

脱氮假单胞菌生产维生素 B₁₂ 过程中粪卟啉Ⅲ的测定及发酵调控*

王泽建 赵琳琳 储 炬 庄英萍 张嗣良**

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室国家生化工程技术研究中心 上海 200237)

摘要 脱氮假单胞菌发酵生产维生素 B₁₂ 过程中,副产物粪卟啉Ⅲ的积累对产物的代谢合成和分离提取有很大的影响。建立了发酵液中粪卟啉Ⅲ的 HPLC 快速测定方法,发酵液处理后直接进样测定,检测线性范围为 12~275 μg/ml,重复性好。研究了不同供氧水平、二氧化碳浓度和 pH 值对发酵过程中维生素 B₁₂ 和粪卟啉Ⅲ代谢合成的影响,并在 120 吨发酵罐中进行了发酵过程优化控制。结果表明:在发酵过程产物的合成期控制适当的供氧水平、控制二氧化碳浓度在 8.6±0.8%、维持 pH 值在 7.0±0.12 能明显抑制卟啉Ⅲ的生物合成,同时使维生素 B₁₂ 产量提高 15%。

关键词 维生素 B₁₂ 粪卟啉Ⅲ 发酵 测定 控制

中图分类号 Q819

维生素 B₁₂ (VB₁₂) 又名钴胺素,是一类含咕啉环化合物。三价钴位于类似卟啉的咕啉环平面的中心,与钴离子连接的基团多为脱氧腺苷(5'-deoxyadenosyl)、甲基(-CH₃)、氰基(-CN),从而形成腺苷钴胺素、甲基钴胺素和氰钴胺素^[1]。由于 VB₁₂ 的化学结构式极其复杂,化学合成需要 70 多步反应且成本十分昂贵,因此现行工业发酵过程中主要利用深层液体发酵技术直接生产^[2]。脱氮假单胞菌具有生长快、产量高等特点而被广泛采用。由微生物发酵生产的 VB₁₂ 主要存在于细胞内,发酵液经水解后固形杂质由过滤除去,与 VB₁₂ 性质不同的可溶性杂质由吸附、层析、结晶除去,与 VB₁₂ 性质相似的杂质还留在产品中,使产品的纯度受到限制。尤其是在脱氮假单胞菌为主的耗氧发酵过程中,产生的与 VB₁₂ 性质相似的中间代谢物杂质,对后续工艺的生产能力产生了很大的影响,使后续工艺过程耗时长、消耗大,直接影响了产品的收率、纯度和成本^[2]。因此对发酵过程中副产物的检测和控制非常必要。

近年来随着对脱氮假单胞菌的分子生物学基因工程改造^[3-4]以及发酵 VB₁₂ 过程培养基条件、金属离子、合成前体物质氨基酸和甜菜碱添加策略等因素的优化与控制,VB₁₂ 发酵单位明显提高^[5-6],然而,发酵过程中往往伴随着一种深红色的物质的大量生成。Demain 等^[7]在考察乙硫氨酸对脱氮假单胞菌代谢的影响时,通过两步分光光度法测定证实积累的该深红色物质为粪卟啉Ⅲ(coproporphyrin III, COP-III)(图 1),它与 VB₁₂ 都是从共同的前体尿卟啉原Ⅲ代谢生成的^[8],这些与 VB₁₂ 结构类似的色素大分子在后续的吸附和层析过程中难以完全去掉,增加了产品分离提取难度,一般在出口原料药中要求

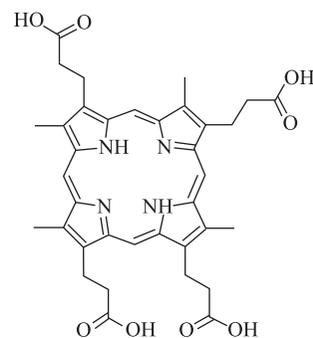


图 1 粪卟啉Ⅲ结构

Fig. 1 Chemical structure of coproporphyrin III

收稿日期:2011-03-31 修回日期:2011-05-24

* 国家科技支撑项目(2008BA163B01)、上海市重点学科建设项目(B505)资助项目

** 通讯作者,电子邮箱:siliangz@ecust.edu.cn

低于1%。更重要的是粪卟啉Ⅲ的大量合成是VB₁₂发酵过程代谢异常的体现。因此该物质在发酵过程中的及时测定和控制对指导工业维生素B₁₂发酵过程优化有非常重要的意义。在前期的VB₁₂发酵过程研究证实脱氮假单胞菌对氧有很高的亲和力,供氧对发酵代谢的影响很大;而且培养过程中发现pH值的变化对发酵代谢过程也有很大影响;在大规模的生产过程中,由于通气条件较差,同时存在较高的静水压强,使得发酵液中溶解的二氧化碳浓度很高,二氧化碳浓度的变化对大规模生产发酵有很大的影响;本文建立了用高压液相快速准确测定发酵液中该暗红色物质的方法,并进一步考察了发酵过程中的关键因素供氧条件、pH值和二氧化碳浓度对该物质合成代谢的影响,并成功地用于指导发酵过程优化,为脱氮假单胞菌发酵生产VB₁₂过程该物质的跟踪测定和控制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

脱氮假单胞杆菌(*P. denitrificans*),由华荣制药有限公司提供。

1.2 种子培养基(g/L)

蔗糖 40,玉米浆 20,甜菜碱 5,(NH₄)₂SO₄ 1,(NH₄)₂HPO₄ 2,MnSO₄·H₂O 0.8,COCl₂·6H₂O 0.02,MgO 0.3,DMBI 0.01,ZnSO₄·7H₂O 0.01,pH 7.2~7.4。

1.3 发酵培养基(g/L)

蔗糖 80,玉米浆 45,甜菜碱 14,(NH₄)₂SO₄ 1,KH₂PO₄ 0.75,COCl₂·6H₂O 0.075,MgO 0.5,DMBI 0.05,ZnSO₄·7H₂O 0.08,CaCO₃ 1,pH 7.2~7.4。

补料培养基1(g/L):葡萄糖 300,DMBI 0.15,COCl₂·6H₂O 0.15。

补料培养基2(g/L):甜菜碱 30,DMBI 0.4,COCl₂·6H₂O 0.3。

1.4 主要试剂和设备

甜菜碱(华荣制药有限公司),玉米浆(河北兴柏糖业有限公司),其它试剂均为国产分析纯。HPLC液相色谱仪(Agilent公司);尾气质谱MAX300-LG分析仪(美国Extrel公司);50L全自动发酵罐(上海国强生化装备有限公司)。

1.5 还原糖和总糖测定

采用改进了的DNS法和葡萄糖试剂盒^[9]。

1.6 发酵过程尾气分析

采用Extrel过程质谱MAX300-LG对发酵过程中

的进气和尾气进行实时在线采集分析,该质谱仪能够精确测定发酵过程尾气中的氩气、氮气、二氧化碳和氧气等分子量300以内的可挥发性气体。使用之前用标准气体对仪器的响应度进行标定。摄氧率(OUR)通过对发酵尾气的分析数据计算得到。计算公式如下:

$$OUR = \frac{F_{in}}{V} \left[C_{O_2,in} - \frac{C_{O_2,in} \cdot C_{CO_2,in}}{1 - (C_{O_2,out} + C_{CO_2,out})} \right] \cdot f$$

$$f = \frac{273}{273 + t_{in}} \cdot P_{in} \cdot \frac{1}{1 + h} \times 10^{-5}$$

F_{in} :进气流量 L/min; V :发酵液体积 l; $C_{O_2,in}$ 、 $C_{CO_2,in}$:分别为进气中惰性气体、氧气及二氧化碳的质量分率; $C_{O_2,out}$ 、 $C_{CO_2,out}$:分别为排气中氧气和二氧化碳的摩尔质量分率; P_{in} :进气的绝对压强 Pa; t_{in} :进气的温度℃; h :进气的相对湿度(%)。

1.7 VB₁₂含量测定

样品制备:取10 ml发酵液,加入8%亚硝酸钠溶液和冰醋酸各2.5 ml,摇匀,于95~100℃水浴30 min;水浴后冷却至室温,50W白炽灯下光照30 min后加去离子水定容至50 ml,过滤;所得滤液用0.22 μm微孔滤膜过滤后进行液相色谱分析;高效液相色谱条件:流动相为(pH 3.5)乙酸钠水溶液:乙腈(30:70, v/v);色谱柱为Backman C18柱;检测波长为515 nm;进样量是20 μl;流速为1.0 ml/min。

1.8 50 L发酵罐发酵工艺

采用二级发酵:用10 ml无菌水洗涤斜面,将悬液接种2 ml到母瓶培养基中,装量100 ml/500 ml,32℃,转速280 r/min,培养20~22 h。将培养好的种子液1250 ml接种到装有25 L培养基的发酵罐中,发酵罐为二级平叶搅拌桨,32℃,通气量1 vvm,发酵过程中根据菌体生长和残糖情况来连续补加葡萄糖和甜菜碱料液培养基。发酵过程中的pH值、溶氧、菌体的摄氧率和二氧化碳释放速率等参数全部使用Biostar软件进行实时采集。

1.9 发酵罐不同进气CO₂浓度培养实验

在50 L发酵罐中,当菌体生长处于稳定期,维生素B₁₂快速合成期时,分别取2.5 L转接到4个同样的5 L的发酵罐中培养。通过调整各发酵罐的转速和流量,使得它们具有同样水平的OUR和CER。通入不同比例的纯CO₂气体与空气的混合气体,控制4个不同的进气CO₂浓度,分别为0.03%、3.32%、8.86%和13.84%,总的通气量都控制在2.5 L/min,罐压维持在0.03 MPa,培养32h后测定粪卟啉Ⅲ的含量变化。

1.10 120 m³ 发酵生产工艺

采用三级发酵:将5支培养好的斜面用无菌水洗涤后得到的菌悬液接种到装有50 L培养基的100 L种子罐中,32℃,300 r/min,培养45~50 h;当菌浓长到OD₇₀₀为15时,移种到9 m³的二级种子罐,装液量5 m³,32℃,200 r/min,培养30~35 h;待OD₇₀₀为15时,移种到120 m³的生产罐中,装料量为85 m³,发酵过程中温度控制在32℃,转速,pH值、溶氧、尾气实施在线采集和分析。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 测定粪卟啉Ⅲ含量方法的建立

精确称量粪卟啉Ⅲ标准品,使用超纯水溶解配置成标准品母液,母液使用0.45 μm滤膜过滤后避光保存在-4℃。色谱条件建立:Beckman C18(5 μm,4.6 mm,25 cm)色谱柱;流动相A为乙腈,流动相B为醋酸钠缓冲液(使用乙酸调pH至3.4);柱温35℃;检测波长365nm;流速1.2ml/min;进样量10 μl。洗脱条件:0~15min,5%~30%乙腈恒速梯度洗脱;5~15min,30%~70%乙腈梯度洗脱,15~20min,70%~30%乙腈梯度洗脱,20~25min,30%乙腈恒速洗脱。根据保留时间确定样品中粪卟啉Ⅲ的色谱峰,图2a为粪卟啉Ⅲ标准品的色谱图。

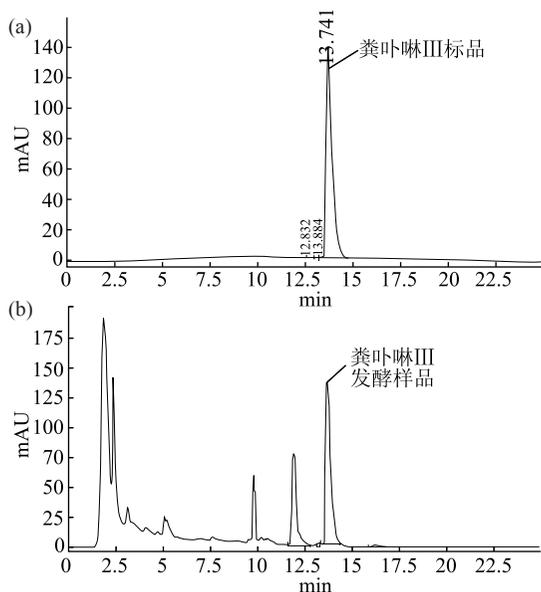


图2 粪卟啉Ⅲ标准品及发酵液样品的HPLC 色谱图

Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of coproporphyrin III

(a) Standard (b) Fermentation sample

将粪卟啉Ⅲ标准品母液稀释为梯度浓度溶液进行高压液相测定分析,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,粪卟啉Ⅲ溶液的质量浓度(X)为横坐标,经线性回归得到标准品的线性方程为: $Y = 235.4X + 3.9$,相关系数R²为0.9976,线性范围为12~275 μg/ml,最低检出限为0.45 μg/ml。

2.2 样品中粪卟啉Ⅲ含量及回收率测定

将带菌体的发酵液超声破碎后得到的上清,加入20%体积的冰醋酸加热煮沸,然后放入0~4℃冷却1h后,9000 r/min离心除沉淀,上清液经0.2 μm纤维素膜过滤后进样进行测定,从发酵液样品处理后的液相色谱图(图2b)可以看出,此色谱条件能很好地对粪卟啉Ⅲ进行分离。精确称量5份等量的同一批发酵样品处理液进行回收率考察实验,分别向发酵样本加入一定量的标准品,根据标准品添加量和实际测得的量进行回收率验证,测得的回收率分别为98.4%、96.5%、101.3%、98.6%和98.2%,实验重复3次,回收率全部能达到了96.5%以上,标准偏差小于0.86%。该方法能够实现发酵样品中粪卟啉Ⅲ的精确测定。

2.3 不同供氧水平对粪卟啉代谢的影响

在50 L发酵罐中进行脱氮假单胞菌发酵生产VB₁₂实验,当发酵进入菌体生长稳定期,产物开始快速合成的阶段时,无菌取出发酵液,按不同的装液量(10、20、40、80、100 ml)分装到500 ml的三角摇瓶中进行发酵培养(每组3个平行),48h后测定发酵液中的粪卟啉Ⅲ含量(表1)。从表1实验测定结果中可以看出当装液量为40ml/500ml时,VB₁₂的合成速率最高达到了1.29 mg/L·h,而且随着供氧的增加或降低,VB₁₂的合成速率呈现明显下降的趋势,当装液量为100ml/500ml时的高供氧条件下合成速率降到了0.75 mg/L·h。粪卟啉

表1 不同装液量对VB₁₂快速合成期VB₁₂和粪卟啉Ⅲ代谢的影响

Table 1 Effects of different oxygen supply levels on the production rate of vitamin B₁₂ and coproporphyrin III in high vitamin B₁₂ biosynthesis phase

装液量	10ml	20ml	40ml	80ml	100ml
转接后0h-VB ₁₂ mg/L	88.90	88.90	88.90	88.90	88.90
转接后0h-粪卟啉 mg/L	45.30	45.30	45.30	45.30	45.30
转接后48h-VB ₁₂ mg/L	124.85	137.69	150.67	132.45	113.75
转接后48h-粪卟啉 mg/L	93.80	86.40	64.60	59.20	44.10
VB ₁₂ 合成速率 mg/L·h	0.75	1.02	1.29	0.91	0.52
粪卟啉合成速率 mg/L·h	1.01	0.86	0.40	0.29	—

Ⅲ的合成速率与供氧的关系明显不同于供氧对产物合成的影响。当装液量从 100ml 降到 40ml 时,随着供氧水平的增加,粪卟啉Ⅲ的合成速率与 VB₁₂的合成速率都同时增加,但随着供氧水平的继续增加,粪卟啉Ⅲ的合成速率仍然呈现增加的趋势,当装液量为 10ml/500ml 时高达 1.01 mg/L·h。

粪卟啉Ⅲ的生物合成途径见图 3,它是血红素合成过程中产生的代谢物。大量研究报道表明,在原核生物中血红素在氧的调控方面起着非常重要的作用。在细菌的氧调控机制中,二元调控系统家族的 FixL 蛋白与 FixJ 蛋白非常重要,FixL 是结合血红素的感应元件,其感受氧的机制是通过血红素与氧的结合或分离来调节 FixL 蛋白的自身磷酸化程度及磷酸基团向 FixJ 的转移^[10]。脱氮假单胞菌生产 VB₁₂是好氧过程,该菌对氧表现出极高的亲和力,发酵生产过程中高的摄氧率使得需要大量的血红素来促进氧化磷酸化反应^[11-12]。血红素的合成与粪卟啉Ⅲ的合成来自于共同的前体粪卟啉原Ⅲ,粪卟啉原Ⅲ与 VB₁₂合成的共同前体为尿卟啉原Ⅲ(uroporphyrinogen Ⅲ)见图 3, Demain 等^[7]在研究乙硫氨酸对脱氮假单胞菌代谢的影响时证实在脱氮假单胞菌 VB₁₂发酵代谢过程中有大量的粪卟啉原Ⅲ生成粪卟啉Ⅲ。尿卟啉原Ⅲ合成血红素过程中,需要大量的氧作为底物参与代谢反应,在过高的供氧水平下,脱氮假单胞菌的氧消耗速率明显增加,从而使得由尿卟啉原Ⅲ生成粪卟啉原Ⅲ的分支途径通量比例增加,促进了粪卟啉Ⅲ的积累,使得发酵液的颜色呈现较深的暗红色。

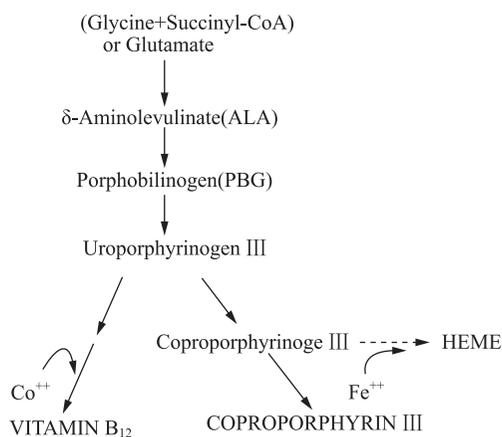


图 3 VB₁₂和粪卟啉Ⅲ的生物合成途径
Fig. 3 Biosynthetic pathway of vitamin B₁₂ and coproporphyrin III

(ALA: 5-氨基乙酰丙酸; PBG: 胆色素原; Uroporphyrinogen Ⅲ; 尿卟啉原Ⅲ Coproporphyrinogen Ⅲ; 粪卟啉原Ⅲ; Heme: 血红素)

2.4 二氧化碳浓度对 VB₁₂及粪卟啉Ⅲ合成的影响

CO₂是微生物的代谢产物,也是细胞内一些合成代谢的基质,是细胞代谢不可忽视的影响因素。在微生物大规模培养过程中,由于通气条件受限,有着高的罐压和静水压,发酵基质中 CO₂的溶解度急剧升高,细胞代谢过程中碳水化合物氧化产生的 CO₂无法及时释放,使得培养基中的溶解 CO₂大量累积^[13]。尤其是呼吸强度较大的微生物培养过程,溶解 CO₂水平会快速提高,对于发酵过程中菌体的生长和代谢必然会产生重要影响^[14-15]。

为了更好地考察 CO₂对维生素 B₁₂合成过程中粪卟啉Ⅲ代谢的影响,我们将 50 L 反应器中培养了 126h,菌体生长已处于稳定期、维生素 B₁₂快速合成阶段的发酵培养液,分别无菌取样 2.5 L 分装到 4 个 5 L 的发酵罐中培养。通过调整纯 CO₂气体与空气的混合比例,控制四个不同的进气 CO₂浓度(0.03%、3.32%、8.86%和 13.84%),继续培养 32 小时后测定维生素 B₁₂和粪卟啉Ⅲ的合成速率如图 4 所示。

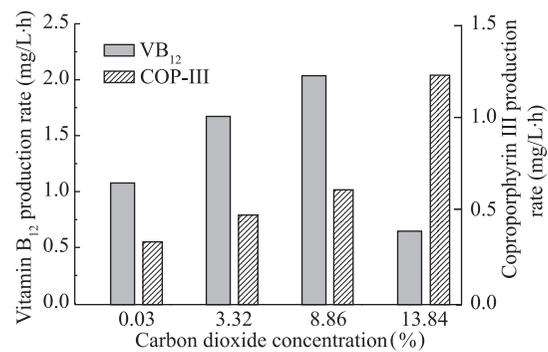


图 4 不同二氧化碳浓度对合成期 VB₁₂生成速率和粪卟啉Ⅲ生成速率的影响

Fig. 4 Effects of carbon dioxide on the production rate of vitamin B₁₂ and coproporphyrin III

在前期关于 CO₂浓度对发酵过程的影响表明适当浓度的 CO₂的加入对维生素 B₁₂合成的关键前体 δ-ALA 的生成是非常有利的^[16]。从维生素 B₁₂合成途径可知^[12],前体物质 δ-ALA 的合成主要以 TCA 循环中的谷氨酸和琥珀酰辅酶 A 为底物,因此随着大量的前体流向产物合成途径,以二氧化碳和三碳底物羧化生成草酰乙酸的回补途径的增强就显得非常关键。从实验结果可以看出随着进气二氧化碳浓度从 0.03% 上升到 8.86% 时,VB₁₂的合成速率和副产物粪卟啉Ⅲ的合成速

率呈现等比例上升的趋势。说明维持一定的二氧化碳浓度能明显促进其前体尿卟啉原Ⅲ的合成速率。在 8.84% 的进气二氧化碳浓度下得到最高 VB₁₂ 的合成速率 2.04 mg/L·h, 随着进气中二氧化碳浓度的继续增加, VB₁₂ 的合成明显受到抑制, 而副产物粪卟啉Ⅲ的合成速率显著上升, 在 13.84% 的进气二氧化碳浓度下, 粪卟啉Ⅲ的合成速率达到了 1.24 mg/L·h, 与只通空气的正常发酵(0.32 mg/L·h)相比升高了 2.9 倍。可见当通气中二氧化碳浓度大于 8.84% 时, 由尿卟啉原Ⅲ生成粪卟啉Ⅲ合成的速率将逐渐高于尿卟啉原Ⅲ合成 VB₁₂ 的速率, 并显著抑制了 VB₁₂ 的生成。因此在工业大型发酵罐中通过控制合适的二氧化碳浓度, 对促进 VB₁₂ 的合成和减少副产物粪卟啉Ⅲ的积累是非常必要的。

2.5 不同 pH 对 VB₁₂ 及粪卟啉合成速率的影响

在工业 VB₁₂ 发酵过程中, pH 值对 VB₁₂ 的合成和发酵液颜色的变化有很大的影响, 为了了解 pH 值与副产物代谢之间的关系, 我们将 50L 发酵罐中培养 96h 的培养液无菌分装到摇瓶中(50ml/500ml), pH 值用 NaOH 或 4N 盐酸调节并分别维持在 5.6 ± 0.15、6.10 ± 0.13、6.6 ± 0.09、7.0 ± 0.12、7.5 ± 0.15、7.9 ± 0.1, 280 r/min 培养 36 h 后测定不同条件下粪卟啉Ⅲ和 VB₁₂ 的代谢情况。

图 5 是不同 pH 值条件下测定分析得到的 VB₁₂ 和粪卟啉Ⅲ生成速率。实验结果显示 pH 值对 VB₁₂ 和粪卟啉Ⅲ的生成都有非常显著的影响, 当 pH 值维持在 7.0 ± 0.12 的情况下, 脱氮假单胞菌合成 VB₁₂ 的速率最

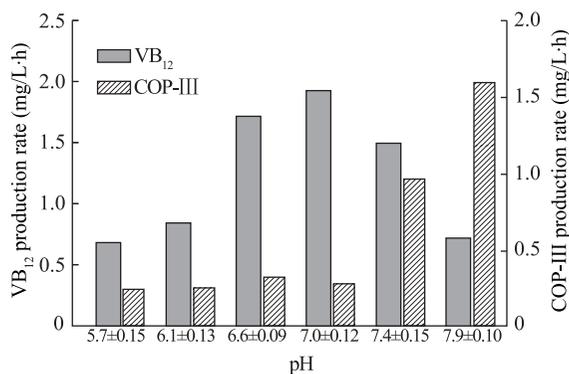


图 5 不同 pH 对合成期 VB₁₂ 生成速率和副产物粪卟啉Ⅲ生成速率的影响

Fig. 5 Effects of different pH on the production rate of vitamin B₁₂ and coproporphyrin III

高(1.92 mg/L·h), 当 pH 值降到 6.10 ± 0.13 或高于 7.0 ± 0.12 时, 都使得 VB₁₂ 的合成速率明显降低。从粪卟啉Ⅲ的生成趋势来看, 其合成速率在 pH 值低于 7.0 ± 0.12 的情况下都较低, 小于 0.35 mg/L·h; 然而随着 pH 值升高, 粪卟啉Ⅲ的生成速率显著增加, 当 pH 值为 7.9 ± 0.1 时, 其合成速率达到了 1.61 mg/L·h, 是 pH 值为 7.0 ± 0.12 时的 4.5 倍以上。因此在生产过程中控制 pH 值在 7.0 ± 0.12 对于提高 VB₁₂ 的发酵产量、同时降低副产物粪卟啉Ⅲ的积累是非常有利的。

2.6 工业发酵过程的优化控制

试验结果证实, 在脱氮假单胞菌发酵生产 VB₁₂ 的过程中, 供氧水平、二氧化碳浓度、和 pH 值对产物 VB₁₂ 和副产物粪卟啉Ⅲ的合成有着显著的影响。因此在发酵过程中我们通过转速和通气量的协同调整, 来控制供氧水平和尾气中二氧化碳的浓度, 并通过补糖和加碱控制将发酵过程 pH 维持在 6.8 ~ 7.2。从图 6 中可以看出, 由于该生产菌对氧有很强的亲和力, 随着发酵过程菌体的生长和氧消耗速率的增加, 在 17 ~ 18h 溶氧迅速降到几乎为零的水平。并且随着转速和通气的调整, 溶氧水平几乎不再变化, 这种情况下, 供氧水平的高低可以通过测得的菌体的氧消耗速率参数 OUR 来表征。在发酵过程前期通过增大搅拌转速和降低通气量的方式来控制 OUR 在 38 ± 1.6 mmol/L·h 的同时, 将尾气中二氧化碳的浓度控制在 7.2 ~ 8.5%, 在 54h 进入 VB₁₂ 快速合成期后通过转速和通气量的调整将 OUR 分阶段逐级降低控制在 32.4 ± 0.8 和 24.7 ± 1.3 mmol/L·h, 二氧化碳浓度稳定控制在 8.6 ± 0.8%。从试验结果证实这种控制策略能明显促进产物 VB₁₂ 的合成, 同时有效降低了发酵过程中后期由于供氧和搅拌转速的不匹配调整造成的过高的二氧化碳浓度对产物 VB₁₂ 合成的抑制和粪卟啉Ⅲ的大量积累。发酵培养 196 小时 VB₁₂ 发酵单位达到了 226 ± 3.4 mg/L, 比对照(197 ± 3.4 mg/L)提高了 15%, 同时将粪卟啉Ⅲ的积累量由 380 ± 5.9 mg/L 降到了 162 ± 3.3 mg/L, 降低了 57.4%。

3 结论

脱氮假单胞菌发酵生产 VB₁₂ 过程中, 副产物粪卟啉Ⅲ的积累对产品后提取有很大的影响, 本文建立了利用高压液相快速测定发酵液中粪卟啉Ⅲ含量的方法, 并研究了不同供氧水平、二氧化碳浓度和 pH 值对发

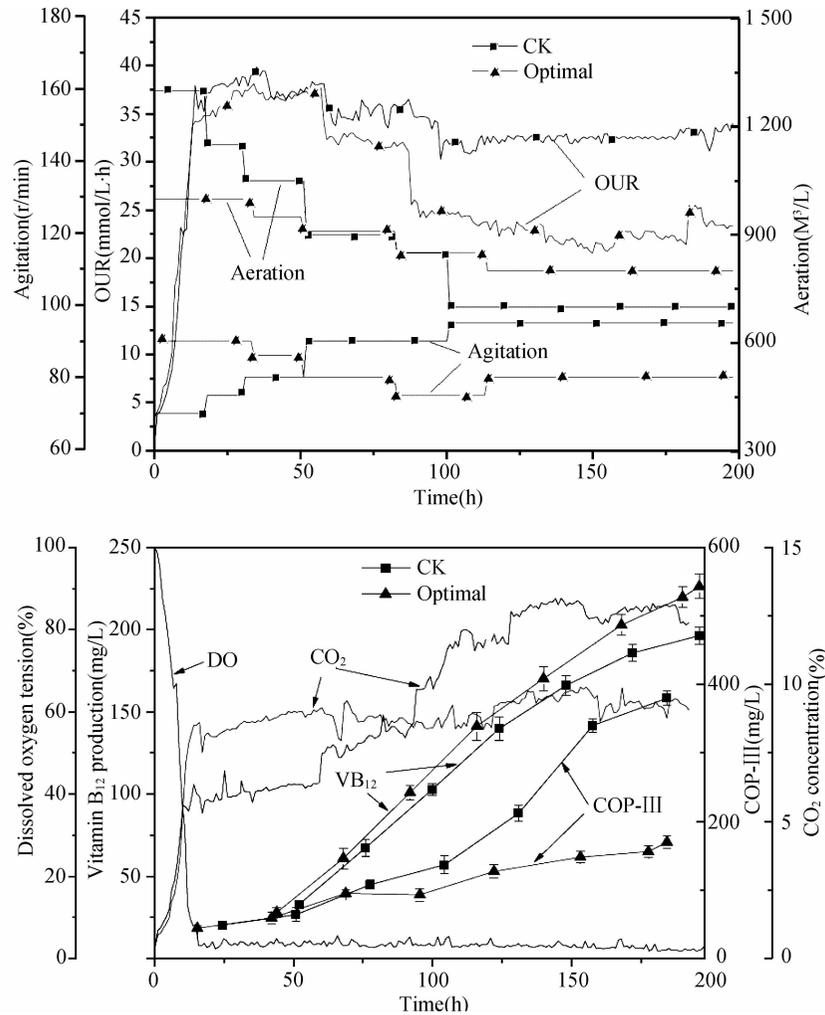


图6 优化的控制策略对发酵过程 VB₁₂和粪卟啉Ⅲ合成代谢的影响

Fig. 6 Time course of vitamin B₁₂ and coproporphyrin III biosynthesis under optimal control strategy in industrial fermentation

Symbols: optimal fermentation (Optimal, ▲) and control (CK, ■)

酵过程中 VB₁₂和杂质粪卟啉Ⅲ合成的影响,研究结果表明过高的供氧水平、高于 8.86% 的二氧化碳浓度、以及当 pH 值高于 7.0 ± 0.12 的情况下都会加速粪卟啉Ⅲ的合成。在工业发酵生产中通过搅拌和通气量的合理调控能显著提高 VB₁₂的合成速率,同时有效抑制粪卟啉Ⅲ的积累。

参考文献

- [1] 罗伟,郝常明. 维生素 B₁₂的研究及其进展. 中国食品添加剂,2002,3:15-18.
Luo W, Hao C M. China Food Additives, 2002, 3:15-18.
- [2] Martens J H, Barg H, Warren M J, et al. Microbial production of vitamin B₁₂. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 275-285.
- [3] Scott A I, Roessner C A, Stolowich N J, et al. Biosynthesis of vitamin B₁₂. Discovery of the enzymes for oxidative ring contraction and insertion of the fourth methyl group. FEBS Lett, 1993, 331: 105-108.
- [4] Warren M J, Raux E, Schubert H L, et al. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). Nat Prod Rep, 2002, 19: 390-412.
- [5] Li K T, Liu D H, Li Y L, et al. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2008, 31: 605-610.
- [6] Li K T, Liu D H, Li Y L, et al. Improved large-scale production of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding. Bioresource Technology, 2008, 99: 8516-8520.

- [7] Demain A L, White R F. Porphyrin overproduction by *Pseudomonas denitrificans*: essentiality of betaine and stimulation by ethionine. *J Bacteriol*,1971,107:456-460.
- [8] Warren M J. Finding the final pieces of the vitamin B₁₂ biosynthetic jigsaw. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 4799-4800.
- [9] Jermyn M A. Increasing the sensitivity of the anthrone method for carbohydrate. *Anal Biochem*,1975,68:332-335.
- [10] Plakunov V K,Shelemekh O V. Mechanisms of oxygen regulation in microorganisms. *Microbiology*,2009,78:535-546.
- [11] Wang Z J, Wang H Y, Li Y L, et al. Improved vitamin B₁₂ production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process. *Bioresource Technology*,2010,101:2845-2852.
- [12] Roessner C A, Santander P J, Scott A I, et al. Multiple biosynthetic pathways for vitamin B₁₂: Variations on a central theme. In: *Vitamins & Hormones*. Litwack G, Begley T. San Diego: Academic Press,2001,61:267-297.
- [13] Ferrentino G, Ferrari G, Poletto M, et al. Microbial inactivation kinetics during high-pressure carbon dioxide treatment: nonlinear model for the combined effect of temperature and pressure in apple juice. *J Food Sci*,2008. 73(8):389-395.
- [14] Wang D, Li Q, Li W L, et al. Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009,45:491-497.
- [15] El-Sabbagh N, Harvey L M, McNeil B. Effects of dissolved carbon dioxide on growth, nutrient consumption, cephalosporin C synthesis and morphology of *Acremonium chrysogenum* in batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology*,2008, 42:315-324.
- [16] 王慧媛,王泽建,黄明志,等. CO₂ 对脱氮假单胞菌发酵生产维生素 B₁₂的影响. *华东理工大学学报(自然科学版)*,2010, 36:499-505.
- Wang H Y, Wang Z J, Huang M Z, et al. *Journal of East China University of Science and Technology (natural science edition)*, 2010,36:499-505.

The Determination and Control of Coproporphyrin Ⅲ in Vitamin B₁₂ Fermentation by *Pseudomonas denitrificans*

WANG Ze-jian ZHAO Lin-lin CHU Ju ZHANG Ying-ping ZHANG Si-liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract The accumulation of coproporphyrin Ⅲ, which is byproduct generated in vitamin B₁₂ fermentation of *Pseudomonas denitrificans*, greatly affect the biosynthesis of vitamin B₁₂ and the extraction in industrial production. An effective method for determining coproporphyrin Ⅲ concentration directly after suitable treatment of the fermentation broth. Furthermore, the influence of oxygen supply levels, carbon dioxide concentrations and pH on coproporphyrin Ⅲ biosynthesis were investigated, the optimal control strategy was implemented in 120 m³ industrial bioreactor. The results revealed that higher oxygen supply promoted the coproporphyrin Ⅲ accumulation, controlling the inlet carbon dioxide concentration at 8.6 ± 0.8% and pH at 7.0 ± 0.12 could greatly inhibit the coproporphyrin Ⅲ biosynthesis, and the vitamin B₁₂ production increased for 15% than that of control.

Key words Vitamin B₁₂ Fermentation Coproporphyrin Ⅲ Determination Control