

鸟苷生产菌的选育及其发酵条件优化*

张蓓 马雷 武改红 张克旭 陈宁

(天津科技大学食品科学与生物工程学院,天津 300222)

摘要 以枯草芽孢杆菌 T1001 为出发菌株,经紫外线、硫酸二乙酯逐级诱变处理,选育出腺嘌呤缺陷型(Ade⁻)菌株,然后经蛋氨酸亚砷(MSO^r)、8-氮鸟嘌呤(8-AG^r)结构类似物平板定向筛选,获得鸟苷高产菌株 TA208。通过模式识别法对发酵培养基的组成进行优化,同时对发酵条件如温度、pH 值等进行了探索。在最优条件下,在 5L 自控发酵罐上发酵 60h,可产鸟苷 23.68g/L。

关键词 鸟苷,诱变育种,条件优化

鸟嘌呤核苷(Guanosine)又名 9-β-D-呋喃核糖基鸟嘌呤,简称鸟苷,其用途十分广泛,是食品和医药产品的重要中间体,可用于合成食品增鲜剂 5'-鸟苷酸二钠、呈味核苷酸二钠和核苷类抗病毒药物如利巴韦林、阿昔洛韦等,也是用于制造无环鸟苷(Acyclovir)、三氧唑核苷(ATC)、三磷酸鸟苷钠(GTP)等药物的主要原料。随着鸟苷工业用途的日益增长,发酵法生产鸟苷的研究也得到更广泛的重视^[1-2]。

以枯草芽孢杆菌 T1001 为出发菌株,经过紫外线、硫酸二乙酯逐级诱变处理,定向选育出一株鸟苷高产菌 TA208(Ade⁻ + MSO^r + 8-AG^r),并用模式识别法对发酵培养基组成和培养条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 出发菌株

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) T1001 天津科技大学代谢控制发酵研究室保藏菌株。

1.2 培养基(g/L)

- (1)完全培养基:见参考文献[3]。
- (2)基本培养基:见参考文献[4]。
- (3)种子培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10,玉米浆 10,酵母膏 10,尿素 2,味精 5,NaCl 5,pH 7.0~7.2 0.1 MPa 灭菌 10 min。
- (4)发酵培养基(g/L):葡萄糖 120,豆饼水

解液 50,酵母粉 16,(NH₄)₂SO₄ 15,MgSO₄·7H₂O 4,KH₂PO₄ 2,味精 10,CaCl₂ 2,pH 7.0~7.2 0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.3 诱变方法

采用常规 UV、DES 诱变法^[5]。

1.4 分析方法

pH:采用酸度计测定;菌体生长:吸取样品菌液 0.5 mL,摇瓶发酵液用蒸馏水稀释 20 倍,5L 发酵罐发酵液用蒸馏水稀释 50 倍,摇匀后测定 A₆₂₀ 值;还原糖:SBA-40C 多功能生物传感分析仪;鸟苷:采用纸层析法测定^[6]。

2 结果与讨论

2.1 鸟苷高产菌 TA208 的选育

以枯草芽孢杆菌 T1001 为出发菌株,采用紫外线和 DES 诱变处理,根据代谢控制发酵原理,依次赋予其 Ade⁻、MSO^r、8-AG^r 等遗传标记,最后获得一株鸟苷高产菌 TA208,其诱变谱系见图 1。

| 菌株 | 鸟苷产量(g/L) |
|--|-----------|
| 枯草芽孢杆菌 T1001 | 0 |
| ↓紫外线、DES | |
| TA012(Ade ⁻) | 8.9 |
| ↓紫外线、DES | |
| TM42(Ade ⁻ + MSO ^r) | 11.9 |
| ↓DES | |
| TA(Ade ⁻ + MSO ^r + 8-AG ^r) | 14.1 |

图 1 鸟苷生产菌 TA208 的选育谱系

2.2 种子培养条件的优化

2.2.1 种子生长曲线的测定

鸟苷产生菌 TA208 在种子培养基中不同

第一作者:博士研究生,编审。

*天津市高等学校科技发展基金项目(No. 20031205)

收稿时间 2003-11-11

时间的 pH 值和 OD 值如图 2 所示。由图 2 可知,鸟苷产生菌的延迟期很短,在 2 h 左右就开始进入对数期,16 h 左右对数期结束。种子培养基的 pH 值随时间的延长逐渐降低,在 4 h 达到最低点 pH 6.4,然后迅速升高,在对数末期 pH 达 7.3 左右。

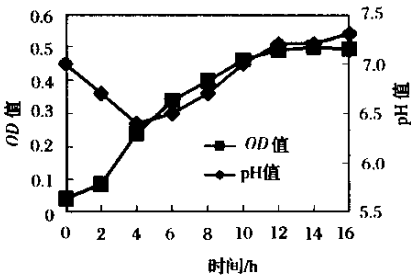


图 2 种子生长曲线

2.2.2 不同接种时间对鸟苷发酵的影响

不同接种时间对鸟苷发酵的影响如图 3。

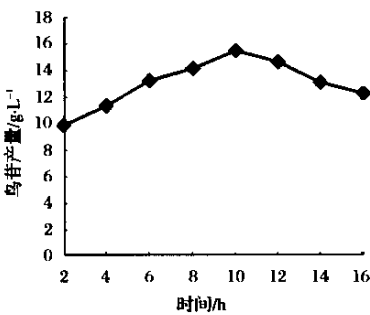


图 3 接种时间对鸟苷产量的影响

由图 3 可知,在种子生长时间为 10 h 时转入发酵培养基,鸟苷产量最高,因此,确定最适接种时间为 10 h。

2.3 发酵培养基组成的优化

表 1 试验设计及结果 g/L

| 编 号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 葡萄糖 X_1 | 80 | 80 | 80 | 100 | 100 | 100 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 |
| 酵母粉 X_2 | 14 | 16 | 18 | 14 | 16 | 18 | 14 | 16 | 18 | 16 | 14 |
| 豆浓 X_3 | 30 | 50 | 70 | 50 | 70 | 30 | 70 | 30 | 50 | 50 | 50 |
| 玉米浆 X_4 | 0 | 10 | 20 | 20 | 0 | 10 | 10 | 20 | 0 | 20 | 0 |
| 硫酸铵 X_5 | 10 | 10 | 5 | 15 | 5 | 5 | 15 | 10 | 15 | 15 | 15 |
| 鸟苷产量 | 15.75 | 13.28 | 11.94 | 16.63 | 12.53 | 12.21 | 17.43 | 15.94 | 17.13 | 15.22 | 16.32 |

应用 MATLAB 软件对表 1 所示试验设计组合进行 PCA 运算,得到 4 个主成分,结果如下:

采用模式识别方法对发酵培养基进行了优化。所谓模式识别(pattern recognition),即用一定的数学方法,对多因素信息进行处理,将物群分类,了解各因素之间的关系以及各因素对分类的影响,并确定物体所属类别,为进行判别和决策提供依据。主成分分析(principal component analysis, PCA)是模式识别中的一种降维映射法,它将多维空间的信息在低维(一般是二维)空间中表现出来,可用于样本分类^[7,8]。文中以发酵培养基组分为特征变量构筑模式空间,以鸟苷产量为评价目标,将样本划分为优与非优 2 类。通过主成分分析法进行线性映射,将高维模式空间降至二维可视区,再以优化拟合方法从二维空间逆推回原高维空间,得到优化的发酵培养基组成^[9]。模式识别运算过程示意图见图 4。

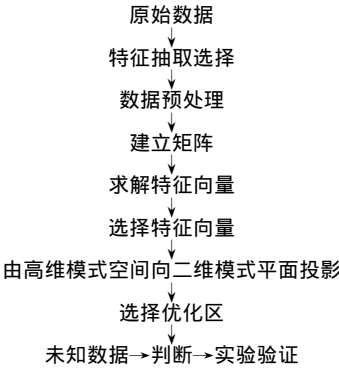


图 4 模式识别过程示意图

发酵培养基中对发酵产苷影响最大的是碳源和氮源。选择葡萄糖、酵母粉、豆浓、玉米浆和硫酸铵为待优化控制变量,试验设计及鸟苷发酵产量如表 1 所示。

$$Y_1 = 0.5395X_1 - 0.3381X_2 + 0.5704X_4 + 0.5189X_5$$
$$Y_2 = -0.4936X_1 - 0.3788X_2 + 0.6454X_4 - 0.4432X_5$$
$$Y_3 = -X_3$$

$$Y_4 = -0.0767X_1 - 0.8553X_2 - 0.5064X_4 + 0.0790X_5$$
$$Y_5 = 0.6779X_1 - 0.1035X_2 - 0.0413X_4 - 0.7267X_5$$

式中 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_5 分别表示经标准化后的原始变量线性组合成的矢量,各矢量相互正交,称这些矢量为**主成分**。第 1 主成分反映了样本间的最大差异,其他矢量所反映的差异程度依次降低。

以第 1、2 主成分 Y_1 、 Y_2 为坐标轴构成一个模式空间,二维映射如图 5 所示,主成分得分列于表 2(主成分得分是原始数据在由主成分所定义的新坐标系中确定的数据)。

表 2 主成分得分表

| 试验号 | 主成分 | |
|-----|---------|---------|
| | Y_1 | Y_2 |
| 1 | -0.2451 | 1.8493 |
| 2 | -0.9246 | 0.4374 |
| 3 | -2.3798 | -0.8562 |
| 4 | 0.9765 | -0.5684 |
| 5 | -0.9972 | 1.1250 |
| 6 | -1.6768 | -0.2869 |
| 7 | 1.6796 | 0.0009 |
| 8 | 0.2244 | -1.2927 |
| 9 | 0.5777 | 0.0456 |
| 10 | 1.0001 | -1.4111 |
| 11 | 1.7653 | 0.9571 |

以鸟苷产量 ≥ 16 g/L 为优类样本,其余均为非优类样本。由图 5 结果可以看出,这两类样本能够被显著分开,分别落在不同的区域,这也是模式识别的实质所在。既然 2 类样本已经分离,只要在优类样本区域内寻找一些点,然后把优化点逆映射回原样本空间,就可以得到优

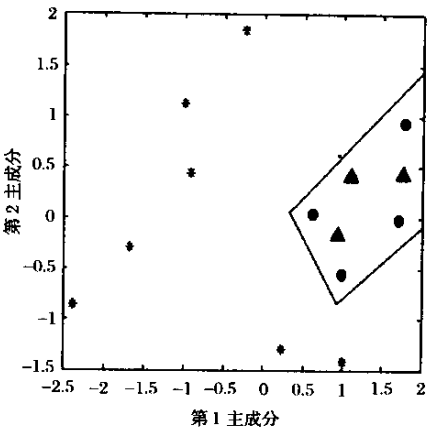


图 5 发酵培养基模式识别图

化的发酵培养基组成。在图 5 中找到 3 个点,位置如图 5 中▲所示。用 Monte Carlo 法^[10]把 3 个点进行逆映射,得到的发酵培养基组成及验证实验结果如表 3 所示。

由表 3 可以看出,优化后的发酵培养基产苷相对初始值均有所提高,其中▲3 为最优发酵培养基配方,其发酵液中可积累鸟苷 18.37 g/L。

2.4 发酵条件的优化

2.4.1 发酵过程中 pH 对发酵的影响

鸟苷发酵过程中,pH 值的控制对发酵前期菌体的生长与中后期的发酵产苷有一定的影响。在初始 pH 值均为 7.0 的条件下,用氨水调节 pH,测定了不同 pH 对鸟苷发酵的影响,结果见表 4。

表 3 优化参数及试验结果

| 选择点 | 葡萄糖 (X_1) g·L ⁻¹ | 酵母粉 (X_2) g·L ⁻¹ | 豆浓 (X_3) g·L ⁻¹ | 玉米浆 (X_4) g·L ⁻¹ | 硫酸铵 (X_5) g·L ⁻¹ | 鸟苷产量 / g·L ⁻¹ |
|-----|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| ▲1 | 114.5 | 15.2 | 50 | 11.2 | 14.0 | 17.61 |
| ▲2 | 112.6 | 14.6 | 50 | 6 | 14.3 | 17.84 |
| ▲3 | 117.3 | 14.2 | 50 | 5.8 | 15.8 | 18.37 |

表 4 不同 pH 对鸟苷发酵的影响

| pH 值 | 菌体生长(OD) | 鸟苷产量/g·L ⁻¹ |
|------|----------|------------------------|
| 6.2 | 0.95 | 17.18 |
| 6.4 | 1.17 | 18.24 |
| 6.7 | 1.25 | 16.65 |
| 7.0 | 1.16 | 15.17 |
| 7.2 | 0.97 | 14.57 |

由表 4 结果可以看出,当 pH 控制在 6.4 时,发酵结束鸟苷产量最高达 18.24 g/L。发酵过程中 pH 过高或过低,均会造成菌体生长延期,菌体量不够,产苷减少。

2.4.2 温度对发酵的影响

温度对鸟苷发酵有一定的影响。实验中测

定了不同温度对鸟苷发酵的影响,结果见表 5。

表 5 不同温度对鸟苷发酵的影响

| 温度/℃ | 菌体生长(OD) | 鸟苷产量/g·L ⁻¹ |
|------|----------|------------------------|
| 28 | 0.923 | 14.56 |
| 32 | 1.023 | 15.29 |
| 36 | 1.245 | 18.65 |
| 38 | 0.916 | 12.24 |

由表 5 结果可知,鸟苷发酵的最适温度为 36℃。在此温度下,菌体生长好,菌浓高,鸟苷产量也高。温度太低,则菌体生长较慢,难以完成对原料的转化;温度太高,则菌体易衰老,不利于高产鸟苷。

2.5 鸟苷发酵过程曲线的绘制

利用优化的发酵条件,在 5L 自控发酵罐上测定了鸟苷高产菌 TA208 的分批发酵过程曲线,结果见图 6。

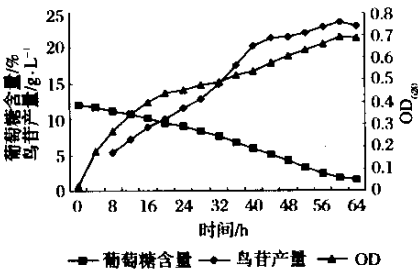


图 6 鸟苷分批发酵过程曲线

由图 6 可知,菌体生长延滞期很短,很快进入对数生长期,此时菌体的生长速率达到最大,耗糖速率随之加快,鸟苷产量也开始增加。24~60 h 为菌体生长稳定期,此时耗糖速率较快,

鸟苷大量合成,在发酵至 60h 时鸟苷产量达到最高值 23.68 g/L。60~64 h 为菌体衰亡期,耗糖速率减慢,菌体浓度不再增加,产苷量降低。

参 考 文 献

1 关维先,关月秋. 嘌呤类抗病毒药物的研究进展[J]. 中国医药情报, 1995, 1(3):182~185

2 张克旭,杜连祥译. 核酸发酵[M]. 北京:中国轻工业出版社,1987

3 张克旭,陈宁,张永志等. 微生物学报[J],1991, 31(2):108~114

4 杜连祥主编. 工业微生物学实验技术[M]. 天津:天津科学技术出版社,1992

5 章春春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京:科学出版社,1984

6 蔡显鹏,储炬,庄英萍等. 鸟苷发酵过程分析[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(9):5~9

7 Jain A K, Duin R P W, Mao J. Statistical pattern recognition: a review[J]. Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2000, 22(1):4~37

8 Trier D, Jain A K, Taxt T. Feature extraction methods for character recognition-a survey[J]. Pattern Recognition, 1996, 29(4):641~662

9 陈念贻,钦佩,陈瑞亮等. 模式识别方法在化学化工中的应用[M]. 北京:科学出版社, 2000

10 徐驰,陈超菊,王焕章等. 谷氨酸发酵工艺参数的模式识别优化设计[J]. 生物工程学报, 1994, 10(2):124~129

11 张蓓. 代谢工程[M]. 天津:天津大学出版社, 2003

12 张克旭,陈宁,张蓓等. 代谢控制发酵[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998

Breeding of Guanosine Producing Strain and Optimizing of Fermentation Condition

Zhang Bei Ma Lei Wu Gaihong Zhang Kexu Chen Ning

(College of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222)

ABSTRACT Guanosine-overproducing mutant was derived from *Bacillus subtilis* T1001 by using ultraviolet and diethyl sulfate(DES). The mutant was selected directionally and step wisely on the agar plates containing methionine sulfoxide(MSO) and 8-azaguanine(8-AG). The fermentation medium was optimized by pattern recognition method and the fermentation condition was also studied. Under the optimal condition, the mutant could produce guanosine 23.68 g/L after fermentation in 5L auto-fermenter for 60 hours.

Key words guanosine, mutagenesis, optimization