

脱氮假单胞杆菌耗氧合成 $V_{B_{12}}$ 发酵条件的研究*

刘东洪¹, 李昆太¹, 赵强², 储炬¹, 王永红¹, 庄英萍¹, 张嗣良¹

1 (华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海, 200237)

2 (石家庄华荣制药有限公司, 河北石家庄, 050041)

摘要 对脱氮假单胞杆菌(*Pseudomonas denitrificans*)耗氧合成 $V_{B_{12}}$ 的培养模式研究表明, 分批补料发酵比分批发酵合成 $V_{B_{12}}$ 提高 71.42%; 其中液糖补料与糖蜜补料在同等条件下, 产物浓度前者比后者高出 19.08%。最适 $V_{B_{12}}$ 合成的培养条件如种龄、接种量和初始 pH 值分别为 18h, 10% 和 7.0; 发酵过程中摇床的转速对 $V_{B_{12}}$ 的合成影响显著, 其中最佳转速为 260r/min。在以上优化条件下, $V_{B_{12}}$ 的最高单位能达到 140 g/L。

关键词 脱氮假单胞杆菌, 耗氧合成, $V_{B_{12}}$, 发酵条件

$V_{B_{12}}$ 又称为钴胺素(cobalamin), 是一类含有钴的咕啉类化合物总称^[1]。对人类而言, $V_{B_{12}}$ 的需求量是非常微量的(约 1 μ g/d), 但必不可少, 因为它是人和其它哺乳动物维持生长和促进红细胞生长的重要因子, 主要用于激活两个酶: 甲硫氨酸合酶和甲基丙二酰辅酶 A 变位酶, 在临床上用于治疗恶性贫血和恢复造血功能等^[2]。

$V_{B_{12}}$ 的合成仅局限于某些原核生物, 目前还未发现真菌能够合成。费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanii*) 和脱氮假单胞杆菌(*Pseudomonas denitrificans*) 主要用作工业生产菌株, 分别是在厌氧和好氧条件下合成^[3]。原有文献和生产工艺均以厌氧发酵合成 $V_{B_{12}}$ 为主, 近年来国内外利用好氧发酵生产的工艺正在逐渐推广, 但对其代谢特性研究的报道并不多。目前对 $V_{B_{12}}$ 合成的研究主要集中在以下几个方面^[4]: 进一步弄清 $V_{B_{12}}$ 的合成途径以及相关酶的作用机理; 通过基因工程技术获得维生素 $V_{B_{12}}$ 的高产菌株; 优化培养条件和工艺条件; 提高纯化和提取技术。实验中通过 *P. denitrificans* 耗氧发酵生产 $V_{B_{12}}$ 来研究 2 种不同的培养模式以及 2 种不同的补料对 $V_{B_{12}}$ 合成的影响; 并从其它发酵操作条件如接种量、供氧水平和初始 pH 等角度对 $V_{B_{12}}$ 发酵的影响进行了研究。经过研究, 摇瓶发酵单位从最初的 70 g/L 提高到了 140 g/L, 提高幅度为 100 %。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

第一作者: 硕士研究生(庄英萍为通讯作者)。

* 国家重点基础研究发展计划(2007CD714303)

收稿日期: 2007-11-14

脱氮假单胞杆菌(*P. denitrificans*), 石家庄华荣制药有限公司。

1.1.2 培养基

斜面培养基(g/L): 糖蜜 120, $(NH_4)_2SO_4$ 0.25, $(NH_4)_2HPO_4$ 1.5, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 琼脂 20; pH 7.0~7.2。

种子培养基(g/L): 糖蜜 100, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1; pH 7.2~7.4。

发酵培养基(g/L): 糖蜜 150, $(NH_4)_2SO_4$ 3.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0, 甜菜碱 6.34, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.15, DMBI 0.08, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $CaCO_3$ 1.0, pH 7.0~7.2。

补料培养基: 以糖蜜或葡萄糖作为补料中的碳源, 其总糖浓度均控制在 180 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养

用接种针将斜面上的菌体刮下, 倒入一定的无菌水, 打散均匀, 然后接入种子培养基中, 在 32 $^{\circ}C$, 260 r/min 摇床上培养。

1.2.2 发酵培养

分批培养: 将种子液接入发酵培养基, 接种量 10%, 在 32 $^{\circ}C$, 260 r/min 摇床上培养 96 h; 分批补料培养: 将种子液接入发酵培养基, 接种量 10%, 在 32 $^{\circ}C$, 260 r/min 摇床上培养 168 h, 并在 72 h、96 h 和 120 h 进行补料。

1.2.2 分析方法

1.2.2.1 菌体浓度

采用测量菌体干重法(dry cell weight, DCW)。吸 10 mL 发酵液, 经离心和洗涤后, 菌体 85 $^{\circ}C$ 烘干至恒重, 称菌体干重。

1.2.2.2 总糖的测定

采用斐林试剂法^[5]。

1.2.2.3 氨基氮的测定

采用甲醛滴定法^[5]。

1.2.2.4 NH_4^+ 浓度的测定

Berthlet 比色法^[6]。

1.2.2.5 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 浓度的测定

高效液相色谱法。

(1) 样品制备:在备好的 10 mL 发酵液中加入 8% NaNO_3 溶液和冰醋酸各 2.5 mL, 摇匀, 置 95~100 °C 水浴中加热 30 min 后取出, 冷却至室温, 定容至 50 mL, 过滤, 所得滤液用 0.45 μm 微孔滤膜针头过滤器过滤 1 mL 至样品瓶, 用微量进样器吸取氰化钠溶液 20 μL 放入样品瓶中, 将样品瓶放入 35~40 °C 水浴中反应 1 h, 取出, 在给定条件下进行液相色谱分析。

(2) 高效液相色谱条件:流动相:250 mmol/L 磷酸水溶液-乙腈 (30 : 70, v/v), 色谱柱:大连依利特 Hypersil NH_2 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测波长:361 nm; 进样量:20 μL ; 流速:1.7 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 培养模式对 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 合成的影响

分批发酵过程中菌体浓度和营养物质浓度不断发生改变, 对设备控制和操作要求比较低, 可以减少染菌的几率, 但相对来说单位不高; 而分批补料发酵则能使营养物质在某个阶段维持在一定浓度, 尤其是在发酵后期阶段, 仍可保证一定的营养物浓度, 有利于菌体生长和产物合成^[7]。图 1 是在摇瓶中分批发酵与分批补料发酵(分别在 72 h、96 h 和 120 h 进行糖蜜补料)生产 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 各项参数比较。

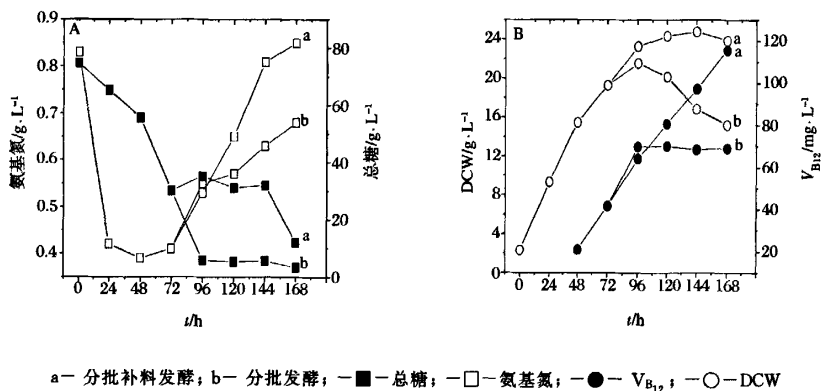


图 1 不同培养模式对 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 的影响

从图 1(A)中可以看出,分批发酵生产 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 糖浓度逐渐减少,到 96h 糖消耗到接近于 0,而氨基氮在 24 h 下降到 0.4 g/L 左右,并维持到 72 h,然后逐渐回升;而分批补料发酵生产 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 在 72~144 h 之间糖浓度能维持在 30~40 g/L,直到最后才消耗完。从图 1(B)中可以看出,对于分批发酵模式菌体生长在 96 h 达到最大值,然后由于发酵液中碳源的缺乏,无法为菌体提供营养成分,所以 96 h 以后菌体量就开始下降,同样生产 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 的浓度在 96 h 以后也没有增加,一直维持在 70 mg/L 左右;对于补料模式,由于在 72~144 h 能使糖浓度维持在 30 到 40 g/L,因此菌体量在 96 h 之后能有一定的上升,并使得菌体衰老期延后,这样对于 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 的合成也有很大的促进作用,最后单位能接近于 120 mg/L,所以在发酵后期补加营养物质的补料分批发酵比分批发酵提高

71.42%。

2.2 不同补加培养基对 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 合成的影响

上述实验是在摇瓶中采用分批补加糖蜜培养模式获得的结果,但从显示的结果中可以看出,在此模式下氨基氮回升得比较早,这可能是因为糖蜜中含有较多的有机氮源。为了进一步研究碳、氮源对 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 合成是否有影响,对补加糖蜜和葡萄糖 2 种不同分批补料模式进行了对比,结果如图 2 所示。

从图 2(A)中可以看出,补加糖蜜的发酵液中的氨基氮在 96h 就开始回升了,到放瓶的时候达到了 0.92 g/L,而补加葡萄糖的发酵液中的氨基氮在最后放瓶的时候才回升;同样对于发酵液中的 NH_4^+ 也表现出以上的现象。这主要是因为糖蜜中含有比较丰富的有机氮源。从图 2(B)中可以看出,在 72~120 h,补加糖蜜的发酵液中的菌体干重和 $\text{V}_{\text{B}_{12}}$ 都要比补加

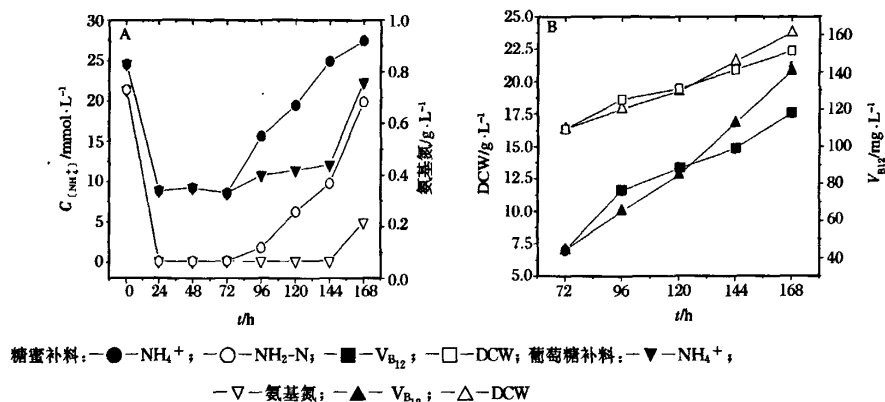


图2 不同补加培养基对维生素 B_{12} 合成的影响

液糖的都要高;而在 120 h 之后,后者要比前者高,其中 $V_{B_{12}}$ 的产量在 144 h 高出 13.65 mg/L,168 h 高出 22.48 mg/L,同期相比提高了 19.06%。这有可能是补加糖蜜所引起的 NH_4^+ 效应(浓度过高),导致抑制维生素 B_{12} 的合成,相比而言,补加液糖则使 NH_4^+ 浓度保持在较低的水准,确保了持续合成 $V_{B_{12}}$ 的能力。

2.3 培养条件对 $V_{B_{12}}$ 合成的影响

2.3.1 种龄对 $V_{B_{12}}$ 的影响

种子质量会对细胞代谢的特性产生直接影响,其中种龄和接种量是 2 个主要的因素^[8,9]。

图 3 是脱氮假单胞杆菌的种子生长过程曲线。

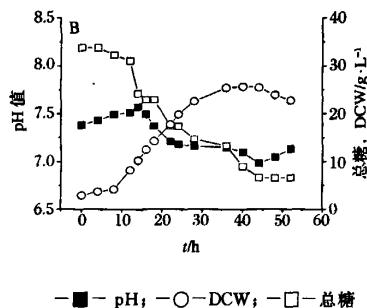


图3 种子生长过程参数变化曲线

从图 3 可以看出,菌体干重在 8 h 以前变化不大,均在 5 g/L 以下;10h 以后菌体生长速率明显加快,到 40 h 菌体干重达到最大值,为 25.70 g/L;之后,随着培养时间的延长,菌体干重开始下降。这说明脱氮假单胞杆菌的对数生长期是 10~40 h;种子在 14 h 以前的 pH 值不断上升,此时的糖耗情况变化也不大;14 h 以后,pH 值开始下滑,这主要原因是糖的消耗也不断的增加,这种现象一直持续到 44 h 才停止,可以看出,此时的 pH 值已经降到最低点了,同时残糖浓度也几乎接近于 0;之后,菌体开始衰老,出现自溶,

pH 值表现出上升的趋势。以上的结果与种子培养过程中菌体形态的显微观测结果是一致的,当种子在 8 h 以前,显微镜视野中的菌体量少,形状为短杆;10 h 以后有一定的菌体正处于分裂状态;到 18 h、20 h 和 24 h 的时候,菌体密集,而且大量细胞正处在分裂状态,40 h 以后菌体开始衰老,杆状细胞开始出现中空现象,52 h 以后细胞细长,很多细胞中间已经空了。

采用不同生长周期的菌种进行摇瓶培养,最终实验结果表明,当种龄为 18 h 时, $V_{B_{12}}$ 的产量达到最大值,为 122.24 g/L,从分析中得出,种龄过小或偏大都不利于 $V_{B_{12}}$ 的生物合成,因此最适种龄为 18 h。

2.3.2 接种量对 $V_{B_{12}}$ 的影响

在以上实验基础上对接种量进行了考察。分别选用 1%、5%、10%、15%、20% 的接种量,发酵结束后测定 $V_{B_{12}}$ 的含量,结果表明 10% 的接种量效果最好。

2.3.3 初始 pH 值对 $V_{B_{12}}$ 合成的影响

将发酵培养基的初始 pH 值分别调到 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,考察其对 $V_{B_{12}}$ 产量的影响,当初始 pH 值为 7.0 时, $V_{B_{12}}$ 的产量最大,因此最佳 pH 值为 7.0。

2.3.4 摇床转速对 $V_{B_{12}}$ 合成的影响

通过不同发酵阶段的转速变化来考察摇瓶中不同供氧水平对 $V_{B_{12}}$ 合成的影响。具体的试验设计和结果见表 1。

表 1 摇瓶发酵过程中转速变化对维生素 B_{12} 合成的影响

不同发酵阶段转速变化情况/ $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$			$V_{B_{12}}$	相对
0~60 h	60~100 h	100~160 h	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	百分比/%
260	260	260	138.45	100
200	200	200	95.45	68.94
260	260	200	135.57	97.91
200	200	260	98.82	71.37
200	260	260	125.46	90.62
260	200	200	118.60	85.66

由表 1 可以看出,摇瓶转速一直维持在 260 r/min 时,放瓶时的 $V_{B_{12}}$ 单位在 6 种处理中最高,达到 138.45 mg/L。转速为 200 r/min 时,放瓶时的 $V_{B_{12}}$ 单位最低,仅为 95.45 mg/L,比转速一直为 260 r/min 的放瓶 $V_{B_{12}}$ 单位低了 31.06%。摇瓶发酵过程的第 60~100 h 是 *P. denitrificans* 开始大量合成 $V_{B_{12}}$ 的阶段,由表 1 可以看出,该发酵阶段的供氧状况对最终放瓶单位影响最为关键,该阶段转速为 200 r/min 的 3 个处理的放瓶 $V_{B_{12}}$ 单位相对较低,都低于该阶段转速为 260 r/min 的 3 个处理。从以上试验结果可以得出结论,摇瓶发酵过程中供氧状况良好更有利于 $V_{B_{12}}$ 的生物合成。

3 结 论

对脱氮假单胞杆菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 的好氧发酵合成 $V_{B_{12}}$ 的代谢特性进行了初步研究,从补料操作的方式和批发酵以及培养条件等几个操作参数进行了研究,得到下述结论:

(1) 分批补料发酵生产 $V_{B_{12}}$ 的产量明显要高于批发酵,相比可以提高 71.42%。

(2) 液糖补料替代糖蜜补料对 $V_{B_{12}}$ 合成非常有利。在同等条件相比下, $V_{B_{12}}$ 的产量在液糖补料下高出糖蜜补料的 19.08%。

(3) 适合维生素 B_{12} 生物合成的最佳种龄为 18

h,接种量为 10%、初始 pH 值为 7.0。

(4) $V_{B_{12}}$ 的生物合成对氧的供应表现非常敏感。

参 考 文 献

- 1 Warren MJ, Raux E, Heidi L, et al. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B_{12}) [J]. Nat Prod Rep, 2002, 19: 390~412
- 2 Martens JH, Barg H, Warren MJ, et al. Microbial production of vitamin B_{12} [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 275~285
- 3 Battersby AR, Finian JL. Biosynthesis of $V_{B_{12}}$ [J]. Topics in Current Chemistry, 1998, 195:143~193
- 4 Roman RV, Iuc E, Mustea A, et al. Optimization of Medium Components in Vitamin B_{12} Biosynthesis[J]. Roum Biotechnol Lett, 2001, 6(4): 343~350
- 5 北大生化系生化教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1986
- 6 徐展东,易蕴玉,全文海. 利用苯酚-次氯酸盐反应测定铵离子方法的探讨[J]. 无锡轻工大学学报,1998,17(1):34~38
- 7 叶勤. 发酵过程原理[M]. 北京:化学工业出版社,2005
- 8 俞俊棠,唐孝宣,邬行彦,等. 新编生物工艺学(上)[M]. 北京:化学工业出版社,2002
- 9 储炬,李友荣. 现代工业发酵调控学[M]. 北京:化学工业出版社,2002

Optimization of Fermentation Conditions for Aerobic Biosynthesis of Vitamin B_{12} by *Pseudomonas denitrificans*

Liu Donghong¹, Li Kuntai¹, Zhao Qiang², Chu Ju¹, Zhuang Yingping¹, Wang Yonghong¹, Zhang Siliang¹

1 (State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, National Engineering Research Center for Biotechnology, Shanghai 200237, China)

2 (Shijiazhuang PharmaGroup Hua Rong Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050041, China)

ABSTRACT The culture models of aerobic biosynthesis that generated vitamin B_{12} by *Pseudomonas denitrificans* were studied. Contrast to batch fermentation in production of vitamin B_{12} , fed-batch fermentation increased by 71.42%. The substitution of molasses for liquid sugar increased the vitamin B_{12} concentration by 19.08%. The maximal yield of vitamin B_{12} could be obtained when the culture was under the conditions as seed age 18 h, inoculum level 10% and initial pH 7.0. The rotation speed, the optimal of which was 260 r/min, had significant effect on the production of vitamin B_{12} . The highest production of vitamin B_{12} (140 g/L) was achieved under the above fermentation conditions.

Key words *Pseudomonas denitrificans*, aerobic biosynthesis, vitamin B_{12} , fermentation conditions