8	7.4	6.4	7.0
光密度 650 毫微米(×10)	0.25	0.25	0.295	0.048	无生长

二、发酵条件

用产氨短杆菌的野生型菌株分段合成核苷酸类物质常用含有高浓度的磷盐和镁盐,以及适量锰离子的发酵培养基^[16]。我

们试验了以下几种影响产氨短杆菌 B₁₋₁₅₋₄₅ 产生 5'-肌苷酸的因素如下:

1. 培养基分组灭菌前,起始 pH 的选择:

表 4 说明,糖镁液的起始 pH5.7(自然 pH),磷氮液 pH 7.0 为好。

表 4 培养基分组灭菌前,起始 pH 对生成 5'-肌苷酸的影响

糖镁液 pH	5.7(自然 pH)						7.0					
	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
磷氮液 pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5'-IMP (克/升)	6.03	9.41	8.69	7.01	6.67	5.13	4.68	6.94	7.47	6.75	6.57	5.6

2. 发酵过程中, pH 和尿素用量对产生 5'-肌苷酸的影响: 发酵培养液,调节不同的 pH,流加相同或不同量的尿素,以及采用少量尿素多次流加方式控制发酵过程

中 pH 表明(表 5、6): 在发酵过程中,控制 pH 6.7—7.0 有利 5'-肌苷酸的积累。按照发酵过程中 pH 值的要求,尿素总用量 0.7% 左右为适宜。

表 5 起始 pH 和尿素用量对产生 5'-IMP 的影响

起始 pH	7.0	6.5	6.0	7.0	6.5	6.0
起始尿素(%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
流加尿素(%)	0.3	0.3	0.3	流加尿素控制 pH		
最终 pH	6.7	6.6	6.2	6.7	6.8	6.2
5'-IMP (克/升)	11.28	10.62	6.43	12.70	12.78	7.11

表 6 尿素用量对产生 5'-IMP 的影响

起始 pH	7.0								
起始尿素(%)	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4
流加尿素(%)	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.4
最终 pH	6.2	6.4	6.7	6.2	6.7	6.8	6.5	6.7	7.2
5'-IMP(克/升)	5.22	6.75	6.03	6.75	10.98	11.07	8.82	11.52	7.82

3. 玉米浆的用量: 不同来源的玉米浆(上海药用辅料厂或华北制药厂)和不同批号的玉米浆, 在发酵培养基中要求的用量是不相同的。由表 7 可见, 本试验的玉米浆用量以 3%—4% 为好。

表 7 玉米浆用量对产生 5'-IMP 的影响

玉米浆浓度(%)	1	2	3	4	5
最 终 pH	6.5	6.5	6.7	7.0	7.0
5'-IMP (克/升)	6.4	8.2	11.6	12.0	10.8

4. 锰离子对产生 5'-肌苷酸的影响: 以发酵培养基为基础, 添加不同量的锰离子进行发酵试验。表 8 说明: 产氨短杆菌为非锰离子敏感株^[17]。增加适量的锰离子, 有利于 5'-肌苷酸的生成。

表 8 Mn^{2+} 对产生 5'-IMP 的影响

Mn^{2+} (微克/升)	不添加	50	100	200
光密度 650 毫微米 $\times 10$	0.26	0.265	0.27	0.265
最 终 pH	7.1	7.3	7.3	7.2
5'-IMP (克/升)	13.2	16.0	16.3	15.1

三、缩短发酵时间的试验

产氨短杆菌 $B_{1-15-15}$ 在适宜的发酵条件下, 具有较强的分段合成 5'-肌苷酸的能力。但发酵周期达五天之久, 不利于工业生产。为此, 我们进一步探讨发酵液在添加次黄嘌呤后, 合成 5'-肌苷酸过程中的作用条件。发现提高反应温度, 促进核苷酸合成酶系的活力, 可以缩短发酵周期一半。结果如下:

在 30℃ 发酵 48 小时的发酵液, 流加 0.4% 尿素和 0.4% 次黄嘌呤后, 在不同的温度下振荡保温或在橡皮塞密闭不通气情况下磁力搅拌 10 小时, 测定 5'-肌苷酸含量(图 1)。说明在保温过程中不需要通气, 37℃ 有利于次黄嘌呤转化生成 5'-肌苷酸。但是, 发酵前期的温度不宜过高(表 9), 在 34℃ 条件下进行发酵, 5'-肌苷酸的产量

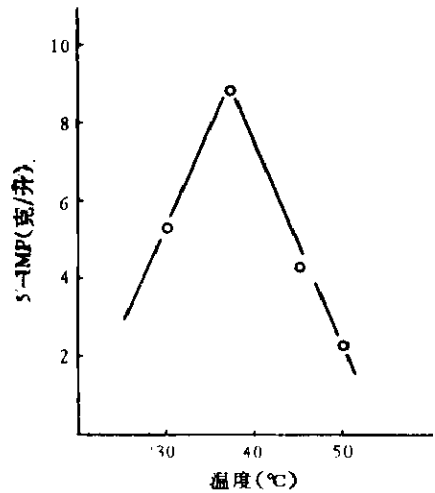


图 1 温度对转化作用的影响

明显下降。在 37℃ 条件下进行发酵, 不产生 5'-肌苷酸。由此可见, 在适宜的发酵条件下, 适当提高转化反应的温度(37℃), 可以加快核苷酸的合成速度, 缩短发酵周期(由五天缩短至二天半)。

表 9 发酵温度对产生 5'-肌苷酸的影响

发 酵		保 温		5'-肌苷酸 (克/升)
温度(°C)	时间(小时)	温度(°C)	时间(小时)	
30	48	37	10	9.54
34	48	37	10	4.66
37	48	37	10	不产酸

四、工业原料试验

1. 取代试验: 在发酵培养基中, 以一种或二种工业原料代替化学纯原料进行发酵试验。结果(表 10): 除甘薯淀粉水解液以外, 使用其他工业原料对 5'-肌苷酸的积聚量影响不大。

2. 有机氮源的选择: 产氨短杆菌 $B_{1-15-15}$ 的生长, 需要一定量的生物素和氨基酸。由表 11 可见, 当发酵培养基中采用稍高浓度的玉米浆, 可以省掉蛋白胨来制备工业原料的发酵培养液。

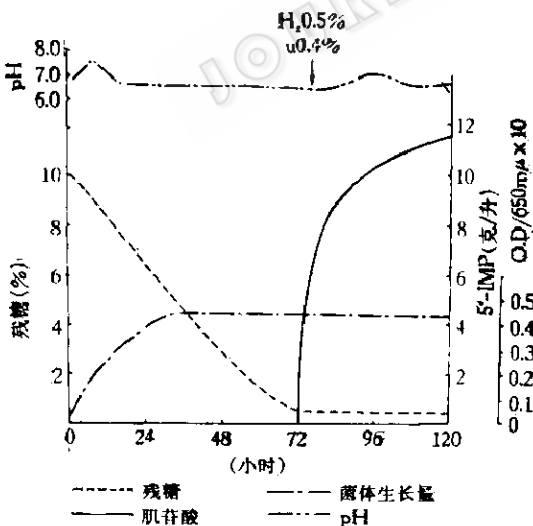
表 10 工业原料的取代试验

编 号	原 料	5'-IMP (克/升)
1	对照组(全部化学纯原料)	10.40
2	甘薯淀粉水解糖液(上海味精厂)代替葡萄糖	7.74
3	工业硫酸镁代替化学纯硫酸镁	9.90
4	工业尿素代替化学纯尿素	8.66
5	1.15% 工业磷酸用 20% 工业氢氧化钾调节 pH6.7 后代替化学纯磷酸氢二钾和磷酸二氢钾	8.84
6	水解糖液和工业硫酸镁代替化学纯葡萄糖和硫酸镁	7.20
7	水解糖液和 1.15% 磷酸(用 KOH 调 pH6.7)代替葡萄糖和磷酸氢二钾、磷酸二氢钾	7.38

表 11 有机氮源对产生 5'-肌苷酸的影响

项 目	编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
玉米浆用量(%)		3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	4.0
添加有机氮源名称			蛋白胨 1%	鱼粉 1%	鱼粉中性蛋白酶水解液	干酵母 1%	纸浆酵母 1%	豆饼水解液 1%		
5'-IMP (克/升)		5.58	7.02	4.85	6.84	5.04	6.24	6.40	6.68	6.84

注: 基础培养液组成: 甘薯淀粉水解液(19.6 波美度)50 毫升, 硫酸镁 1% (分开灭菌), 1.15% 磷酸(用 20% KOH 调节 pH6.7), 氯化钙 0.01%, 尿素 0.7%, (分开灭菌), 次黄嘌呤 0.3—0.4% (分开灭菌) pH7.0。

图 2 产氨短杆菌 B₁₋₁₅₋₁₅ 发酵过程

讨 论

1. 产氨短杆菌 B₁₋₁₅₋₁₅ 野生型(生物素缺陷型)菌株, 在发酵过程中如不添加核酸

碱基, 不产生核苷酸类物质。由图 2 可见, 在前 72 小时的发酵过程中葡萄糖已基本上被消耗, 培养液中并无 5'-肌苷酸产生。当加入次黄嘌呤后, 培养液中 5'-肌苷酸的含量突跃上升(在 8 小时内达 8.5 克/升)。延长发酵时间, 产量虽有增加, 但递增速度缓慢。这是否表明, 在发酵过程的前期已积累了 R-5-P 和 PRPP 等中间产物, 以及合成核苷酸类物质的酶系, 加入核酸碱基后, 就表现出合成核苷酸的酶反应? 对此有待进一步探讨。

2. 本菌的生长和发酵对温度的要求是不一致的。如 37℃ 是本菌生长的最适温度, 但在 37℃ 条件下进行发酵, 不产生 5'-肌苷酸。在 42℃ 以上的培养条件下, 菌体已不能正常生长繁殖了, 但在 30℃ 发酵的发酵液, 添加次黄嘌呤后在 45—50℃ 的条

件下进行保温反应,仍然可以产生一定量的 5'-肌苷酸。这是否表明在 30℃ 的发酵条件下,有利于本菌积累合成 5'-IMP 所需要的中间体和酶系呢?对此有待进一步研究。

3. 值得注意的是,我们发现产氨短杆菌 $B_{1-15-15}$ 在上述发酵条件下,添加不同的核酸碱基,可以产生相应的核苷酸类物质(表 12)。这是尤其令人感兴趣的。

表 12 产氨短杆菌 $B_{1-15-15}$ 产生核苷酸类物质

添 加 前 体	产 物	产 量	备 注
次黄嘌呤	5'-IMP	15 克/升	
腺嘌呤	5'-AMP	2.86 克/升	少量 ADP 和 ATP
腺嘌呤 泛酸钙 半胱氨酸	CoA	30—40 单位/毫升	
腺嘌呤 菸酰胺	CoI	1.5 克/升	5'-AMP 2.5 克/升
尿嘧啶	5'-UMP	1.98 克/升	
5'-氟尿嘧啶	5'-F-UMP	5.4 克/升	
5'-碘尿嘧啶	5'-I-UMP	+++	未定量
6-氮杂尿嘧啶	6-az-UMP	4.7 克/升	

参 考 资 料

- [1] 国中明:日本酿造协会志 56(1): 12, 1961.
- [2] 斋藤健等:特许公报, 28996, 1974.
- [3] Nakayama, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 32 (11): 1331, 1968.
- [4] 奈良高等:特许公报, 39477, 39478, 1973.
- [5] Nara, T. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 15: 19—25, 1967.
- [6] Ogata, K.: *C. A.*, 81 (1): 2381w, 1974.
- [7] 奈良高等:特许公报, 32795, 1971.
- [8] 上海味精厂等:《微生物资料汇编》第 2 集,第 31 页,科学出版社,1971.
- [9] 上海酵母厂:《微生物资料汇编》第 6 集,科学出版社,1972.
- [10] Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (ed),

Methods in Enzymology III, p. 891, Academic Press Inc., New York N. Y., 1957.

- [11] Sakai, T. et al.: *J. Chromatogra.*, 66, 111, 1972.
- [12] Tanaka, H. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35 (7): 989, 1971.
- [13] Nakayama, K. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35 (4): 518, 1971.
- [14] 盛祖嘉:微生物遗传学基础,第 184—185 页,上海科技出版社,1963.
- [15] 陈驹声:氨基酸与肌苷酸发酵,第 31 页,轻工业出版社,1965.
- [16] Misawa, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 34 (4): 617, 1970.
- [17] Nara, T. et al.: *Amino Acid and Nucleic Acid*, 18: 111—119, 1968.

THE "SALVAGE" SYNTHESIS OF 5'-INOSINIC ACID AND OTHER NUCLEIC ACID-RELATED SUBSTANCES BY *BREVIBACTERIUM AMMONIAGENES* B₁₋₁₅₋₁₅

Shanghai Institute of Industrial Microbiology,
Shanghai Aerated Water Manufactory

(Shanghai)

A wild strain of *Brevibacterium ammoniagenes* B₁₋₁₅₋₁₅ (biotin-requiring and Mn^{++} -insensitive) was found to be capable of converting exogenous purine and pyrimidine bases to the corresponding nucleotides by "salvage pathway".

Addition of 0.3—0.5% hypoxanthine to the fermentation medium on the 3rd day of shaking cultivation and with further incubation for 2 days led to the accumulation of 12—16 g/l 5'-IMP.

The suitable fermentation conditions were as follows: The components of cultural medium were autoclaved separately

with an initial pH of 5.7 (natural pH) for solution containing glucose and Mg^{++} , pH 7.0 for solution containing N and P sources. The pH was controlled at 6.7—7.0 by adding urea in a total amount of 0.7%; suitable amount of corn steep liquor was 3—4%, and Mn^{++} in 50—100 μ g/l.

By addition of urea (0.4%) and hypoxanthine (0.4%) on the 2nd day of incubation at 30°C and then raising the temperature to 37°C, the fermentation period was shortened to 2.5 days with a 5'-IMP yield of 9.54 g/l.