

Vc 两步发酵中伴生菌的作用机制*

吕淑霞¹ 冯 树¹ 张忠泽¹ 刘 阳² 谢占武² 安海英²

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)¹ (东北制药总厂 沈阳 110026)²

摘要: 应用细胞培养和膜分离技术研究了 Vc 两步发酵中伴生菌巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 对氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 产酸作用机制。结果表明: 巨大芽孢杆菌培养液中分子量在 30~50kD 及大于 100kD 组分明显促进产酸; 其组分通过凝胶层析分离纯化, 自动紫外检测仪检测 (280nm), 聚丙烯酰胺凝胶电泳及考马斯亮兰 G250 特异染色, 初步证实为蛋白质, 且至少是两种以上蛋白质, 它们在低温下稳定性较好。

关键词: 巨大芽孢杆菌, 氧化葡萄糖酸杆菌, 2-酮基-L-古龙酸

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 05-0010-04

THE EFFECT OF *BACILLUS MEGATERIUM* IN VITAMIN C TWO-STEP FERMENTATION

LU Shu-Xia¹ FENG Shu¹ ZHANG Zhong-Ze¹ LIU Yang² XIE Zhan-Wu² AN Hai-Yan²

(*Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015*)¹

(*General Pharmaceutical factory of Northeast, Shenyang 110026*)²

Abstract: The effect of *Bacillus megaterium* (B. m) on 2-keto-L-gulonic acid (2-KGA) synthesis by *Gluconobacter oxydans* (G. o) was studied in Vc two-step fermentation process. By using ultrafiltration, *Bacillus megaterium* culture the supernatant from B. m was divided into several parts in molecular weight. Of which the metabolites with molecular weight range from 30,000 to 50,000 Dalton and that over 100,000 Dalton can enhance the ability of G. o in converting L-sorbose into 2-KGA apparently. Further isolating and purifying the 30,000~50,000 Dalton and over 100,000 Dalton by means of Gel Chromatography, detection by auto-ultraviolet detector, polyacrylamide gel electrophoresis and specific dyeing by Coomassie brilliant blue G250, the materials could be at least two sorts of proteins which are stable at low temperature (4°C).

Key words: *Bacillus megaterium*, *Gluconobacter oxydans*, 2-keto-L-gulonic acid

Vc 两步发酵法的第二步发酵是由氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 两种混合菌共同完成^[1-3], 使 L-山梨糖转化为维生素 C 前体物质——2-酮基-L-古龙酸 (2-Keto-L-Gulonic Acid, 2-KGA)。前者为产酸菌俗称小菌, 后者为伴生菌俗称大菌^[4-5]。它们各自单独培养, 产酸菌生长较弱、产酸很少, 伴生菌不产酸, 混合培养时产酸显著增高^[6-7]。即伴生菌强烈影响产酸菌, 本文从细胞水平和分子水平研究其影响机制, 查明了有关生化作用的基本特征。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 伴生菌——巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 及产酸菌——氧化葡萄糖

* 辽宁省重大科技攻关项目 (No. 97221011)

中国科学院“百人计划”资助项目 (No. 989902)

收稿日期: 2000-08-02 修回日期: 2000-10-25

酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 由东北制药总厂提供。

1.1.2 培养基: 选用二菌适用的种子培养基, 分离培养基和发酵培养基^[5,10]

1.2 方法

1.2.1 培养方法: 混合菌种子和发酵分别在 28℃, 180r/min 振荡培养 24h 和 72h^[5]。

1.2.2 伴生菌培养液组分的制备: 伴生菌培养液 6000r/min 冷冻离心 20min, 收集上清液; 用超滤膜超滤, 分别收集大于 100kD、100~50kD、50~30kD 及小于 30kD 的组分, 通过无菌微孔滤膜除菌后冰箱存放备用。

1.2.3 伴生菌生物活性物质的分离、纯化: 伴生菌培养液截留组分大于 100kD 及 50~30kD 分别经 Sephadex G150 凝胶过滤柱层析分离、纯化, 以 0.025mol/L Tris-HCl (pH7.2, 0.1mol/L NaCl) 洗脱, 以自动紫外 (280nm) 检测仪检测记录并收集洗脱峰处的洗脱液, 通过无菌微孔滤膜除菌后冰箱存放备用。

1.2.4 分析方法: 2-酮基-L-古龙酸的测定采用碘量法^[8]; 蛋白质含量测定采用 Folin-酚法^[9]; pH 值测定采用精密 pH 值试纸; 菌浓度测定采用浊度法^[6]。

2 结果与讨论

2.1 巨大芽孢杆菌的伴生作用

对伴生菌、产酸菌及混合菌产 2-酮基-L-古龙酸能力进行测定, 结果见表 1。

表 1 伴生菌、产酸菌及混合菌产
2-酮基-L-古龙酸能力

组别	伴生菌	产酸菌	混合菌
耗氧量 (0.1N, mL)	0.15	0.43	7.97
2-KGA (mg/mL)	1.15	3.31	61.30

表 1 表明: 伴生菌不产酸, 产酸菌产酸很低, 而混合菌产酸很高, 说明产酸菌大量产酸需要伴生菌存在。

2.2 巨大芽孢杆菌的生物学特性

2.2.1 伴生菌生长: 伴生菌随培养时间延续, 呈现出典型的生长曲线。蛋白质含量的变化开始呈下降趋势, 而后随时间延续

蛋白质含量逐渐增加, 如图 1 所示。

伴生菌进入生长稳定期后, 芽孢大量形成, 伴生菌营养体在变成芽孢过程中, 释放细胞内含物, 使蛋白质含量增加。通过电泳可见培养液中, 产生多条蛋白质谱带。

2.2.2 伴生菌培养液 pH 值随培养时间变化: 在单独培养条件下伴生菌培养液 pH 值会逐渐升高, 如图 2 所示。高 pH 值可中和产酸菌生长代谢中产生的酸, 防止 pH 值下降过大, 有利于维持混合菌发酵中产酸菌处于相对稳定的 pH 值环境中。

2.3 伴生菌培养液组分对产酸菌产酸的影响

测定各组分对产酸菌发酵产酸的影响, 结果列于表 2

表 2 伴生菌培养液不同范围分子量组分对产酸菌产酸的影响

组别	培养基	上清液	30~50kD	50~100kD	>100kD
耗氧量 (0.1N, mL)	0.70	3.36	4.18	0.33	6.65
2-KGA (mg/mL)	5.38	25.84	32.15	2.54	51.15

超滤截留分子量在 30~50kD 及大于 100kD 组分对产酸菌产酸有明显的促进作用。分别高出对照 6 倍和 9.5 倍, 大于 100kD 组高于 30~50kD 组 1.59 倍。

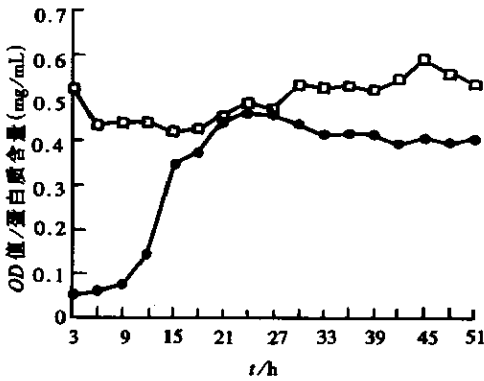


图1 伴生菌生长及培养液蛋白质含量变化
 ●—OD值, □—蛋白质含量

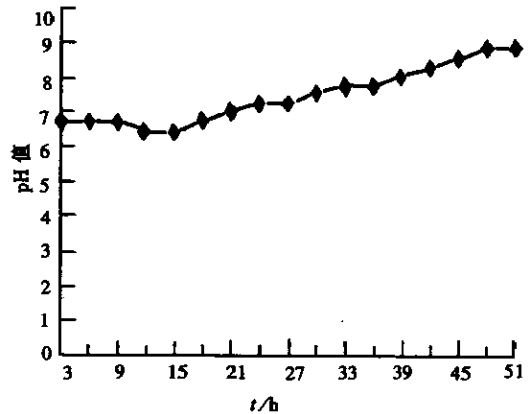


图2 伴生菌培养液 pH 值随培养时间变化

表3 低温放置的伴生菌培养液有效组分对产酸菌产酸的影响

组别	培养基	30~50kD	大于100kD
耗氧量 (0.1N, mL)	0.80	1.35	3.85
2-KGA (mg/mL)	6.15	10.38	29.61

菌产酸的作用仍具备,但活性仅为原活性的32%和58%。

2.4 低温对伴生菌培养液有效组分的影响

对产酸菌产酸有明显促进作用的30~50kD以及大于100kD的伴生菌培养液组分放置冰箱里(4℃)保存,一个月后取出进行发酵实验,结果见表3。4℃低温下保存的伴生菌培养液二有效组分其促进产酸

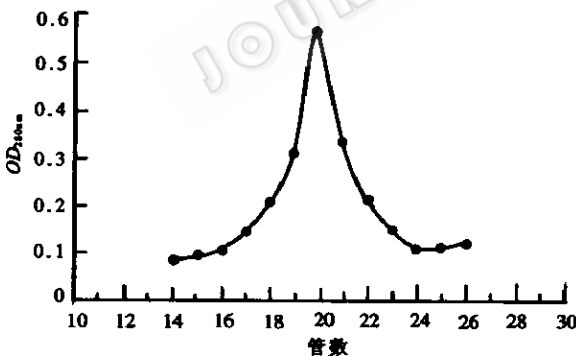


图3 30~50kD组分在Sephadex G150凝胶柱层析上的洗脱曲线

2.5 伴生菌培养液活性物质生化特征

将具有明显促进产酸菌产酸的30~50kD及大于100kD的伴生菌组分分别经Sephadex G150凝胶过滤柱层析进行分离纯化。结果如图3及图4。图3为30~50kD组分在Sephadex G150凝胶柱层析上的洗脱曲线,该洗脱曲线只有一个紫外(280nm)吸收峰,记作洗脱峰A;图4为大于100kD组分在Sephadex G150凝胶柱层析上的洗脱曲线,图4显示出一个小的笔架峰及一个主峰分别记作洗脱峰B1及洗脱峰B2。将洗脱曲线上对应于洗脱峰

(280nm紫外吸收峰)处的洗脱液分别收集起来,进行摇瓶发酵实验,结果(表4)表明经分离纯化的有效活性物质对产酸菌产酸有促进作用,大于100kD的出现二峰值,从产酸量看,第一洗脱峰B1高于洗脱峰A 1.26倍,第二洗脱峰B2高于洗脱峰A 1.95倍,平均仍高于洗脱峰A 1.60倍。

表4 分离纯化的伴生菌培养液中活性蛋白对产酸菌产酸的作用

组别	培养基	洗脱峰 A	洗脱峰 B1	洗脱峰 B2
耗氧量 (0.1N, mL)	0.70	1.15	1.45	2.24
2-KGA (mg/mL)	5.38	8.85	11.15	17.23

比较表 2、表 3、表 4 中大于 100kD 组分对产酸菌产酸能力的影响效果,可以看出:大于 100kD 的伴生菌组分促进产酸菌产酸能力最强。而经低温放置一个月后活性仅为原来 58%,这可能是其中活性物质经一段时间的低低温放置后其活性下降所致。经 Sephadex G150 凝胶过滤后,因其洗脱过程的稀释作用使有效活性物质浓度降低,促使产酸菌产酸能力较凝胶过滤前低,并且大于 100kD 组分经层析后出现两个峰值,各自均促进产酸菌产酸,但也比层析前的低,这也从另一个侧面说明大于 100kD 组分中的活性物质具有协同作用。

此外,在本研究中,对伴生菌胞外液,膜超滤截留液及凝胶过滤层析洗脱液进行蛋白质含量监测, PAGE 电泳并以考马斯亮兰 G250 特异染色,初步证明活性物质属蛋白类物质。

3 结语

Vc 二步发酵中,伴生菌巨大芽孢杆菌培养液中分子量在 30~50kD 及大于 100kD 组分明显促进产酸,促进产酸的活性物质具蛋白质属性,且至少是两种以上的蛋白质。其在低温条件下稳定性尚好。

伴生菌生长过程中 pH 值升高起到中和产酸产生的酸,避免混合培养中培养基 pH 值过低对产酸菌的抑制。

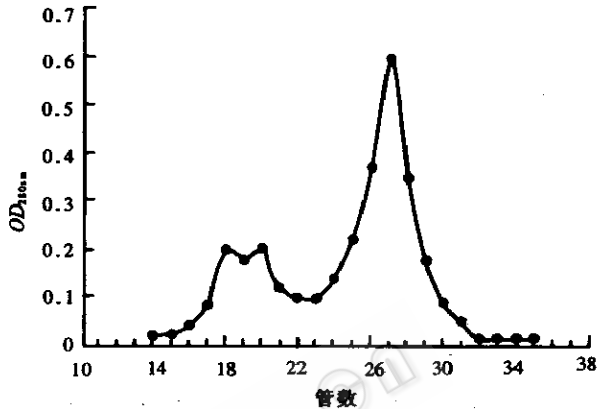


图4 大于 100kD 组分在 Sephadex G150 凝胶柱层析上的洗脱曲线

参考文献

- [1] 尹光琳. 生物工程学报, 1986, 2 (4): 17~21.
- [2] 郭丰文, 郑晓琼. 医药情报, 1994, 6: 1~4.
- [3] 郭新友, 尹光琳. 微生物学通报, 1998, 25 (3): 139~143.
- [4] 冯 树, 张忠泽. 微生物学杂志, 1999, 19 (2): 46~51.
- [5] 张 舟, 冯 树, 江 晶, 等. 微生物学杂志, 1999, 19 (2): 8~10.
- [6] 魏东芝, 袁渭康, 尹光琳, 等. 生物工程学报, 1992, 8 (3): 277~282.
- [7] 朱可丽, 孙传宝, 张忠泽, 等. 微生物学杂志, 1998, 18 (2): 13~15.
- [8] 程茉莉, 严杏珍. 医药工业, 1981, 6: 17~18.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997, 137~138.
- [10] 薛震役, 尹光琳. 微生物学通报, 2000, 27 (2): 89~92.