

典型性甲基供体对脱氮假单胞杆菌 代谢过程的氧调控作用

周 佳,程 新,彭志远,彭卫福,李昆太*

(江西农业大学生物科学与工程学院,江西南昌 330045)

摘 要:本文在 7L 发酵罐中分别以甜菜碱和氯化胆碱作为合成维生素 B₁₂ 的甲基供体,分别考察了二者对脱氮假单胞杆菌代谢过程的影响。结果表明:使用氯化胆碱的罐批出现了溶氧过早回升、pH 剧烈下降等异常的代谢现象,致使发酵过程的菌体生长缓慢且维生素 B₁₂ 合成量低;而使用甜菜碱作为甲基供体时,其菌体代谢活力要明显优于使用氯化胆碱的罐批,整个发酵过程的 pH 和溶氧均能保持在稳定且合适的水平,最终的菌体量和维生素 B₁₂ 产量也更高。

关键词:脱氮假单胞杆菌,维生素 B₁₂,甲基供体,代谢过程

Regulatory effect of the typical methyl-group donors on the oxygen metabolism in *Pseudomonas denitrificans*

ZHOU Jia, CHENG Xin, PENG Zhi-yuan, PENG Wei-fu, LI Kun-tai*

(College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In this paper, the fermentation processes of *Pseudomonas denitrificans* were investigated in 7L fermenter by using betaine and choline chloride as the typical methyl-group donors for vitamin B₁₂ biosynthesis, respectively. When using choline chloride as the methyl-group donor, the dissolved oxygen (DO) and pH respectively presented an obviously zooming and dropping phenomena, resulting in a slow cell growth and low vitamin B₁₂ biosynthesis. However, the metabolism capability under betaine as methyl-group donor was significantly better than that of choline chloride, and the pH and DO could be maintained at a stable and appropriate level during the whole fermentation processes. As a result, the final cell growth and vitamin B₁₂ production were significantly higher than those obtained in choline chloride.

Key words: *Pseudomonas denitrificans*; vitamin B₁₂; methyl-group donor; metabolism process

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)07-0162-04

维生素 B₁₂ 系钴胺素类 (cobalamin) 化合物,它是一种重要的生物活性物质,可以用来治疗恶性贫血症,同时它也是许多微生物和动物的生长因子^[1]。由于维生素 B₁₂ 的化学合成步骤过于复杂,目前几乎都是通过脱氮假单胞杆菌 (*Pseudomonas denitrificans*)、谢氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*) 和费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*) 等微生物的发酵来生产维生素 B₁₂^[2]。由于维生素 B₁₂ 产率高,有关脱氮假单胞杆菌的应用研究更是成为人们当前所关注的热点。脱氮假单胞杆菌生物合成维生素 B₁₂ 的过程共涉及八步甲基化反应^[3],尽管这些甲基化反应均是由 S-腺苷-L-甲硫氨酸提供甲基参与完成,但是甲硫氨酸上的甲基往往来源于外源甲基供体。首

先,甜菜碱 (N,N,N-三甲基甘氨酸) 在甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶 (Betaine homocysteine S-methyltransferase, BHMT) 的催化下向高半胱氨酸转移一个甲基,分别形成二甲甘氨酸和甲硫氨酸^[4-5];甲硫氨酸进一步通过甲硫氨酸腺苷转移酶 (methionine adenosyltransferase) 催化形成 S-腺苷-L-甲硫氨酸,所生成的 S-腺苷-L-甲硫氨酸最终参与到维生素 B₁₂ 合成途径中的甲基化反应过程。和甜菜碱一样,氯化胆碱分子中也含有三个甲基^[6],它可逐步通过胆碱脱氢酶 (choline dehydrogenase) 和甘氨酸甜菜碱醛脱氢酶 (glycine betaine aldehyde dehydrogenase) 的催化生成甜菜碱,所生成的甜菜碱再进一步参与到 S-腺苷-L-甲硫氨酸的合成反应中^[7]。由此可见,在脱氮假单胞杆菌合成维生素 B₁₂ 的过程中,甜菜碱和氯化胆碱是十分重要的外源甲基供体。多项研究也表明,发酵培养基中加入甜菜碱和氯化胆碱能够大大促进脱氮假单胞杆菌合成维生素 B₁₂^[8-11]。然而,目前很少有文献报道这两种典型性甲基供体会对脱氮假单胞杆菌的代谢过程产生怎样的影响。基于此,本

收稿日期: 2012-09-18 * 通讯联系人

作者简介: 周佳 (1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究。

基金项目: 国家自然科学基金 (31060009); 江西省自然科学基金 (2010GQN0062); 江西省教育厅科技项目 (GJJ10416); 江西农业大学基金项目 (2008-2519)。

文在7L发酵罐中分别以甜菜碱和氯化胆碱为甲基供体,考察了这两种甲基供体下的菌体代谢过程变化,结果发现二者会对脱氮假单胞杆菌发酵过程产生截然不同的氧调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脱氮假单胞杆菌(*Pseudomonas denitrificans*)由本实验室保存;蔗糖、甜菜碱、氯化胆碱、5,6-二甲基苯并咪唑、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、硫酸铵等试剂均为国产分析纯。

8453型紫外-可见分光光度计 Agilent公司; HP 1100型色谱仪 Agilent公司;7-L全自动发酵罐镇江东方生物工程设备技术有限责任公司等。

1.2 培养基

斜面培养基(g/L):蔗糖 20、玉米浆 10、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1、琼脂 20, pH7.0~7.2。

种子培养基(g/L):蔗糖 30、玉米浆 10、 KH_2PO_4 5、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.3、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.7、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2、 MgSO_4 1.5、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02、5,6-二甲基苯并咪唑 0.0045, pH7.2~7.4。

发酵培养基(g/L):蔗糖 80、玉米浆 30、甜菜碱/氯化胆碱 15、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2、 MgSO_4 1.5、 KH_2PO_4 0.75、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.14、5,6-二甲基苯并咪唑 0.075, pH7.2~7.4。

1.3 发酵方法

1.3.1 斜面培养 从 -20°C 的冰箱中取出保藏好的甘油管菌种,接种于配制好的斜面,置于 28°C 恒温培养箱培养48h。

1.3.2 摇瓶种子培养 每支新鲜的斜面以10mL无菌水洗下菌体,制成菌悬液。取菌悬液1mL接至装量为60mL/300mL三角瓶的种子培养基中, 32°C 在摇床上振荡(260r/min)培养至菌体光密度值(OD_{700})为9~10。

1.3.3 7-L发酵罐上发酵培养 将500mL菌体吸光值(乘以稀释倍数后的 OD_{700})为9~10左右的摇瓶种子接种装量为5L/7L罐的发酵培养基中,培养条件为罐温(32 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ 、罐压0.05~0.06MPa,通气比1:1(vvm),搅拌转速根据发酵过程的溶氧变化进行调整。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生物量测定 采用测量菌体干重法(Dry cell weight, DCW)。吸取10mL发酵液至离心管中,5000r/min离心弃上清液,所得菌体以蒸馏水洗涤两次, 80°C 下烘至恒重后称量。

1.4.2 溶解氧测定 Mettler Toledo 在线溶氧检测系统。

1.4.3 pH测定 Mettler Toledo 在线pH检测系统。

1.4.4 维生素 B_{12} 含量的测定:高效液相色谱法

a.样品制备:取10mL发酵液,加入8%亚硝酸钠溶液和冰醋酸各2.5mL,摇匀,于 $95 \sim 100^\circ\text{C}$ 水浴30min;水浴后冷却至室温,加去离子水定容至50mL,过滤;所得滤液用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜针头过滤

器过滤1mL至样品瓶中,用微量进样器吸取氧化钠溶液 $20\mu\text{L}$ 放入样品瓶中,将样品瓶放入 $35 \sim 40^\circ\text{C}$ 水浴中反应1h,使发酵液中不同形式的维生素 B_{12} 转化为氰钴胺素,在给定条件下进行液相色谱分析;

b.高效液相色谱条件:流动相为250mmol/L磷酸水溶液-乙腈(30:70, v/v);色谱柱为大连依利特 Hypersil NH_2 柱(4.6mm \times 250mm, $5\mu\text{m}$);检测波长为361nm;进样量是 $20\mu\text{L}$;流速为1.7mL/min。

2 结果与讨论

2.1 不同甲基供体对脱氮假单胞杆菌发酵耗氧的影响

分别以氯化胆碱和甜菜碱为合成维生素 B_{12} 的甲基供体,在7L发酵罐中考察了这两种典型性甲基供体对脱氮假单胞杆菌发酵过程耗氧的影响,结果如图1所示。

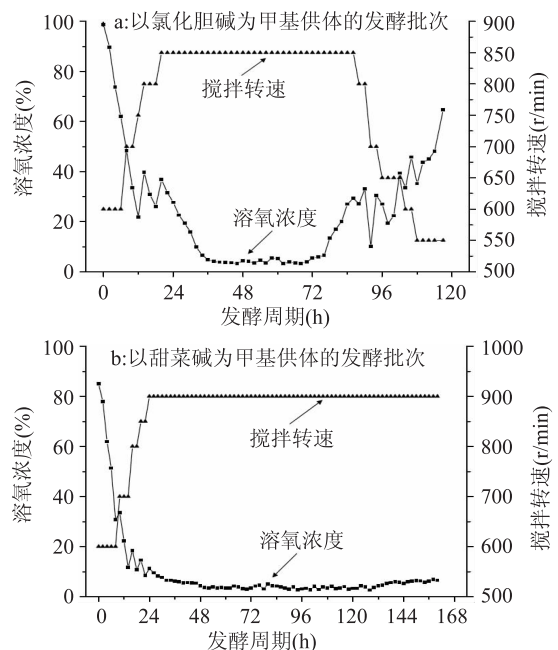


图1 氯化胆碱和甜菜碱为甲基供体下的转速和溶氧的动态变化情况

Fig.1 Time courses of agitation and DO under using choline chloride (a) and betaine (b) as methyl-donor for *Pseudomonas denitrificans* fermentation in 7L fermenter

由图1所示的两种甲基供体下的发酵过程溶氧变化趋势可以看出,其发酵前期随着菌体量不断增加,耗氧量也随之增大,均不得通过提高搅拌转速以增加供氧量。但是,当以氯化胆碱为甲基供体时,发酵液的溶氧在第76h后开始出现明显的回升,这表明脱氮假单胞杆菌的代谢明显变缓。此时,不得通过降低搅拌转速(由850r/min逐步降低到550r/min)来压制溶氧的回升,但是发酵液的溶氧浓度仍然难以控制在适宜的水平。整个发酵过程不得不在第117h时结束,此时溶氧水平已高达64.6%。

而当以甜菜碱为甲基供体时,尽管搅拌转速一直高达900r/min,但是脱氮假单胞杆菌整个发酵过程的溶氧浓度却一直保持在3%~7%的范围内,并没有像使用氯化胆碱的发酵批次那样出现明显的溶氧回升

现象。以上溶氧变化趋势表明,脱氮假单胞杆菌在以甜菜碱为甲基供体进行发酵时,其代谢能力要明显优于使用氯化胆碱作为甲基供体的发酵批次。

2.2 不同甲基供体对脱氮假单胞杆菌菌体生长及产物合成的影响

当脱氮假单胞杆菌分别以氯化胆碱和甜菜碱为甲基供体进行发酵时,其发酵过程的溶氧浓度变化说明二者会对菌体的代谢能力产生一定的差异。为了深入了解这两种甲基供体对脱氮假单胞杆菌代谢过程的影响,进一步测定了这两个发酵批次下的 pH、菌体生长和维生素 B₁₂ 合成等发酵参数的变化情况,结果如图 2 所示。

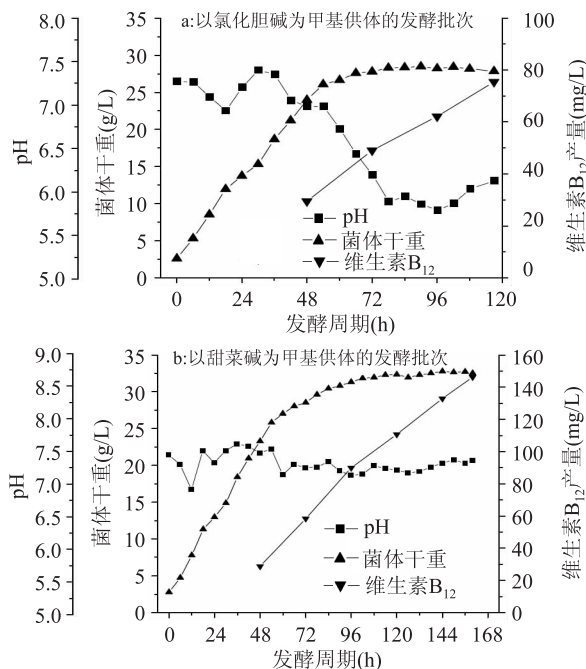


图2 氯化胆碱和甜菜碱作为甲基供体下的 pH、菌体量和维生素 B₁₂ 产量等参数变化趋势

Fig.2 Time courses of pH, DCW and vitamin B₁₂ under using choline chloride (a) and betaine (b) as methyl-donor for *Pseudomonas denitrificans* fermentation in 7L fermenter

由图 2 所示的 pH 变化可以看出,使用氯化胆碱为甲基供体的发酵批次,其发酵液的 pH 在第 54h 后出现剧烈的下降趋势, pH 在第 96h 时甚至降低至 5.78。这很可能是由于氯化胆碱作为甲基供体被菌体利用后,致使氯离子不断地积累,因而造成发酵液的 pH 出现明显的下降。由于甜菜碱又名三甲基甘氨酸,属于两性化合物,水溶液一般呈中性^[12],因此该罐批下的 pH 变化较为稳定,一直保持在 7.15~7.50,并未像使用氯化胆碱的罐批那样 pH 呈现剧烈的下降趋势。

由图 2 还可以看出,以氯化胆碱为甲基供体的罐批,其菌体量在第 54h 后表现出十分缓慢的增加趋势,发酵过程的最大菌体干重仅为 28.48g/L;而使用甜菜碱作为甲基供体的罐批,其菌体生长要明显优于使用氯化胆碱的罐批,发酵过程的最大菌体干重达到 32.78g/L。

与菌体生长趋势较为一致的是,甜菜碱作为甲

基供体更有利于维生素 B₁₂ 的合成。该罐批放罐时(160h)的维生素 B₁₂ 产量为 146.2mg/L,而且在第 120h 时维生素 B₁₂ 合成量就达 110.67mg/L,而以氯化胆碱为甲基供体的罐批在第 117h 时的维生素 B₁₂ 产量仅为 75.49mg/L。

有研究表明,脱氮假单胞杆菌发酵过程的溶氧浓度和 pH 会对维生素 B₁₂ 的合成产生显著的影响^[13-14]。由于使用氯化胆碱作为甲基供体会造成脱氮假单胞杆菌发酵过程溶氧显著回升以及 pH 剧烈下降,造成不利于菌体代谢的异常环境。然而使用甜菜碱为甲基供体的发酵过程,却能将溶氧浓度和 pH 控制在适宜于维生素 B₁₂ 合成的范围内。

3 结论

通过在 7L 发酵罐中考察使用氯化胆碱或甜菜碱作为甲基供体对脱氮假单胞杆菌发酵过程的影响,可以得出结论:使用氯化胆碱作为合成维生素 B₁₂ 的甲基供体时,发酵液 pH 会因氯离子的积累而出现明显的下降趋势,而且由于 pH 剧烈下降导致菌体生长和维生素 B₁₂ 合成受到抑制,最终因菌体代谢异常而造成发酵过程的溶氧过早回升,不得不提前放罐;而使用甜菜碱作为甲基供体时,发酵过程的 pH 能保持在较为适宜的范围内,使得菌体代谢能力较使用氯化胆碱的罐批更为良好,因而没有出现溶氧回升的现象,最终的维生素 B₁₂ 产量也更高。因此,在脱氮假单胞杆菌发酵产维生素 B₁₂ 的过程中,宜选用甜菜碱作为外源甲基供体。

参考文献

- [1] 曾碧榕,何旭敏,夏海平,等.维生素 B₁₂ 工业生产技术的进展[J].中国医药工业杂志,2003,34(8):421-424.
- [2] Martens H, Barg H, Warren MJ, et al. Microbial production of vitamin B₁₂ [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 275-285.
- [3] Warren MJ, Raux E, Schubert HL, et al. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂) [J]. Nat Prod Rep, 2002, 19(4):390-412.
- [4] White RF, Kaplan L, Birnbaum J. Betaine - homocysteine transmethylase in *Pseudomonas denitrificans*, a vitamin B₁₂ overproducer [J]. J Bacteriol, 1973, 113: 218-223.
- [5] Mulligan JD, Laurie TJ, Garrow TA. An assay for betaine - homocysteine methyltransferase activity based on the microbiological detection of methionine [J]. Methods of Nutritional Biochemistry, 1998, 9: 351-354.
- [6] Sleator RD, Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence [J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26: 49-71.
- [7] Gu ZJ, Wang L, Rudulier DL, et al. Characterization of the Glycine Betaine Biosynthetic Genes in the Moderately Halophilic Bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T [J]. Curr Microbiol, 2008, 57: 306-311.
- [8] Demain AL, Daniels HJ, Schnabel L, et al. Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B₁₂ fermentation [J]. Nature, 1968, 220: 1324-1325.

(下转第 168 页)

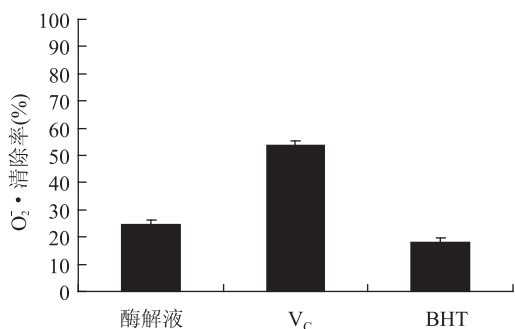
图6 酶解液、V_c及BHT对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.6 Scavenging effect of enzymatic hydrolysate, V_c and BHT on superoxide radical

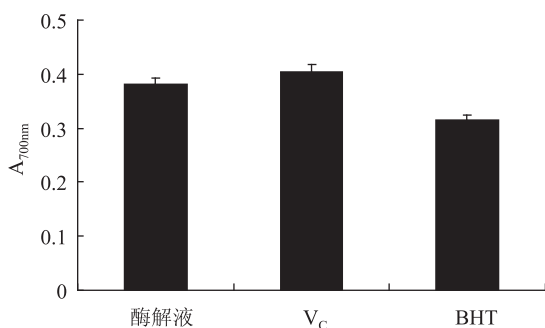
图7 酶解液、V_c及BHT的还原能力

Fig.7 Reducing power of enzymatic hydrolysate, V_c and BHT

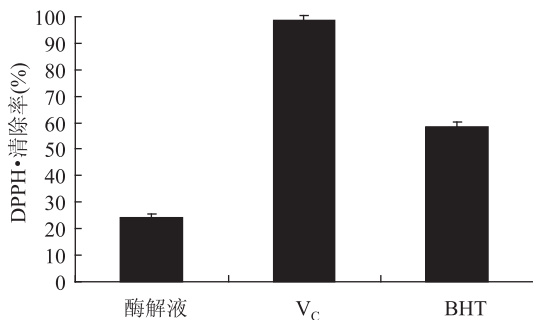
图8 酶解液、V_c及BHT对DPPH自由基的清除作用

Fig.8 Scavenging effect of enzymatic hydrolysate, V_c and BHT on DPPH radical

3 结论

3.1 在相同反应条件下,单一胰蛋白酶酶解液的清除羟自由基效果优于复合蛋白酶;复合蛋白酶中胰

蛋白酶的比例越大,清除效果越强;单一木瓜蛋白酶酶解液的清除羟自由基能力最弱。

3.2 经过 L₉(3⁴) 正交实验分析,酶解的最佳工艺(以·OH清除率计)为:初始pH为3.5,酶解时间为3.5h,酶解温度为45℃,所得酶解液·OH清除率为76.19%。

3.3 清除自由基能力的实验结果表明,河蚬酶解液对超氧阴离子的清除率高于BHT,对羟自由基、二苯代苦味肼基自由基的清除率均低于BHT,此外,河蚬酶解液的还原能力与同浓度的V_c接近,高于同浓度BHT的还原能力。综合考虑到BHT作为化学合成抗氧化剂有使用限量(200μg/mL),且实验并未将酶解液抗氧化肽分离纯化,所以河蚬酶解液的清除自由基能力与BHT相近。

参考文献

- [1] 吴燕燕, 尚军, 李来好, 等. 合浦珠母贝肉短肽的分离及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 123-126.
- [2] 牛瑞, 孙溢, 于建生, 等. 扇贝裙边酶解制备抗氧化肽的实验研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(1): 214-221.
- [3] 汪何雅, 杨瑞金, 王璋. 牡蛎的营养成分及蛋白质的酶法水解[J]. 水产学报, 2003, 27(4): 163-168.
- [4] 关志强, 郑贤德, 洪鹏志, 等. 冻结对文蛤肉营养成分及结构的影响[J]. 制冷, 2003, 22(1): 1-4.
- [5] 庆宁, 林岳光, 金启增. 翡翠贻贝软体部营养成分的研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(1): 82-84.
- [6] 杨建敏, 邱盛尧, 郑小东, 等. 美洲帘蛤软体部营养成分分析及评价[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 495-498.
- [7] 韩鹏, 王勤, 陈清西. 河蚬软体部分营养成分分析及评价[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 115-117.
- [8] 万德光, 吴家荣. 药用动物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 45-47.
- [9] 张钟, 郭元新, 李凤霞. 黑糯玉米芯色素清除超氧阴离子自由基和羟自由基的体外实验研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(11): 36-38.
- [10] 郑大贵, 叶青, 叶红德, 等. DPPH·评价V_c、异V_c及其衍生物的抗氧化性能[J]. 食品工业科技, 2008, 29(4): 113-115.
- [11] 徐建国, 胡庆平. 决明子水提物体外清除自由基活性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 73-75.
- [12] 荣建华, 李小定, 谢笔钧. 大豆肽体外抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118-120.

glycine betaine analogues in common foods[J]. Food Chemistry, 2003, 83: 197-204.

[13] Li KT, Liu DH, Chu Ju, et al. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2008, 31: 605-610.

[14] Wang ZJ, Wang HY, Li YL, et al. Improved vitamin B₁₂ production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process[J]. Bioprocess Technol, 2010, 101: 2845-2852.

(上接第164页)

[9] Demain AL, White RF. Porphyrin overproduction by *Pseudomonas denitrificans*: essentiality of betaine and stimulation by ethionine[J]. J Bacteriol, 1978, 107: 456-460.

[10] Roman RV, Iluc E, Mustea A, et al. Optimization of Medium Components in Vitamin B₁₂ Biosynthesis[J]. Roum Biotechnol Lett, 2001, 6: 343-350.

[11] Li KT, Liu DH, Li YL, et al. Improved large-scale production of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding[J]. Bioresource Technol, 2008, 99: 8516-8520.

[12] de Zwart FJ, Slow S, Payne RJ, et al. Glycine betaine and