

荧光假单胞菌 AR4 在 2- 酮基 - D- 葡萄糖酸 工业生产中的应用研究

孙文敬^{1,2}, 陈 丽², 任蓓蕾², 张建国², 刘敬泽^{1,*}
(1. 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050016;
2. 郑州拓洋实业有限公司, 河南 郑州 450001)

摘 要: 在噬菌体存在的情况下, 采用抗噬菌体菌株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)AR4 在 200m³ 发酵罐上进行了 2- 酮基 - D- 葡萄糖酸的发酵生产。结果表明, 荧光假单胞菌 AR4 对生产环境中噬菌体的抗性稳定, 发酵周期短, 发酵转化率高; 经过 10 次传代, 荧光假单胞菌 AR4 对噬菌体的抗性及其发酵生产 2- 酮基 - D- 葡萄糖酸的能力没有改变; 该菌株的发酵产物可以用于食品抗氧化剂 D- 异抗坏血酸钠的合成。

关键词: 2- 酮基 - D- 葡萄糖酸; 荧光假单胞菌; 噬菌体; 抗噬菌体菌株; D- 异抗坏血酸钠

Study on the Appl i cati on of Phage-resi tant Strai n *Pseudomonas fluorescens*AR4 i n Industri al
Producti on of 2-keto-D-gl uconi c Aci d

SUN Wen-jing^{1,2}, CHEN Li², REN Bei -lei², ZHANG Jian-guo², LIU Jing-ze^{1,*}
(1. College of Li fe Science, Hebei Normal Uni versi ty, Shi ji a zhuang 050016, Chi na;
2. Zhengzhou Tuoyang Industri al Co. Ltd., Zhengzhou 450001, Chi na)

Abstract : In the presence of phages, 2-keto-D-gl uconi c aci d fermentati on by *Pseudomonas fluorescens*AR4, whi ch was a phage-resi tant mutant obtai ned from the mutati on of the strai n A46, was conducted i n 200m³ fermentor. The resul ts showed that the mutant resi stanceagai nst the phages was stable, wi th shorter fermentati on peri od and hi gher fermentati on conversi on rate than i ts parent. After 10 generati ons, i ts resi stanceagai nst the phages and 2-keto-D-gl uconi c aci d produci ng abi l i ty had not changed. The fermentati on product of *P. fluorescens*AR4 coul d be used i n the synthesi s of sodi um D-i soascorbate.

Key words: 2-keto-D-gl uconi c aci d; *Pseudomonas fluorescens*; phage; phage-resi tant mutant; sodi um D-i soascorbate
中图分类号: Q939. 97 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)11-0105-04

2-酮基-D-葡萄糖酸(2-keto-D-gluconic acid 2KGA)是目前国际上大规模生产的有机酸之一, 通常采用细菌发酵的方法由 D- 葡萄糖转化而来, 主要用于食品抗氧化剂 D- 异抗坏血酸及其钠盐的合成^[1]。

国内外已报道的 2KGA 产生菌较多, 如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、鸡血藤欧文氏菌(*Erwinia milletia*)、球状杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、恶臭假单胞菌(*Ps. putida*)和产酮产碱菌(*Alcaligenes ketogenes*)等^[2], 但荧光假单胞菌因其相对优良、稳定的产酸性能而被作为国内外 2KGA 发酵生产中最主要的工业用菌。

荧光假单胞菌 A46 是多年来国内 2KGA 发酵生产的

主要工业用菌, 其发酵周期短, 产酸率高, 对噬菌体 KS502 和 KS503 具有稳定的抗性^[3]。但是, 随着生产环境的变化和新噬菌体的出现, 2004 年以来该菌株经常遭到噬菌体的侵染, 造成发酵生产水平严重波动, 使生产企业蒙受了很大的经济损失。

噬菌体污染已成为近年来国内 2KGA 发酵生产中存在的主要问题之一。噬菌体污染的防治需要采取综合治理措施, 其中合理使用抗噬菌体菌株是解决该问题的主要措施之一。为此, 本研究室采用紫外诱变的方法选育了抗噬菌体菌株荧光假单胞菌 AR4^[1], 研究了该菌株产 2KGA 的发酵条件^[4], 初步探讨了 2KGA 补料分批培养工艺^[5]。在此基础上, 本研究室开展了荧光假单胞菌

AR4 在 2 KGA 工业生产中的应用工作。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)AR4 本研究室选育保藏。

1.2 发酵设备

3 m³ 的气升式不锈钢发酵罐,用于一级种子培养; 2.5 m³ 的气升式不锈钢发酵罐,用于二级种子培养; 200 m³ 的气升式碳钢发酵罐,用于发酵培养。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基

牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1.0%, NaCl 0.5%, 琼脂 2.0%, pH7.0。

1.3.2 种子培养基

葡萄糖 2.0%, 玉米浆 1.0%, 尿素 0.2%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, 轻质 CaCO₃ 0.25%, pH7.0。

1.3.3 发酵培养基

淀粉水解糖 11.65%, 玉米浆 2.45%, 轻质 CaCO₃ 8.0%。

1.3.4 淀粉水解糖补加液

淀粉水解糖 30.0%。

1.4 培养条件

1.4.1 斜面菌种培养

将活化的保藏菌种接至斜面培养基上, 30 培养 24h。

1.4.2 3 m³ 种子罐种子培养

将斜面菌种的菌悬液接入 1400L 种子培养基中, 控制罐温 33 、罐压 0.030MPa、通气量 1:0.5(vvm)进行培养。

1.4.3 25 m³ 种子罐种子培养

将 3 m³ 种子罐培养的种子按 10% 的接种量接入 14 m³ 种子培养基中, 控制罐温 33 、罐压 0.030MPa、通气量 1:0.5(vvm)进行培养。

1.4.4 200 m³ 发酵罐发酵培养

按 15% 左右的接种量将液体种子接入 90 m³ 发酵培养基中, 控制罐温 33 、罐压 0.025MPa、通气量 1:0.5(vvm)进行发酵。

1.5 补料方法

当发酵培养基中的残糖降至 3% 左右时, 以 14 ~ 18 m³/h 的流速加入 55 m³ 的淀粉水解糖, 然后继续进行发酵直至终点。

1.6 D- 异抗坏血酸钠的合成方法

采用 H₂SO₄ 酸化、阳离子交换处理的方法对发酵液

进行净化, 参照蒋明珠等^[6]报道的方法合成 D- 异抗坏血酸钠。

1.7 测定方法

1.7.1 菌体生长量(OD 值)测定

用 0.2 mol/L 的 HCl 稀释种子培养液或发酵液 20 倍, 以新制蒸馏水做空白实验, 用 721 型分光光度计测定种子培养液或发酵液在 690 nm 处的光密度, 比色杯的光程为 1 cm。

1.7.2 发酵液中 2KGA 的测定

采用碘量法测定^[7]。

1.7.3 葡萄糖的测定

采用国产 SBA 生物传感分析仪测定。

1.7.4 pH 值的测定

用国产 PHS-25A 型 pH 计测定。

1.7.5 噬菌体检测

采用 Adams 法^[8]进行检测。

1.7.6 D- 异抗坏血酸钠质量的检测

按 GB8273-1987 检测。

1.8 发酵转化率的计算

发酵转化率 = 发酵液中 2KGA 量 / 发酵培养基中葡萄糖量 × 180/194 × 100%

2 结果与分析

2.1 AR4 菌株的种子培养液质量

先前的研究结果^[9]和生产实践表明, 在特定生产条件下, pH 值、菌体生长量(本研究中用种子培养液 OD 值来表示)和培养周期是除镜检结果之外判断种子培养液质量的主要指标。在不遭受噬菌体侵染的情况下, AR4 菌株的亲株——A46 菌株在本研究条件下的种子培养液质量指标为: 一级种子培养液的 pH 值为 5.70 ± 0.30, OD 值为 0.200 ± 0.040, 培养周期为 10 ± 2h; 二级种子培养液的 pH 值 6.00, OD 值为 0.500 ± 0.050, 培养周期 6h。在生产环境中噬菌体存在的情况下, 对 AR4 菌株进行了连续 20 批次的种子培养。生产结果(表 1)表明, AR4 菌株在种子培养液 pH 值、OD 值和培养周期等指标上与 A46 菌株无明显差别。镜检结果显示, 在培养过程中 AR4 的菌体形态正常, 未出现噬菌体或杂菌污染现象。

2.2 AR4 菌株的种子培养过程

在种子培养过程中定期取样, 测定种子培养液的 pH 值、OD 值和葡萄糖含量, 绘制菌种生长曲线。典型的一级种子的培养过程(图 1)为: 菌种在前 6h 的培养中无明显生长, 处于延滞期(适应期); 6h 后菌种生长明显加速, 很快进入对数生长期, 种子培养液 pH 值的下

表1 AR4 菌株种子培养结果
Table 1 Results of the seed culture

批次	一级种子培养液			二级种子培养液		
	pH 值	OD 值	培养周期	pH 值	OD 值	培养周期
1	5.70	0.240	12.0	6.10	0.500	4.0
2	5.40	0.210	8.0	6.60	0.550	4.0
3	5.60	0.220	8.0	6.20	0.480	5.2
4	5.40	0.210	9.0	6.00	0.480	4.4
5	5.50	0.190	9.5	6.00	0.520	4.0
6	5.40	0.200	10.0	6.80	0.520	5.6
7	5.60	0.200	9.0	6.20	0.480	4.0
8	5.40	0.230	9.4	6.40	0.500	4.3
9	5.50	0.240	8.5	6.60	0.500	4.5
10	5.80	0.180	9.0	6.40	0.500	4.0
11	5.70	0.180	9.5	6.50	0.480	4.3
12	5.40	0.230	10.0	6.30	0.550	4.0
13	5.60	0.200	9.0	6.60	0.540	6.0
14	5.60	0.240	9.0	6.80	0.480	5.0
15	5.90	0.160	9.0	6.00	0.490	4.0
16	5.40	0.230	9.5	6.10	0.500	5.0
17	5.50	0.240	12.0	6.00	0.550	4.0
18	5.40	0.240	11.5	6.10	0.480	4.0
19	5.80	0.240	12.0	6.30	0.520	4.0
20	5.40	0.240	11.5	6.10	0.480	4.0

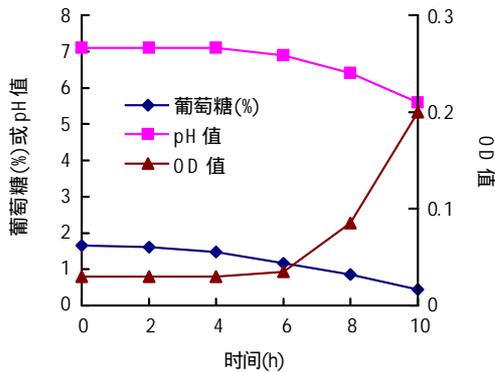


图1 一级种子培养过程

Fig.1 The course of the one-step seed culture

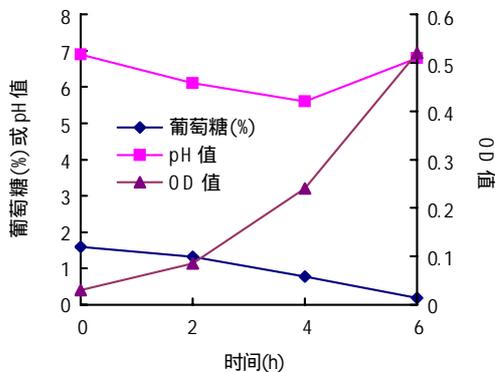


图2 二级种子培养过程

Fig.2 The course of the two-step seed culture

降幅度加大；10h 时，菌体生长量(OD 值)达到 0.200 左右，pH 值降至 5.70 左右，此时即可将其移入二级种子

培养基中。典型的二级种子的培养过程(图 2)为：接入一级种子后，菌种经过很短的适应期进入对数生长阶段，种子培养液的 pH 值也迅速降至 5.70 左右；4h 后，菌种生长速率进一步加快，种子培养液的 pH 值回升；6h 时，菌体生长量(OD 值)达到 0.450 以上，pH 值升至 6.00 以上，此时即可将其移入发酵培养基中。从种子培养过程来看，AR4 菌株与 A46 菌株无明显差别。

2.3 AR4 菌株的发酵过程及 2KGA 生产能力

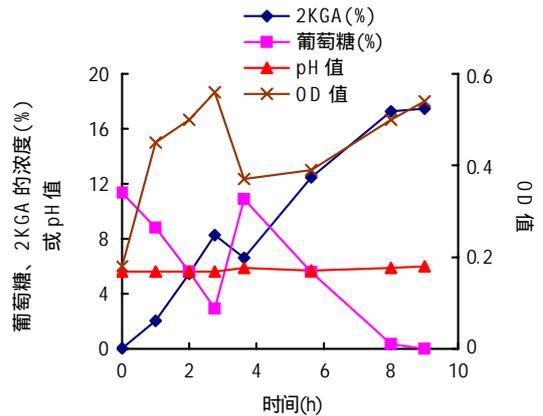


图3 补料分批培养生产 2KGA 的发酵过程

Fig.3 The course of 2KGA fermentation by strain AR4 in fed-batch culture

表2 AR4 菌株的 2KGA 生产能力

Table 2 2KGA producing ability of strain AR4

批次	发酵液体积 (m ³)	发酵液中 2KGA 浓度 (g/L)	2KGA (kg)	发酵转化率 (%)	发酵周期 (h)
1	151.5	172.3	26103.5	89.75	32.0
2	147.4	178.6	26325.6	90.52	35.0
3	144.5	180.0	26010.0	89.43	33.5
4	147.0	177.7	26121.9	89.82	32.0
5	147.0	176.7	25974.9	89.31	34.0
6	145.0	180.7	26201.5	90.09	33.5
7	143.6	183.2	26307.5	90.45	36.0
8	145.5	181.8	26451.9	90.95	34.5
9	146.7	175.3	25716.5	88.42	30.5
10	148.0	177.3	26240.4	90.22	35.0
11	142.5	185.0	26362.5	90.64	36.0
12	145.3	176.5	25645.5	88.18	31.5
13	143.9	178.8	25729.3	88.47	30.0
14	150.4	173.6	26109.4	89.77	35.0

利用前述的 1~14 批次二级种子培养液(菌种传代不超过 4 次)，在 200m³ 气升式发酵罐上进行了连续 14 批次的发酵生产。从发酵过程(图 3)来看，在菌体生长量、葡萄糖消耗及 2KGA 产量的变化趋势上，采用 AR4 菌株进行的发酵与采用 A46 菌株的正常发酵(未受噬菌体侵染的情况下进行的发酵)基本相同。在本研究中，发酵液中 pH 值的波动不大，这一点与以前的报道^[5]不符，可能与培养基初始 pH 值的调节方式及培养基中轻质 CaCO₃

的加量过大有关。从2KGA的生产能力(表2)来看,AR4菌株对培养基中葡萄糖的发酵转化率平均可达89.50%以上,达到或超过了A46菌株的转化水平,且发酵周期有所缩短,一般不超过36h。从镜检结果来看,发酵生产过程中AR4菌株的菌体形态正常,未出现溶菌现象。噬菌体检测结果表明,AR4菌株对生产环境中的噬菌体具有明显的抗性,在整个生产过程中无异常表现。

2.4 AR4菌株的遗传稳定性

在生产环境中噬菌体存在的条件下,采用多次传代的AR4菌株在200m³气升式发酵罐上进行了连续6批次的发酵生产,考察菌株的遗传稳定性。镜检结果显示,发酵生产过程中AR4菌株的菌体形态正常,未出现异常的溶菌现象。生产结果(表3)表明,经多次传代,抗噬菌体菌株AR4的2KGA生产能力几乎没有变化,发酵过程中无异常现象发生,即菌株对噬菌体的抗性没有改变。噬菌体检测结果也支持了这一观点。

表3 AR4菌株的遗传稳定性
Table 3 Hereditary stability of strain AR4

传代次数	发酵液体积(m ³)	发酵液中2KGA浓度(g/L)	2KGA(kg)	发酵转化率(%)	发酵周期(h)
5	145.5	180.7	26291.9	90.40	34.0
6	147.0	178.1	26180.7	90.02	35.5
7	143.8	180.0	25884.0	89.00	35.5
8	144.6	178.4	25796.6	88.70	30.5
9	148.5	175.8	26106.3	89.76	35.0
10	149.4	176.6	26384.0	90.72	34.5

2.5 AR4菌株的发酵产物在D-异抗坏血酸钠合成中的应用

在本研究中,利用AR4菌株在200m³气升式发酵罐上进行了20批次的发酵,生产2KGA共计521943.9kg。

将发酵生产的2KGA应用于食品抗氧化剂D-异抗坏血酸钠的合成中,得到了377486.3kg成品,合成收率为65.87%,与国内目前的工业合成水平相当。经检测,本研究生产的D-异抗坏血酸钠的产品质量符合GB8273-1987所规定的各项指标要求。上述结果表明,AR4菌株的发酵产物完全可以应用于食品抗氧化剂D-异抗坏血酸钠的合成。

3 结论

荧光假单胞菌AR4是一株优良的2KGA生产菌株,具有发酵周期短、转化率高、对噬菌体抗性稳定等特点,完全可以应用于食品抗氧化剂D-异抗坏血酸钠的工业生产中。

参考文献:

- [1] 孙文敬,杨庆文,赵峰梅,等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌荧光假单胞菌A46抗噬菌体菌株的选育[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 67-70.
- [2] 孙文敬,白照熙,谢红,等. 我国D-异抗坏血酸钠的研究和生产现状[J]. 微生物学通报, 1990, 17(3): 170-172.
- [3] 赵峰梅,孙文敬,王慕华,等. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌荧光假单胞菌K1005抗噬菌体菌株的选育[J]. 工业微生物, 2000, 30(4): 6-10.
- [4] 孙文敬,杨庆文,黄惠英,等. 荧光假单胞菌AR4产2-酮基-D-葡萄糖酸发酵条件的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 46-49.
- [5] 孙文敬,赵峰梅,杨庆文,等. 补料分批培养生产2-酮基-D-葡萄糖酸的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 115-117.
- [6] 蒋明珠,白照熙,张俊贤,等. 食品添加剂——D-异抗坏血酸钠生产工艺的研究[J]. 食品与发酵工业, 1990, 16(4): 54-59.
- [7] 钱俊青. 间接发酵法生产异维生素C钠的中间体分析方法的探讨[J]. 食品工业, 1996, (1): 54-56.
- [8] Adams M H. Bacteriophages[M]. New York and London: Interscience Publishers, 1959. 450-451.
- [9] 蒋明珠,白照熙,张俊贤,等. 球状杆菌K1022的2-酮基-D-葡萄糖酸发酵试验[J]. 工业微生物, 1989, (5): 3-7.



与干细胞衰老调控有关的蛋白

在近期《Nature》杂志中,三个实验室分别报告了一种蛋白的发现。该蛋白专门在干细胞中调控衰老。这个发现可帮助回答一个根本问题:为什么哺乳动物的祖先细胞随着年龄增长会逐渐失去其分裂和生成新细胞的能力Norman Sharpless及其同事培育出一种剔除了肿瘤抑制因子p16 INK4a的小鼠,该因子是细胞周期控制中涉及的一种蛋白,已知会以一种依赖于年龄的方式表达。在对该蛋白在血液、胰腺和大脑的再生中所起作用进行的研究中,三个小组分别发现,p16 INK4a不仅是一种生物标记,而且是衰老过程的一个促成因子。通过比较p16 INK4a在小鼠体内表达增多或减少所产生的效应,他们发现,p16 INK4a阻止干细胞的增殖,但只是在比较老的小鼠体内。综合起来,该研究表明,p16 INK4a通过肿瘤抑制因子的行动减少癌症的发病,与此同时通过降低干细胞功能对衰老做出贡献。该研究还表明,2-型糖尿病也许与胰岛失去再生能力有关,阻断该蛋白在某些组织中的作用,也许能够抵抗衰老的某些效应。