



## 甜菜碱对枯草芽孢杆菌合成利巴韦林的影响

邢晨光<sup>1</sup>, 赵希景<sup>2</sup>, 谢希贤<sup>1</sup>, 陈宁<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 江苏诚意药业有限公司, 淮安 223002)

**摘要:** 以枯草芽孢杆菌 TM903 为供试菌株, 采用摇瓶分批补料发酵的培养方式, 考察了甜菜碱添加量对枯草芽孢杆菌合成利巴韦林及其合成途径中嘌呤核苷磷酸化酶(PNPase)活力的影响。结果表明, 初始培养基添加 0.7 g/L 的甜菜碱, 发酵 36 h 后每间隔 3 h 流加 0.1 g/L 甜菜碱, 可显著提高 PNPase 的相对酶活, 并且使利巴韦林的产量达 4.21 g/L, 比未添加前提高了 47.2%。

**关键词:** 利巴韦林; 嘌呤核苷磷酸化酶; 枯草芽孢杆菌; 甜菜碱

**中图分类号:** Q93      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2009)04-0014-04

### Effects of Betaine on Biosynthesis of Ribavirin by *Bacillus subtilis*

XING Chen-guang<sup>1</sup>, ZHAO Xi-jing<sup>2</sup>, XIE Xi-xian<sup>1</sup>, CHEN Ning<sup>1</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Jiangsu Chengyi Pharmaceutical Co., Ltd., Huaian 223002, China)

**Abstract:** The activity of PNPase and ribavirin production via *Bacillus subtilis* TM903 was investigated by fed-batch fermentation in shake flasks with the different concentration of betaine. 0.7 g/L betaine was added to the initial fermentation medium, and 0.1 g/L betaine was added into the fermentation system every three hours after 36 hours. The results show that the activity of PNPase can be improved markedly and ribavirin yield raise by 47.2% (4.21 g/L) compared with the fermentation system without betaine.

**Keywords:** ribavirin; PNPase; *Bacillus subtilis*; betaine

利巴韦林(ribavirin)化学名为 1-β-D-咪唑核糖基-1H-1,2,4-三唑-3-甲酰胺,为广谱抗病毒药物,对 DNA 和 RNA 病毒均有抑制作用,由于其具有毒性低、活性强、疗效高、副作用少、不易产生耐药性等优点,所以有很高的临床应用价值<sup>[1-3]</sup>。主要有化学合成<sup>[4]</sup>、酶法合成<sup>[5]</sup>和发酵合成<sup>[6]</sup>等方法生产利巴韦林,目前国内外对酶法合成以及化学法合成的研究较多,而对发酵法生产利巴韦林的研究鲜有报道,且发酵水平低,因此研究利巴韦林的高水平发酵势在必行。发酵法生产利巴韦林的菌株主要是枯草芽孢杆菌,而由其生物合成途径可知,要提高利巴韦林转化率,一方面需要刺激前体物鸟苷的积累,另一方面必须提高微生物体内嘌呤核苷磷酸化酶(PNPase)的活性。表达量

的增加可以促进鸟苷分解成鸟嘌呤与外加的三氮唑甲酰胺(TCA)进一步转化合成利巴韦林。

有报道<sup>[7-12]</sup>,许多表面活性剂用于氨基酸和核苷类物质的生产。汪泽等人在腺苷发酵中发现,培养基中添加4%的季铵盐阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵,能使腺苷产率提高20%;Udagawa等人和Konicek等人在谷氨酸和赖氨酸发酵中添加表面活性剂能增加产量近30%。甜菜碱(三甲氨基乙内酯)是一种表面活性剂,能够改善细胞的通透性,有利于产物的分泌和营养物的运输,减少产物的反馈抑制。目前尚未见文献报道在利巴韦林发酵过程中添加甜菜碱对枯草芽孢杆菌生长和代谢的影响。本文对此进行了考察。

收稿日期: 2008-11-04; 修回日期: 2009-03-02

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金项目(20070903)

作者简介: 邢晨光(1981—),男,山西运城人,硕士研究生;通信作者: 陈宁,教授, ningch@tust.edu.cn.

## 1 材料与方

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) TM903 由天津科技大学代谢工程研究室保存。

#### 1.1.2 培养基

斜面培养基、种子培养基、发酵培养基的组成见文献[13]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 种子培养

接一环生长良好的斜面种子至装有 25 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中,9 层纱布封口,置于旋转式摇床上,180 r/min,36 °C 振荡培养 8~10 h。

#### 1.2.2 摇瓶发酵培养

按 10% 的接种量吸取 3 mL 种子发酵液至装有 30 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶中,置于旋转式摇床上,220 r/min,36 °C 振荡培养至 24 h 时补加 1.0% 三氮唑甲酰胺,继续培养至 64 h 发酵结束。

#### 1.2.3 菌体生长量的测定

取一定体积(30 mL)的发酵液,8 000 r/min,离心 5 min,弃去上清液,用去离子水洗涤 3 次后,80 °C 烘干至恒重,为菌体的干重(g/L)。

#### 1.2.4 利巴韦林含量的测定

采用高效液相(HPLC)方法测定发酵液中利巴韦林含量。测定条件:色谱柱为 C<sub>18</sub>(5 μm, 4.6 mm×250 mm),流动相为 4% 乙腈,柱温 22 °C,流量 0.8 mL/min,吸收波长 207 nm。

#### 1.2.5 PNPase 活力的测定

通过测定反应体系中利巴韦林的生成量测定酶活力<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甜菜碱对菌体生长和利巴韦林合成量的影响

为考察甜菜碱对菌体生长和利巴韦林合成的影响,分别在 0 h、24 h、48 h 添加不同浓度的甜菜碱,发酵 64 h 后,测定菌体生长量和利巴韦林合成量,每个条件重复 3 次,对实验结果进行方差分析,并对均值进行两两比较, Tukey-kramer 检验,显著水平选择 0.05。其中甜菜碱添加浓度为 0.3、0.7、1.2 g/L,以发酵培养基中不加甜菜碱作为对照,结果如表 1、图 1、图 2 所示。

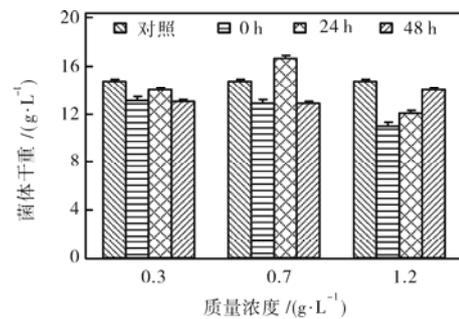


图 1 甜菜碱对利巴韦林发酵过程菌体生长的影响

Fig.1 Effect of betaine addition level on bacterial growth

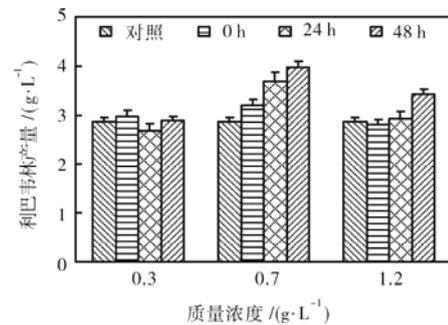


图 2 甜菜碱对利巴韦林产量的影响

Fig.2 Effect of betaine addition level on ribavirin production

表 1 甜菜碱的添加时间和添加浓度对菌体生长和利巴韦林合成的方差分析

Tab.1 Analysis of variance of ribavirin synthesis and thalline about betaine addition different level and time in ribavirin production

变量	自由度	细胞生长			利巴韦林合成		
		SS	F 值	P>F	SS	F 值	P>F
质量浓度	2	12.04	33.25	<0.000 1	4.890	34.86	<0.000 1
添加时间	2	8.489	23.49	<0.000 1	9.169	65.40	<0.000 1
交互作用	4	3.598	4.979	0.009 7	7.358	27.26	<0.000 1

从表 1 可以看出,甜菜碱的添加时间和添加浓度对菌体生长和利巴韦林积累的影响都很大,而且添加浓度和添加时间有交互作用。

从图 1 可以看出,添加甜菜碱会影响菌体的生

长,其中在发酵中期(24 h)添加对菌体的影响最大,而在发酵前期和发酵后期添加低浓度的甜菜碱对菌体生长影响不大。这可能是因为发酵中期菌体处于对数期,生长代谢旺盛,需氧量大,而甜菜碱的加入改

善了发酵液与空气的混合,提高了溶氧,利于菌体生长.然而,发酵前期添加 1.2 g/L 的甜菜碱使菌体量降低为对照的 74.6%;发酵中期添加 0.7 g/L 甜菜碱使菌体量提高了 13.3%.因此,高浓度甜菜碱对菌体的生长有一定的抑制作用.

由图 2 可知,在培养基中添加甜菜碱不会抑制利巴韦林合成,0.3~1.2 g/L 的范围内利巴韦林产量都在 2.68 g/L 以上.在发酵中后期添加甜菜碱对利巴韦林合成最有利.发酵 48 h 添加 1.2 g/L 甜菜碱,利巴韦林的产量比 0 h 添加 1.2 g/L 甜菜碱的产量 (2.71 g/L) 提高了 26.2% (3.42 g/L); 24 h 和 48 h 添加 0.3 g/L 甜菜碱,利巴韦林的产量比 0 h 添加 0.3 g/L 甜菜碱的产量 (2.92 g/L), 分别降低了 8.22% (2.68 g/L) 和 3.42% (2.82 g/L). 因此,低浓度的甜菜碱只有在发酵早期添加才有利于利巴韦林发酵,而高浓度的甜菜碱则在发酵中后期添加最有利于利巴韦林的发酵.分析其原因是:前期加入低浓度甜菜碱改善细胞膜的通透性,利于前体物鸟苷的外溢,降低产物的反馈抑制,刺激前体物鸟苷的大量合成;后期由于菌体生长处于衰亡期,加入高浓度甜菜碱破坏了细胞膜的生理功能,加速 PNPase 的泄漏,促进利巴韦林的合成.

由上述结果可知,在枯草芽孢杆菌发酵生产利巴韦林的过程中添加一定量的甜菜碱,可促进目的产物利巴韦林的合成,但高浓度的甜菜碱对菌体生长有一定的抑制作用.

### 2.2 培养基中甜菜碱的初始浓度对利巴韦林合成的影响

由于甜菜碱对菌体生长有一定的抑制作用,而且其抑制强度与其浓度呈正比.所以,在初始培养基中分别添加 0.3、0.5、0.7、0.9、1.2、2.0 g/L 的甜菜碱,进一步考察不同初始浓度甜菜碱对利巴韦林产量的影响,结果见表 2.

表 2 不同初始浓度甜菜碱对利巴韦林产量的影响

Tab.2 Effect of betaine addition different level on ribavirin production

甜菜碱初始质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	利巴韦林产量/(g·L <sup>-1</sup> )
0.0	2.68
0.3	2.98
0.5	3.21
0.7	3.82
0.9	3.89
1.2	2.86
2.0	1.45

由表 2 可以看出:培养基中添加 0.9 g/L 甜菜碱

时,利巴韦林的产量最高.随着甜菜碱浓度进一步增加,利巴韦林的产量逐渐下降.为控制成本,选择添加 0.7 g/L 甜菜碱.

### 2.3 甜菜碱的流加量对利巴韦林合成的影响

研究表明<sup>[9]</sup>,起始培养基中加入 0.7 g/L 甜菜碱后,在 36 h 时就基本被消耗完,若不再补加甜菜碱,不利于利巴韦林的合成,因此需采用分批补料流加的方式.在种子和发酵培养基包括发酵条件、甜菜碱初始添加浓度 (0.7 g/L) 以及补料液浓度 (0.1 g/L) 相同的条件下,分别采用 3 种补料方式进行补料分批发酵,结果见表 3.

表 3 不同流加方式对利巴韦林产量的影响

Tab.3 Effects of the addition method of betaine on ribavirin production

补料方式	利巴韦林产量/(g·L <sup>-1</sup> )	A <sub>620</sub>
A	3.02	1.542
B	4.21	1.764
C	2.48	1.026

注: A. 发酵 36 h 后,每隔 5 h 补料 10 mL; B. 发酵 36 h 后,每隔 3 h 补料 5 mL; C. 发酵 36 h 后,每隔 1 h 补料 1 mL.

从表 3 可知,补料方式 B 效果最好,A 次之,C 最差.方式 C 加入补料时间间隔过于频繁,使基底中甜菜碱浓度过大,而方式 B 则使甜菜碱浓度维持在最佳水平,说明菌体在较低甜菜碱浓度下生长,加速了底物转化,不存在对菌体生长和产苷的抑制作用,有利于利巴韦林的积累.

### 2.4 甜菜碱浓度对 PNPase 活力的影响

PNPase 是利巴韦林生物合成过程中的关键酶之一,PNPase 的表达量及活力的高低直接影响利巴韦林的生成量.为研究甜菜碱对 PNPase 的影响,在发酵培养基中分别加入 0.7 g/L、1.2 g/L 的甜菜碱,以不添加甜菜碱作为对照,发酵 64 h,以 1.2.5 方法测定酶活,结果如图 3、图 4 所示.

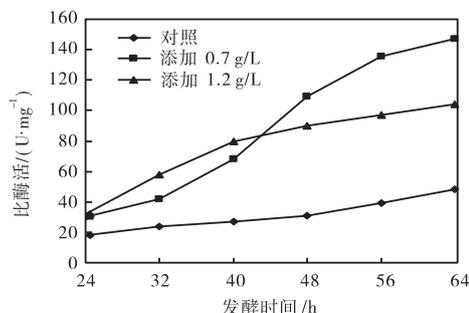


图 3 添加不同浓度甜菜碱对发酵液中 PNPase 的影响  
Fig.3 Effect of betaine addition different level on PNPase in the fermentation broth

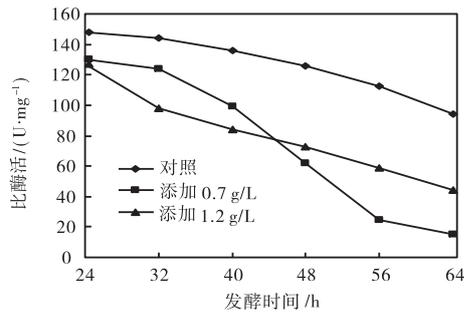


图4 添加不同浓度甜菜碱对发酵液菌体中PNPase的影响  
Fig.4 Effect of betaine addition different level on PNPase of bacterium

从图3、图4可知,发酵后期添加0.7 g/L甜菜碱发酵液中的比酶活是对照组的3.07倍,并且比添加1.2 g/L甜菜碱发酵液中比酶活提高了41.6%,而菌体中比酶活为对照组的17.02%。这是因为添加甜菜碱能改变细胞膜的通透性,加强胞内PNPase的外溢,增强酶的活性,刺激利巴韦林的合成。但高浓度甜菜碱对菌种的生长有一定程度抑制作用,而菌体浓度的高低直接影响PNPase的潜在相对活力。因此,添加0.7 g/L甜菜碱不仅对菌体生长较宜,而且PNPase比酶活也较高,利于利巴韦林的合成。

### 3 结论

选择甜菜碱作为发酵促进剂,通过研究甜菜碱的添加时间和添加浓度对PNPase及利巴韦林合成的影响,确定的最佳工艺条件为:甜菜碱初始质量浓度0.7 g/L,发酵36 h后,每间隔3 h补加0.1 g/L甜菜碱,此时利巴韦林的产量为4.21 g/L,比未添加甜菜碱前提高了47.2%。

#### 参考文献:

- [1] Lee J, Kim J H, Kim K, et al. Ribavirin enhances osteoclast formation through osteoblasts via up-regulation of TRANCE/RANKL[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 296 (1/2): 17-24.
- [2] Parker W B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin[J]. Virus Res, 2005, 107 (2): 165-171.
- [3] 邢晨光,徐庆阳,陈宁,等. 利巴韦林的生产方法及研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2008, 37 (4): 39-40.
- [4] Pei W, Joze K. Preparation of platinum(II) complexes with 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1, 2, 4-t riazol-3-carboximide and its deoxy-analogue[J]. Chin Chem Lett, 2001, 12 (6): 559-562.
- [5] Shirae H, Yokozeki K, Uchicyama M, et al. Enzymatic production of ribavirin from purine nucleosides by *Brevibacterium acetylum* AJ1442[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52 (6): 1777-1783.
- [6] Akira H, Keiko K, Satouakira. Method for producing ribavirin by adding inducer 1H-1, 2, 4-t riazole-3-carboxamide: J P, 17830[P]. 1979-07-03.
- [7] Udagawa K, Abe S, Kinoshita S, et al. Effects of surface active agents on L-glu-tamic acid fermentation[J]. J Ferment Technol, 1962, 40 (6): 614-619.
- [8] Konicek J, Smekal F, Konickova M, et al. Effect of Tween 80 and dimethyl sulfoxide on biosynthesis of L-lysine in regulatory mutants of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Folia Microbiol, 1991, 36 (6): 587-589.
- [9] Bazdyreva N M, Kuestva L S. Effect of the surface-active substance N-cetylpyridinium chloride on the biosynthetic capacity of *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872, a producer of NAD [J]. Prikl Biokhim Mikrobiol (Russian), 1984, 20 (3): 334-339.
- [10] 汪泽, 乔宾福, 袁勤生. 十六烷基三甲基溴化铵对枯草杆菌黄嘌呤缺陷型菌株产生腺苷的影响[J]. 工业微生物, 2001, 31 (1): 34-36.
- [11] Vandamme E J. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes[J]. J Chem Techno Biotechno, 1992, 53 (4): 313-327.
- [12] Battersby A R, Leeper F J. Biosynthesis of vitamin B12 [J]. Top Curr Chem, 1998, 195: 143-193.
- [13] 武改红, 赵希景, 徐庆阳, 等. 混合菌发酵法生产三氮唑核苷的工艺条件优化[J]. 化工学报, 2007, 58 (6): 1535-1540.
- [14] 刘淑云, 赵希景, 谢希贤, 等. 枯草芽孢杆菌 TM903 嘌呤核苷磷酸化酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 生物技术通讯, 2008, 19 (3): 391-393.