

D-核糖高产菌株的选育及其生产性试验

张一平 杜郭君 朱晓宏 王红连 邓崇亮 柏建新

(江苏省微生物研究所有限公司, 无锡 214063)

摘要 *Bacillus subtilis* JSIM-1018 菌株是 1 株产 D-核糖的莽草酸营养缺陷型突变株, 以此菌株为出发菌株, 通过甲基磺酸乙酯和紫外线连续、间断诱变处理, 获得了 1 株次黄嘌呤、莽草酸双重缺陷型突变株 No.271 菌株。该突变株摇瓶发酵的 D-核糖平均产量为 108.1 g/L, 比亲株提高了 15.8 g/L。在 30 000 L 发酵罐中, 连续 5 罐批, 平均产 D-核糖 96.4 g/L, 最高为 98 g/L, 比亲株提高了 16.25 g/L。

关键词 D-核糖, 莽草酸营养缺陷型, 次黄嘌呤营养缺陷型, 突变株, 选育

D-核糖是生物体内遗传物质核糖核酸(RNA)的组成糖, 也是各种核苷酸辅酶和维生素的组成糖。对于生物体来说, 核糖是一种具有重要生理意义的戊糖。D-核糖是工业上合成维生素 B₂ 的重要原料^[1]; 也是调味品、调味香精的合成原料^[2]; 还有一定的医疗作用, 具有治疗心肌局部缺血、改善心脏功能的作用^[3,4], 同时它还具有抗疲劳、提高人体耐力的作用, 可作为功能性保健食品^[5]。还是合成抗病毒、抗肿瘤药物的中间体^[6,7]。

发酵法是工业上生产 D-核糖最先进的方法。国内外主要是采用枯草芽孢杆菌的莽草酸缺陷型突变株^[8,9]。江苏省微生物研究所选育到 1 株枯草芽孢杆菌的莽草酸缺陷型突变株 JSIM-1018, 摇瓶积累 D-核糖达 92 g/L, 3 000 L 发酵罐 D-核糖产量最高 81.75 g/L, 平均 64.16 g/L^[10]。文中以此菌株为出发菌株, 选育到 1 株莽草酸、次黄嘌呤双重缺陷型突变株, 其糖代谢有较大的突破。

1 材料和方法

1.1 出发菌株

Bacillus subtilis JSIM-1018 菌株, 莽草酸营养缺陷型, 缺失转酮醇酶。

1.2 培养基

完全培养基: 葡萄糖 0.5%、蛋白胨 1%、酵母膏 0.2%、NaCl 0.2%、琼脂 2% pH7.2。

基本培养基: 葡萄糖 1%、(NH₄)₂SO₄ 0.4%、K₂HPO₄ 1.4%、KH₂PO₄ 0.6%、MgSO₄ 0.02%、生物素 0.0004%、琼脂 2% pH7.2。

补充培养基: 基本培养基中加入次黄嘌呤 50 μg/mL 和/或莽草酸 100 μg/mL pH7.2。

种子培养基: 参见文献 10]

发酵培养基: 参见文献 10]

1.3 菌种诱变

采用常规方法, 用甲基磺酸乙酯结合紫外线照射诱变出发菌株。处理过的菌悬液经稀释后, 涂布于完全培养基, 32℃培养 2 d。长出的单菌落同时接种于“基本培养基 + 莽草酸”和“基本培养基 + 莽草酸 + 次黄嘌呤”上。32℃培养 3 d 后, 检出在“基本培养基 + 莽草酸”上不生长, 而在“基本培养基 + 莽草酸 + 次黄嘌呤”上能生长的菌株, 即为所需要的突变株。

1.4 发酵试验

1.4.1 摇瓶发酵

斜面细胞接入 30 mL 种子培养基中, 往复式摇床(冲程 7 cm, 频率 108 r/min) 36℃培养 18 h 后, 以 10% 的量接入 20 mL 发酵培养基中, 38℃发酵培养 72 h, 测定 D-核糖含量。

1.4.2 发酵罐生产

菌种活化用茄子瓶 5 只, 种子罐为不锈钢标准型罐, 转速 300 r/min, 容积 3 000 L, 装液量 2 100 L; 发酵罐为不锈钢标准型罐, 转速 180 r/min, 容积 30 000 L, 装液量 21 000 L。种子罐培养温度 36℃, 发酵罐培养温度 38℃。

1.5 测定方法

1.5.1 菌体生长

种子 OD 与发酵 OD 均为培养液稀释 20 倍后, 用 721 分光光度计在 660 nm 处测量光密度(OD)值。

1.5.2 D-核糖含量

参见文献 10]

1.5.3 残糖测定

参见文献 10]

第一作者: 学士, 助理研究员。

收稿时间: 2004-11-10

2 结 果

2.1 从 *Bacillus subtilis* JSIM-1018 菌株诱变出次黄嘌呤缺陷型突变株 No.271 菌株

以 *Bacillus subtilis* JSIM-1018 菌株为出发菌株 ,按照“材料与方法”描述的方法进行诱变处理 ,在处理方法上采用紫外线与甲基磺酸乙酯连续、间断、交替诱变处理 ,提高突变率。从8 000余个诱变单菌落中 ,挑出 1 株在“基本培养基 + 莽草酸”上不能生长 ,在“基本培养基 + 莽草酸 + 次黄嘌呤”上能生长的突变株 ,菌株编号 No.271。

为了准确鉴定突变株的营养需求 ,检测了在基本培养基、基本培养基 + 莽草酸、基本培养基 + 次黄嘌呤、基本培养基 + 莽草酸 + 次黄嘌呤 4 种培养基上 ,突变株 No.271 与亲株 JSIM-1018 的生长情况 ,结果见表 1。

表 1 *Bacillus subtilis* JSIM-1018 与突变株 No.271 的营养需求

菌 株	生 长 情 况			
	基本培养基	基本培养基 + 次黄嘌呤	基本培养基 + 莽草酸	基本培养基 + 莽草酸 + 次黄嘌呤
JSIM-1018	—	—	+++	+++
No.271	—	—	—	+++

注 :— 不生长 ;+++ 生长。

从表 1 可以看出 ,No.271 菌株能够在同时含有

莽草酸和次黄嘌呤的培养基上生长 ,但是如果缺乏莽草酸或次黄嘌呤的任何一种 ,则不能生长。营养实验证明 No.271 菌株是 1 株莽草酸、次黄嘌呤双重缺陷型新突变株。

2.2 突变株 No.271 与亲株 JSIM-1018 摇瓶发酵积累 *D*-核糖的比较

从微生物磷酸戊糖代谢途径分析 ,莽草酸是芳香族氨基酸的前体 ,莽草酸营养缺陷型丧失了将 5-磷酸-*D*-核糖与 5-磷酸木酮糖反应生成 7-磷酸景天庚酮糖的能力 ,从而能积累过量的 *D*-核糖^[1]。菌株增加了次黄嘌呤营养缺陷型标记后 ,能阻断 5-磷酸-*D*-核糖流向 5'-嘌呤核苷酸的代谢流^[1]。因此 ,通过在培养基中添加含嘌呤碱基的物质 ,如 RNA ,对 *D*-核糖的积累进行了试验。在种子培养基中添加 0.05% 的 RNA ,在发酵培养基中添加 0.01% 的 RNA ,摇瓶发酵结果见表 2。

从表 2 可看出 ,新菌株 No.271 种子培养 18 h ,发酵培养 24 h 后 ,取样测得的生长 *OD* 均明显高于对照 ,*D*-核糖的积累量也相应有较大幅度提高 ,而亲株 JSIM-1018 在种子培养和发酵培养中 ,生长 *OD* 变化不大 ,*D*-核糖积累量也未见明显提高。No.271 菌株平均积累 *D*-核糖 108.1 g/L ,JSIM-1018 菌株平均积累 *D*-核糖 92.3 g/L ,新菌株平均比亲株提高了 15.8 g/L。

表 2 添加嘌呤类物质对 *D*-核糖积累的影响

菌 株	对 照				添 加 RNA			
	种子 <i>OD</i>	发酵 <i>OD</i>	<i>D</i> -核糖 /g·L ⁻¹	<i>D</i> -核糖 平均/g·L ⁻¹	种子 <i>OD</i>	发酵 <i>OD</i>	<i>D</i> -核糖 /g·L ⁻¹	<i>D</i> -核糖 平均/g·L ⁻¹
JSIM-1018	0.52	0.60	91.5	91.46	0.54	0.623	92.56	92.3
	0.51	0.615	92.35		0.52	0.63	93.68	
	0.505	0.61	90.54		0.52	0.64	91.85	
No.271	0.47	0.56	90.62	90.50	0.68	0.79	108.74	108.1
	0.44	0.54	89.85		0.65	0.81	109.34	
	0.46	0.53	91.03		0.66	0.78	106.22	

2.3 No.271 菌株 *D*-核糖发酵生产性试验

No.271 菌株在 30 000 L 发酵罐上生产 ,所用的碳源为玉米淀粉经双酶法制得的酶解糖 ,糖分消。在 3 000 L 发酵罐中进行种子培养 ,培养 18 h 后 ,按 10% 的接种量接入发酵培养基。表 3 是连续 5 罐批的发酵结果 ,表 4 是第 4 批发酵全过程批报 ,图 1 是第 4 批 *D*-核糖发酵的时间过程曲线。

表 3 30 000 L 罐 5 罐批发酵结果

罐 号	批 次	初糖 /%	<i>D</i> -核糖 /g·L ⁻¹	发酵周期 /h	糖转化率 /%
301	1	20.5	95.7	66	46.68
302	2	22.6	97.0	65	42.92
303	3	19.8	93.8	71	47.37
304	4	21.5	98.0	68	45.58
301	5	20.2	97.5	70	48.27
平 均		20.92	96.4	68	46.16

从图 1 可看出 ,No.271 突变株发酵 18 h 后菌体

OD 值迅速增加,发酵 30 h 时,OD 值就突破至 1.0 以上,并一直持续增加;24 h 后耗糖速度明显加快,D-核糖产量迅速增加;发酵结束时葡萄糖基本耗尽,D-核糖最高产量达到 98 g/L。而亲株 JSIM-1018 在

3 000 L 罐上发酵生产时,发酵生长 OD 一直未超过 0.7,D-核糖最高产量为 81.75 g/L^[10]。No.271 突变株罐上 D-核糖产量比亲株提高了 16.25 g/L。

表 4 30 000 L 发酵罐发酵全过程批报

发酵时间/h	0	12	18	24	30	36	42	48	54	60	68
pH	6.3	6.3	6.4	6.1	5.9	6.0	6.05	6.1	6.1	6.2	6.8
CO ₂	10	11.5	11	9.5	10	10	7.5	9.0	10.5	8.5	7.0
糖/%	21.5	18.2	16.0	14.1	11.5	8.0	5.3	3.6	1.8	0.9	0.3
OD	0.58	0.59	0.6	0.8	1.02	1.20	1.28	1.30	1.50	1.30	1.32
D-核糖/g·L ⁻¹	-	-	18.8	21.0	28.9	40.0	51.5	65.5	79.4	90.5	98.0

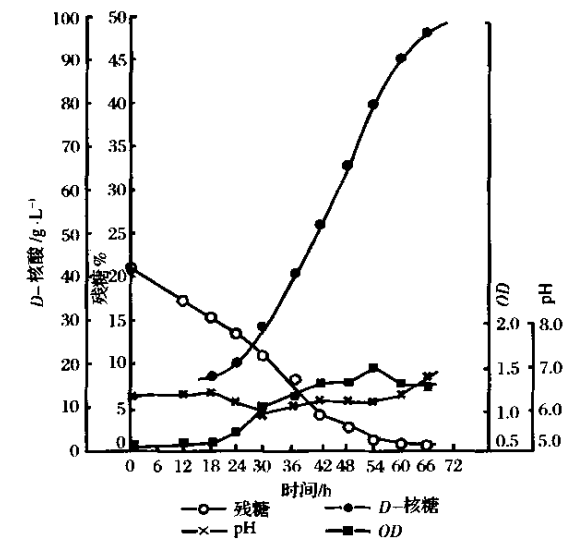


图 1 No.271 菌株 30000L 发酵罐 D-核糖发酵过程

2.4 No.271 菌株发酵过程中菌体形态

No.271 菌株在 30 000 L 发酵罐的生长过程中,细胞形态呈现一系列的变化。发酵前 24 h,菌体呈单个杆菌状,个体形态短小,菌体不弯曲;24 h 后,菌体变得粗壮,菌量多,分裂成数字型及锁状结构,出现类似阿拉伯数字的形态,这种现象是缺失转酮醇酶突变株的特征性表现;发酵至 54 h 时,菌体开始变得细长,大多以单个菌存在,弯曲形态消失;60 h 后菌体出现肿大,长短不齐;72 h 时,细胞肿大更明显,出现空泡,表现出自溶现象。

3 讨论

文中以 1 株缺失转酮醇酶活性的莽草酸缺陷型突变株 *Bacillus subtilis* JSIM-1018 为出发菌株,采用遗传诱变育种手段,选育到 1 株次黄嘌呤、莽草酸双重缺陷型突变株 No.271。

D-核糖是葡萄糖经磷酸戊糖途径(HMP 途径)所生成,生物体要积累 D-核糖,首先必须积累 5-磷酸

-D-核糖,然后再去磷酸形成 D-核糖。莽草酸缺陷型丧失了将 5-磷酸-D-核糖与 5-磷酸木酮糖反应生成 7-磷酸景天庚酮糖的能力,从而能积累较多量的 D-核糖。但是 5-磷酸-D-核糖还可在磷酸核糖焦磷酸激酶的作用下转化为 5-磷酸-D-核糖-焦磷酸(PRPP),从而进入嘌呤核苷酸代谢途径,合成肌苷酸、腺苷酸、鸟苷酸等 5'-嘌呤核苷酸^[11]。

从 5-磷酸-D-核糖到肌苷酸(IMP)有多步酶反应^[11],猜测突变株 No.271 很可能缺失磷酸核糖焦磷酸激酶,即从 5-磷酸-D-核糖到 PRPP 这一步酶反应被阻断了,从而阻断了 5-磷酸-D-核糖到 5'-嘌呤核苷酸的代谢途径,突变株的糖代谢能力有大的突破,摇瓶与罐上的 D-核糖产量均比亲株有较大提高。

参 考 文 献

- 1 De Wulf P, Vandamme E J. Production of D-ribose by fermentation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48 :141 ~ 148
- 2 Atkinson B, Mavituna F. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook (2nd edn) [M]. London: Macmillan, 1991
- 3 Zimme H-G, Ibel H Snchner U, Schad. Ribose intervention in the cardiac pentose phosphate pathway is not species specific[J]. Science, 1984, 223 :712 ~ 714
- 4 Sasajima K, Yoneda M. Production of D-ribose by microorganisms. In: Vandamme E J. ed, Biotechnology of Vitamins, Pigments, and Growth Factors[M]. Elsevier: New York, 1989. 167 ~ 197
- 5 Zimmer H G. Normalization of depressed heart function in rats by ribos[J]. Science, 1983, 220 :81 ~ 82
- 6 Chan M F, Hsiao C-N. A versatile and stereospecific synthesis of a dihydroxyethylene Dipeptide Isostere of Renin inhibitors from D-Ribose[J]. Tetrahedron Lett, 1992, 33 : 3567 ~ 3570

- 7 Tycroft A D Singh G , Wightman R H. Stereoselective synthesis of 3- β -*D*-ribofuranosylpyrazole from 2,3-o-isopropylidene-*D*-Ribose ; a new route to pyrazole *L*-nucleosides[J]. J Chem Soc Perkin Trans , 1995(1) 2667 ~ 2668
- 8 Sasajima K , Yoneda M . Carbohydrate Metabolism Mutants a *Bacillus Species* Part II *D*-Ribose Accumulation by Pentose Phosphate Pathway Mutant[J]. Agr Biol Chem , 1971 , 35 (4) 509 ~ 517
- 9 Masabiko Yoneda , Kea-Ichi sasajima. Method For Production of *D*-Ribos[P]. US Patent 3 607 648
- 10 邓崇亮 , 柏建新. 枯草杆菌 JSIM-1018 糖代谢突变株积累 *D*-核糖研究[J]. 微生物学通报 , 1997 24(4) : 214 ~ 217
- 11 アミノ酸 . 核酸集談会編 . 核酸 发醭 M]. 日本 : 奥村印刷株式会社 , 1976. 190 ~ 195

Breeding of *D*-ribose Over-producing Mutant and Its production

Zhang Yiping Du Guojun Zhu Xiaohong Wang Honglian
Deng Chongliang Bai Jianxin

(Limited Company of Jiangsu Institute of Microbiology , Wuxi , 214063 , China)

ABSTRACT Strain of *Bacillus subtilis* JSIM-1018 was a shikimic acid auxotrophy mutant which could accumulate *D*- ribose. This strain was selected as the starting strain in this study. After treating with UV ray and EMS , a hypoxanthine and shikimic acid double auxotrophy mutant strain No.271 was obtained. In the shaking flask culture , the average *D*- ribose production of mutant strain No.271 was 108.1 g/L , which is 15.8 g/L more than that of its parent strain. In the 30 000 L fermentors , the average *D*- ribose production was 96.4 g/L for 5 times ' fermentation , the highest *D*- ribose production was 98 g/L , which is 16.25 g/L more than that of its parent strain.

Key words *D*- ribose , shikimic acid auxotrophy , hypoxanthine auxotrophy , mutant , breeding

信息窗

我国开发出可溶性全骨复合物

天津科技大学经过多年研究 ,在动物骨综合利用方面攻克了一系列技术难题 ,取得了可喜的成果。其中 ,通过高新技术和独特的加工工艺 ,把动物骨中所有矿物质成分离子化、有机物质分子化 ,使之成为能被人体完全消化吸收的可溶性产品的研究成果 ,不仅填补了我国畜产资源利用技术的一项空白 ,而且在世界上也是首创。

据介绍 ,“动物骨综合利用技术”研究应用了 4 项关键技术 ,包括 :骨中矿物质成分的真空离子化技术 ,有机成分的电离、电解、活性化技术 ,活性有机成分的絮凝回收技术和天然胶原蛋白分子的再生提取技术。通过这些技术 ,把坚硬的骨骼制备成可溶性全骨复合物 ,使骨中所有有机、无机成分 ,均处于游离、可溶解和可吸收状态 ,并且骨中所含有的蛋白质、黏多糖和其他有机成分 ,均保持了特殊的生理活性。课题组以这些技术为基础 ,开发出高钙肉制品添加剂。

据了解 ,开发补钙添加剂 ,国外很早就尝试过用超细粉碎的骨粉。但是无论粉碎多么细 ,坚硬的羟基磷灰石也永远是结晶状态 ,胶原蛋白也是难溶解的纤维状态 ,它们既影响被添加食品 ,如香肠的适口性 ,又严重影响香肠的保水性。该项目开发的可溶性全骨复合物则完全解决了这些问题 ,这在肉制品添加剂开发上是一个创举。同时 ,与众多补钙产品不同 ,该项目开发出的产品包括了人体成骨及其代谢所需要的、并且可以完全消化吸收的全部矿物质成分和特殊的蛋白质 ,是营养成分极平衡的壮骨保健品。它们能通过骨中含有的骨生长促进因子等活性成分调节骨质代谢 ,通过骨中钙、磷等无机成分 ,和骨细胞、骨胶原蛋白以及数十种有机营养成分 ,滋养骨质、促进骨的生长 ,达到预防和治疗老年人骨质疏松症、幼儿生长发育不良等骨代谢疾病的目的。

该项目根据不同应用领域 ,开发出几种产品类型。例如 :天然可溶性矿物质与蛋白质复合物 ,为白色或黄色粉末 ,可以开发成速溶颗粒、片剂、饮料等保健食品 ;天然羟基磷灰石(骨矿物质成分) ,为纯白色粉末 ,可以作为壮骨、调节骨脂代谢的保健食品原料 ,以及用于修复牙齿微小损伤的牙膏天然添加剂 ;天然胶原蛋白或骨胶原蛋白 ,可作为化妆品原料、食品增稠剂、具有美容作用的食物添加剂、香肠等产品的蛋白质填充剂等。

随着人类膳食结构的变化 ,人体骨骼生长发育以及改善人体造血功能所需要的矿物质和其他活性成分 ,越来越不能满足人体的正常需要 ,从而造成了老年性骨质疏松症、贫血等疾病发病率的剧增 ,这在发达国家已经成为社会性问题。该成果的转化 ,将有望形成新兴的高新技术产业 ,经济效益和社会效益前景广阔。