

利用淀粉直接发酵生产肌苷菌株的构建*

陈 宁 王艳萍 王一凡 张克旭

(天津轻工业学院食品工程系 天津 300222)

摘 要 以肌苷生产菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TF₂ 为受体菌, 利用质粒 DNA 的原生质体转化法, 将携带糖化型 α -淀粉酶基因的重组质粒 pBX96 导入肌苷产生菌 TF₂ 中, 转化频率为 5.7×10^{-6} , 获得一株能以淀粉为碳源生产肌苷的转化子 TI40(pBX96), 该工程菌株能在以淀粉为碳源的培养基上平均积累肌苷 4.64g /L, 经过 92 代, 质粒自发丢失率为 0.78%。培养 48h 后, 工程菌株的糖化型 α -淀粉酶活力为受体菌的 7.79 倍。并对工程菌株 TI40(pBX96) 的发酵条件做了初步摸索。

关键词 肌苷, 枯草芽孢杆菌, pBX96, 原生质体转化, 发酵条件

到目前为止, 所发现的肌苷生产菌都不能直接利用淀粉生产肌苷。通常在工业生产中, 必需先将淀粉以酶法或酸法制成淀粉水解糖, 再加以利用。如果能选育出以淀粉为碳源生产肌苷的优良菌株, 将会大大简化生产程序, 降低生产成本。以此为目的, 我们采用质粒的原生质体转化技术, 将携带外源糖化型 α -淀粉酶基因的质粒 pBX96 引入肌苷生产菌 TF₂ 中, 选育出一株能以淀粉为碳源平均积累肌苷 4.64g /L 的工程菌株 TI40(pBX96)。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

1.1.1 受体菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TF₂。遗传标记为 $ade^- + his^- + 8-AG^r + 6-MP^r + SD^r + Km^s$ 。天津轻工业学院代谢调控研究室保存菌种。

1.1.2 质粒: pBX96, 6.65kb, 带有巨大芽孢杆菌(*Bacillus megatherium*) AS1.127 的 Amy 基因和 Cm、Km 抗性基因。Amy 基因编码糖化型 α -淀粉酶。

1.1.3 基因供体菌: 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) C172 (pBX96), 由南开大学杨文博副教授提供^[1]。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(%): 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.4, 酵母粉 1.0, 牛肉膏 1.4, pH7.2, 0.1MPa 灭菌 20min。

1.2.2 保藏培养基(%): 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 0.4, 酵母粉 0.5, NaCl 0.25, pH7.2, 0.1MPa 灭菌 20min。

* 天津市科委攻关项目。

本文于 1996 年 3 月 7 日收到。

1.2.3 种子培养基(%): 葡萄糖 2.0, 蛋白胨 1.0, 酵母粉 1.5, 玉米浆 1.0, NaCl 0.25, 尿素 0.2, pH7.2。

1.2.4 发酵培养基(%): 葡萄糖 10, 药用酵母粉 1.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCO_3 2.0, 尿素 0.3, pH7.0。

1.2.5 转化子发酵培养基: 发酵培养基中葡萄糖改为可溶性淀粉, 其余相同。

1.2.6 基本培养基(%): 葡萄糖 0.5, 柠檬酸钠 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, KH_2PO_4 0.6, pH7.0。

1.2.7 转化子基本培养基: 基本培养基中葡萄糖变为 1% 可溶性淀粉, 卡那霉素 $50\mu\text{g}/\text{ml}$, 其余相同。

1.2.8 LB(%): 蛋白胨 1, NaCl 0.25, 酵母粉 0.5, pH7.2。

1.2.9 LBS:LB 中加入 1% 可溶性淀粉, 卡那霉素 $50\mu\text{g}/\text{ml}$, 其余相同。

1.2.10 SMM、SMMP、PAB、40%PEG6000、DM-3 再生培养基: 见文献[2]。

1.3 方法

1.3.1 pBX96 质粒的提取: 见文献[3,4]。

1.3.2 原生质体形成、转化及再生: 见文献[2,5]。

1.3.3 原生质体化频率、再生频率及转化频率计算: 受体菌计数为 A, 未形成原生质体的菌体计数为 B, DM-3 再生平板菌落计数为 C, 转化子计数为 D, 按文献[6], 原生质体化频率 $= (A - B) / B \times 100\%$, 再生频率 $= (C - B) / (A - B) \times 100\%$, 转化频率 $= D / (C - B) \times 100\%$ 。

1.3.4 质粒稳定性检测: 见文献[6]。

1.3.5 转化子阳性菌落的检出: 以 LBS+Km 平板通过 I_2 -KI 试剂显色检出。

1.3.6 糖化型 α -淀粉酶活力测定: 采用 DNS 法^[7]。酶活力单位定义为 40℃ 条件下, 每分钟水解可溶性淀粉产生 $1\text{mmol}/\text{L}$ 还原糖的酶量为一个单位。

1.3.7 肌苷检测: 采用纸层析法^[8], 用 751-G 型分光光度计进行测定。

1.3.8 发酵: 种子培养采用 250ml 三角瓶装 20ml 种子培养基, 往复式摇床 96 r/min, 33℃, 18 h。发酵采用接种量 5%, 500ml 三角瓶装 20ml 发酵培养基, 往复式摇床 96 → 110 → 120 r/min, 33 → 34 → 36℃, 72 h。

2 结果和讨论

2.1 受体菌株遗传标记及摇瓶产苷的鉴定

对受体菌 TF_2 的遗传标记进行了验证, 发现 TF_2 具有 Ade、His 双重营养缺陷标记。对 8-氮鸟嘌呤(8-AG)、6-巯基嘌呤(6-MP)和磺胺嘧啶(SD)有较强的抗性, 对卡那霉素(Km)敏感。

经测定, 发现在以葡萄糖为碳源的发酵培养基中, TF_2 平均积累肌苷 $13.86\text{g}/\text{L}$, 在以淀粉为碳源的发酵培养基中平均积累肌苷 $0.565\text{g}/\text{L}$ 。

2.2 原生质体形成、转化与再生

收集培养至 7 h 的 TF_2 菌悬液, 离心, 以 SMMP 洗涤, 悬浮, 加入 $2\text{mg}/\text{ml}$ 的溶菌酶, 37℃ 作用 2h, 其间以显微镜观察原生质体的形成情况^[9]。

将保存在 TE 中的质粒 pBX96 50 μ l 与等体积的 2 \times SMM 溶液在无菌试管中混合, 加入 0.5ml 原生质体悬浮液, 快速加入 1.5ml 40% PEG6000 溶液, 20 μ l CaCl₂, 在试管中轻轻混匀, 2min 后以 5ml SMMP 稀释, 离心, 洗涤, 重悬在 1ml SMMP 中, 37 $^{\circ}$ C 慢摇 90min, 稀释涂布在 DM-3+Km 再生平板上, 保温培养, 待长出菌落, 点接于 LBS+Km 平板上, 检出阳性菌落 Amy⁺Km^r(图 1、2)。经测定, 原生质体形成率为 99%, 再生率为 0.20%, 转化频率为 5.7 $\times 10^{-6}$ 。

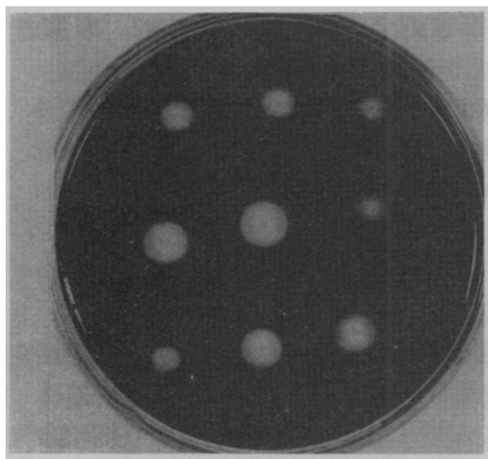


图 1 37 $^{\circ}$ C 培养 24h 的转化子

Fig. 1 Transformants after 24h incubation at 37 $^{\circ}$ C

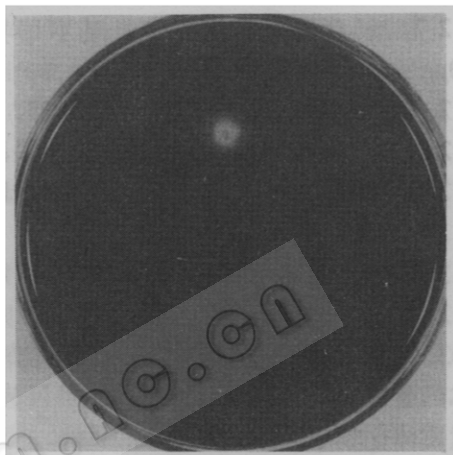


图 2 受体菌与转化子的比较

(上面点接转化子, 下面点接受体菌)

Fig. 2 Comparison of recipient and transformants

(upper: transformants below: recipient)

2.3 最佳涂板前培养时间及质粒稀释倍数的确定

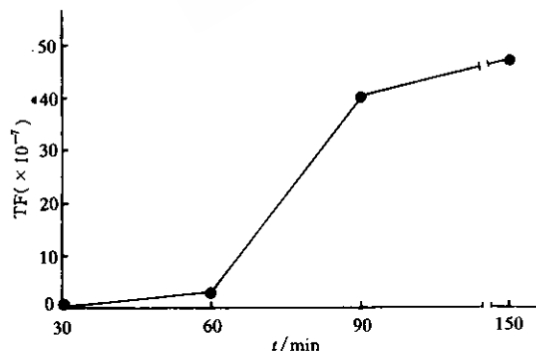


图 3 涂板前培养时间与转化频率的关系

Fig. 3 Relation between incubation time before plating and transformation frequency

TF 转化频率 Transformation frequency.

外源抗性基因在细胞内的表达需要一定的时间, 如图 3 所示, 涂板前培养 90min 左右, 转化频率即可达到最大, 再延长时间转化频率变化不大。

将制备的质粒稀释不同的倍数, 转化相同体积同时制备的原生质体, 发现 1.5ml 菌液制备而来的质粒 DNA 不稀释直接转化频率最高, 达 5.7 $\times 10^{-6}$, 而稀释 2.5 倍或 5 倍, 则转化频率急剧降低, 与文献报道相吻合。

2.4 转化子产苷能力的初筛与复筛

从 DM-3 再生平板上检出转化子 70 株, 任选其中的 47 株, 以淀粉为碳源

进行摇瓶发酵, 其产苷能力如表 1 所示。

表 1 转化子产苷能力(初筛)
Table 1 Primary screening of transformants

菌号 Strains	产苷能力 Inosine production /g · L ⁻¹	菌号 Strains	产苷能力 Inosine production /g · L ⁻¹	菌号 Strains	产苷能力 Inosine production /g · L ⁻¹
TF ₂	0.488	TI16	2.73	TI32	1.65
TI1	1.26	TI17	3.37*	TI33	1.33
TI2	1.04	TI18	2.31	TI34	1.75
TI3	1.67	TI19	2.34	TI35	2.10
TI4	1.57	TI20	3.56*	TI36	1.67
TI5	1.04	TI21	2.99	TI37	1.97
TI6	1.21	TI22	1.95	TI38	1.50
TI7	1.00	TI23	2.25	TI39	2.03
TI8	1.21	TI24	3.43*	TI40	3.53*
TI9	1.33	TI25	2.99	TI41	1.80
TI10	1.30	TI26	3.27*	TI42	3.56*
TI11	1.50	TI27	2.06	TI43	2.62
TI12	1.31	TI28	3.37*	TI44	2.71
TI13	0.84	TI29	2.11	TI45	2.25
TI14	1.52	TI30	2.35	TI46	2.25
TI15	1.75	TI31	3.76*	TI47	3.43*

进行摇瓶发酵，其产苷能力如表 1 所示。

可以看出，转化子多数具有产苷能力，而 TI13 菌产苷微量，从结果可以看出转化子在以淀粉为碳源的培养基中产苷要高于受体菌 TF₂。由初筛的 47 株转化子中得到 9 株产苷较好的菌株，分别是 TI17、TI20、TI24、TI26、TI28、TI31、TI40、TI42 和 TI47 (表中星花)，将这 9 株菌继续进行发酵，挑选出一株产苷能力较高的 TI40(pBX96)。经复筛，该菌株在最佳条件下平均积累肌苷 4.60g /L。

2.5 工程菌株 TI40(pBX96) 遗传稳定性测定

对 TI40(pBX96) 的缺陷标记及淀粉圈的有无进行了验证，结果如表 2 所示。TI40(pBX96) 保留了受体菌的营养缺陷标记，且增加了 Km 抗性标记，在以淀粉为碳源的培养基上表现出 α- 淀粉酶活力。对 TI40(pBX96) 质粒稳定性进行了检测，发现该转化子经过 92 代后，质粒自发丢失率为 0.78%，说明 pBX96 负载适宜，易于复制传代，稳定性良好^[10]。

2.6 TF₂ 与 TI40(pBX96) 糖化型 α- 淀粉酶活力比较

利用 DNS 法，测定了发酵液在发酵进行到 24、48 和 72h 时的酶活力，对 TF₂ 和 TI40(pBX96) 分泌的淀粉酶的活力作了比较，结果如表 3 所示。

如表 3 所示，TI40(pBX96) 的酶活力在发酵过程中始终高于 TF₂。48h 时 TI40

表 2 工程菌株 TI40(pBX96) 营养缺陷型的鉴定
Table 2 Identification of auxotroph of engineering strain TI40

培养基类型 Medium types	生长情况 * Growth phenomenon	淀粉圈 ** Transsparent circle by using starch
MM + Km	—	N
MM + Ade + Km	—	N
MM + His + Km	—	N
MM + Ade + His + Km	+	Y

* + 生长 Growth; — 不生长 No growth.
** N 无淀粉圈 No transsparent circle by using starch;
Y 有淀粉圈 Transsparent circle by using starch.

表 3 TI40(pBX96) 和 TF₂ 发酵液中酶活力的比较
Table 3 Comparison of activity of saccharifying type α -amylase between TI40(pBX96) and TF₂

时间 t / h	TI40(pBX96) 酶活力 Activity of TI40(pBX96) / u	TF ₂ 酶活力 Activity of TF ₂ / u
24	2.00	0.88
48	29.48	3.78
72	11.41	1.90

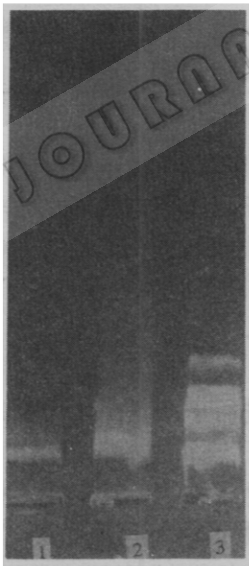


图 4 转化子和供体菌质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA extracted from transformants and donor

- 1. 转化子的质粒 DNA Plasmid DNA extracted from transformant;
- 2. 供体菌的质粒 DNA Plasmid DNA extracted from donor;
- 3. λ DNA HindIII 标记物 λ DNA HindIII marker.

(pBX96) 的酶活力达到 TF₂ 的 7.8 倍。

2.7 TI40(pBX96) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

为进一步证实 pBX96 已被导入 TF₂ 中，分别提取受体菌 TF₂、供体菌 C172(pBX96) 和转化子 TI40(pBX96) 的质粒，经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色后的带型如图 4 (受体菌经四次提取进行电泳均未出现质粒带，为负结果)。从转化子 TI40(pBX96) 和供体菌 C172(pBX96) 中分别提取的质粒 DNA 的带型完全一致，证明转化子中被导入的质粒为 pBX96。

2.8 TI40(pBX96) 发酵条件的初步研究

利用均匀设计方法，采用四因素五水平 5 组实验的方法，考查

了发酵培养基中淀粉浓度, 药用酵母粉、玉米浆和 Mg^{2+} 用量对产苷的影响。发现当淀粉浓度为 8%, 药用酵母粉、玉米浆和 Mg^{2+} 用量分别为 1.2%、1.0% 和 0.4% 时产苷最高, 达 5.28 g/L。

还研究了通风量对 TI40 (pBX96) 产苷的影响, 发现 48h 之前 110r/min, 48h 之后 120r/min 的通风方式较适宜, 此时产苷达 4.58 g/L。

2.9 pBX96 质粒表达的稳定性检测

将 TI40 (pBX96) 菌株在 LB+Km 斜面上连续转接 10 代, 分别测其产苷能力, 发现产苷能力较第 2 代有升有降, 但都稳定在 4.64 g/L 左右, 说明质粒的表达是稳定的。

参 考 文 献

- [1] 杨文博, 冯耀宇. 微生物学通报, 1994, 21(5): 273 ~ 278.
- [2] Chang S, Cohen S N. *Mol Gen Genet*, 1979, 168: 111.
- [3] 王岳五, 张 蓓, 陈 宁, 等. 实用重组 DNA 技术. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 1 ~ 5.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19 ~ 25.
- [5] 郭兴华, 贾士芳, 陈乃用, 等. 微生物学报, 1982, 22(3): 263 ~ 268.
- [6] 陈启民, 耿运琪, 倪 津, 等. 遗传学报, 1989, 16(3): 206 ~ 212.
- [7] 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 等. 工具酶的活力测定. 上海: 上海科学技术出版社, 1982. 74 ~ 76.
- [8] 陈 宁, 孙振环, 刘永生, 等. 天津轻工业学院学报, 1995, 1: 8 ~ 13.
- [9] 江行娟, 杨庆云, 任大明. 遗传学报, 1981, 8(1): 1 ~ 7.
- [10] 吕向阳, 蒋如璋, 王桂芬. 遗传学报. 1991, 18(2): 185 ~ 192.

THE CONSTRUCTION OF AN ENGINEERING STRAIN TO PRODUCING INOSINE BY FERMENTATION STARCH

Chen Ning Wang Yanping Wang Yipeng Zhang Kexu

(Tijun Institute of Light Industry Department of Food Engineering, Tianjin 300222)

Abstract Inosine-producing strain *Bacillus subtilis* TF₂ was used as recipient. By means of protoplast transformation, pBX96 containing saccharifying type α -amylase gene was transformed to TF₂, with frequency of transformation was 5.7×10^{-6} . An engineering strain TI40 (pBX96), which can utilize starch as the carbon source to produce inosine and accumulate an average of 4.64 g/L inosine, was obtained. After 92 generation, the frequency of plasmid-free cells was 0.78%. After 48 hours, the activity of the saccharifying type α -amylase of the transformant is 7.79 times more than TF₂. The condition of the fermentation of the transformant TF40 (pBX96) was studied.

Key words Inosine, *Bacillus subtilis*, pBX96, Protoplast transformation, Fermentation conditions