

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 12 月 27 日 (27.12.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/174978 A1

(51) 国际专利分类号:

C12P 39/00 (2006.01) G01N 27/62 (2006.01)
C12P 7/60 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) C12R 1/11 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/076310

(22) 国际申请日: 2012 年 5 月 31 日 (31.05.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201110165681.3 2011 年 6 月 20 日 (20.06.2011) CN
201110314740.9 2011 年 10 月 17 日 (17.10.2011) CN
201110315641.2 2011 年 10 月 17 日 (17.10.2011) CN
201110346058.8 2011 年 11 月 4 日 (04.11.2011) CN
201110407078.1 2011 年 12 月 9 日 (09.12.2011) CN
201210044060.4 2012 年 2 月 24 日 (24.02.2012) CN
201210049440.7 2012 年 2 月 29 日 (29.02.2012) CN
201210109628.6 2012 年 4 月 13 日 (13.04.2012) CN
201210148033.1 2012 年 5 月 14 日 (14.05.2012) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 天津大学 (TIANJIN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国天津市南开区卫津路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 元英进 (YUAN, Yingjin) [CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 邹阳 (ZOU, Yang) [CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 马倩 (MA, Qian) [CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 高赞 (GAO, Yun)

[CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 杜瑾 (DU, Jin) [CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 杨洁 (YANG, Jie) [CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。 李霞 (LI, Xia) [CN/CN]; 中国天津市卫津南路 92 号, Tianjin 300072 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。

(54) Title: STRAIN IMPROVEMENT AND PROCESS OPTIMIZATION IN TWO-STEP MIXED FERMENTATION FOR PRODUCTION OF VITAMIN C

(54) 发明名称: 维生素 C 二步混菌发酵的菌种改造和过程优化

(57) Abstract: A method for improving the yield of vitamin C precursor 2-keto-L-gulonic acid by means of mixing strains to create a subculture and by enhancing the interaction between two strains, said method including steps for solid culturing, seed culturing, isolation and purification, and fermentation. Also provided is a method for using the mixed subculture to detect changes in protein, phospholipid component, nutritional environment and micromolecular metabolite in the process of passage of strains for industrial production of vitamin C. In addition, the present invention also comprises a use for gluconobacter oxydans having a vector encoding a sorbosone dehydrogenase gene; a method for detecting change in protein in cells in the process of applying glutathione to gluconobacter oxydans; and a method for a quality control index for the use of corn steep liquor as a raw material for fermentation.

(57) 摘要: 一种通过混菌进化传代培养和强化两菌相互作用以提高维生素 C 的前体 2-酮基-L-古龙酸工业产量的方法, 包括固体培养、种子培养、分纯和发酵的步骤。还包括利用所述混菌传代培养检测维生素 C 工业生产菌株过程中蛋白质、磷脂组、营养环境和小分子代谢物变化的方法。此外, 本发明还包括含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的用途、检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化的方法、以及发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法。

WO 2012/174978 A1

维生素 C 二步混菌发酵的菌种改造和过程优化

技术领域

本发明属于工业微生物领域。具体而言，本发明涉及检测维生素 C 工业生产菌株传代过程中蛋白质、磷脂组、营养环境和小分子代谢物变化的方法。本发明还涉及提高维生素 C 的前体 2-酮基-L-古龙酸工业产量的方法，包括混菌进化传代培养、强化两菌相互作用提高 2-酮基-L-古龙酸产量的方法以及分子生物学基因改造方法和添加谷胱甘肽的方法。本发明还提供了用于发酵的原料玉米浆的质量控制指标。

背景技术

随着经济发展和生活水平不断提高，人类对健康越来越重视，各种维生素类保健品的需求量逐年增加。在各种维生素中，维生素 C 是一种高效抗氧化剂，参与人体新陈代谢中重要的生物合成过程，是维持机体营养、生长所必需的维生素。它还在药品、食品和化妆品添加等方面有极为广泛的应用。

目前，我国生产维生素 C 的方法为“二步发酵法”，第一步发酵使用黑醋杆菌将山梨醇转化为 L-山梨糖，第二步发酵为巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌混合发酵，将山梨糖转化为维生素 C 的前体 2-酮基-L-古龙酸。其中，第二步发酵中，氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)为产酸菌，巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)为伴生菌，若不加入巨大芽孢杆菌而单独使用氧化葡萄糖杆菌时，生长极端缓慢，产酸效率低，当加入巨大芽孢杆菌，可使氧化葡萄糖杆菌生长速率提高，产酸量增加，但是，巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)混菌发酵 2-酮基-L-古

龙酸的转化率尚有可提高的空间。

在两菌混合培养中，它们之间的交流最先经由感受外界信号的细胞膜，再进一步传递到胞内，并产生一系列的信号事件，包括细胞内蛋白质的变化、细胞膜磷脂组的变化。另外，培养液的营养环境不断的发生变化，进而传递到胞内，产生一系列不同的生长及发酵行为。对于这些变化的研究和测定，将对揭示传代培养强化两菌相互作用促进产酸的作用机制提供有利信息，并为进一步优化生产工艺提供支持。

另一方面，提高氧化葡萄糖杆菌自身的糖酸转化能力是提高混菌发酵生产效率的关键。分子生物学操作和代谢工程手段加快了菌株人工进化、能够快速提高菌株特性，可以基于基因信息有目的地高效改造菌株。专利 CN1621518 和专利 CN1515669 获得了氧化葡萄糖杆菌进行糖酸转化的关键酶——山梨酮脱氢酶的核酸序列。基于该信息可以对氧化葡萄糖杆菌进行分子水平改造，进而提高其与巨大芽孢杆菌混合发酵时的 2-酮基-L-古龙酸混菌发酵性能。

此外，添加谷胱甘肽后，氧化葡萄糖杆菌体生长及 2-酮-L-古龙酸产量显著提高，其作用机理尚不明确。通过高通量的蛋白组学的手段来了解添加谷胱甘肽进行氧化葡萄糖杆菌发酵过程中的蛋白质变化规律，可揭示谷胱甘肽促进氧化葡萄糖杆菌生长及 2-酮-L-古龙酸生产的作用机制，为对氧化葡萄糖杆菌进行分子生物学改造提供有利信息，从而提高其生长及生产能力。

另一方面，发酵原料玉米浆对于发酵产品也有很大影响。玉米浆是生产玉米淀粉过程中在浸渍玉米时得到的副产品。它含有氨基酸、有机酸、可溶性糖、维生素和金属盐类等多种营养物质，是生产抗生素等培养基中的重要原料，为微生物生长提供天然的有机氮源。由于其价格低廉、营养丰富，在工业微生物发酵中得到广泛地

应用。玉米浆现有的技术质量检测方法由各生产厂商自行规定，并无国家统一标准。现行的质量检查规定外观浓稠、不透明；色泽棕色到棕褐色；无腐臭等异味；及规定干重、蛋白质、酸度、亚硫酸和灰分的含量标准。这些检查不能科学准确地判定原料的质量，不同批次的原料对发酵产品的效价有很大的影响，为了全面准确地控制原料的质量，保证高效价发酵产品，提高产率，避免浪费，故有必要对其质量控制指标进行研究。

发明内容

本发明的第一个方面提供了一种混菌进化传代培养提高 2-酮基-L-古龙酸产量的方法，包括如下步骤：

(1) 固体培养：

取存于液氮的 10-500 μ L 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-500 μ L 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，28-35 $^{\circ}$ C，培养 24-48 小时；

(2) 种子培养：

将经步骤 (1) 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基，在 28-35 $^{\circ}$ C，200-280 r/min 摇床振荡培养，24h-48h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} cfu/ml，在 28-35 $^{\circ}$ C，200-280 r/min 摇床振荡培养，以 24h-48h 为传代周期，以体积比为 1%-10% 为传代比接入新的种子培养基中，传代 50-80 天；

(3) 分纯：

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯,再分别接种于固体培养基上,28-35℃培养24-48小时;再分别转入种子培养基,在28-35℃,200-280 r/min摇床振荡培养24h-48h,得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将所述原始巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中,使原始巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml,使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^9 cfu/ml,在28-35℃,200-280 r/min摇床振荡培养72h-96h,获得2-酮基-L-古龙酸。

固体培养基的制备为:按比例称取 L-山梨糖 10-50g,玉米浆 2-10g,牛肉膏 2-10g,酵母浸粉 2-10g,尿素 0.5-5g,蛋白胨 2-12g,琼脂 10-50g, KH_2PO_4 0.5-5g, MgSO_4 0.1-0.7g, CaCO_3 0.5-5g,加水至 1L,调 pH 为 6.5-7.0,121℃灭菌 20min,制成固体培养基。

固体培养基的制备优选的是:按比例称取 L-山梨糖 20g,玉米浆 3g,牛肉膏 3g,酵母浸粉 3g,尿素 1g,蛋白胨 10g,琼脂 20g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g,加水至 1L,调 pH 为 6.8,121℃灭菌 20min,制成固体培养基。

种子培养基制备为:按比例称取 L-山梨糖 10-50g,玉米浆 2-10g,牛肉膏 2-10g,酵母浸粉 2-10g,尿素 0.5-5g,蛋白胨 2-12g, KH_2PO_4 0.5-5g, MgSO_4 0.1-0.7g, CaCO_3 0.5-5g,加水至 1L,调 pH 为 6.5-7.0,121℃灭菌 20min,制成种子培养基。

种子培养基的制备优选的是:按比例称取 L-山梨糖 20g,玉米浆 3g,牛肉膏 3g,酵母浸粉 3g,尿素 1g,蛋白胨 10g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g,加水至 1L,调 pH 为 6.8,121℃灭菌 20min,制成种子培养基。

发酵培养基制备为:按比例称取 L-山梨糖 40-120g,玉米浆

10-50g, 尿素 10-25g, KH_2PO_4 0.5-3g, MgSO_4 0.2-1.2g, CaCO_3 0.5-5g 加水至 1L, 调 pH 为 6.5 -7.5, 121℃ 灭菌 20min, 制成发酵培养基。

发酵培养基的制备优选的是: 按比例称取 L-山梨糖 80g, 玉米浆 20g, 尿素 12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 7.0, 121℃ 灭菌 20min, 制成发酵培养基。

该方法通过混菌进化传代培养数十代后, 能明显提高巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 的生长速度和氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 产 2-酮基-L-古龙酸效率, 从而可提高对培养基的利用效率, 提高 L-山梨糖的转化效率 10%-15%。

本发明的第二个方面提供了强化两菌相互作用提高 2-酮基-L-古龙酸产量的方法, 包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取存于液氮的 10-500 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-500 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28-35℃, 培养 24-48 小时;

(2) 种子培养:

将经步骤 (1) 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养, 24h-48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} cfu/ml, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养, 以 24h-48h 为传代周期, 以体积比为 1%-10% 为传代比接入新

的种子培养基中，传代 100-200 天；

(3) 分纯：

将步骤 (2) 获得的传代培养混菌菌株划线分纯，再分别接种于固体培养基上，28-35℃培养 24-48 小时；再分别转入种子培养基，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 24h-48h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；

(4) 发酵：

将所述进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} cfu/ml，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 72h-96h，获得 2-酮基-L-古龙酸或将所述原始巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使原始巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^9 cfu/ml，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 72h-96h，获得 2-酮基-L-古龙酸。

固体培养基的制备为：按比例称取 L-山梨糖 10-50g，玉米浆 2-10g，牛肉膏 2-10g，酵母浸粉 2-10g，尿素 0.5-5g，蛋白胨 2-12g，琼脂 10-50g， KH_2PO_4 0.5-5g， MgSO_4 0.1-0.7g， CaCO_3 0.5-5g，加水至 1L，调 pH 为 6.5-7.0，121℃灭菌 20min，制成固体培养基。

固体培养基的制备优选的是：按比例称取 L-山梨糖 20g，玉米浆 3g，牛肉膏 3g，酵母浸粉 3g，尿素 1g，蛋白胨 10g，琼脂 20g， KH_2PO_4 1g， MgSO_4 0.2g， CaCO_3 1g，加水至 1L，调 pH 为 6.8，121℃灭菌 20min，制成固体培养基。

种子培养基制备为：按比例称取 L-山梨糖 10-50g，玉米浆 2-10g，牛肉膏 2-10g，酵母浸粉 2-10g，尿素 0.5-5g，蛋白胨 2-12g，

KH_2PO_4 0.5-5g, MgSO_4 0.1-0.7g, CaCO_3 0.5-5g, 加水至 1L, 调 pH 为 6.5-7.0, 121℃灭菌 20min, 制成种子培养基。

种子培养基的制备优选的是: 按比例称取 L-山梨糖 20g, 玉米浆 3g, 牛肉膏 3g, 酵母浸粉 3g, 尿素 1g, 蛋白胨 10g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 6.8, 121℃灭菌 20min, 制成种子培养基。

发酵培养基制备为: 按比例称取 L-山梨糖 40-120g, 玉米浆 10-50g, 尿素 10-25g, KH_2PO_4 0.5-3g, MgSO_4 0.2-1.2g, CaCO_3 0.5-5g 加水至 1L, 调 pH 为 6.5-7.5, 121℃灭菌 20min, 制成发酵培养基。

发酵培养基的制备优选的是: 按比例称取 L-山梨糖 80g, 玉米浆 20g, 尿素 12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 7.0, 121℃灭菌 20min, 制成发酵培养基。

该方法通过混菌进化传代培养数十代后, 能明显提高巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 的生长速度和氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 产 2-酮基-L-古龙酸效率, 从而可提高对培养基的利用效率, 提高 L-山梨糖的转化效率 10%-15%。

本发明的第三个方面提供了检测维生素 C 工业混菌传代不同代数蛋白质变化的方法, 包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的 10-200 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-200 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28-35℃, 培养 24-48 小时;

②种子培养:

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基,在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 24h-48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养,以 24h-48h 为传代周期,以体积比为 1%-10%为传代比接入新的种子培养基中,传代 100-150 天,选定 3-4 个取样时间取 3-4 个样;

③分纯:

将步骤(1)②获得的 3-4 个样的混菌细胞划线分纯,再分别接种于固体培养基上,28-35℃培养 24 h-48 h;再分别转入种子培养基,在 28-35℃, 200-280 rpm 摇床振荡培养 24 h-48 h,得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中;

④不同进化时期巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌培养:

将步骤(1)③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到种子培养基中,使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 10-15h;

(2) 细胞内蛋白质的测定:

①细胞收集及淬灭:

分别将步骤(1)④获得的巨大芽孢杆菌培养物和氧化葡萄糖杆菌培养物,在 4℃下,以 4000~6000rpm 的转速离心,收集下层的

细胞，并用 pH 为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞；

②提取细胞内蛋白：

取所述破碎细胞，每份 80~100mg 分别置于离心管中，每管加入 0.5~1mL 细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎 20~50s；加入 5~15 μ L 质量比为 2~4:1 的 DNase I /RNaseA 酶混合溶液，混匀，4℃静置反应 10~30min；加入 5~15 μ L 80~120mM 的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置 1~3h；15000rpm 离心 25~40min；取上清，得到蛋白溶液；

所述细胞裂解液为：8 mol·L⁻¹ 尿素，质量浓度为 4% 的 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸，40 mM 的 Tris,余量为水；

③蛋白浓度测定：

采用 Bradford 试剂盒，将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝 G-250 溶液中，测定步骤（2）②获得的各个蛋白溶液在 595nm 处的吸光值，建立标准曲线；测定各个蛋白溶液蛋白的浓度；

④沉淀蛋白

分别取含 50~100 μ g 蛋白的步骤（2）②获得的各个蛋白溶液，每份加入 4~6 倍体积的-20℃~-40℃的丙酮，在-20℃~-40℃的条件下放置 12~20h；离心，弃上清，沉淀用-20℃~-40℃的体积浓度为 70%-85%的丙酮水溶液洗涤；干燥得到蛋白干粉；

⑤蛋白还原以及酶解

分别向各个蛋白干粉中，添加 20~40 μ L 40~60mM 的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白；再加入 1~4 μ L 三（2-羧乙基）膦，在 50~60℃还原反应 1-1.5h，再加入 1~2 μ L 甲基硫代磺酸甲酯，室温反应 10~15min，终止还原反应；再加入 20~30 μ L 浓度为

0.2~0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 蛋白酶解 12~18 小时, 得酶解液;

⑥蛋白标记

向步骤(2)⑤获得的各个酶解液中分别加入一管用 60~80 μL 乙醇溶解的 iTRAQ 标记试剂, 室温反应 1-1.5h;

⑦溶液混合

将步骤(2)⑥标记后的各个来自巨大芽孢杆菌的蛋白溶液混合; 将步骤(2)⑥标记后的各个来自氧化葡萄糖杆菌的蛋白溶液混合; 于-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

⑧差异表达蛋白鉴定

将(2)⑦中得到的两组混合液, 进行 Q-Tof 质谱鉴定, 得到蛋白谱, 通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白;

(3) 聚类分析:

采用 Expander4.0 对步骤(2)⑧中得到的数据进行标准化后, 进行 K-means 聚类, 得到具有不同变化规律的数据类别, 获得候选差异蛋白;

(4) 过程分析

将步骤(3)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表, 观察并分析这些蛋白变化的规律, 进而发现混菌进化培养在提高氧化葡萄糖杆菌产 2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

利用该方法可以从揭示混菌传代培养对巨大芽孢杆菌以及氧化葡萄糖杆菌细胞内蛋白变化产生的影响, 找到发酵过程中的重要蛋白, 这些蛋白含量的变化规律为了解混菌发酵过程的内在机理提供依据, 从而为进一步优化发酵过程, 提高维生素 C 产量提供理论基础。同时也为工业混菌发酵过程的研究提供新的思路和方法。

本发明的第四个方面提供了分析维生素 C 生产菌株传代过程磷脂组变化的方法，包括如下步骤：

(1) 固体培养：

取 10–500 μL 保藏于体积浓度为 15–30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10–500 μL 保藏于体积浓度为 15–30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，28–35°C，培养 24 h–48 h；

(2) 种子培养：

将经步骤 (1) 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在 28–35°C，200–280 rpm 摇床振荡培养，24 h–48 h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 – 2×10^{10} cfu/mL，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 – 2×10^{11} cfu/mL，在 28–35°C，200–280 rpm 摇床振荡培养，以 24h–48h 为传代周期，以体积比为 1%–10% 为传代比接入新的种子培养基中，传代 100–150 天，在 0–100 或 0–150 天选 3–5 个取样时间取 3–5 个样；

(3) 分纯：

将步骤 (2) 获得的 3–5 个传代培养混菌菌株划线分纯，再分别接种于固体培养基上，28–35°C 培养 24 h–48 h；再分别转入种子培养基，在 28–35°C，200–280 rpm 摇床振荡培养 24 h–48 h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；

(4) 发酵：

将所述进化了的巨大芽孢杆菌、进化了的氧化葡萄糖杆菌以及混合的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到发酵培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 – 2×10^{10}

cfu/mL,使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 – 2×10^{11} cfu/mL,在 28–35°C, 200–280 rpm 摇床振荡培养 10 h–15 h;

(5) 细胞磷脂组的提取:

①取在步骤(4)摇床振荡培养 10 h–15 h 的三种细胞悬液 100–200 mL, 1000–3000 rpm 离心 3–10 min, 去除上清液, 保留细胞, 用 pH=7.2–7.4 的磷酸盐缓冲液洗细胞 1–3 次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤①所得细胞制成干粉, 称取 200–300 mg 细胞干粉, 置于离心管 A 中, 加入 0.5–0.8 mL 超纯水, 充分混匀;

③向离心管 A 中再加入 2–4 mL 提取液, 充分混匀; 1000–3000 rpm 离心 3–10 min, 使溶液分层, 取下层有机溶剂层, 置于离心管 B 中;

④重复步骤③ 2–4 次, 至细胞完全沉降;

⑤向离心管 B 中, 加入 0.8–1.2 mol/L KCl 水溶液 0.5–1.5 mL, 充分混匀, 2000–4000 rpm 离心 3–10 min, 除去含水溶性杂质的上清;

⑥再向离心管 B 加入 1–3 mL 超纯水, 充分混匀, 2000–4000 rpm 离心 3–10 min, 去上清;

⑦蒸馏或氮气吹干步骤⑥所得混合物中的有机溶剂, 得到总磷脂提取混合物;

⑧将所述总磷脂提取混合物溶于 0.2–2 mL 储存液中制成样品, 冷冻–40°C 以下保存;

⑨检测前, 向所述样品内加入磷脂标准品, 使磷脂标准品终浓度为 0.5–1.5 µg/mL;

所述提取液是含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为 1–2:1, 所述二丁基羟基甲苯的质量分数为

0.005–0.01%;

所述储存液为含有二丁基羧基甲苯的氯仿/甲醇溶液,所述氯仿/甲醇的体积比为 1–4:1,所述二丁基羧基甲苯的质量分数为 0.005–0.01%;

(6) LC-MS 检测

采用 LC-MS 对步骤 (5) 获得的加入了磷脂标准品的样品进行检测,得到维生素 C 生产菌株传代过程的磷脂组的分子结构和含量数据;

(7) 多元统计分析

将步骤 (6) 获得的维生素 C 生产菌株传代过程的磷脂组的分子含量数据,进行多元统计分析,得到区分不同传代时间维生素 C 生产菌株的差异磷脂分子标志物;

(8) 过程分析

将步骤 (7) 获得的差异磷脂分子标志物的含量按照不同传代时间制成图表,观察并分析这些磷脂分子变化的规律,进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的磷脂分子及相关代谢途径,从而为以提高 2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化提供方向。

所述细胞制成干粉的方法优选为使用液氮在研钵内研磨细胞。

所述步骤 (5) ⑦中所述蒸馏优选为 30–40°C 减压蒸馏。

所述磷脂标准品为磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰乙醇胺和磷脂酸至少两种。

所述磷脂酰甘油,磷脂酰乙醇胺,溶血性磷脂酰乙醇胺或磷脂酸的脂肪酸疏水尾长度为每条 10–20 个碳原子。

所述 LC-MS 检测条件优选为:

色谱柱: Hypersil GOLD Silica, 其规格为 150mm × 2.1mm,

5 μ m;

进样量: 10 μ L;

柱温: 25 $^{\circ}$ C;

流动相 A (%): 氯仿 (89.5), 甲醇 (10), 氢氧化铵 (0.5);

流动相 B (%): 氯仿 (55), 甲醇 (39), 氢氧化铵 (0.5),
水 (5.5);

梯度程序: 0–7 min, 20–30% B; 7–15 min 30–40% B; 15–20
min 40–50% B; 20–25 min 50% B; 25–35min, 50–20% B;
35–45min, 20% B;

离子化方式: ESI (负离子方式);

扫描方式: MS Scan;

扫描范围: m/z 400–900;

扫描速度: 1000 scan/s;

毛细管电压: 3 KV;

锥孔电压: 30 V;

萃取电压 3 V;

离子源温度: 100 $^{\circ}$ C;

脱溶剂气温度: 350 $^{\circ}$ C;

锥孔气流量: 50 L/Hr

脱溶剂气流量: 400 L/Hr;

进/出口能量: 50;

碰撞能量: 2;

HM1/LM1/HM2/LM2: 15.0;

Ion Energy 1: 1.0;

Ion Energy 2: 2.0.

所述多元统计分析方法为 Pareto 预处理后进行主成分分析。

本发明提供了一种分析维生素 C 生产菌株传代过程磷脂组变化的手段,这种手段涉及细胞总磷脂的提取和分析,多元统计方法分析所获得的磷脂组学数据,通过对不同传代数的维生素 C 生产菌株在单独和混合培养条件下的磷脂分子分别进行定性和定量分析,找到与增强维生素 C 生产菌株两菌相互作用相关的磷脂分子和代谢途径的分析提供了方法,对以提高 2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化具有重要的意义。

本发明的第五个方面提供了检测维生素 C 生产菌株传代过程中营养环境变化的方法,包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的 10-500 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-500 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28-35 $^{\circ}\text{C}$, 培养 24-48 h;

② 种子培养:

将经步骤 (1) ① 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在 28-35 $^{\circ}\text{C}$, 200-280 r/min 摇床振荡培养 24-48 h, 分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35 $^{\circ}\text{C}$, 200-280 r/min 摇床振荡混菌培养, 以 24-48h 为传代周期, 以体积比为 1%-10% 为传代比接入新的种子培养基中, 传代 100-150 天得到混菌细胞, 在传代 0-100 天或 0-150 天中选定 3-4 个时间取样, 取 3-4 个样;

③分纯:

将步骤(1)②获得的 3-4 个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上, 28-35℃培养 24-48 h; 再分别转入新的种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 rpm 摇床振荡培养 24-48 h, 分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液; 保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中;

④发酵:

将步骤(1)③获得的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌, 分别接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 10-15 h;

(2) 营养环境中物质的测定:

①培养液的收集:

分别取步骤(1)④获得的巨大芽孢杆菌培养液、氧化葡萄糖杆菌培养液和混菌体系培养液 1-2 mL, 以 5000-10000 rpm 的转速离心, 收集上清, 并用 0.22 μ m 纤维素微孔滤膜过滤, 得滤液;

②样品制备:

取步骤(2)①获得的滤液 10-50 μ L 置于离心管中, 加入 50-200 μ L 的 0.04-0.14 mg/ml 氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物, 冷冻干燥; 加入 40-100 μ L 浓度为 20 mg/mL 的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于 30℃-40℃水浴中脗化反应 60-120 min; 再加入 50-100 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于 35℃-40℃水浴进行硅烷化反应 30-60 min;

③GC-TOFMS 检测:

将 1 μ L 步骤(2)②获得的样品进到气相色谱仪中, 色谱柱为

DB-5MS, 所述色谱柱的规格为 30 m×0.25 mm i.d., 进样口温度为 250℃-280℃, 载气为高纯氦气, 流速 0.6-0.8ml/min, 分流比 3: 1-20: 1, 柱温箱升温程序为: 初始 50℃-80℃, 保持 2 min-5 min, 以 4℃/min-8℃/min 的速度升到 260℃-300℃, 保持 3 min-8 min, 使用 EI 电离源, 源温 230℃-260℃, 检测器电压 2300 V-2700V, 电离电压 60 eV-80 eV, 电流 30 μA-50 μA; 质谱检测范围 50-800 m/z; 营养环境物质的鉴定使用 NIST 2005 数据库, 质谱数据的处理和营养环境物质相对含量的测定使用 Masslynx 4.1 软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到营养环境物质的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)获得的营养环境物质的相对含量的数据进行 Pareto 预处理;

②用 Metlab 7.0 (Mathworks. Inc.) 软件对步骤(3)①预处理后的数据进行主成分分析, 得到差异营养环境标志物;

(4) 过程分析

将差异营养环境标志物的相对含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析这些物质变化的规律, 检测出维生素 C 生产菌株传代过程中营养环境的变化。

利用该方法可以从揭示混菌传代培养对巨大芽孢杆菌、氧化葡萄糖杆菌以及混菌体系产生的影响, 找到影响传代培养营养环境中的重要物质, 这些物质含量的变化规律为了解传代培养促进氧化葡萄糖杆菌生长及 2-酮基-L-古龙酸生产的作用机理提供依据, 从而为进一步优化发酵过程, 提高维生素 C 产量提供理论基础。

本发明的第六个方面提供了一种分析检测维生素 C 生产菌株

传代培养过程中小分子代谢物变化的方法，包括如下步骤：

(1) 混菌传代培养：

① 固体培养：

取保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，28-35℃，培养 24-48 h；

② 种子培养：

将经步骤 (1) ① 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养 24-48 h，分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养，以 24-48h 为传代周期，以体积比为 1%-10% 为传代比接入新的种子培养基中，传代 100-150 天得到混菌细胞，在传代 0-100 天或 0-150 天中选定 3-5 个时间取样，取 3-5 个样；

③ 分纯：

将步骤 (1) ② 获得的 3-5 个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上，28-35℃ 培养 24-48 h；再分别转入新的种子培养基，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养 24-48 h，分别得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中；

④ 发酵：

将步骤 (1) ③ 获得的进化了的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌，分别接种到新的种子培养基

中,使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL,进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL,在 28-35℃, 200-280rpm 摇床振荡培养 10-15 h;

(2) 胞内小分子代谢物样品的制备和测定:

①各取在步骤(1)④获得的三种细胞悬液 100-200 mL,分别在 1000-3000 rpm 离心 3-10 min,去除上清液,保留细胞,用 pH=7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液洗细胞 1-3 次,相同条件离心,去除上清,得到细胞;

②将步骤(2)①所得细胞制成干粉,各称取 30-60 mg 细胞干粉,分别置于三个离心管中,再加入 0.5-1.5 mL 提取液,加入 30-70 μ L 浓度为 0.020-0.060mg/mL 氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物,混匀;1000-3000 rpm 离心 3-10 min,取上清液置于三个新的离心管中冷冻干燥;

③将步骤(2)②获得三个离心管中分别加入 40-100 μ L 浓度为 10-30 mg/mL 的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于 30℃-40℃水浴中肟化反应 60-120 min;再加入 50-100 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于 35℃-40℃水浴进行硅烷化反应 30-60 min;

所述提取液为体积分数为 50-70%的甲醇水溶液;

④GC-TOF/MS 检测:

将 1 μ L 步骤(2)③获得的样品进到气相色谱仪中,色谱柱为 DB-5MS,所述色谱柱的规格为 30 m $\times$ 0.25 mm i.d.,进样口温度为 250℃-280℃,载气为高纯氦气,恒压 80-100KPa,分流比 3: 1-20: 1,柱温箱升温程序为:初始 50℃-80℃,保持 3 min-6 min,以 4℃/min-8℃/min 的升到 260℃-300℃,保持 3 min-8 min,使用 EI 电离源,源温 230℃-260℃,检测器电压 2300 V-2700V,电离电压 60 eV-80 eV,电流 30 μ A-50 μ A;质谱检测范围 50-800 m/z;小分子

代谢物的鉴定使用 NIST 2005 数据库, 质谱数据的处理和代谢物相对含量的测定使用 Masslynx 4.1 软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到小分子代谢物的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)④获得的维生素 C 生产菌株传代过程的小分子代谢物的相对含量数据进行 Pareto 预处理;

②用 SIMCA-P 11.5 软件对预处理后的数据进行主成分分析, 得到区分不同传代时间维生素 C 生产菌株的小分子代谢物标志物;

(4) 过程分析

将小分子代谢物标志物的含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析小分子代谢物标志物变化的规律, 检测出维生素 C 生产菌株传代过程中细胞内小分子代谢物的变化。

所述细胞制成干粉的方法为液氮研磨细胞。

本发明的第七个方面提供了通过代谢工程的手段来改造氧化葡萄糖杆菌, 增加其山梨酮脱氢酶基因的拷贝数, 提高氧化葡萄糖杆菌与巨大芽孢杆菌混菌发酵转化 L-山梨糖为 2-酮基-L-古龙酸的性能的方法。其包括如下步骤:

(1) 山梨酮脱氢酶基因的体外扩增:

采用细菌基因组提取试剂盒提取氧化葡萄糖杆菌的基因组; 取该基因组溶液 1 μ l, 5 $\times$ FastPfu buffer 4 μ l, 20mM 的 dNTP 2 μ l, 20nM 的引物 1 0.4 μ l, 20nM 的引物 2 0.4 μ l, 无菌水 11.8 μ l, FastPfu 酶 0.4 μ l, 在 PCR 管中混合均匀; 将 PCR 管放入 PCR 仪中进行扩增循环, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 2min; 95 $^{\circ}$ C 20s, 55 $^{\circ}$ C 35s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min; 4 $^{\circ}$ C 30min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将 PCR 产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 PCR

扩增产物。

所述引物 1 的序列为：5'-CCCAAGCTTGACTGGCAGCAGCGCAAC-3'

所述引物 2 的序列为：5'-CGCGGATCCCCGTGATAGCGGCACATGTC-3'

(2) 编码山梨酮脱氢酶基因载体的构建：

取步骤(1)获得的 PCR 扩增产物溶液 8 μ l，与 1 μ l 10 $\times$ digest buffer，0.5 μ l HindIII 酶，0.5 μ l BamHI 酶混合均匀，在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行酶切反应 2 小时；反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳，将酶切产物条带切下，经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切 PCR 产物。取载体 pBBR1MCS 溶液 8 μ l，与 1 μ l 10 $\times$ digest buffer，0.5 μ l KpnI 酶，0.5 μ l HindIII 酶混合均匀，在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行酶切反应 2 小时；反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳，将酶切产物条带切下，经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切载体产物。取酶切 PCR 产物 5.5 μ l，酶切载体产物 3 μ l，10 $\times$ ligase buffer 1 μ l，DNA ligase 0.5 μ l，混合均匀，在 22 $^{\circ}$ C 条件下进行连接反应 30min。将连接产物用化学转化法转化入大肠杆菌 DH5 α 中，涂布于含抗生素的 LB 固体培养基上，在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 12h。培养后获得的单菌落在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 12h，用质粒小量提取试剂盒提取质粒，获得编码山梨酮脱氢酶基因载体。

(3) 编码山梨酮脱氢酶基因载体转化入氧化葡萄糖杆菌

将氧化葡萄糖杆菌涂布在固体培养基上，在 30 $^{\circ}$ C 条件下培养 48 小时；用 2ml 无菌水将菌体洗下，冰浴 10min，4 $^{\circ}$ C，4000rpm 离心 5min 后收集细胞，用预冷的无菌水洗一次，10%甘油洗两次后，100 μ l 10%甘油重悬细胞；与步骤(2)所得编码山梨酮脱氢酶基因载体的水溶液 10 μ l 混合均匀置于电转杯中，冰浴 5min，将电转杯

置于电转仪中 1800V 电击;电击产物与 900 μ l 种子培养基混合均匀,在 30℃, 140rpm 条件下培养 2 小时,将培养物涂布于固体培养基上,在 30℃条件下培养 4 天,获得的单菌落转入种子培养基中,在 30℃, 250rpm 条件下培养,获得含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌。

所述固体培养基为: L-山梨糖 20g, 玉米浆 3g, 牛肉膏 3g, 酵母浸粉 3g, 尿素 1g, 蛋白胨 10g, 琼脂 20g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 6.8, 121℃灭菌 20min。

所述种子培养基为: L-山梨糖 20g, 玉米浆 3g, 牛肉膏 3g, 酵母浸粉 3g, 尿素 1g, 蛋白胨 10g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 6.8, 121℃灭菌 20min。

(4) 混菌发酵

将步骤(3)获得的含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌接种到发酵培养基中,使含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的密度为 4×10^8 cfu/ml, 使巨大芽孢杆菌的密度为 4×10^8 cfu/ml, 在 30℃, 250rpm 条件下培养 120h, 获得 2-酮基-L-古龙酸。

所述发酵培养基为: 按比例称取 L-山梨糖 80g, 玉米浆 20g, 尿素 12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 7.0, 121℃灭菌 20min。

利用该方法能提高氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌混菌发酵转化 L-山梨糖生产 2-酮基-L-古龙酸的糖酸转化率。

本发明的第八个方面涉及检测谷胱甘肽提高氧化葡萄糖杆菌产 2-酮-L-古龙酸过程中细胞内蛋白质变化的方法, 包括如下步骤:

(1) 细胞内蛋白质的测定:

①细胞收集及淬灭:

取 3-5 份氧化葡萄糖杆菌以 8%~16% 的体积比分别接种到发酵培养基 A 中,另取 3-5 份所述氧化葡萄糖杆菌以 8%~16% 的体积比分别接种到发酵培养基 B 中,将两种接种后的培养基在 28℃~32℃,转速为 200~250rpm 的条件下培养发酵,在发酵过程中选取 1 h、15 h 为取样点取出发酵液样品,在 4℃ 下,以 4000~6000rpm 的转速离心,收集下层的细胞,并用 pH 为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液清洗,用液氮淬灭,终止代谢反应;用液氮研磨破碎细胞,获得 3-5 份从培养基 A 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞,3-5 份从培养基 A 中发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞,3-5 份从培养基 B 中发酵 1h 收集淬灭的破碎细胞,3-5 份从培养基 B 中发酵 15h 收集淬灭的破碎细胞;

所述发酵培养基 A 为: 80 g·L⁻¹ 山梨糖, 20 g·L⁻¹ 玉米浆, 1 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.2 g·L⁻¹ MgSO₄, 和 12 g·L⁻¹ 尿素, 余量为水;

所述发酵培养基 B 为: 80 g·L⁻¹ 山梨糖, 20 g·L⁻¹ 玉米浆, 1 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 0.2 g·L⁻¹ MgSO₄, and 12 g·L⁻¹ 尿素, 0.8~1.5mg·mL⁻¹ 的谷胱甘肽, 余量为水;

②提取细胞内蛋白:

取步骤①获得的破碎细胞,每份 100~200mg 分别置于离心管中,每管加入 0.5~2ml 细胞裂解液,混匀,冰上间歇超声破碎 20~50s;加入 5~15μL 的质量比为 2~4:1 的 DNase I /RNaseA 酶混合溶液,混匀,4℃ 静置反应 10~30min;加入 5~15μL 80~120mM 的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液,4℃ 静置 1~3h;15000rpm 离心 25~40min;取上清,得到蛋白溶液;所述细胞裂解液为: 8 mol·L⁻¹ 尿素,质量浓度为 4% 的(3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸), 40 mM 的 Tris,余量为水;

③蛋白浓度测定:

采用 Bradford 试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝 G-250 溶液中, 测定步骤②获得的各个蛋白溶液在 595nm 处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

④沉淀蛋白

分别取包含 50~150 μg 蛋白的步骤③获得的各个蛋白溶液, 加入 4~6 倍体积的 $-20^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$ 的丙酮, 沉淀 12~20h; 离心, 弃上清, 沉淀用 $-20^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$ 的体积浓度为 70%-85% 的丙酮水溶液洗涤; 冷冻干燥备用; -80°C 贮存;

⑤蛋白还原以及酶解

向步骤④所得的各个干燥蛋白中, 添加 10~40 μL 40~60mM 的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白;

加入 1~4 μL 三(2-羧乙基)膦, 在 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 反应 1h, 对各个蛋白进行还原化处理; 然后加入 1~2 μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应 10~15min, 终止还原反应;

向上述溶液中, 加浓度为 0.2~0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液 20~30 μL , 37°C 反应 12~18 小时, 进行蛋白酶解;

⑥蛋白标记

在每个经步骤⑤酶解的蛋白酶解液中分别加入一管用 60~80 μL 乙醇溶解的 iTRAQ 标记试剂, 室温反应 1h;

⑦溶液混合

将步骤溶液⑥获得的溶液混合得 3-5 份混合液, 使每个混合液中都包括从培养基 A 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基 A 中发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基 B 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白和从培养基 B 中

发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白；于-20℃保存；

⑧差异表达蛋白鉴定

将⑦中得到的混合液，进行 Q-Tof 质谱鉴定，得到蛋白谱，通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白；

(2) 主成分分析：

采用 matlab 对步骤(1)⑧中得到的数据进行标准化后，进行主成分分析，得到具有不同变化规律的数据类别，获得候选差异蛋白；

(3) 过程分析

将步骤(2)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表，观察并分析这些蛋白变化的规律，进而发现谷胱甘肽在提高氧化葡萄糖杆菌产 2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

利用该方法可以从揭示氧化葡萄糖杆菌受谷胱甘肽作用后细胞内蛋白变化规律，找到发酵过程中的重要蛋白，这些蛋白含量的变化规律为了解发酵过程的内在机理提供依据，从而为进一步优化发酵过程，提高维生素 C 产量，对氧化葡萄糖杆菌进行分子改造提供理论基础。同时也为工业混菌发酵过程的研究提供新的思路和方法。

本发明的第九个方面涉及寻找发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法，其特征是包括下述步骤：

(1) 对玉米浆的化学成分的测定：

① 样品的制备：

将 0.5-2g 均匀的发酶用原料玉米浆置于离心管中，离心收集上清；将获得的上清液用超纯水稀释 10-40 体积倍，取 10-40 μ L 置于另一离心管中，加入 30-50 μ L 的 0.040mg/mL 氘标记的琥珀酸甲醇

溶液为内标；冷冻干燥后，加入 50-100 μ L 浓度为 20mg/mL 的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于 30 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C 水浴中脗化反应 60-120min；再加入 60-100 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于 35 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C 水浴进行硅烷化反应 20-50min；

②气相色谱-飞行时间质谱联用仪测定方法：

将 1 μ L 步骤①获得的样品进到气相色谱中，色谱柱为 DB-5MS，所述色谱柱的规格为 30 m $\times$ 0.25 mm i.d.，进样口温度 250 $^{\circ}$ C-280 $^{\circ}$ C，载气为高纯氦气，流速 0.6-0.8ml/min，分流比 30: 1-10: 1，柱温箱升温程序为：初始 50 $^{\circ}$ C-80 $^{\circ}$ C 保持 2-5min，以 4 $^{\circ}$ C/min-8 $^{\circ}$ C/min 的速度升到 250 $^{\circ}$ C-300 $^{\circ}$ C，保持 8-10min，使用 EI 电离源，源温 230 $^{\circ}$ C-280 $^{\circ}$ C，检测器电压 2300V-2700V，电离电压 60eV-80eV，电流 30 μ A-50 μ A；质谱检测范围 50-800m/z；成分的鉴定使用 NIST 数据库，质谱数据的处理和成分相对含量的测定使用 Masslynx 4.1 软件；并通过对色谱峰面积积分处理，并与内标物的峰面积对照，得到发酵用原料玉米浆中化学成分的相对含量；

(2) 偏最小二乘判别分析法

①将方法(1)获得的数据进行标准化和预处理；

②用 SIMCA-P 11.5 软件对预处理后的数据进行偏最小二乘法判别分析，得到用于表达样本相似性和差异性的得分图、载荷图和 VIP 图；在得分图中，样品点相互之间距离越近，说明样本的相似度越大，距离越远，说明样本差异越大，可用来寻找不同批次玉米浆中各物质的相似和差异；在载荷图中，每个点表示每个物质，距离中心点距离越远的物质，其不同批次的含量差异越大，便可作为玉米浆的质量控制指标；VIP 表示每个物质对区分样本的贡献大小，VIP>1 可以认为是对玉米浆质量影响最为显著的指标。

该方法采用高通量高分辨率的检测技术，可以同时测得玉米浆

中的多种化学成分，方法简便，经过多批原料验证，重复性好。该方法分辨率和灵敏度高，具有良好的重现性和稳定性，采用的偏最小二乘判别分析法可以迅速有效地从高通量数据中筛选到区别不同批次原料的化学物质，发现玉米浆中九种化学物质葡萄糖、乳酸、脯氨酸、磷酸、半乳糖、丙氨酸、果糖、5-酮脯氨酸、甘氨酸可以考虑作为玉米浆的质量控制指标，是对现行玉米浆质量检查的一个补充。

附图说明

图 1 为根据本发明的第一个方面的传代过程中 2-酮基-L-古龙酸转化率变化。图例：◆：2-酮基-L-古龙酸转化率。

图 2 为根据本发明的第一个方面的传代 50 天后菌种发酵结果。

图 3 为根据本发明的第二个方面的传代 100 天后菌种交叉搭配发酵结果。

图 4 为根据本发明的第二个方面的传代 150 天后菌种交叉搭配发酵结果。

图 5 为根据本发明的第三个方面的传代培养 0、50、100、150 代的氧化葡萄糖杆菌蛋白聚类分析；

图 6 为根据本发明的第三个方面的传代培养 0、50、100、150 代的氧化葡萄糖杆菌细胞内山梨糖/山梨酮脱氢酶相对表达量；

图 7 为根据本发明的第三个方面的传代培养 0、50、100、150 代的巨大芽孢杆菌蛋白聚类分析；

图 8 为根据本发明的第三个方面的传代培养 0、50、100、150 代的巨大芽孢杆菌聚类分析中类别 2。

图 9 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌的磷脂含量变化；

图 10 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌的主成分分析得分图（图 10-1）和荷载图（图 10-2）；

图 11 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌的磷脂分子标志物含量变化；

图 12 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌的磷脂含量变化；

图 13 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌的主成分分析得分图（图 13-1）和荷载图（图 13-2）；

图 14 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌的磷脂分子标志物含量变化；

图 15 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的混菌的磷脂含量变化；

图 16 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的混菌的主成分分析得分图（图 16-1）和荷载图（图 16-2）；

图 17 为根据本发明的第四个方面的不同传代时间的混菌的磷脂分子标志物含量变化。

图 18 为根据本发明的第五个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌营养环境的主成分分析得分图（图 18-1）和载荷图（图 18-2）；

图 19 为根据本发明的第五个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌传代培养过程中营养环境标志物的变化图；

图 20 为根据本发明的第五个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌营养环境物质的主成分分析得分图（图 20-1）和载荷图（图 20-2）；

图 21 为根据本发明的第五个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌传代培养过程中营养环境标志物的变化图；

图 22 为根据本发明的第五个方面的不同传代时间的混菌营养

环境物质的主成分分析得分图（图 22-1）和载荷图（图 22-2）；

图 23 为根据本发明的第五个方面的不同传代时间的混菌传代培养过程中营养环境中差异物质的变化图；

图 24 为根据本发明的第六个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌小分子代谢物的主成分分析得分图（图 24-1）和载荷图（图 24-2）；

图 25 为根据本发明的第六个方面的不同传代时间的氧化葡萄糖杆菌传代培养过程中小分子代谢物标志物的含量变化；

图 26 为根据本发明的第六个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌小分子代谢物的主成分分析得分图（图 26-1）和载荷图（图 26-2）；

图 27 为根据本发明的第六个方面的不同传代时间的巨大芽孢杆菌传代培养过程中小分子代谢物标志物的含量变化；

图 28 为根据本发明的第六个方面的不同传代时间的混菌小分子代谢物的主成分分析得分图（图 28-1）和载荷图（图 28-2）；

图 29 为根据本发明的第六个方面的不同传代时间的混菌传代培养过程中小分子代谢物标志物的含量变化；

图 30 为根据本发明的第七个方面的含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌混菌发酵结果；

图 31 为根据本发明的第八个方面的对四组样品蛋白(混合溶液)数据进行主成分分析：A、得分图：“▲”表示来自培养基 B 1h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品，“○”表示来自培养基 A 15h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品，“■”表示来自培养基 B 15h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品； B、物质载荷图

图 32 为根据本发明的第八个方面的硫胺素转运蛋白及以其为辅酶的重要酶表达情况：GSH-1h/KV-1h，表示来自培养基 B 1h 的

样品/来自培养基 A 1h 的样品; KV-15h/KV-1h, 表示来自培养基 A 15h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品, GSH-15h/KV-1h, 表示来自培养基 B 15h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品;

图 33 为根据本发明的第八个方面的三羧酸循环、磷酸戊糖途径中的关键酶表达情况: GSH-1h/KV-1h, 表示来自培养基 B 1h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品; KV-15h/KV-1h, 表示来自培养基 A 15h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品, GSH-15h/KV-1h, 表示来自培养基 B 15h 的样品/来自培养基 A 1h 的样品;

图 34 为根据本发明的第九个方面的不同批次玉米浆的偏最小二乘法判别分析得分图, 图 34-1 为不同批次玉米浆主成分分析 t[1]-t[2]图; 图 34-2 为不同批次玉米浆主成分分析 t[1]-u[1]图;

图 35 为根据本发明的第九个方面的不同批次玉米浆的偏最小二乘判别分析载荷图, 图 35-1 为不同批次玉米浆 $w^*c[1]$ - $w^*c[2]$ 散点图; 图 35-2 为不同批次玉米浆第一主成分的 p-p(corr) S 图;

图 36 为根据本发明的第九个方面的不同批次玉米浆的偏最小二乘判别分析 VIP 图 (VIP.>1)。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解, 下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例1-1

一种混菌进化传代培养提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法, 包括如下步骤:

(1) 固体培养:

固体培养基的制备为: 按比例称取L-山梨糖20g, 玉米浆3g, 牛肉膏3g, 酵母浸粉3g, 尿素1g, 蛋白胨10g, 琼脂20g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g加水至1L, 调pH为6.8, 121℃灭菌20min, 制成固体培养基;

将存于液氮的150 μL 保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和150 μL 保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 30℃, 培养48小时;

(2) 种子培养:

种子培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖20g, 玉米浆3g, 牛肉膏3g, 酵母浸粉3g, 尿素1g, 蛋白胨10g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g加水至1L, 调pH为6.8, 121℃灭菌20min, 制成种子培养基;

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在30℃, 250 r/min摇床振荡培养, 48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml, 在30℃, 250 r/min摇床振荡培养, 以24h为传代周期, 以体积比为4%为传代比接入新的种子培养基中, 传代50天;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 30℃, 培养48小时; 再分别转入种子培养基, 在30℃, 250 r/min摇床振荡培养48h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

发酵培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖80g, 玉米浆20g, 尿素12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5 g, CaCO_3 1g, 加水至1L, 调pH 为7.0, 121℃灭菌20min, 制成发酵培养基;

(4) 发酵:

将原始的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中, 使原始的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml, 在30℃, 250 r/min摇床振荡培养96h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

2-酮基-L-古龙酸和L-山梨糖含量测定:

采用高效液相色谱法(HPLC)。

样品制备: 取发酵培养不同时间的发酵液1mL于1.5mL离心管中, 10000r/min转速离心3min, 取上清100 μ L于1.5mL离心管中, 并加入900 μ L流动相(5mM H_2SO_4)得到稀释十倍的样品。振荡混匀后, 用0.22 μ m的纤维素微孔滤膜过滤样品, 得到待测样品。

高效液相色谱条件: 色谱柱: bio-rad HPX-87H, 流动相: 5mM H_2SO_4 , 流速: 0.6mL/min, 柱温: 65℃, 示差检测器。

检测结果见图2。

图例: ◇: 原始氧化葡萄糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配; △: 传代50天氧化葡萄糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配。

原始氧化葡萄糖杆菌与原始巨大芽孢杆菌利用实施例1-1步骤(4)的发酵条件进行搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到78%;

传代培养50天的氧化葡萄糖杆菌与原始巨大芽孢杆菌搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到88.2%, 有了10.2%的提高。

实施例1-2

一种混菌进化传代培养提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法,包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取存于液氮的10 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和10 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C, 培养24小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基, 在35 $^{\circ}$ C, 200 r/min摇床振荡培养24h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml, 在35 $^{\circ}$ C, 200r/min摇床振荡培养, 以24h为传代周期, 以体积比为2%为传代比接入新的种子培养基中, 传代60天;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C培养24小时; 再分别转入种子培养基, 在35 $^{\circ}$ C, 200 r/min摇床振荡培养24h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将原始的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡糖杆菌接种到发酵培养基中, 使原始的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml, 在35 $^{\circ}$ C, 200 r/min摇床振荡培养96h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

本实施例所用的培养基:

固体培养基的制备为：按比例称取L-山梨糖10g，玉米浆10g，牛肉膏5g，酵母浸粉2g，尿素5g，蛋白胨5g，琼脂10g， KH_2PO_4 5g， MgSO_4 0.5g， CaCO_3 0.5g，加水至1L，调pH为6.5，121℃灭菌20min，制成固体培养基。

种子培养基制备为：按比例称取L-山梨糖10g，玉米浆10g，牛肉膏8g，酵母浸粉2g，尿素5g，蛋白胨2g， KH_2PO_4 5g， MgSO_4 0.5g， CaCO_3 0.5g，加水至1L，调pH为6.5，121℃灭菌20min，制成种子培养基。

发酵培养基制备为：按比例称取L-山梨糖40g，玉米浆50g，尿素20g， KH_2PO_4 0.5g， MgSO_4 1.2g， CaCO_3 2g加水至1L，调pH为6.5，121℃灭菌20min，制成发酵培养基。

实施例1-3

一种混菌进化传代培养提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法，包括如下步骤：

(1) 固体培养：

取存于液氮的200 μL 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌（*Gluconobacter oxydans*）和200 μL 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）分别接种于固体培养基上，30℃，培养36小时；

(2) 种子培养：

将经步骤（1）培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在30℃，240 r/min摇床振荡培养36h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml，在30℃，240 r/min摇床振荡培养，以36h为传代周

期，以体积比为1%为传代比接入新的种子培养基中，传代70天；

(3) 分纯：

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯，再分别接种于固体培养基上，30℃培养36小时；再分别转入种子培养基，在30℃，240 r/min摇床振荡培养36h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；

(4) 发酵：

将原始的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使原始的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml，在30℃，240 r/min摇床振荡培养96h，获得2-酮基-L-古龙酸。

本实施例所用的各个培养基：

固体培养基的制备为：按比例称取L-山梨糖30g，玉米浆2g，牛肉膏10g，酵母浸粉5g，尿素0.5g，蛋白胨12g，琼脂30g， KH_2PO_4 0.5g， MgSO_4 0.7g， CaCO_3 3g，加水至1L，调pH为6.8，121℃灭菌20min，制成固体培养基。

种子培养基制备为：按比例称取L-山梨糖30g，玉米浆2g，牛肉膏10g，酵母浸粉8g，尿素0.5g，蛋白胨8g， KH_2PO_4 0.5g， MgSO_4 0.7g， CaCO_3 3g，加水至1L，调pH为6.8，121℃灭菌20min，制成种子培养基。

发酵培养基制备为：按比例称取L-山梨糖80g，玉米浆10g，尿素25g， KH_2PO_4 1g， MgSO_4 0.2g， CaCO_3 5g加水至1L，调pH为6.8，121℃灭菌20min，制成发酵培养基。

实施例1-4

一种混菌进化传代培养提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法，包括如下步骤：

(1) 固体培养:

取存于液氮的500 μ L保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和500 μ L保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C, 培养48小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/ml, 使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养, 以48h为传代周期, 以体积比为10%为传代比接入新的种子培养基中, 传代80天;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C培养48小时; 再分别转入种子培养基, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养48h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将原始的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡糖杆菌接种到发酵培养基中, 使原始的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/ml, 使进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养72h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

本实施例所用的各个培养基:

固体培养基的制备为: 按比例称取L-山梨糖50g, 玉米浆5g, 牛肉膏2g, 酵母浸粉10g, 尿素3g, 蛋白胨2g, 琼脂50g, KH_2PO_4 3g,

MgSO₄0.1g, CaCO₃5g, 加水至1L, 调pH为7.0, 121℃灭菌20min, 制成固体培养基。

种子培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖50g, 玉米浆8g, 牛肉膏2g, 酵母浸粉10g, 尿素3g, 蛋白胨12g, KH₂PO₄3g, MgSO₄0.1g, CaCO₃0.5-5g, 加水至1L, 调pH为7.0, 121℃灭菌20min, 制成种子培养基。

发酵培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖120g, 玉米浆30g, 尿素10g, KH₂PO₄3g, MgSO₄0.5g, CaCO₃0.5g加水至1L, 调pH 为7.5, 121℃灭菌20min, 制成发酵培养基。

实施例2-1

一种强化两菌相互作用提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法, 包括如下步骤:

(1) 固体培养:

固体培养基的制备为: 按比例称取L-山梨糖20g, 玉米浆3g, 牛肉膏3g, 酵母浸粉3g, 尿素1g, 蛋白胨10g, 琼脂20g, KH₂PO₄1g, MgSO₄0.2 g, CaCO₃1 g加水至1L, 调pH为6.8, 121℃灭菌20min, 制成固体培养基;

将存于液氮的150μL保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和150μL保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 30℃, 培养48小时;

(2) 种子培养:

种子培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖20g, 玉米浆3g, 牛肉膏3g, 酵母浸粉3g, 尿素1g, 蛋白胨10g, KH₂PO₄1g, MgSO₄0.2 g, CaCO₃1 g加水至1L, 调pH为6.8, 121℃灭菌20min, 制成种子

培养基;

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基,在30℃,250 r/min摇床振荡培养,48h,得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml,使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml,在30℃,250 r/min摇床振荡培养,以24h为传代周期,以体积比为4%为传代比接入新的种子培养基中,传代100天;

(3)分纯:

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯,再分别接种于固体培养基上,30℃,培养48小时;再分别转入种子培养基,在30℃,250 r/min摇床振荡培养48h,得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;

(4)发酵:

发酵培养基制备为:按比例称取L-山梨糖80g,玉米浆20g,尿素12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5 g, CaCO_3 1g,加水至1L,调pH 为7.0,121℃灭菌20min,制成发酵培养基;

将进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中,使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml,使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml,在30℃,250 r/min摇床振荡培养96h,获得2-酮基-L-古龙酸。

实施例2-2

一种强化两菌相互作用提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法,包括如下步骤:

步骤(1)、(2)和(3)同实施例2-1

(4)发酵:

将原始的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使原始的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml，在30℃，250 r/min摇床振荡培养96h，获得2-酮基-L-古龙酸。

2-酮基-L-古龙酸和L-山梨糖含量测定：

采用高效液相色谱法（HPLC）。

样品制备：取发酵培养不同时间的发酵液1mL于1.5mL离心管中，10000r/min转速离心3min，取上清100μL于1.5mL离心管中，并加入900μL流动相（5mM H₂SO₄）得到稀释十倍的样品。振荡混匀后，用0.22μm的纤维素微孔滤膜过滤样品，得到待测样品。

高效液相色谱条件：色谱柱：bio-rad HPX-87H，流动相：5mM H₂SO₄，流速：0.6mL/min，柱温：65℃，示差检测器。

实施例2-1、2-2检测结果见图3。

图例：◇：原始氧化葡萄糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配；

□：传代100天氧化葡萄糖杆菌和传代100天巨大芽孢杆菌搭配；

△：传代100天氧化葡萄糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配；

原始氧化葡萄糖杆菌与原始巨大芽孢杆菌利用实施例2-1步骤（4）的发酵条件进行搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到78%；用实施例2-1的方法传代培养100天的进化了的氧化葡萄糖杆菌和传代培养100天的进化了的巨大芽孢杆菌搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到91%-92%，它比原始氧化葡萄糖杆菌与原始巨大芽孢杆菌搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率提高了13%-14%；

传代培养100天的氧化葡萄糖杆菌与原始巨大芽孢杆菌搭配的混菌发酵（实施例2-2）发酵周期和2-酮基-L-古龙酸转化率与传代培养100天的氧化葡萄糖杆菌和传代培养100天的巨大芽孢杆菌混菌发酵相似。

实施例2-3

一种强化两菌相互作用提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法,包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取存于液氮的10 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和10 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C, 培养24小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基, 在35 $^{\circ}$ C, 200 r/min摇床振荡培养24h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml, 在35 $^{\circ}$ C, 200r/min摇床振荡培养, 以24h为传代周期, 以体积比为2%为传代比接入新的种子培养基中, 传代150天;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 35 $^{\circ}$ C培养24小时; 再分别转入种子培养基, 在35 $^{\circ}$ C, 200 r/min摇床振荡培养24h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将所述进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡糖杆菌接种到发酵培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml, 在35 $^{\circ}$ C, 200r/min摇床振荡培养96h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

本实施例所用的培养基:

固体培养基的制备为: 按比例称取L-山梨糖10g, 玉米浆10g, 牛肉膏5g, 酵母浸粉2g, 尿素5g, 蛋白胨5g, 琼脂10g, KH_2PO_4 5g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 0.5g, 加水至1L, 调pH为6.5, 121℃灭菌20min, 制成固体培养基。

种子培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖10g, 玉米浆10g, 牛肉膏8g, 酵母浸粉2g, 尿素5g, 蛋白胨2g, KH_2PO_4 5g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 0.5g, 加水至1L, 调pH为6.5, 121℃灭菌20min, 制成种子培养基。

发酵培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖40g, 玉米浆50g, 尿素20g, KH_2PO_4 0.5g, MgSO_4 1.2g, CaCO_3 2g加水至1L, 调pH 为6.5, 121℃灭菌20min, 制成发酵培养基。

实施例2-4

一种强化两菌相互作用提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法, 包括如下步骤:

步骤(1)、(2)和(3)同实施例2-3

(4) 发酵:

将原始的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡糖杆菌接种到发酵培养基中, 使原始的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 cfu/ml, 使进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^9 cfu/ml, 在35℃, 200 r/min摇床振荡培养96h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

各个培养基同实施例2-2。

实施例2-3、2-4检测结果见图4。

图例: ◇: 原始氧化葡糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配; □: 传代150天氧化葡糖杆菌和传代150天巨大芽孢杆菌搭配; Δ: 传代150天氧化葡糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配; ○: 原始氧化葡糖杆

菌和传代150天巨大芽孢杆菌搭配。

原始氧化葡萄糖杆菌与原始巨大芽孢杆菌利用实施例2-3步骤(4)的发酵条件进行搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到78%；用实施例2-3的方法传代培养150天的进化了的氧化葡萄糖杆菌和传代培养150天的进化了的巨大芽孢杆菌混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率在发酵末期达到95%，比原始氧化葡萄糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率混菌提高了17%，发酵周期较原始混菌的发酵周期缩短了9%；传代培养150天的氧化葡萄糖杆菌和原始巨大芽孢杆菌搭配的混菌体系发酵过程（实施例2-4）的2-酮基-L-古龙酸转化率比原始混菌提高了16%，发酵周期与传代培养150天的混菌相似。

实施例2-5

一种强化两菌相互作用提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法，包括如下步骤：

(1) 固体培养：

取存于液氮的200 μ L保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌（*Gluconobacter oxydans*）和200 μ L保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）分别接种于固体培养基上，30℃，培养36小时；

(2) 种子培养：

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在30℃，240 r/min摇床振荡培养36h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml，在30℃，240 r/min摇床振荡培养，以36h为传代周

期，以体积比为1%为传代比接入新的种子培养基中，传代200天；

(3) 分纯：

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯，再分别接种于固体培养基上，30℃培养36小时；再分别转入种子培养基，在30℃，240 r/min摇床振荡培养36h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；

(4) 发酵：

将所述进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml，在30℃，240 r/min摇床振荡培养96h，获得2-酮基-L-古龙酸。

本实施例所用的各个培养基：

固体培养基的制备为：按比例称取L-山梨糖30g，玉米浆2g，牛肉膏10g，酵母浸粉5g，尿素0.5g，蛋白胨12g，琼脂30g， KH_2PO_4 0.5g， MgSO_4 0.7g， CaCO_3 3g，加水至1L，调pH为6.8，121℃灭菌20min，制成固体培养基。

种子培养基制备为：按比例称取L-山梨糖30g，玉米浆2g，牛肉膏10g，酵母浸粉8g，尿素0.5g，蛋白胨8g， KH_2PO_4 0.5g， MgSO_4 0.7g， CaCO_3 3g，加水至1L，调pH为6.8，121℃灭菌20min，制成种子培养基。

发酵培养基制备为：按比例称取L-山梨糖80g，玉米浆10g，尿素25g， KH_2PO_4 1g， MgSO_4 0.2g， CaCO_3 5g加水至1L，调pH为6.8，121℃灭菌20min，制成发酵培养基。

实施例2-6

一种强化两菌相互作用提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法，包括如下步骤：

(1) 固体培养:

取存于液氮的500 μ L保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和500 μ L保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C, 培养48小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/ml, 使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养, 以48h为传代周期, 以体积比为10%为传代比接入新的种子培养基中, 传代180天;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C培养48小时; 再分别转入种子培养基, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养48h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将所述进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡糖杆菌接种到发酵培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/ml, 使进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/ml, 在28 $^{\circ}$ C, 280 r/min摇床振荡培养72h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

本实施例所用的各个培养基:

固体培养基的制备为: 按比例称取L-山梨糖50g, 玉米浆5g, 牛肉膏2g, 酵母浸粉10g, 尿素3g, 蛋白胨2g, 琼脂50g, KH_2PO_4 3g,

MgSO₄0.1g, CaCO₃5g, 加水至1L, 调pH为7.0, 121℃灭菌20min, 制成固体培养基。

种子培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖50g, 玉米浆8g, 牛肉膏2g, 酵母浸粉10g, 尿素3g, 蛋白胨12g, KH₂PO₄3g, MgSO₄0.1g, CaCO₃0.5-5g, 加水至1L, 调pH为7.0, 121℃灭菌20min, 制成种子培养基。

发酵培养基制备为: 按比例称取L-山梨糖120g, 玉米浆30g, 尿素10g, KH₂PO₄3g, MgSO₄0.5g, CaCO₃0.5g加水至1L, 调pH 为7.5, 121℃灭菌20min, 制成发酵培养基。

实施例3-1

一种检测维生素C工业混菌传代不同代数蛋白质变化的方法, 包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的20μL保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和20μL保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28℃, 培养24小时;

② 种子培养:

将经步骤(1) ①培养的巨大大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在28℃, 200r/min摇床振荡培养24h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 CFU/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL, 在28℃, 200 r/min摇床振荡培养, 以24h为传代周

期，以体积比为1%为传代比接入新的种子培养基中，传代150天，选定4个取样时间取4个样，分别为0天、50天、100天、150天；

③分纯：

将步骤（1）②获得的4个样的混菌细胞划线分纯，再分别接种于固体培养基上，28℃培养24 h；再分别转入种子培养基，在28℃，200 rpm摇床振荡培养24 h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中；

④不同进化时期巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌培养：

将步骤（1）③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到种子培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 CFU/mL，进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL，在28℃，200 r/min摇床振荡培养10h；

（2）细胞内蛋白质的测定：

①细胞收集及淬灭：

分别将步骤（1）④获得的巨大芽孢杆菌培养物和氧化葡萄糖杆菌培养物，在4℃下，以4000rpm的转速离心，收集下层的细胞，并用pH为7.2的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞；

②提取细胞内蛋白：

取所述破碎细胞，每份80mg 分别置于离心管中，每管加入0.5mL细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎20s；加入5μL 质量比为2:1的DNase I /RNaseA酶混合溶液，混匀，4℃静置反应10min；加入5μL 80mM的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置1h；15000rpm离心25min；取上清，得到蛋白溶液；

所述细胞裂解液为： $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素，质量浓度为4% 的3-[(3

- 胆酰胺丙基) - 二乙胺]-丙磺酸, 40 mM 的Tris,余量为水;

③蛋白浓度测定:

采用Bradford试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝G-250溶液中, 测定步骤(2)②获得的各个蛋白溶液在595nm处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

④沉淀蛋白

分别取含50 μg 蛋白的步骤(2)②获得的各个蛋白溶液, 每份加入4倍体积的 -20°C 的丙酮, 在 -20°C 的条件下放置12h; 离心, 弃上清, 沉淀用 -20°C 的体积浓度为70%的丙酮水溶液洗涤; 干燥得到蛋白干粉;

⑤蛋白还原以及酶解

分别向各个蛋白干粉中, 添加20 μL 40mM的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白; 再加入1 μL 三(2-羧乙基)膦, 在 50°C 还原反应1h, 再加入1 μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应10min, 终止还原反应; 再加入20 μL 浓度为0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液, 37°C 蛋白酶解12小时, 得酶解液;

⑥蛋白标记

向步骤(2)⑤获得的各个酶解液中分别加入一管用60 μL 乙醇溶解的iTRAQ标记试剂, 室温反应1h;

⑦溶液混合

将步骤(2)⑥标记后的各个来自巨大芽孢杆菌的蛋白溶液混合; 将步骤(2)⑥标记后的各个来自氧化葡萄糖杆菌的蛋白溶液混合; 于 -40°C 保存;

⑧差异表达蛋白鉴定

将(2)⑦中得到的两组混合液, 进行Q-Tof质谱鉴定, 得到蛋白谱, 通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白;

(3) 聚类分析:

采用Expander4.0对步骤(2)⑧中得到的数据进行标准化后,进行K-means聚类,得到具有不同变化规律的数据类别,获得候选差异蛋白;

(4) 过程分析

将步骤(3)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表,观察并分析这些蛋白变化的规律,进而发现混菌进化培养在提高氧化葡萄糖杆菌产2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

在混菌传代培养过程,氧化葡萄糖杆菌产生了多种进化方向,表现为细胞内蛋白在不同代数呈现不同表达规律,见图5。通过聚类分析,发现它们的表达量变化可以分为6类,其中,类别1、类别3以及类别5表现为各代蛋白表达变化不大;类别2与类别4表现为进化后蛋白表达有不同程度提高,其中包括负责转化山梨糖为2-酮-L-古龙酸的山梨糖/山梨酮脱氢酶。此酶在各代的表达情况如图6所示,在50代有轻微的表达下调,在100代和150代有逐渐提高的表达量。此现象的原因,可能为50代时,混菌之间发生剧烈的相互作用,进行适应性选择,随着相互配合作用的增强,氧化葡萄糖杆菌越来越适应混菌环境,具有了更强的生产能力。

同时,对不同传代时期的巨大芽孢杆菌进行聚类分析,结果如图7所示。类别1中131种蛋白表达量无明显变化;类别2中9种蛋白表达量随着传代数增加呈现上调趋势;类别3中88种蛋白表达量随着传代数增加有微弱上调趋势;类别4中25种蛋白在50代有轻度下调,而后在100代、150代轻度上调。此四类中,变化最明显的为类别2,具体蛋白表达情况,如图8所示。在类别2的9个蛋白中,4个与immune inhibitor A(immune inhibitor A; immune inhibitor A metalloprotease; immune inhibitor A precursor; peptide M6

immune inhibitor A)有关, 一个与寡肽转运有关(oligopeptide binding protein oppA), 此外还有抵抗活性氧的过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, Mn)。Immune inhibitor A为芽孢杆菌中降解抗菌肽的蛋白, 对芽孢杆菌抵抗外部免疫系统有重要作用, 此外, 它还是芽孢杆菌孢外壁的重要组成部分。其表达量随传代培养代数增加, 呈现上调, 表明巨大芽孢杆菌芽孢的抗逆性有了提高。同时, 转运寡肽能力也有所提高, 利于自身的生长需要。

综上所述, 混菌传代培养对氧化葡萄糖杆菌以及巨大芽孢杆菌均产生了利于双方生长的影响, 表现为氧化葡萄糖杆菌生产能力的提高, 以及巨大芽孢杆菌抗逆性的提高。这一发现, 为后续对氧化葡萄糖杆菌进行基因改造提供了依据, 也为工业混菌过程研究及控制提供了基础。

实施例3-2

一种检测维生素C工业混菌传代不同代数蛋白质变化的方法, 包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的10 μ L保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和10 μ L保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C, 培养36小时;

② 种子培养:

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在30 $^{\circ}$ C, 250 r/min摇床振荡培养36h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使

巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 CFU/mL，在30℃，250r/min摇床振荡培养，以36h为传代周期，以体积比为5%为传代比接入新的种子培养基中，传代100天，选定3个取样时间取3个样，分别为0天、50天、100天；

③分纯：

将步骤（1）②获得的3个样的混菌细胞划线分纯，再分别接种于固体培养基上，30℃培养36h；再分别转入种子培养基，在30℃，250 rpm摇床振荡培养36 h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中；

④不同进化时期巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌培养：

将步骤（1）③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到种子培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL，进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 CFU/mL，在30℃，250 r/min摇床振荡培养12h；

（2）细胞内蛋白质的测定：

①细胞收集及淬灭：

分别将步骤（1）④获得的巨大芽孢杆菌培养物和氧化葡萄糖杆菌培养物，在4℃下，以5000rpm的转速离心，收集下层的细胞，并用pH为7.3的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞；

②提取细胞内蛋白：

取所述破碎细胞，每份90mg 分别置于离心管中，每管加入0.8mL细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎40s；加入10μL 质量比为3:1的DNase I /RNaseA酶混合溶液，混匀，4℃静置反应20min；加入10μL 100mM的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置2h；

15000rpm离心30min; 取上清, 得到蛋白溶液;

所述细胞裂解液为: $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 质量浓度为4% 的3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸, 40 mM 的Tris, 余量为水;

③蛋白浓度测定:

采用Bradford试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝G-250溶液中, 测定步骤(2)②获得的各个蛋白溶液在595nm处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

④沉淀蛋白

分别取含80 μg 蛋白的步骤(2)②获得的各个蛋白溶液, 每份加入5倍体积的 -40°C 的丙酮, 在 -40°C 的条件下放置15h; 离心, 弃上清, 沉淀用 -40°C 的体积浓度为80%的丙酮水溶液洗涤; 干燥得到蛋白干粉;

⑤蛋白还原以及酶解

分别向各个蛋白干粉中, 添加20 μL 50mM的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白; 再加入2 μL 三(2-羧乙基)膦, 在 55°C 还原反应1.2h, 再加入1 μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应10min, 终止还原反应; 再加入25 μL 浓度为0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液, 37°C 蛋白酶解16小时, 得酶解液;

⑥蛋白标记

向步骤(2)⑤获得的各个酶解液中分别加入一管用70 μL 乙醇溶解的iTRAQ标记试剂, 室温反应1.2h;

⑦溶液混合

将步骤(2)⑥标记后的各个来自巨大芽孢杆菌的蛋白溶液混合; 将步骤(2)⑥标记后的各个来自氧化葡萄糖杆菌的蛋白溶液混合; 于 -40°C 保存;

⑧差异表达蛋白鉴定

将(2)⑦中得到的两组混合液,进行Q-Tof质谱鉴定,得到蛋白谱,通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白;

(3) 聚类分析:

采用Expander4.0对步骤(2)⑧中得到的数据进行标准化后,进行K-means聚类,得到具有不同变化规律的数据类别,获得候选差异蛋白;

(4) 过程分析

将步骤(3)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表,观察并分析这些蛋白变化的规律,进而发现混菌进化培养在提高氧化葡萄糖杆菌产2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

实施例3-3

一种检测维生素C工业混菌传代不同代数蛋白质变化的方法,包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的200 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和200 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上,35 $^{\circ}$ C,培养48小时;

② 种子培养:

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基,在35 $^{\circ}$ C,280 r/min摇床振荡培养48h,得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL,使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} CFU/mL,在35 $^{\circ}$ C,280 r/min摇床振荡培养,以48h为传代

周期，以体积比为10%为传代比接入新的种子培养基中，传代150天，选定4个取样时间取4个样，分别为0天、50天、100天、150天；

③分纯：

将步骤（1）②获得的4个样的混菌细胞划线分纯，再分别接种于固体培养基上，35℃培养48 h；再分别转入种子培养基，在35℃，280 rpm摇床振荡培养48 h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中；

④不同进化时期巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌培养：

将步骤（1）③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到种子培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL，进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} CFU/mL，在35℃，280 r/min摇床振荡培养15h；

（2）细胞内蛋白质的测定：

①细胞收集及淬灭：

分别将步骤（1）④获得的巨大芽孢杆菌培养物和氧化葡萄糖杆菌培养物，在4℃下，以6000rpm的转速离心，收集下层的细胞，并用pH为7.4的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞；

②提取细胞内蛋白：

取所述破碎细胞，每份100mg 分别置于离心管中，每管加入1mL细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎50s；加入15μL 质量比为4:1的DNase I /RNaseA酶混合溶液，混匀，4℃静置反应30min；加入15μL 120mM的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置3h；15000rpm离心40min；取上清，得到蛋白溶液；

所述细胞裂解液为： $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素，质量浓度为4% 的3-[(3

- 胆酰胺丙基) - 二乙胺]-丙磺酸, 40 mM 的Tris,余量为水;

③蛋白浓度测定:

采用Bradford试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝G-250溶液中, 测定步骤(2)②获得的各个蛋白溶液在595nm处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

④沉淀蛋白

分别取含100 μg 蛋白的步骤(2)②获得的各个蛋白溶液, 每份加入6倍体积的-40℃的丙酮, 在-40℃的条件下放置20h; 离心, 弃上清, 沉淀用-40℃的体积浓度为85%的丙酮水溶液洗涤; 干燥得到蛋白干粉;

⑤蛋白还原以及酶解

分别向各个蛋白干粉中, 添加40 μL 60mM的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白; 再加入4 μL 三(2-羧乙基)膦, 在60℃还原反应1.5h, 再加入2 μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应15min, 终止还原反应; 再加入30 μL 浓度为0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液, 37℃蛋白酶解18小时, 得酶解液;

⑥蛋白标记

向步骤(2)⑤获得的各个酶解液中分别加入一管用80 μL 乙醇溶解的iTRAQ标记试剂, 室温反应1.5h;

⑦溶液混合

将步骤(2)⑥标记后的各个来自巨大芽孢杆菌的蛋白溶液混合; 将步骤(2)⑥标记后的各个来自氧化葡萄糖杆菌的蛋白溶液混合; 于-40℃保存;

⑧差异表达蛋白鉴定

将(2)⑦中得到的两组混合液, 进行Q-Tof质谱鉴定, 得到蛋白谱, 通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白;

(3) 聚类分析:

采用Expander4.0对步骤(2)⑧中得到的数据进行标准化后,进行K-means聚类,得到具有不同变化规律的数据类别,获得候选差异蛋白;

(4) 过程分析

将步骤(3)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表,观察并分析这些蛋白变化的规律,进而发现混菌进化培养在提高氧化葡萄糖杆菌产2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

实验证明,实施例3-2和实施例3-3与实施例3-1的结果类似。

本发明所采用的固体培养基、种子培养基的组成选自中国专利申请号为201110314740.9公开的培养基,例如:

固体培养基:按比例称取L-山梨糖20 g,玉米浆3 g,牛肉膏3 g,酵母浸粉3 g,尿素1 g,蛋白胨10 g,琼脂20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g,加水至1 L,调pH=6.8, 121°C灭菌20 min,制成固体培养基。

种子培养基:按比例称取L-山梨糖20 g,玉米浆3 g,牛肉膏3 g,酵母浸粉3 g,尿素1 g,蛋白胨10 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g,加水至1 L,调pH=6.8, 121°C灭菌20 min,制成种子培养基。

实施例4-1

一种分析维生素C生产菌株传代过程磷脂组变化的方法,其特征是包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取100 μL 保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和100 μL 保藏于体积浓度为20%的甘

油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 30°C, 培养36小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在30°C, 240 rpm摇床振荡培养, 36h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 cfu/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/mL, 在30°C, 240 rpm摇床振荡培养, 以36h为传代周期, 以体积比为5%为传代比接入新的种子培养基中, 传代150天, 分别在第0天、第50天、第100天和第150天取4个样;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的4个传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 30°C培养36小时; 再分别转入种子培养基, 在30°C, 240 rpm摇床振荡培养36h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将进化了的巨大芽孢杆菌、进化了的氧化葡萄糖杆菌以及混合的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到发酵培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 cfu/mL, 使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/mL, 在30°C, 240 rpm摇床振荡培养13h;

(5) 细胞磷脂组的提取:

①取在步骤(4)摇床振荡培养13 h的三种细胞悬液150mL, 2000 rpm离心5 min, 去除上清液, 保留细胞, 用pH=7.3的磷酸盐缓冲液洗细胞2次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤①所得三种细胞使用液氮在研钵内分别研磨制成干粉，每种称取250 mg细胞干粉，置于三支离心管A中，分别加入0.6mL超纯水，充分混匀；

③向三支离心管A中分别再加入3 mL提取液，充分混匀；2000 rpm离心5 min，使溶液分层，取下层有机溶剂层，置于三支离心管B中；

④重复步骤③ 3次，至三种细胞完全沉降；

⑤向三支离心管B中，各加入1.0 mol/L KCl水溶液1.0 mL，充分混匀，3000 rpm离心5 min，除去含水溶性杂质的上清；

⑥再向三支离心管B各加入2 mL超纯水，充分混匀，3000 rpm离心5 min，去上清；

⑦30°C减压蒸馏步骤⑥所得混合物中的有机溶剂，得到三种总磷脂提取混合物；

⑧将三种总磷脂提取混合物溶于1 mL储存液中制成样品，冷冻-40°C以下保存；

⑨检测前，向三个样品内分别加入磷脂标准品，磷脂标准品为双十二烷酰磷脂酰甘油、双十二烷酰磷脂酰乙醇胺、十二烷酰溶血性磷脂酰乙醇胺和双十二烷酰磷脂酸，这四种磷脂标准品终浓度均为1.0 µg/mL；

所述提取液是含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液，所述氯仿/甲醇的体积比为1.5:1，所述二丁基羟基甲苯的质量分数为0.007%；

所述储存液为含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液，所述氯仿/甲醇的体积比为2:1，所述二丁基羟基甲苯的质量分数为0.007%；

(6) LC-MS检测

采用LC-MS对步骤(5)获得的三个加入了磷脂标准品的样品进行检测，得到维生素C生产菌株传代过程的磷脂组的分子结构见

表1、表2和表3和含量数据见图9、图12和图15;

LC-MS检测条件为:

色谱柱: Hypersil GOLD Silica, 其规格为150mm × 2.1mm,
5μm;

进样量: 10 μL;

柱温: 25 °C;

流动相A (%): 氯仿 (89.5), 甲醇 (10), 氢氧化铵 (0.5);

流动相B (%): 氯仿 (55), 甲醇 (39), 氢氧化铵 (0.5),
水 (5.5);

梯度程序: 0–7 min, 20–30% B; 7–15 min 30–40% B; 15–20
min 40–50% B; 20–25 min 50% B; 25–35min, 50–20% B;
35–45min, 20% B;

离子化方式: ESI (负离子方式);

扫描方式: MS Scan;

扫描范围: m/z 400–900;

扫描速度: 1000 scan/s;

毛细管电压: 3 KV;

锥孔电压: 30 V;

萃取电压 3 V;

离子源温度: 100°C;

脱溶剂气温度: 350°C;

锥孔气流量: 50 L/Hr

脱溶剂气流量: 400 L/Hr;

进/出口能量: 50;

碰撞能量: 2;

HM1/LM1/HM2/LM2: 15.0;

Ion Energy 1: 1.0;

Ion Energy 2: 2.0;

(7) 多元统计分析

将步骤(6)获得的维生素C生产菌株传代过程的磷脂组的分子含量数据,进行多元统计分析,得到区分不同传代时间维生素C生产菌株的差异磷脂分子标志物;多元统计分析方法为Pareto预处理后进行主成分分析;见图10、图13和图16;

(8) 过程分析

将步骤(7)获得的差异磷脂分子标志物的含量按照不同传代时间制成图表图11、图14和图17,观察并分析这些磷脂分子变化的规律,进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的磷脂分子及相关代谢途径,从而为以提高2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化提供方向。

表4-1巨大芽孢杆菌磷脂分子鉴定表

磷脂分子	巨大芽孢杆菌
磷脂酰甘油 (PG)	PG27:0, PG28:1, PG28:0, PG29:1, PG29:0, PG30:1, PG30:0, PG31:2, PG31:1, PG31:0, PG32:2, PG32:1, PG32:0, PG33:2, PG33:1, PG33:0, PG34:2, PG34:1, PG34:0, PG35:1, PG35:0
磷脂酰乙醇胺 (PE)	PE27:0, PE28:1, PE28:0, PE29:1, PE29:0, PE30:1, PE30:0, PE31:2, PE31:1, PE31:0, PE32:2, PE32:1, PE32:0, PE33:2, PE33:1, PE33:0, PE34:2, PE34:1, PE35:0, PE36:0, PE37:0, PE38:0
溶血性磷脂酰乙醇胺(LPE)	LPE13:0, LPE14:0, LPE15:0, LPE16:0

磷脂酸 (PA)	PA28:0, PA29:1, PA29:0, PA30:1, PA30:0, PA31:1, PA31:0, PA32:1, PA32:0, PA33:1, PA33:0
----------	---

如表4-1所示,通过本发明的方法提取并检测维生素C生产菌株(巨大芽孢杆菌)传代过程磷脂组磷脂分子共58种,其中磷脂酰甘油分子21种,磷脂酰乙醇胺分子22种,溶血性磷脂酰乙醇胺分子4种,磷脂酸分子11种。

表4-2 氧化葡萄糖杆菌磷脂分子鉴定表

磷脂分子	氧化葡萄糖杆菌
磷脂酰甘油 (PG)	PG28:1, PG28:0, PG29:0, PG31:0, PG32:1, PG32:0, PG33:1, PG33:0, PG34:2, PG34:1, PG34:0, PG35:2, PG35:1, PG35:0, PG36:3, PG36:2, PG36:1, PG37:2, PG37:1, PG38:1, PG38:0
磷脂酸 (PA)	PA28:0

如表4-2所示,通过本发明的方法提取并检测维生素C生产菌株氧化葡萄糖杆菌磷脂分子共22种,其中磷脂酰甘油分子21种,磷脂酸分子1种。

表4-3 混菌磷脂分子鉴定表

磷脂分子	巨大芽孢杆菌
磷脂酰甘油 (PG)	PG27:0, PG28:1, PG28:0, PG29:1, PG29:0, PG30:1, PG30:0, PG31:2, PG31:1, PG31:0, PG32:2, PG32:1, PG32:0, PG33:2, PG33:1, PG33:0, PG34:2, PG34:1, PG34:0, PG35:1, PG35:0
磷脂酰乙醇胺 (PE)	PE27:0, PE28:1, PE28:0, PE29:1, PE29:0, PE30:1, PE30:0, PE31:2, PE31:1, PE31:0, PE32:2, PE32:1, PE32:0, PE33:2, PE33:1, PE33:0, PE34:2, PE34:1, PE35:2, PE37:0

溶血性磷脂酰乙醇胺 (LPE)	LPE13:0, LPE14:0, LPE15:0, LPE16:0, LPE17:0, LPE18:1
磷脂酸 (PA)	PA27:0, PA28:0, PA29:1, PA29:0, PA30:1, PA30:0, PA31:1, PA31:0, PA32:1, PA32:0, PA33:1, PA33:0, PA34:3, PA34:2, PA34:1, PA35:3

如表4-3所示,通过本发明的方法提取并检测维生素C生产菌株混菌磷脂分子共63种,其中磷脂酰甘油分子21种,磷脂酰乙醇胺分子20种,溶血性磷脂酰乙醇胺分子6种,磷脂酸分子16种。

图9中,巨大芽孢杆菌细胞在传代时间为0、50、100和150天时,细胞磷脂总含量分别为10.89, 6.80, 7.06和8.64 nmol/mg细胞干重,显示出在两菌共同传代时间到第50天时,巨大芽孢杆菌细胞磷脂总量显著下降,再随传代增加(100、150天)而缓慢上升的变化趋势。以0、50、100和150天的巨大芽孢杆菌磷脂样本中的所有磷脂分子的含量为矩阵,进行主成分分析(图10),得分图显示传代0天和50天细胞磷脂成分区别最大(距离最远),而100和150天逐渐接近0天细胞;荷载图显示大多数PG分子与0天细胞成正相关,而传代50天后,若干PE和LPE分子含量显著增加,而在100天时,PA分子含量较高。图11为主成分分析荷载图中离群点(分子标志物)的含量变化。其中PE34:2、PE34:1和LPE16:0在50天细胞中含量最高;一系列PG分子在50天含量最低,之后逐渐上升;一系列PA分子在50天明显下降,在100天又发生激增。以上变化表明,随两菌传代共同传代时间增加,磷脂代谢过程发生重大变化。在巨大芽孢杆菌中,LPE和PA分子的增加,表明诱导细胞凋亡的信号转导事件发生的概率增加,而这种信号事件可能与巨大芽孢杆菌产孢密切相关,进而影响小菌,即氧化葡萄糖杆菌的生长和生产。

图12中, 氧化葡萄糖杆菌细胞在传代时间为0、50、100和150天时, 细胞磷脂总含量分别为5.92, 1.42, 0.96和0.85 nmol/mg细胞干重, 表明氧化葡萄糖杆菌细胞磷脂总含量在传代50天后, 显著下降。以0、50、100和150天的氧化葡萄糖杆菌磷脂样本中的所有磷脂分子的含量为矩阵, 进行主成分分析(图13), 得分图显示0和50天细胞磷脂成分明显区分, 而100和150天细胞与50天细胞差异不大; 荷载图显示传代50天后, PA分子含量增加。图14为区分不同传代时间的分子标志物百分含量变化图, 其中PA28:0含量随传代时间延长呈上升趋势。

图15中, 混菌细胞在传代数0、50、100和150天时, 细胞磷脂总含量分别为8.39, 6.33, 6.62和7.91 nmol/mg细胞干重, 显示细胞磷脂总含量在传代50天时显著下降, 而后增加的趋势。以0、50、100和150天的混菌磷脂样本中的所有磷脂分子的含量为矩阵, 进行主成分分析(图16), 得分图显示0、50、100和150天细胞磷脂成分明显区分, 且在第一主成分方向顺序分布, 表明混菌细胞磷脂组成随传代数增加而逐渐变化的趋势; 荷载图显示大多数PG和LPE分子与0天细胞成正相关, 而随传代进行, PE和PA分子含量增加。图17为区分不同传达数的混菌的磷脂分子标志物。其中一系列PG和LPE分子随传代下降, 而PE和PA分子, 有随之增加的趋势。这表明随两菌传代时间增加, 相互作用时间延长, 磷脂代谢发生变化; LPE的减少和PA的增加, 提示不同的磷脂代谢相关酶类在两菌共同传代和细胞膜信号转导中的不同作用。

实施例4-2

一种分析维生素C生产菌株传代过程磷脂组变化的方法, 其特征是包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取10 μ L保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和10 μ L保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C, 培养48小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的**巨大芽孢杆菌**和**氧化葡糖杆菌**分别转入种子培养基, 在28 $^{\circ}$ C, 200 rpm摇床振荡培养, 48h, 得到**巨大芽孢杆菌种子液**和**氧化葡糖杆菌种子液**;

将**巨大芽孢杆菌**和**氧化葡糖杆菌**接种到新的种子培养基中, 使**巨大芽孢杆菌**的密度为 2×10^7 cfu/mL, 使**氧化葡糖杆菌**的密度为 2×10^8 cfu/mL, 在28 $^{\circ}$ C, 200rpm摇床振荡培养, 以24h为传代周期, 以体积比为1%为传代比接入新的种子培养基中, 传代130天, 分别**在第0天、第20天、第40天、第80天和第130天**取5个样;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的5个传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C培养24小时; 再分别转入种子培养基, 在28 $^{\circ}$ C, 200 rpm摇床振荡培养48h, 得到**进化了的巨大芽孢杆菌种子液**和**进化了的氧化葡糖杆菌种子液**;

(4) 发酵:

将所述**进化了的巨大芽孢杆菌**、**进化了的氧化葡糖杆菌**以及**混合的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡糖杆菌**分别接种到发酵培养基中, 使**进化了的巨大芽孢杆菌**的密度为 2×10^7 cfu/mL, 使**进化了的氧化葡糖杆菌**的密度为 2×10^8 cfu/mL, 在28 $^{\circ}$ C, 200rpm摇床振荡培养15h;

(5) 细胞磷脂组的提取:

①取在步骤(4)摇床振荡培养10h的三种细胞悬液100mL, 1000

rpm离心10 min, 去除上清液, 保留细胞, 用pH= 7.2的磷酸盐缓冲液洗细胞1次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤①所得细胞使用液氮在研钵内研磨制成干粉, 称取200mg细胞干粉, 置于离心管A中, 加入0.5 mL超纯水, 充分混匀;

③向离心管A中再加入2 mL提取液, 充分混匀; 1000 rpm离心10 min, 使溶液分层, 取下层有机溶剂层, 置于离心管B中;

④重复步骤③ 2次, 至细胞完全沉降;

⑤向离心管B中, 加入0.8mol/L KCl水溶液0.5mL, 充分混匀, 2000 rpm离心10 min, 除去含水溶性杂质的上清;

⑥再向离心管B加入1 mL超纯水, 充分混匀, 2000 rpm离心10 min, 去上清;

⑦40°C减压蒸馏步骤⑥所得混合物中的有机溶剂, 得到总磷脂提取混合物;

⑧将所述总磷脂提取混合物溶于0.2 mL储存液中制成样品, 冷冻-40°C以下保存;

⑨检测前, 向所述样品内加入磷脂标准品, 磷脂标准品为双二十烷酰磷脂酰甘油、双二十烷酰磷脂酰乙醇胺, 这两种磷脂标准品终浓度均为0.5 μ g/mL;

所述提取液是含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为1:1, 所述二丁基羟基甲苯的质量分数为0.005%;

所述储存液为含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为1:1, 所述二丁基羟基甲苯的质量分数为0.005%;

(6) LC-MS检测

采用LC-MS对步骤(5)获得的加入了磷脂标准品的样品进行检测, 得到维生素C生产菌株传代过程的磷脂组的分子结构和含量数据;

LC-MS检测条件为同实施例4-1;

(7) 多元统计分析

将步骤(6)获得的维生素C生产菌株传代过程的磷脂组的分子含量数据,进行多元统计分析,得到区分不同传代时间维生素C生产菌株的差异磷脂分子标志物;多元统计分析方法为Pareto预处理后进行主成分分析;

(8) 过程分析

将步骤(7)获得的差异磷脂分子标志物的含量按照不同传代时间制成图表,观察并分析这些磷脂分子变化的规律,进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的磷脂分子及相关代谢途径,从而为以提高2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化提供方向。

实施例4-3

一种分析维生素C生产菌株传代过程磷脂组变化的方法,其特征是包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取500 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)和500 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上,35 $^{\circ}$ C,培养24小时;

(2) 种子培养:

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基,在35 $^{\circ}$ C,280 rpm摇床振荡培养,24h,得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/mL,使氧化葡萄糖杆菌的密度为

2×10^{11} cfu/mL, 在 35°C , 280 rpm摇床振荡培养, 以48h为传代周期, 以体积比为10%为传代比接入新的种子培养基中, 传代100天, 分别在第0天、第50天和第100天取3个样;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的3个传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 35°C 培养48小时; 再分别转入种子培养基, 在 35°C , 280 rpm摇床振荡培养24h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将所述进化了的巨大芽孢杆菌、进化了的氧化葡萄糖杆菌以及混合的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到发酵培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} cfu/mL, 使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} cfu/mL, 在 35°C , 280 rpm摇床振荡培养10h;

(5) 细胞磷脂组的提取:

①取在步骤(4)摇床振荡培养15h的三种细胞悬液200mL, 3000 rpm离心3min, 去除上清液, 保留细胞, 用pH=7.4的磷酸盐缓冲液洗细胞3次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤①所得细胞使用液氮在研钵内研磨制成干粉, 称取300 mg细胞干粉, 置于离心管A中, 加入0.8 mL超纯水, 充分混匀;

③向离心管A中再加入4 mL提取液, 充分混匀; 3000 rpm离心3min, 使溶液分层, 取下层有机溶剂层, 置于离心管B中;

④重复步骤③4次, 至细胞完全沉降;

⑤向离心管B中, 加入1.2 mol/L KCl水溶液1.5 mL, 充分混匀, 4000 rpm离心3 min, 除去含水溶性杂质的上清;

⑥再向离心管B加入3 mL超纯水, 充分混匀, 4000 rpm离心3

min, 去上清;

⑦氮气吹干步骤⑥所得混合物中的有机溶剂, 得到总磷脂提取混合物;

⑧将所述总磷脂提取混合物溶于2 mL储存液中制成样品, 冷冻-40°C以下保存;

⑨检测前, 向所述样品内加入磷脂标准品, 磷脂标准品为双癸烷酰磷脂酰甘油、双癸烷酰磷脂酰乙醇胺和双十二烷酰磷脂酸, 使这三个磷脂标准品终浓度均为1.5 µg/mL;

所述提取液是含有二丁基羧基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为2:1, 所述二丁基羧基甲苯的质量分数为0.01%;

所述储存液为含有二丁基羧基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为4:1, 所述二丁基羧基甲苯的质量分数为0.01%;

(6) LC-MS检测

采用LC-MS对步骤(5)获得的加入了磷脂标准品的样品进行检测, 得到维生素C生产菌株传代过程的磷脂组的分子结构和含量数据;

LC-MS检测条件为同实施例4-1;

(7) 多元统计分析

将步骤(6)获得的维生素C生产菌株传代过程的磷脂组的分子含量数据, 进行多元统计分析, 得到区分不同传代时间维生素C生产菌株的差异磷脂分子标志物; 多元统计分析方法为Pareto预处理后进行主成分分析;

(8) 过程分析

将步骤(7)获得的差异磷脂分子标志物的含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析这些磷脂分子变化的规律, 进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的磷脂分子及相关代谢途径, 从而

为以提高2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化提供方向。

实验证明，实施例4-2和实施例4-3与实施例4-1的结果类似。

本发明所采用的固体培养基、种子培养基和发酵培养基的组成选自中国专利申请号为201110314740.9公开的培养基，例如：

固体培养基：按比例称取L-山梨糖20 g，玉米浆3 g，牛肉膏3 g，酵母浸粉3 g，尿素1 g，蛋白胨10 g，琼脂20 g， KH_2PO_4 1 g， MgSO_4 0.2 g， CaCO_3 1 g，加水至1 L，调pH=6.8，121°C灭菌20 min，制成固体培养基。

种子培养基：按比例称取L-山梨糖20 g，玉米浆3 g，牛肉膏3 g，酵母浸粉3 g，尿素1 g，蛋白胨10 g， KH_2PO_4 1 g， MgSO_4 0.2 g， CaCO_3 1 g，加水至1 L，调pH=6.8，121°C灭菌20 min，制成种子培养基。

发酵培养基：按比例称取L-山梨糖80 g，玉米浆20 g，尿素12 g， KH_2PO_4 1g， MgSO_4 0.5g， CaCO_3 1g，加水至1 L，调pH=7.0，121°C灭菌20min，制成发酵培养基。

实施例5-1

一种检测维生素C生产菌株传代过程中营养环境变化的方法，包括如下步骤：

（1）混菌传代培养：

①固体培养：

取存于液氮的500 μL 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌（*Gluconobacter oxydans*）和500 μL 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）分别接种于固体培养基上，28°C，培养24 h；

②种子培养:

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基,在28℃,200 r/min摇床振荡培养24h,得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 CFU/mL,使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL,在28℃,200 r/min摇床振荡培养,以24h为传代周期,以体积比为1%为传代比接入新的种子培养基中,传代150天得到混菌细胞,在传代0-150天中选定4个取样时间分别为0天、50天、100天、150天取4个样;

③分纯:

将步骤(1)②获得的4个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上,28℃培养24 h;再分别转入新的种子培养基,在28℃,200 rpm摇床振荡培养24 h,分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中;

④发酵:

将步骤(1)③获得的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌,分别接种到新的种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 CFU/mL,氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL,在28℃,200 r/min摇床振荡培养10 h;

(2) 营养环境中物质的测定:

①培养液的收集:

分别取步骤(1)④⑤获得的巨大芽孢杆菌培养液、氧化葡萄糖杆菌培养液和混菌体系培养液1 mL,以5000 rpm的转速离心,收集上清,并用0.22 μm纤维素微孔滤膜过滤;

②样品制备:

取步骤(2)①获得的滤液10 μL 置于离心管中,加入50 μL 的0.04 mg/ml氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物,冷冻干燥;加入40 μL 浓度为20 mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中脗化反应60 min;再加入50 μL N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴进行硅烷化反应30 min;

③GC-TOFMS检测:

将1 μL 步骤(2)③获得样品进到气相色谱中,色谱柱为DB-5MS,所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d.,进样口温度250 $^{\circ}\text{C}$,载气为高纯氦气,流速0.6 ml/min,分流比3:1,柱温箱升温程序为:初始50 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min,以4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升到260 $^{\circ}\text{C}$,保持3 min,使用EI电离源,源温230 $^{\circ}\text{C}$,检测器电压2300 V,电离电压60 eV,电流30 μA ;质谱检测范围50-800 m/z;营养环境物质的鉴定使用NIST 2005数据库,质谱数据的处理和营养环境物质相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件;并通过对色谱峰面积积分处理,并与内标物的峰面积对照,得到营养环境物质的相对含量;

(3)主成分分析:

①将步骤(2)获得的营养环境物质的相对含量的数据进行Pareto预处理;

②用Metlab 7.0 (Mathworks. Inc.) 软件对步骤(3)①预处理后的数据进行主成分分析,得到差异营养环境标志物;

得到用于表达样本相似性和差异性的得分图和载荷图;在得分图中,样品点相互之间距离越近,说明样本的相似度越大,距离越远,说明样本差异越大,用来比较不同代数巨大芽孢杆菌、氧化葡萄糖杆菌和混菌体系传代培养过程中营养环境的相似和差异;在载荷图中,每个点表示各营养成分,距离中心点距离越远的物质,其在传代培养的过程中的差异就越大,便可作为传代培养营养环境变化

的标志物；见图 18、图 20和图22。

(4) 过程分析

将差异营养环境标志物的相对含量按照不同传代时间制成图表图 19、图 21和图 23，观察并分析这些物质变化的规律，检测出维生素C生产菌株传代过程中营养环境的变化，进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的营养环境成分，从而为揭示混菌传代培养过程中两菌的相互作用机制和培养条件优化提供了方向。

表 5-1 氧化葡糖杆菌传代培养过程中营养环境物质鉴定表

糖	赤藓糖	葡萄糖	呋喃核糖
	木酮糖	山梨糖	景天庚糖
	核糖	N-乙酰氨基葡萄糖	松二糖
	果糖	半乳糖	
氨基酸	丙氨酸	苏氨酸	谷氨酸
	缬氨酸	脯氨酸	苯丙氨酸
	异亮氨酸	天冬氨酸	半胱氨酸
	甘氨酸	4-氨基丁酸	赖氨酸
	丝氨酸	鸟氨酸	酪氨酸
	甲硫氨酸	4-羟基脯氨酸	精氨酸
	5-酮脯氨酸	色氨酸	
糖的衍生物	木糖醇	甘露醇	核糖醇
	2-酮基-L-古龙酸	葡糖酸	2-酮基葡萄糖酸
	赤藓糖醇	半乳糖酸	葡萄糖醇
有机酸	丙酮酸	乳酸	草酸
	甘油酸	2,3,4-三羟基丁酸	丁烯二酸
	磷酸	苹果酸	柠檬酸
	α -氨基丁二酸	2-氨基辛酸	2-氧代己酸

	3-羟基丙酸	3-羟基丁酸	羟乙酸
	2,4-二羟基丁酸	2-氧代-戊二酸	4-羟基苯乙酸
	2-羟基-3-甲基丁酸	2-羟基-4-甲基戊酸	吡咯-2-羧酸
脂肪酸	正十六碳脂肪酸	正十八碳脂肪酸	
其他	尿素	2-羟基乙胺	1, 4-丁二胺
	1, 5-戊二胺	尿嘧啶	胸腺嘧啶
	甘油	天冬酰胺	尿酸
	肌醇	甘油	

如表5-1所示, 通过本发明的方法检测维生素C生产菌株(氧化葡萄糖杆菌)传代过程营养环境物质共74种, 其中糖11种, 氨基酸20种, 糖的衍生物9种, 有机酸21种, 脂肪酸2种, 胺类及含氮化合物等其他物质11种。

表5-2 巨大芽孢杆菌传代培养过程中营养环境物质鉴定表

糖	赤藓糖	葡萄糖	呋喃核糖
	木酮糖	山梨糖	景天庚糖
	核糖	N-乙酰氨基葡萄糖	松二糖
	果糖	半乳糖	
氨基酸	丙氨酸	苏氨酸	谷氨酸
	缬氨酸	脯氨酸	苯丙氨酸
	异亮氨酸	天冬氨酸	半胱氨酸
	甘氨酸	4-氨基丁酸	赖氨酸
	丝氨酸	鸟氨酸	酪氨酸
	甲硫氨酸	4-羟基脯氨酸	精氨酸
	5-酮脯氨酸	色氨酸	

糖的衍生物	木糖醇	甘露醇	核糖醇
	葡萄糖醇	葡糖酸	2-酮基葡萄糖酸
	赤藓糖醇	半乳糖酸	
有机酸	丙酮酸	乳酸	草酸
	甘油酸	2,3,4-三羟基丁酸	丁烯二酸
	磷酸	苹果酸	柠檬酸
	α -氨基丁二酸	2-氨基辛酸	2-氧代己酸
	3-羟基丙酸	3-羟基丁酸	羧乙酸
	2,4-二羟基丁酸	2-氧代-戊二酸	4-羟基苯乙酸
	2-羟基-4-甲基戊酸	2-氨基苯甲酸	吡咯-2-羧酸
	2-羟基-3-甲基丁酸		
脂肪酸	正十六碳脂肪酸	正十八碳脂肪酸	
其他	尿素	2-羟基乙胺	1, 4-丁二胺
	1, 5-戊二胺	尿嘧啶	胸腺嘧啶
	甘油	天冬酰胺	尿酸
	肌醇	次黄嘌呤	

如表5-2所示,通过本发明的方法检测维生素C生产菌株(巨大芽孢杆菌)传代过程营养环境物质共74种,其中糖11种,氨基酸20种,糖的衍生物8种,有机酸22种,脂肪酸2种,胺类及含氮化合物等其他物质11种。

表5-3 混菌传代培养过程中营养环境物质鉴定表

糖	赤藓糖	葡萄糖	呋喃核糖
	木酮糖	山梨糖	景天庚糖
	核糖	N-乙酰氨基葡萄糖	松二糖
	果糖	半乳糖	

氨基酸	丙氨酸	苏氨酸	谷氨酸
	缬氨酸	脯氨酸	苯丙氨酸
	异亮氨酸	天冬氨酸	半胱氨酸
	甘氨酸	4-氨基丁酸	赖氨酸
	丝氨酸	鸟氨酸	酪氨酸
	甲硫氨酸	4-羟基脯氨酸	精氨酸
	5-酮脯氨酸	色氨酸	
糖的衍生物	木糖醇	甘露醇	核糖醇
	葡萄糖醇	葡糖酸	2-酮基葡萄糖酸
	赤藓糖醇	半乳糖酸	2-酮基-L-古龙酸
有机酸	丙酮酸	乳酸	草酸
	甘油酸	2,3,4-三羟基丁酸	丁烯二酸
	磷酸	苹果酸	柠檬酸
	α -氨基丁二酸	2-氨基辛酸	2-氧代-己酸
	3-羟基丙酸	3-羟基丁酸	羟乙酸
	2,4-二羟基丁酸	2-氧代-戊二酸	4-羟基苯乙酸
	丙二酸	2-氨基苯甲酸	吡咯-2-羧酸
	2-羟基-3-甲基丁酸	2-羟基-4-甲基戊酸	2-氧代-3-甲基-丁酸
脂肪酸	正十六碳脂肪酸	正十八碳脂肪酸	
其他	尿素	2-羟基乙胺	1, 4-丁二胺
	1, 5-戊二胺	尿嘧啶	胸腺嘧啶
	甘油	天冬酰胺	尿酸
	肌醇	次黄嘌呤	

如表5-3所示,通过本发明的方法检测维生素C生产菌株混菌传代过程营养环境物质共77种,其中糖11种,氨基酸20种,糖的衍生

物9种，有机酸24种，脂肪酸2种，胺类及含氮化合物等其他物质11种。

以0、50、100和150代的氧化葡萄糖杆菌传代培养的营养环境物质的相对含量为样本矩阵，进行主成分分析（图 18），得分图显示明显可以分为四类，载荷图显示随着传代的进行，培养液环境中某些氨基酸的含量显著增加。图19为区分不同传代时间的分子标志物相对含量变化图，其中缬氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、5-酮脯氨酸、酪氨酸和色氨酸随着传代的时间的延长呈上升趋势，且高于空白培养基，它们是氧化葡萄糖杆菌降解蛋白质的结果，这些物质的积累为大菌的生长提供了足够的营养。

如图20所示，以0、50、100和150代的巨大芽孢杆菌传代培养的营养环境物质的相对含量为样本矩阵，进行主成分分析，得分图显示可以有效分为四类，载荷图中5种分子标志物在第一主成分方向上顺序分布，表明这些标志物随着代数增加而逐渐变化的趋势。图21为区分不同传代时间巨大芽孢杆菌培养环境中分子标志物相对含量的随时间变化趋势。除赤藓糖和4-羟基脯氨酸外，其余标志物分子的含量均低于空白培养基，我们可以认为他们能被大菌用于生长和自身物质的合成。随着传代时间的延长，脯氨酸和甘氨酸含量逐渐降低，尤其是150代大菌培养环境中含量最低，明显低于出发菌株。大菌体内积累更多的脯氨酸，有助于抵抗环境胁迫；甘氨酸对细胞膜具有重要作用，高浓度的甘氨酸有助于增加细胞膜的通透性，随着传代的增加，大菌对甘氨酸的利用能力增强，有助于混菌培养时大菌胞内代谢物的释放，从而促进2-KLG的合成。培养环境中赤藓糖和4-羟基脯氨酸浓度高于空白培养基，可见它们是大菌在胞外积累的结果，且这两种标志物分子随着传代时间的延长，浓度逐渐提高，在150代大菌传代环境中达到最大。其中赤藓

糖是芳香族氨基酸和维生素B₆的合成前体，能够辅助氧化葡萄糖杆菌合成氨基酸并改善碳中心代谢能力。

图22中，混菌细胞在传代时间为0、50、100和150天时以混菌营养环境中的物质的相对含量为样本矩阵进行主成分分析，得分图显示50代和100代的混菌较为接近，0代混菌明显与进化的混菌区分很大。在载荷图中可以看到区分样本的关键性差异分子标志物，即草酸、脯氨酸、丙二酸、5-酮脯氨酸、果糖、酪氨酸、半乳糖酸、十六烷酸、1,5-戊二胺、十八烷酸和色氨酸。这些标志物随着传代时间的延长，在培养环境中含量成降低趋势，尤其是脯氨酸和5-酮脯氨酸在150代混菌中浓度达到最低（图23），这两种物质是影响混菌发酵2-KLG产量的关键物质。以上变化表明，随着两菌传代时间的增加，相互作用时间延长，两菌的营养环境发生变化，这些营养物质的减少，提示进化后的混菌的配合关系更好。

实施例5-2

一种检测维生素C生产菌株传代过程中营养环境变化的方法，包括如下步骤：

（1）混菌传代培养：

①固体培养：

取存于液氮的10 μL保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌（*Gluconobacter oxydans*）和10 μL保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）分别接种于固体培养基上，30℃，培养36 h；

②种子培养：

将经步骤（1）①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在30℃，250 r/min摇床振荡培养36h，分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 CFU/mL，在30℃，250r/min摇床振荡培养，以36h为传代周期，以体积比为5%为传代比接入新的种子培养基中，传代100天得到混菌细胞，在传代0-100天选定3个取样时间取3个样，分别为0天、50天、100天；

③分纯：

将步骤（1）②获得的3个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上，30℃培养36 h；再分别转入新的种子培养基，在30℃，250 rpm摇床振荡培养36 h，分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中；

④发酵：

将步骤（1）③获得的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌，分别接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL，氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^9 CFU/mL，在30℃，250 r/min摇床振荡培养12 h；

（2）营养环境中物质的测定：

①培养液的收集：

分别取步骤（1）④获得的巨大芽孢杆菌培养液、氧化葡萄糖杆菌培养液和混菌体系培养液1.5 mL，以8000 rpm的转速离心，收集上清，并用0.22 μm纤维素微孔滤膜过滤，得滤液；

②样品制备：

取步骤（2）①所获得的滤液20 μL置于离心管中，并加入100 μL的0.10 mg/ml氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物，冷冻干燥；加入80 μL浓度为20 mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于37℃水浴中脗化反应90 min；再加入80 μLN-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺

于37℃水浴进行硅烷化反应40 min;

③GC-TOFMS检测:

将1 μ L步骤(2)②获得样品进到气相色谱中, 色谱柱为DB-5MS, 所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度270℃, 载气为高纯氦气, 流速0.8 ml/min, 分流比20: 1, 柱温箱升温程序为: 初始60℃, 保持3 min, 以6℃/min的速度升到280℃, 保持5 min, 使用EI电离源, 源温250℃, 检测器电压2500 V, 电离电压70 eV, 电流40 μ A; 质谱检测范围50-800 m/z; 营养环境物质的鉴定使用NIST 2005数据库, 质谱数据的处理和营养环境物质相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到营养环境物质的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)获得的营养环境物质的相对含量的数据进行Pareto预处理;

②用Metlab 7.0 (Mathworks. Inc.) 软件对步骤(3)①预处理后的数据进行主成分分析, 得到差异营养环境标志物用于表达样本相似性和差异性的得分图和载荷图; 在得分图中, 样品点相互之间距离越近, 说明样本的相似度越大, 距离越远, 说明样本差异越大, 用来比较不同代数巨大芽孢杆菌、氧化葡萄糖杆菌和混菌体系传代培养过程中营养环境的相似和差异; 在载荷图中, 每个点表示各营养成分, 距离中心点距离越远的物质, 其在传代培养的过程中的差异就越大, 便可作为传代培养营养环境变化的标志物。

(4) 过程分析

将差异营养环境标志物的相对含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析这些物质变化的规律, 进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的营养环境成分, 从而为揭示混菌传代培养过程中

两菌的相互作用机制和培养条件优化提供了方向。

实施例5-3

一种检测维生素C生产菌株传代过程中营养环境变化的方法，包括如下步骤：

(1) 混菌传代培养：

① 固体培养：

取存于液氮的200 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和200 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，35℃，培养48 h；

② 种子培养：

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基，在35℃，280 r/min摇床振荡培养48 h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到一个新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL，使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^{11} CFU/mL，在35℃，280 r/min摇床振荡培养，以48h为传代周期，以体积比为10%为传代比接入新的种子培养基中，在传代0-150天中选定4个取样时间取4个样，分别为0天、50天、100天、150天；

③ 分纯：

将步骤(1)②获得的4个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上，35℃培养48 h；再分别转入新的种子培养基，在35℃，280 rpm摇床振荡培养48 h，分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中；

④ 发酵：

将步骤(1)③获得的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及两种菌混合在一起的混合菌分别接种到种子培养基中,使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL,氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} CFU/mL,在35℃, 280 r/min摇床振荡培养15h;

(2) 营养环境中物质的测定:

①培养液的收集:

分别取步骤(1)④获得的巨大芽孢杆菌培养液、氧化葡萄糖杆菌培养液和混菌体系培养液2 mL,以10000 rpm的转速离心,收集上清,并用0.22 μm纤维素微孔滤膜过滤;

②样品制备:

取步骤(2)①所获得的滤液50 μL置于离心管中,并加入200 μL的0.14 mg/ml氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物,冷冻干燥;加入100 μL浓度为20 mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于40℃水浴中脗化反应120 min;再加入100 μLN-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于40℃水浴进行硅烷化反应60 min;

③GC-MSTOF检测:

将1 μL步骤(2)②获得样品进到气相色谱中,色谱柱为DB-5MS,所述色谱柱的规格为30 m×0.25 mm i.d.,进样口温度为280℃,载气为高纯氦气,流速0.7 ml/min,分流比5: 1,柱温箱升温程序为:初始80℃,保持5 min,以8℃/min的速度升到300℃,保持8 min,使用EI电离源,源温260℃,检测器电压2700 V,电离电压80 eV,电流50 μA;质谱检测范围50-800 m/z;营养环境物质的鉴定使用NIST 2005数据库,质谱数据的处理和营养环境物质相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件;并通过对色谱峰面积积分处理,并与内标物的峰面积对照,得到营养环境物质的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)获得的营养环境物质的相对含量的数据进行Pareto预处理;

②用Metlab 7.0 (Mathworks. Inc.) 软件对步骤(3)①预处理后的数据进行主成分分析, 得到用于表达样本相似性和差异性的得分图和载荷图; 在得分图中, 样品点相互之间距离越近, 说明样本的相似度越大, 距离越远, 说明样本差异越大, 用来比较不同代数巨大芽孢杆菌、氧化葡萄糖杆菌和混菌体系传代培养过程中营养环境的相似和差异; 在载荷图中, 每个点表示各营养成分, 距离中心点距离越远的物质, 其在传代培养的过程中的差异就越大, 便可作为传代培养营养环境变化的标志物。

(4) 过程分析

将差异营养环境标志物的相对含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析这些物质变化的规律, 进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的营养环境成分, 从而为揭示混菌传代培养过程中两菌的相互作用机制和培养条件优化提供了方向。

实验证明, 实施例5-2和实施例5-3与实施例5-1的结果类似。

本发明所采用的固体培养基、种子培养基的组成选自中国专利申请号为201110314740.9公开的培养基, 例如:

固体培养基: 按比例称取L-山梨糖20 g, 玉米浆3 g, 牛肉膏3 g, 酵母浸粉3 g, 尿素1 g, 蛋白胨10 g, 琼脂20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g, 加水至1 L, 调pH=6.8, 121°C灭菌20 min, 制成固体培养基。

种子培养基: 按比例称取L-山梨糖20 g, 玉米浆3 g, 牛肉膏3 g, 酵母浸粉3 g, 尿素1 g, 蛋白胨10 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g, 加水至1 L, 调pH=6.8, 121°C灭菌20 min, 制成种子

培养基。

实施例6-1

一种分析维生素C生产菌株传代过程小分子代谢物变化的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 混菌传代培养：

① 固体培养：

取液氮的100 μL 保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和100 μL 保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，30℃，培养36 h；

(2) 种子培养：

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在30℃，240 rpm摇床振荡培养36 h，分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL，在30℃，240 rpm摇床振荡培养，以36h为传代周期，以体积比为5%为传代比接入新的种子培养基中，传代150天得到混菌细胞，在传代第0，50，100，150天时间点取4个样；

③ 分纯：

将步骤(1)②获得的4个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上，30℃培养36 h；再分别转入新的种子培养基，在30℃，240 rpm摇床振荡培养36 h，分别得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为20%的甘油水溶液中；

④发酵:

将步骤(1)③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌,分别接种到新的种子培养基中,使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^8 CFU/mL,进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL,在30℃,240rpm摇床振荡培养13 h;

(2)胞内小分子代谢物样品的制备和测定:

①各取在步骤(1)④获得的三种细胞悬液150 mL,分别在2000 rpm离心5 min,去除上清液,保留细胞,用pH=7.3的磷酸盐缓冲液洗细胞2次,相同条件离心,去除上清,得到细胞;

②将步骤(2)①所得细胞用液氮研磨的方法制成干粉,各称取50 mg细胞干粉,分别置于三个离心管中,再加入1.0 mL提取液,加入50 μL浓度为0.040 mg/mL氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物,混匀;2000 rpm离心5 min,取上清液置于三个新的离心管中冷冻干燥;

③将步骤(2)②获得三个离心管中分别加入50 μL浓度为20 mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于30℃水浴中脗化反应90 min;再加入80 μL N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于37℃水浴进行硅烷化反应30 min;

所述提取液为体积分数为50的甲醇水溶液;

④GC-TOF/MS检测:

将1 μL步骤(2)③获得的样品进到气相色谱仪中,色谱柱为DB-5MS,所述色谱柱的规格为30 m × 0.25 mm i.d.,进样口温度为280℃,载气为高纯氦气,恒压91 KPa,分流比10:1,柱温箱升温程序为:初始70℃,保持5 min,以5℃/min的升到280℃,保持5 min,使用EI电离源,源温250℃,检测器电压2500V,电离电压70 eV,

电流40 μA ；质谱检测范围50-800 m/z ；小分子代谢物的鉴定使用NIST 2005数据库，质谱数据的处理和代谢物相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件；并通过对色谱峰面积积分处理，并与内标物的峰面积对照，得到小分子代谢物的相对含量；

(3) 主成分分析：

①将步骤(2)④获得的维生素C生产菌株传代过程的小分子代谢物的相对含量数据进行Pareto预处理；

②用SIMCA-P 11.5软件对预处理后的数据进行主成分分析，得到区分不同传代时间维生素C生产菌株的小分子代谢物标志物；

(4) 过程分析

将小分子代谢物标志物的含量按照不同传代时间制成图表，观察并分析小分子代谢物标志物变化的规律，检测出维生素C生产菌株传代过程中细胞内小分子代谢物的变化。进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的代谢物分子及相关代谢途径，从而为揭示混菌传代培养过程中两菌的相互作用机制和提高2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化提供方向。

以0、50、100和150代的氧化葡萄糖杆菌传代培养的小分子代谢物的相对含量为样本矩阵，进行主成分分析(图24)。其得分图(图24-1)明显可以分为四类，其中150代明显与0、50和100代的代谢物谱差异较远，0代与50代相距较近，说明其传代进化差异不是很大。图25为区分氧化葡萄糖杆菌不同传代时间的分子标志物相对含量变化图，其中十六烷酸、十八烯酸和十八烷酸随着传代时间的延长含量降低，说明细胞生长过程中消耗更多的脂肪酸生成细胞膜磷脂，因此游离脂肪酸在100代后显著减少。

以0、50、100和150代的巨大芽孢杆菌传代培养的小分子代谢物的相对含量为样本矩阵，进行主成分分析(图26)，从得分图(图

26-1) 中可以看出巨大芽孢杆菌不同传代培养的代谢物谱差异较大, 明显分为四类。图27为区分不同传代时间巨大芽孢杆菌小分子代谢标志物随时间的变化其相对含量的变化趋势图。其中十六烷酸和十八烷酸随着巨大芽孢杆菌传代时间的延长含量显著降低, 说明细胞生长消耗更多的脂肪酸生成细胞膜磷脂, 因此游离脂肪酸显著减少。此外多数氨基酸, 如脯氨酸和4-羟基脯氨酸显著减少, 5-氧脯氨酸和谷氨酰胺等的含量也都有较明显的减少, 也说明传代过程中巨大芽孢杆菌消耗大量氨基酸用来维持自身生长, 合成胞内蛋白。

以混菌细胞在传代时间为0、50、100和150天时的小分子代谢物的相对含量为样本矩阵进行主成分分析(图28), 得分图(图28-1)显示0代与50、100和150代的混菌样本明显区分, 说明混菌传代培养过程中, 由于两菌的相互作用, 其传代进化的菌株体系与原始出发菌体系明显不同, 但50代和100代较为接近, 在第一主成分上不能明显区分。图29为区分不同传代时间混菌小分子代谢物标志物相对含量的变化趋势图。在这些标志物中, 多数氨基酸如脯氨酸、甘氨酸、4-羟基脯氨酸、5-氧脯氨酸和谷氨酰胺等随着传代时间的延长含量成降低趋势, 尤其是脯氨酸和5-氧脯氨酸在150代混菌中浓度达到最低, 这两种物质是影响混菌发酵2-酮古龙酸产量的关键物质。这些变化表明, 随着混菌传代增加, 两菌相互作用更加协调, 有助于目的产物的生成。

实施例6-2

一种分析维生素C生产菌株传代过程中小分子代谢物变化的方法, 包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的10 μL 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和10 μL 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 28℃, 培养48 h;

②种子培养:

将经步骤(1)①培养的的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基, 在28℃, 200 rpm摇床振荡培养48 h, 分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到一个新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 $2 \times 10^7 \text{CFU/mL}$, 使氧化葡糖杆菌的密度为 $2 \times 10^8 \text{CFU/mL}$, 在28℃, 200rpm摇床振荡培养, 以48h为传代周期, 以体积比为1%为传代比接入新的种子培养基中, 传代100天得到混菌细胞, 在传代0-100天选定3个时间取样, 取3样, 分别为0天、50天、100天;

③分纯:

将步骤(1)②获得的3样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上, 28℃培养48 h; 再分别转入新的种子培养基, 在28℃, 200 rpm摇床振荡培养48 h, 分别得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液; 保藏于体积浓度为15%的甘油水溶液中;

④发酵:

将步骤(1)③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌, 分别接种到新的种子培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 $2 \times 10^7 \text{CFU/mL}$, 进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 $2 \times 10^8 \text{CFU/mL}$, 在28℃, 200rpm摇床振荡培养15 h;

(2) 胞内小分子代谢物样品的制备和测定:

①各取在步骤(1)④获得的三种细胞悬液100 mL, 分别在1000 rpm离心10 min, 去除上清液, 保留细胞, 用pH=7.2的磷酸盐缓冲液洗细胞1次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤(2)①所得细胞用液氮研磨细胞的方法制成干粉, 各称取30 mg细胞干粉, 分别置于三个离心管中, 再加入0.5mL提取液, 加入30 μ L浓度为0.020mg/mL氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物, 混匀; 1000 rpm离心10 min, 取上清液置于三个新的离心管中冷冻干燥;

③将步骤(2)②获得三个离心管中分别加入40 μ L浓度为10mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于30℃水浴中脗化反应60 min; 再加入50 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于35℃水浴进行硅烷化反应30 min;

所述提取液为体积分数为70%的甲醇水溶液;

④GC-TOF/MS检测:

将1 μ L步骤(2)③获得的样品进到气相色谱仪中, 色谱柱为DB-5MS, 所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度为250℃, 载气为高纯氦气, 恒压80KPa, 分流比3: 1, 柱温箱升温程序为: 初始50℃, 保持3 min, 以4℃/min的升到260℃, 保持3 min, 使用EI电离源, 源温230℃, 检测器电压2300 V, 电离电压60 eV, 电流30 μ A; 质谱检测范围50-800 m/z; 小分子代谢物的鉴定使用NIST 2005数据库, 质谱数据的处理和代谢物相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到小分子代谢物的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)④获得的维生素C生产菌株传代过程的小分子代

谢物的相对含量数据进行Pareto预处理;

②用SIMCA-P 11.5软件对预处理后的数据进行主成分分析,得到区分不同传代时间维生素C生产菌株的小分子代谢物标志物;

(4) 过程分析

将小分子代谢物标志物的含量按照不同传代时间制成图表,观察并分析小分子代谢物标志物变化的规律,检测出维生素C生产菌株传代过程中细胞内小分子代谢物的变化。

实施例6-3

一种分析维生素C生产菌株传代过程中小分子代谢物变化的方法,包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的500 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和500 μ L保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 35℃, 培养24;

② 种子培养:

将经步骤(1) ①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在35℃, 280 rpm摇床振荡培养24, 分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} CFU/mL, 在35℃, 280 rpm摇床振荡培养, 以24h为传代周期, 以体积比为10%为传代比接入新的种子培养基中, 传代150天得到混菌细胞, 在传代0-150天中选定4个时间取样, 取4个样, 分别在第0、50、100和第150天取4个样;

③分纯:

将步骤(1)②获得的4个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上, 35℃培养24 h; 再分别转入新的种子培养基, 在35℃, 280 rpm摇床振荡培养24 h, 分别得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液; 保藏于体积浓度为30%的甘油水溶液中;

④发酵:

将步骤(1)③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌, 分别接种到新的种子培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^{10} CFU/mL, 进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^{11} CFU/mL, 在35℃, 280 rpm摇床振荡培养10;

(2) 胞内小分子代谢物样品的制备和测定:

①各取在步骤(1)④获得的三种细胞悬液200 mL, 分别在3000 rpm离心3 min, 去除上清液, 保留细胞, 用pH=7.4的磷酸盐缓冲液洗细胞3次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤(2)①所得细胞用液氮研磨细胞的方法制成干粉, 各称取60 mg细胞干粉, 分别置于三个离心管中, 再加入1.5 mL提取液, 加入70 μL浓度为0.060 mg/mL氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物, 混匀; 3000 rpm离心3 min, 取上清液置于三个新的离心管中冷冻干燥;

③将步骤(2)②获得三个离心管中分别加入100 μL浓度为30 mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于40℃水浴中脗化反应120 min; 再加入100 μL N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于40℃水浴进行硅烷化反应60 min;

所述提取液为体积分数为60%的甲醇水溶液;

④GC-TOF/MS检测:

将1 μL 步骤(2)③获得的样品进到气相色谱仪中, 色谱柱为DB-5MS, 所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度为280 $^{\circ}\text{C}$, 载气为高纯氦气, 恒压100KPa, 分流比20: 1, 柱温箱升温程序为: 初始80 $^{\circ}\text{C}$, 保持6 min, 以8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升到300 $^{\circ}\text{C}$, 保持8 min, 使用EI电离源, 源温260 $^{\circ}\text{C}$, 检测器电压2700V, 电离电压80 eV, 电流50 μA ; 质谱检测范围50-800 m/z; 小分子代谢物的鉴定使用NIST 2005数据库, 质谱数据的处理和代谢物相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到小分子代谢物的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)④获得的维生素C生产菌株传代过程的小分子代谢物的相对含量数据进行Pareto预处理;

②用SIMCA-P 11.5软件对预处理后的数据进行主成分分析, 得到区分不同传代时间维生素C生产菌株的小分子代谢物标志物;

(4) 过程分析

将小分子代谢物标志物的含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析小分子代谢物标志物变化的规律, 检测出维生素C生产菌株传代过程中细胞内小分子代谢物的变化。

实验证明, 实施例6-2和实施例6-3与实施例6-1的结果类似。

本发明所采用的固体培养基、种子培养基的组成选自中国专利申请号为201110314740.9公开的培养基, 例如:

固体培养基: 按比例称取L-山梨糖20 g, 玉米浆3 g, 牛肉膏3 g, 酵母浸粉3 g, 尿素1 g, 蛋白胨10 g, 琼脂20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g, 加水至1 L, 调pH=6.8, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min, 制成固体培养基。

种子培养基: 按比例称取L-山梨糖20 g, 玉米浆3 g, 牛肉膏3 g, 酵母浸粉3 g, 尿素1 g, 蛋白胨10 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, CaCO_3 1 g, 加水至1 L, 调pH=6.8, 121°C灭菌20 min, 制成种子培养基。

本发明所采用的菌株巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) CGMCC No 1.459和氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*) CGMCC No 1.110只用于说明本发明, 但并不用于限定本发明, 实验证明, 巨大芽孢杆菌、氧化葡萄糖杆菌的其它菌株也可以用于本发明。

实施例7

含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌在提高2-酮基-L-古龙酸混菌发酵性能中的应用。其特征是包括如下步骤:

(1) 山梨酮脱氢酶基因的体外扩增:

采用细菌基因组提取试剂盒提取氧化葡萄糖杆菌的基因组; 取该基因组溶液1 μl , 5 $\times$ FastPfu buffer 4 μl , 20mM的dNTP 2 μl , 20nM的引物1 0.4 μl , 20nM的引物2 0.4 μl , 无菌水11.8 μl , FastPfu酶 0.4 μl , 在PCR管中混合均匀; 将PCR管放入PCR仪中进行扩增循环, 扩增程序为: 95°C 2min; 95°C 20s, 55°C 35s, 72°C 2min, 共25个循环; 72°C 5min; 4°C 30min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将PCR产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化PCR扩增产物。

所述引物1的序列为: 5'-

CCCAAGCTTGACTGGCAGCAGCGCAAC-3'

所述引物2的序列为: 5'-

CGCGGATCCCCGTGATAGCGGCACATGTC-3'

(2) 编码山梨酮脱氢酶基因载体的构建:

取步骤(1)获得的PCR扩增产物溶液8 μ l, 与1 μ l 10 $\times$ digest buffer, 0.5 μ l HindIII酶, 0.5 μ l BamHI酶混合均匀, 在37 $^{\circ}$ C条件下进行酶切反应2小时; 反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将酶切产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切PCR产物。取载体pBBR1MCS溶液8 μ l, 与1 μ l 10 $\times$ digest buffer, 0.5 μ l KpnI酶, 0.5 μ l HindIII酶混合均匀, 在37 $^{\circ}$ C条件下进行酶切反应2小时; 反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将酶切产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切载体产物。取酶切PCR产物5.5 μ l, 酶切载体产物3 μ l, 10 $\times$ ligase buffer 1 μ l, DNA ligase 0.5 μ l, 混合均匀, 在22 $^{\circ}$ C条件下进行连接反应30min。将连接产物用化学转化法转化入大肠杆菌DH5 α 中, 涂布于含抗生素的LB固体培养基上, 在37 $^{\circ}$ C条件下培养12h。培养后获得的单菌落在LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C培养12h, 用质粒小量提取试剂盒提取质粒, 获得编码山梨酮脱氢酶基因载体。

(3) 编码山梨酮脱氢酶基因载体转化入氧化葡萄糖杆菌

将氧化葡萄糖杆菌涂布在固体培养基上, 在30 $^{\circ}$ C条件下培养48小时; 用2ml无菌水将菌体洗下, 冰浴10min, 4 $^{\circ}$ C, 4000rpm离心5min后收集细胞, 用预冷的无菌水洗一次, 10%甘油洗两次后, 100 μ l 10%甘油重悬细胞; 与步骤(2)所得编码山梨酮脱氢酶基因载体的水溶液10 μ l混合均匀置于电转杯中, 冰浴5min, 将电转杯置于电转仪中1800V电击; 电击产物与900 μ l种子培养基混合均匀, 在30 $^{\circ}$ C, 140rpm条件下培养2小时, 将培养物涂布于固体培养基上, 在30 $^{\circ}$ C条件下培养4天, 获得的单菌落转入种子培养基中, 在30 $^{\circ}$ C, 250rpm条件下培养, 获得含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌。

所述固体培养基为: L-山梨糖20g, 玉米浆3g, 牛肉膏3g, 酵母浸粉3g, 尿素1g, 蛋白胨10g, 琼脂20g, KH₂PO₄1g, MgSO₄0.2g,

CaCO₃1g, 加水至1L, 调pH为6.8, 121℃灭菌20min。

所述种子培养基为: L-山梨糖20g, 玉米浆3g, 牛肉膏3g, 酵母浸粉3g, 尿素1g, 蛋白胨10g, KH₂PO₄1g, MgSO₄0.2g, CaCO₃1g, 加水至1L, 调pH为6.8, 121℃灭菌20min。

(4) 混菌发酵

将步骤(3)获得的含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌接种到发酵培养基中, 使含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的密度为 4×10^8 cfu/ml, 使巨大芽孢杆菌的密度为 4×10^8 cfu/ml, 在30℃, 250rpm条件下培养120h, 获得2-酮基-L-古龙酸。

所述发酵培养基为: 按比例称取L-山梨糖80g, 玉米浆20g, 尿素12g, KH₂PO₄1g, MgSO₄0.5g, CaCO₃1g, 加水至1L, 调pH为7.0, 121℃灭菌20min。

2-酮基-L-古龙酸和L-山梨糖含量测定:

采用高效液相色谱法(HPLC)。

样品制备: 取发酵培养不同时间的发酵液1mL于1.5mL离心管中, 10000r/min转速离心3min, 取上清100μL于1.5mL离心管中, 并加入900μL流动相(5mM H₂SO₄)得到稀释十倍的样品。振荡混匀后, 用0.22μm的纤维素微孔滤膜过滤样品, 得到待测样品。

高效液相色谱条件: 色谱柱: bio-rad HPX-87H, 流动相: 5mM H₂SO₄, 流速: 0.6mL/min, 柱温: 65℃, 示差检测器。

实施例7-1检测结果见图30。

图例: ◇: 原始氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌混菌发酵;

Δ: 含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌混菌发酵。

原始氧化葡萄糖杆菌与巨大芽孢杆菌利用实施例7-1步骤(2)的

发酵条件进行搭配混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到87%；用实施例7-1的方法获得的含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌混菌发酵的2-酮基-L-古龙酸产率达到98%；2-酮基-L-古龙酸产率提高了12.6%。

实施例8-1

一种检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 细胞内蛋白质的测定：

①细胞收集及淬灭：

取3份氧化葡萄糖杆菌以8%的体积比分别接种到发酵培养基A中，另取3份所述氧化葡萄糖杆菌以8%的体积比分别接种到发酵培养基B中，将两种接种后的培养基在28℃，转速为200rpm条件下培养发酵，在发酵过程中选取1 h、15 h为取样点取出发酵液样品，在4℃下，以4000rpm的转速离心，收集下层的细胞，并用pH为7.2的磷酸盐缓冲液清洗，立即用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨用于破碎细胞，获得3份从培养基A中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞，3份从培养基A中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞，3份从培养基B中发酵1h收集淬灭的破碎细胞，3份从培养基B中发酵15h收集淬灭的破碎细胞；

所述发酵培养基A为：80 g·L⁻¹ 山梨糖，20 g·L⁻¹ 玉米浆，1 g·L⁻¹ KH₂PO₄，0.2 g·L⁻¹ MgSO₄和12 g·L⁻¹ 尿素，余量为水；

所述发酵培养基B为：80 g·L⁻¹ 山梨糖，20 g·L⁻¹ 玉米浆，1 g·L⁻¹ KH₂PO₄，0.2 g·L⁻¹ MgSO₄，and 12 g·L⁻¹ 尿素，0.8~1.5mg·mL⁻¹ 的谷胱甘肽，余量为水；

②提取细胞内蛋白：

取步骤①获得的破碎细胞，每份100mg 分别置于离心管中，每管加入0.5ml细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎20s；加入5 μ L的质量比为2:1的DNase I /RNaseA酶混合溶液，混匀，4℃静置反应10min；加入5 μ L 80mM的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置1h；15000rpm离心25min；取上清，得到蛋白溶液。所述细胞裂解液为：8 mol $\cdot$ L⁻¹ 尿素，质量浓度为4% 的(3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸) (CHAPS)，40 mM 的Tris，余量为水；

③蛋白浓度测定：

采用Bradford试剂盒，将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝G-250溶液中，测定步骤②获得的各个蛋白溶液在595nm处的吸光值，建立标准曲线；测定各个蛋白溶液蛋白的浓度；

④沉淀蛋白

分别取包含50 μ g蛋白的步骤③获得的各个蛋白溶液，加入4倍体积的-20℃的丙酮，沉淀12h；离心，弃上清，沉淀用-20℃的体积浓度为70%的丙酮水溶液洗涤；冷冻干燥备用；-80℃贮存；

⑤蛋白还原以及酶解

向步骤④中所得的各个干燥蛋白中，添加10 μ L 40mM的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白；

加入1 μ L 三(2-羧乙基)膦，在50℃反应1h，对各个蛋白进行还原化处理；然后加入1 μ L 甲基硫代磺酸甲酯，室温反应10min，终止还原反应；

向上述溶液中，加浓度为0.2 μ g/ μ L的胰蛋白酶水溶液30 μ L，37℃反应12小时，进行蛋白酶解；

⑥蛋白标记

在每个经步骤⑤酶解的蛋白酶解液中分别加入一管用60~80 μ L乙醇溶解的iTRAQ标记试剂，室温反应1h；

⑦溶液混合

将步骤溶液⑥获得的溶液混合得3份混合液，使每个混合液中都包括从培养基A中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基A中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基B中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白和从培养基B中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白；于-20℃保存；

⑧差异表达蛋白鉴定

将⑦中得到的混合液，进行Q-Tof质谱鉴定，得到蛋白谱，通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白；

(2) 主成分分析：

采用matlab对步骤(1)⑧中得到的数据进行标准化后，进行主成分分析，得到具有不同变化规律的数据类别，获得候选差异蛋白；

(3) 过程分析

将步骤(2)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表，观察并分析这些蛋白变化的规律，进而发现谷胱甘肽在提高氧化葡萄糖杆菌产2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

添加谷胱甘肽后，氧化葡萄糖杆菌发酵过程中，胞内鉴定到的蛋白如表1所示。

表8-1 氧化葡萄糖杆菌胞内蛋白

glutamate synthase [NADPH] large chain	hydroxyacylglutathione hydrolase
glutamyl-tRNA(Gln) and/or aspartyl-tRNA(Asn) amidotransferase, A	ATP synthase F1, delta subunit

subunit	
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	ATP synthase F1, alpha subunit
bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein	ATP synthase F1, beta subunit
uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein yejF	ATP synthase F1, epsilon subunit
sulfate adenylyltransferase subunit 2 (Sulfate adenylyltransferase) (SAT) (ATP-sulfurylase small subunit)	10 kDa chaperonin 1 (Protein Cpn10 1) (groES protein 1)
putative N-acetylmannosamine-6-P epimerase	chaperonin GroL
coenzyme PQQ biosynthesis protein C	thioredoxin-disulfide reductase
glutamine transport ATP-binding protein glnQ	bacterioferritin
ribosomal protein L17	ATP synthase B/B' CF(0) family protein
DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit	ketol-acid reductoisomerase
30S ribosomal protein S11 (BS11)	yqey-like family protein
30S ribosomal protein S13	O-succinylhomoserine sulfhydrylase
ribosomal protein L15	bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein
ribosomal protein L30	basic membrane family protein
ribosomal protein S5	delta-aminolevulinic acid dehydratase (Porphobilinogensynthase) (ALAD) (ALADH)

ribosomal protein L18	beta-ketoacyl synthase, C-terminal domain protein
50S ribosomal protein L6 (BL10)	invasion associated locus B (IalB) family protein
ribosomal protein S8 family protein	single-stranded DNA-binding protein (SSB) (Helix-destabilizing protein)
2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	his Kinase A (phosphoacceptor) domain protein
ribosomal protein S14p/S29e family protein	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 1 (NADH-dependent enoyl-ACP reductase 1)
50S ribosomal protein L5 (BL6)	cold shock protein cspB (Major cold shock protein)
ribosomal protein L24	sorbose/sorbose dehydrogenase
ribosomal protein S17 family protein	trigger factor
ribosomal protein L29	ribosomal protein L9
ribosomal protein S3	ribosomal protein S18
ribosomal protein L22	ribosomal protein S6
ribosomal protein S19	acyl carrier protein
ribosomal protein L2	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
ribosomal protein L23 family protein	deoC/LacD family aldolase family protein
50S ribosomal protein L4 (BL4)	cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/CLD family protein
ribosomal protein L3 family protein	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase, E2 component of

	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) complex
ribosomal protein S10	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring), E1 component
translation elongation factor Tu	glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily protein
translation elongation factor G	peptidase family M20/M25/M40 family protein
ribosomal protein S7	succinyl-CoA synthetase beta chain (SCS-beta)
DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	malate dehydrogenase, NAD-dependent
DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] (SSDH)
ribosomal protein L7/L12	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit
ribosomal protein L1	nitroreductase family protein
ribosomal protein L11	superoxide dismutase [Fe]
transcription termination/antitermination factor NusG	sorbose/sorbose dehydrogenase
luciferase-like monooxygenase family protein	preprotein translocase, YajC subunit
ribonuclease R	protein-export membrane protein SecF
2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	aconitate hydratase 1
hypothetical protein	integration host factor, alpha subunit
cytochrome c family protein	ribosomal protein L32

sorbose/sorbose dehydrogenase	orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) (OPRTase)
ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein	ATP-dependent protease La
aminopeptidase 2 (Aminopeptidase II) (AP-II)	ribosomal protein S2
sorbose/sorbose dehydrogenase	translation elongation factor Ts
YCII-related domain protein	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein
ribosomal subunit interface protein	uncharacterized protein family (UPF0051) family protein
arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	feS assembly ATPase SufC
peptidase family M3 family protein	GTP-binding protein TypA/BipA
cobalamin-independent synthase, Catalytic domain protein	alanyl-tRNA synthetase
translation initiation factor IF-2	protein RecA
zinc-binding dehydrogenase family protein	bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein
argininosuccinate synthase	ABC transporter family protein
transcription termination factor Rho	bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein
protein-export chaperone SecB	uncharacterized peroxidase-related enzyme family protein
tim44-like domain protein	bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein

thioredoxin	NLPA lipofamily protein
double-strand break repair protein AddB	bacterial extracellular solute-binding family protein
adenosylhomocysteinase	glycine cleavage system H protein
chain D, Crystal Structure Of Uncharacterized Protein	6-phosphogluconolactonase
branched-chain amino acid aminotransferase	nucleoside diphosphate kinase family protein
hypothetical protein	cytosol aminopeptidase family, catalytic domain protein
response regulator	ribosomal protein S9/S16 family protein
uncharacterized protein-like protein	ribosomal protein L13
thiamin/thiamin pyrophosphate ABC transporter, thiamin/thiamin pyrophosphate-binding protein	NAD
chorismate synthase	NAD(P)(+) transhydrogenase (AB-specific), alpha subunit
DNA-binding protein HU 1 (DNA-binding protein II) (HB)	cobaltochelatase, CobS subunit
chaperone protein DnaJ	NADPH-dependent FMN reductase family protein
chaperone protein DnaK	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein
ribosomal protein S15	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase
S1 RNA binding domain protein	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpX

hypothetical protein	clp protease family protein
D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain protein	conserved hypothetical protein
NAD(P)H:quinone oxidoreductase	transaldolase, putative
phosphoserine aminotransferase	DNA topoisomerase I
phosphoglycerate dehydrogenase	histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein
ATP-dependent chaperone ClpB	peptidase T
resolvase, N terminal domain protein	flavin reductase like domain protein
antirestriction protein	glucans biosynthesis protein G
uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein yehX	sorbose/sorbose dehydrogenase
AGR_L_2804p, nitrilotriacetate monooxygenase component A homolog ytnJ - Bacillus subtilis	conserved hypothetical protein
YKOF-related family protein	oppF
glutathione S-transferase, C-terminal domain protein	bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein
binding-protein-dependent transport system inner membrane component family protein	H-NS histone family protein
glutathione synthase	ribosomal protein S21
acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, beta subunit	N-6 DNA Methylase family protein
ompA family protein	ribosomal protein L27
nitrogen regulatory protein P-II 1	ribosomal protein L21

dihydrodipicolinate synthase	large conductance mechanosensitive channel protein
aldo/keto reductase family protein	conserved hypothetical protein
DNA-directed RNA polymerase, omega subunit	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit
aldo/keto reductase family protein	pyruvate carboxylase
riboflavin biosynthesis protein RibD	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	conserved hypothetical protein
aldo/keto reductase family protein	ribosomal protein L20
periplasmic binding proteins and sugar binding domain of the LacI family protein	hsp20/alpha crystallin family protein
putative non-heme chloroperoxidase (Chlorideperoxidase)	phosphate ABC transporter, ATP-binding protein
ATPase	hemolysin-type calcium-binding region
carbamoyl-phosphate synthase large chain (Carbamoyl-phosphate synthetase ammonia chain)	aminotransferase class IV family protein
ribosomal protein S1	translation initiation factor IF-1
integration host factor, beta subunit	carboxynorspermidine decarboxylase
ribosomal protein L25, Ctc-form	phosphopyruvate hydratase
L-lactate dehydrogenase [cytochrome]	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
membrane-bound aldehyde dehydrogenase [pyrroloquinoline-quinone] (ALDH)	phosphoribosylformylglycinamide synthase II
glutamine synthetase, catalytic domain	transketolase

protein	
isoquinoline 1-oxidoreductase subunit alpha	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I
adenylosuccinate synthetase	tellurite resistance protein
modulator of DNA gyrase family protein	protein TolR
cytochrome c oxidase, subunit II	calcineurin-like phosphoesterase family protein
hydantoinase/oxoprolinase family protein	serine hydroxymethyltransferase (Serine methylase)(SHMT)
threonyl-tRNA synthetase	ribosomal protein L28
mgpS	csbD-like family protein
hflC protein	glutathione S-transferase, C-terminal domain protein
protease Do family protein	NADPH-dependent FMN reductase family protein
immunoreactive 28 kDa outer membrane protein	nitrogen regulatory protein P-II (PII signal transducing protein)
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	glutamine synthetase, type I
ribosomal protein L31	aspartate kinase, monofunctional class
prolyl-tRNA synthetase	catalase/oxidase HPI
ribosomal protein L19	metE
hypothetical protein	bacterial extracellular solute-binding proteins, family 5 Middle family protein
glutamyl-tRNA synthetase	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (IGPD)

Cold-shock DNA-binding domain protein	conserved hypothetical protein
lysyl-tRNA synthetase	insulinase (Peptidase family M16) family protein
urease, alpha subunit	ahpC/TSA family protein
ribosomal protein S16	uroporphyrinogen decarboxylase
urease accessory protein UreG	ribosomal protein S4
putative lipoprotein	

如图31A所示，氧化葡萄糖杆菌在添加谷胱甘肽15h后，蛋白表达状况与空白对照有明显差异，通过对具体差异进行分析，得到一系列生物标志物，包括硫胺素焦磷酸/硫胺素转运蛋白（thiB）、硫胺素转运蛋白（TkoF）、寡肽转运蛋白（bacterial extracellular solute-binding protein, family 5）等。谷胱甘肽作为一种三肽，是微生物体内含量最高的硫醇类物质，可以通过寡肽转运途径进入细胞。谷胱甘肽氧化型与还原型谷胱甘肽的转化对于维持微生物的氧化还原状态有重要作用，此转化过程需要NADPH参与，磷酸戊糖途径的提高可以间接利于维持氧化葡萄糖杆菌的氧化还原平衡状态，使得其有较好的生长及产酸环境。硫胺素焦磷酸，是三羧酸循环中丙酮酸脱氢酶、酮戊二酸脱氢酶、磷酸戊糖途径中的转酮醇酶的重要辅酶，在中心碳代谢中发挥着重要作用。通过主成分分析，添加谷胱甘肽后，负责硫胺素转运的两个蛋白均发生较大程度上调，说明谷胱甘肽的添加，使得细胞转运硫胺素的能力提高。如图32所示，这两个硫胺素转运蛋白及丙酮酸脱氢酶、酮戊二酸脱氢酶、转酮醇酶的表达量均在添加谷胱甘肽15h后有明显提高。同时，通过对检测到的蛋白进行定量分析，发现添加谷胱甘肽15h后，氧化葡萄糖杆菌三羧酸循环、磷酸戊糖途径中的关键酶，表达量均有上调，如图

33所示,可能与硫胺素焦磷酸转运增强有关。说明氧化葡萄糖杆菌可能存在硫胺素或硫胺素焦磷酸合成不足或者缺陷,这就为以后进行分子生物学改造,弥补这一缺陷,提供了依据。

综上所述,谷胱甘肽对氧化葡萄糖杆菌生长及2-酮-L-古龙酸生产有重要作用,结合相关蛋白变化、生长曲线及产酸情况,说明谷胱甘肽有利于促进氧化葡萄糖杆菌对硫胺素、硫胺素焦磷酸的转运,从而获得提高的三羧酸循环、磷酸戊糖途径,进一步获得还原力NADPH,为细胞调节胞内氧化还原状态提供能量。这一发现,为后续对氧化葡萄糖杆菌进行基因改造提供了依据,也为工业混菌过程研究及控制提供了基础。

实施例8-2

一种检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化的方法,包括如下步骤:

(1) 细胞内的蛋白质进行测定:

①细胞收集及淬灭:

取4份氧化葡萄糖杆菌以10%的体积比分别接种到发酵培养基A中,另取4份所述氧化葡萄糖杆菌以10%的体积比分别接种到发酵培养基B中,将两种接种后的培养基在30℃,转速为220rpm条件下培养发酵,在发酵过程中选取1 h、15 h为取样点取出发酵液样品,在4℃下,以5000rpm的转速离心,收集下层的细胞,并用pH为7.3的磷酸盐缓冲液清洗,用液氮淬灭,终止代谢反应;用液氮研磨用于破碎细胞,获得4份从培养基A中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞,4份从培养基A中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞,4份从培养基B中发酵1h收集淬灭的破碎细胞,4份从培养基B中发酵15h收集淬灭的破碎细胞;发酵培养基A和发酵培养基B同实施例8-1;

②提取细胞内蛋白:

取步骤①获得的破碎细胞，每份150mg 分别置于离心管中，每管加入1ml细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎40s；加入10 μ L的质量比为3:1的DNase I /RNaseA酶混合溶液，混匀，4 $^{\circ}$ C静置反应15min；加入12 μ L 100mM的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4 $^{\circ}$ C静置2h；15000rpm离心30min；取上清，得到蛋白溶液；所述细胞裂解液同实施例8-1；

③蛋白浓度测定：

采用Bradford试剂盒，将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝G-250溶液中，测定步骤②获得的各个蛋白溶液在595nm处的吸光值，建立标准曲线；测定各个蛋白溶液蛋白的浓度；

④沉淀蛋白

分别取包含100 μ g蛋白的步骤③获得的各个蛋白溶液，加入5倍体积的-30 $^{\circ}$ C的丙酮，沉淀15h；离心，弃上清，沉淀用-30 $^{\circ}$ C的体积浓度为80%的丙酮水溶液洗涤；冷冻干燥备用；-80 $^{\circ}$ C贮存；

⑤蛋白还原以及酶解

向步骤④所得的各个干燥蛋白中，添加20 μ L50mM的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白；

加入2 μ L 三（2-羧乙基）膦，在55 $^{\circ}$ C反应1h，对各个蛋白进行还原化处理；然后加入1.5 μ L甲基硫代磺酸甲酯，室温反应12min，终止还原反应；

向上述溶液中，加浓度为0.25 μ g/ μ L的胰蛋白酶水溶液25 μ L，37 $^{\circ}$ C反应15小时，进行蛋白酶解；

⑥蛋白标记

在每个经步骤⑤酶解的蛋白酶解液中分别加入一管用70 μ L乙醇溶解的iTRAQ标记试剂，室温反应1h；

⑦溶液混合

将步骤溶液⑥获得的溶液混合得4份混合液，使每个混合液中都包括从培养基A中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基A中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基B中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白和从培养基B中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白；于-20℃保存；

⑧差异表达蛋白鉴定

将⑦中得到的混合液，进行Q-Tof质谱鉴定，得到蛋白谱，通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白；

(2) 主成分分析：

采用matlab对步骤(1)⑧中得到的数据进行标准化后，进行主成分分析，得到具有不同变化规律的数据类别，获得候选差异蛋白；

(3) 过程分析

将步骤(2)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表，观察并分析这些蛋白变化的规律，进而发现谷胱甘肽在提高氧化葡萄糖杆菌产2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

通过实验证明，结果与实施例8-1相似。

实施例8-3

一种检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化的方法，包括如下步骤：

①细胞收集及淬灭：

取5份氧化葡萄糖杆菌以16%的体积比分别接种到发酵培养基A中，另取5份所述氧化葡萄糖杆菌以16%的体积比分别接种到发酵培养基B中，将两种接种后的培养基在32℃，转速为250rpm的条件下培养发酵，在发酵过程中选取1 h、15 h为取样点取出发酵液样品，

在4℃下，以6000rpm的转速离心，收集下层的细胞，并用pH为7.4的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞，获得5份从培养基A中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞，5份从培养基A中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞，5份从培养基B中发酵1h收集淬灭的破碎细胞，5份从培养基B中发酵15h收集淬灭的破碎细胞；发酵培养基A和发酵培养基B同实施例8-1；

②提取细胞内蛋白：

取步骤①获得的破碎细胞，每份200mg 分别置于离心管中，每管加入2ml细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎50s；加入15μL的质量比为4:1的DNase I /RNaseA酶混合溶液，混匀，4℃静置反应30min；加入15μL120mM的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置3h；15000rpm离心40min；取上清，得到蛋白溶液；细胞裂解液同实施例8-1；

③蛋白浓度测定：

采用Bradford试剂盒，将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝G-250溶液中，测定步骤②获得的各个蛋白溶液在595nm处的吸光值，建立标准曲线；测定各个蛋白溶液蛋白的浓度；

④沉淀蛋白

分别取包含150 μg蛋白的步骤③获得的各个蛋白溶液，加入6倍体积的-40℃的丙酮，沉淀20h；离心，弃上清，沉淀用-40℃的体积浓度为85%的丙酮水溶液洗涤；冷冻干燥备用；-80℃贮存；

⑤蛋白还原以及酶解

向步骤④所得的各个干燥蛋白中，添加40μL60mM的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白；

加入4μL 三（2-羧乙基）膦，在60℃反应1h，对各个蛋白进行还原化处理；然后加入2μL甲基硫代磺酸甲酯，室温反应15min，

终止还原反应；

向上述溶液中，加浓度为 $0.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液 $30\mu\text{L}$ ， 37°C 反应18小时，进行蛋白酶解；

⑥蛋白标记

在每个经步骤⑤酶解的蛋白酶解液中分别加入一管用 $80\mu\text{L}$ 乙醇溶解的iTRAQ标记试剂，室温反应1h；

⑦溶液混合

将步骤溶液⑥获得的溶液混合得5份混合液，使每个混合液中都包括从培养基A中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基A中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基B中发酵1 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白和从培养基B中发酵15 h收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白；于 -20°C 保存；

⑧差异表达蛋白鉴定

将⑦中得到的混合液，进行Q-Tof质谱鉴定，得到蛋白谱，通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白；

(2) 主成分分析：

采用matlab对步骤(1)⑧中得到的数据进行标准化后，进行主成分分析，得到具有不同变化规律的数据类别，获得候选差异蛋白；

(3) 过程分析

将步骤(2)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表，观察并分析这些蛋白变化的规律，进而发现谷胱甘肽在提高氧化葡萄糖杆菌产2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

通过实验证明，结果与实施例8-1相似。

实施例9-1

寻找发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法，包括下述步骤：

(1) 对11批不同的玉米浆进行化学成分测定：

① 样品的制备：

将1g均匀的玉米浆样品置于离心管中，离心收集上清；将获得的上清液用超纯水稀释20倍，取20 μ L置于另一离心管中，加入30 μ L的0.040mg/mL氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标。冷冻干燥后，加入50 μ L浓度为20mg/mL甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶于30 $^{\circ}$ C水浴中肟化反应90min。反应结束后再加入80 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于37 $^{\circ}$ C水浴进行硅烷化反应30min；

② 气相色谱-飞行时间质谱联用仪测定方法：

将1 μ L步骤①获得的样品进到气相色谱中，色谱柱为DB-5MS，所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d.，进样口温度250 $^{\circ}$ C，载气为高纯氦气，流速0.6ml/min，分流比20:1，柱温箱升温程序为：初始70 $^{\circ}$ C保持2min，以5 $^{\circ}$ C/min的速度升到290 $^{\circ}$ C，保持10min，使用EI电离源，源温280 $^{\circ}$ C，检测器电压2500V，电离电压80eV，电流50 μ A；质谱检测范围50-800m/z；成分的鉴定使用NIST数据库，质谱数据的处理和成分相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件；并通过对色谱峰面积积分处理，并与内标物的峰面积对照，得到发酵用原料玉米浆中成分的相对含量；一共检测到80多种化合物，其中能鉴定到58种，见表1。

(2) 偏最小二乘法判别分析：

① 将步骤(1)获得的数据进行标准化和Pareto预处理，以消除同一样品中不同成分含量的较大差异对偏最小二乘判别分析结果的影响。

②用SIMCA-P 11.5软件对预处理后的数据进行偏最小二乘判别分析,得到用于表达样本相似性和差异性的得分图、载荷图和VIP图;在得分图中,样品点相互之间距离越近,说明样本的相似度越大,距离越远,说明样本差异越大,可用来寻找不同批次玉米浆中各物质的相似和差异;在载荷图中,每个点表示每个物质,距离中心点距离越远的物质,其不同批次的含量差异越大,便可作为玉米浆的质量控制指标;VIP表示每个物质对区分样本的贡献大小,VIP>1可以认为是对玉米浆的质量影响最为显著的指标。

从图34-1(不同批次玉米浆主成分分析t[1]-t[2]图)中可以得到:11批玉米浆可以被明显区分为三类,即批次1和2聚在一起,批次3、4和11聚在一起,其余批次聚为一类。由图34-2(不同批次玉米浆主成分分析t[1]-u[1]图)可知,批次1和2的u[1]值最大,批次3、4和11的u[1]值最小,其余批次的u[1]值在原点附近,由此分为三类。这就表明即使玉米浆检测符合现行的质量检查,但不同批次的玉米浆依然存在较大的差异,对发酵有较大的影响。

从图35中可以找到区分不同批次玉米浆的质量的物质,在图32-1(不同批次玉米浆w*c[1]-w*c[2]散点图)根据距离中心点越远,物质的含量差异越大的原则,可以初步筛选不同批次玉米浆含量差异较大的物质;在图32-2(不同批次玉米浆第一主成分的p-p(corr) S图)根据 $|\text{corr}| > 0.5$ 的原则,进一步筛选可以区分不同批次玉米浆的物质, $p(\text{corr}) > 0.5$ 表明该物质对图34中聚类正半轴影响较大, $p(\text{corr}) < -0.5$ 表明该物质对图34中聚类负半轴影响较大;根据图33来确定各物质的贡献大小,VIP值越大表示各物质对聚类分析的贡献也越大,一般以VIP>1为原则选择标志物。综合三张图的分析,从而最终可以确定区别不同批次玉米浆质量的主要物质有16个,依次为葡萄糖、乳酸、脯氨酸、磷酸、半乳糖、丙氨酸、果糖、5-酮

脯氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、柠檬酸、谷氨酸和赖氨酸。进一步分析发现，乳酸和磷酸含量差异主要由玉米浸渍中微生物发酵引起的，是不同厂家玉米浆工艺差异而造成的；脯氨酸是玉米中的主要氨基酸成分，其差异可能由于不同厂家使用的玉米产地或季节不同而造成的；这些质量差异标志物主要是为微生物提供营养物质的，另外脯氨酸和甘氨酸在发酵过程中还对微生物的渗透压具有重要影响。由于前九个物质影响尤为显著，因此可以考虑作为玉米浆的质量控制指标。

表9-1：实施例9-1 所测得的玉米浆中的化学成分的种类

标号	代谢物	保留时间 /min	标号	代谢物	保留时间 /min
1	乳酸	7.20	30	核糖	23.31
2	2-羟乙酸	7.62	31	天冬酰胺	23.45
3	丙氨酸	8.34	32	核糖醇	24.29
4	乙二酸	9.38	33	木糖醇	24.62
5	缬氨酸	11.50	34	1, 4-丁二胺	24.95
6	尿素	12.38	35	2-酮基葡萄糖酸	25.60
7	磷酸	13.09	36	次黄嘌呤	26.50
8	甘油	13.21	37	鸟氨酸	26.78
9	异亮氨酸	13.70	38	柠檬酸	26.85
10	脯氨酸	13.77	39	1, 5-戊二胺	27.17
11	甘氨酸	14.02	40	腺嘌呤	27.80
12	甘油酸	14.76	41	果糖	27.97
13	尿嘧啶	14.91	42	葡萄糖	28.35
14	丁烯二酸	15.37	43	半乳糖	28.26

15	丝氨酸	15.59	44	赖氨酸	29.05
16	苏氨酸	16.27	45	甘露醇	29.29
17	胸腺嘧啶	16.62	46	酪氨酸	29.37
18	β -丙氨酸	17.37	47	阿卓糖	30.24
19	苹果酸	19.03	48	葡萄糖酸	30.77
20	4-羟基-脯氨酸	19.28	49	黄嘌呤	30.96
21	赤藓糖醇	19.52	50	塔洛糖	31.22
22	甲硫氨酸	19.69	51	十六烷酸	31.63
23	5-酮脯氨酸	19.72	52	肌醇	32.36
24	天冬氨酸	19.83	53	鸟嘌呤	33.08
25	4-氨基丁酸	20.02	54	景天庚糖	33.17
26	半胱氨酸	17.37	55	葡萄糖醇	34.63
27	2-氨基辛酸	21.31	56	硬脂酸	35.37
28	谷氨酸	22.32	57	尿苷	38.81
29	苯丙氨酸	22.36	58	鸟苷	43.95

实施例9-2

寻找发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法，包括下述步骤：

(1) 对11批不同的玉米浆进行化学成分测定：

① 样品的制备：

将2g均匀的玉米浆样品置于离心管中，离心收集上清；将获得的上清液用超纯水稀释40倍，取20 μ L置于另一离心管中，加入40 μ L的0.040mg/mL氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标。冷冻干燥后，加入50 μ L 20mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶于35℃水浴中脗化反应120min。反应结束后再加入70 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于35℃水浴，进行硅烷化反应50min；

② 气相色谱-飞行时间质谱联用仪测定方法:

将1 μ l步骤①获得的样品进到气相色谱中, 色谱柱为DB-5MS, 所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度280 $^{\circ}$ C, 载气为高纯氦气, 流速0.6ml/min, 分流比30: 1, 柱温箱升温程序为: 初始80 $^{\circ}$ C保持5 min, 以8 $^{\circ}$ C/min的速度升到300 $^{\circ}$ C, 保持8min, 使用EI电离源, 源温260 $^{\circ}$ C, 检测器电压2700V, 电离电压80eV, 电流50 μ A; 质谱检测范围50-800m/z; 成分的鉴定使用NIST数据库, 质谱数据的处理和成分相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到发酵用原料玉米浆中成分的相对含量。

(2) 偏最小二乘判别分析:

① 将步骤(1)获得的数据进行标准化和Pareto预处理, 以消除同一样品中不同成分含量的较大差异对偏最小二乘判别分析结果的影响。

②用SIMCA-P 11.5软件对预处理后的数据进行偏最小二乘判别分析, 得到用于表达样本相似性和差异性的得分图、载荷图和VIP图; 在得分图中, 样品点相互之间距离越近, 说明样本的相似度越大, 距离越远, 说明样本差异越大, 可用来寻找不同批次玉米浆中各物质的相似和差异; 在载荷图中, 每个点表示每个物质, 距离中心点距离越远的物质, 其不同批次的含量差异越大, 便可作为玉米浆的质量控制指标; VIP表示每个物质对区分样本的贡献大小, VIP>1可以认为是对玉米浆质量影响最为显著的指标。

通过实验证明, 本实施例的方法也可以得到与实施例9-1相似的结果。

实施例9-3

寻找发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法, 包括下述步

骤:

(1) 对11批不同的玉米浆进行化学成分测定:

① 样品的制备:

将0.5g均匀的玉米浆样品置于离心管中, 离心收集上清; 将获得的上清液用超纯水稀释20倍, 取40 μ L置于另一离心管中, 加入30 μ L的0.040mg/mL氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标。冷冻干燥后, 加入70 μ L 浓度为20mg/mL的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶于37 $^{\circ}$ C水浴中脗化反应60min。反应结束后再加入100 μ LN-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于40 $^{\circ}$ C水浴, 进行硅烷化反应20min;

② 气相色谱-飞行时间质谱联用仪测定方法:

将1 μ L步骤①获得的样品进到气相色谱中, 色谱柱为DB-5MS, 所述色谱柱的规格为30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度270 $^{\circ}$ C, 载气为高纯氦气, 流速0.7ml/min, 分流比20: 1, 柱温箱升温程序为: 初始70 $^{\circ}$ C保持3min, 以4 $^{\circ}$ C/min的速度升到290 $^{\circ}$ C, 保持10min, 使用EI电离源, 源温280 $^{\circ}$ C, 检测器电压2500V, 电离电压70eV, 电流40 μ A; 质谱检测范围50-800m/z; 成分的鉴定使用NIST数据库, 质谱数据的处理和成分相对含量的测定使用Masslynx 4.1软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到发酵用原料玉米浆中成分的相对含量。

(2) 偏最小二乘判别分析:

① 将步骤(1)的数据进行标准化和Pareto预处理, 以消除同一样品中不同成分含量的较大差异对偏最小二乘判别分析结果的影响。

②用SIMCA-P 11.5软件对预处理后的数据进行偏最小二乘判别分析, 得到用于表达样本相似性和差异性的得分图、载荷图和VIP图; 在得分图中, 样品点相互之间距离越近, 说明样本的相似度越

大，距离越远，说明样本差异越大，可用来寻找不同批次玉米浆中各物质的相似和差异；在载荷图中，每个点表示每个物质，距离中心点距离越远的物质，其在不同批次的含量差异越大，便可作为玉米浆的质量控制指标；VIP表示每个物质的对区分样本的贡献大小，VIP>1可以认为是对玉米浆质量影响最为显著的指标。

通过实验证明，本实施例的方法也可以得到与实施例9-1相似的结果。

本发明所采用的菌株巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) CGMCC No 1.459和氧化葡糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*) CGMCC No 1.110只用于说明本发明，但并不用于限定本发明，实验证明，巨大芽孢杆菌、氧化葡糖杆菌的其它菌株也可以用于本发明。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 混菌进化传代培养提高 2-酮基-L-古龙酸产量的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 固体培养：

取 10-500 μ L 保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-500 μ L 保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，28-35℃，培养 24-48 小时；

(2) 种子培养：

将经步骤 (1) 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养，24h-48h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} cfu/ml，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养，以 24h-48h 为传代周期，以体积比为 1%-10%为传代比接入新的种子培养基中，传代 50-80 天；

(3) 分纯：

将步骤 (2) 获得的传代培养混菌菌株划线分纯，再分别接种于固体培养基上，28-35℃培养 24-48 小时；再分别转入种子培养基，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 24h-48h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；

(4) 发酵：

将所述原始巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使原始巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使

进化了的氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^9 cfu/ml, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 72h-96h, 获得 2-酮基-L-古龙酸。

2. 一种强化两菌相互作用提高 2-酮基-L-古龙酸产量的方法, 其特征是包括如下步骤:

(1) 固体培养:

取 10-500 μ L 保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中的氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-500 μ L 保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28-35℃, 培养 24-48 小时;

(2) 种子培养:

将经步骤 (1) 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌分别转入种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养, 24h-48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml, 使氧化葡糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} cfu/ml, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养, 以 24h-48h 为传代周期, 以体积比为 1%-10% 为传代比接入新的种子培养基中, 传代 100-200 天;

(3) 分纯:

将步骤 (2) 获得的传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 28-35℃培养 24-48 小时; 再分别转入种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 24h-48h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将所述进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} cfu/ml，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 72h-96h，获得 2-酮基-L-古龙酸或将所述原始巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌接种到发酵培养基中，使原始巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} cfu/ml，使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^9 cfu/ml，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 72h-96h，获得 2-酮基-L-古龙酸。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征是所述固体培养基的制备为：按比例称取 L-山梨糖 10-50g，玉米浆 2-10g，牛肉膏 2-10g，酵母浸粉 2-10g，尿素 0.5-5g，蛋白胨 2-12g，琼脂 10-50g， KH_2PO_4 0.5-5g， MgSO_4 0.1-0.7g， CaCO_3 0.5-5g，加水至 1L，调 pH 为 6.5-7.0，121℃ 灭菌 20min，制成固体培养基；更优选地，所述固体培养基的制备为：按比例称取 L-山梨糖 20g，玉米浆 3g，牛肉膏 3g，酵母浸粉 3g，尿素 1g，蛋白胨 10g，琼脂 20g， KH_2PO_4 1g， MgSO_4 0.2g， CaCO_3 1g，加水至 1L，调 pH 为 6.8，121℃ 灭菌 20min，制成固体培养基；优选地，所述种子培养基制备为：按比例称取 L-山梨糖 10-50g，玉米浆 2-10g，牛肉膏 2-10g，酵母浸粉 2-10g，尿素 0.5-5g，蛋白胨 2-12g， KH_2PO_4 0.5-5g， MgSO_4 0.1-0.7g， CaCO_3 0.5-5g，加水至 1L，调 pH 为 6.5-7.0，121℃ 灭菌 20min，制成种子培养基；更优选地，所述种子培养基制备为：按比例称取 L-山梨糖 20g，玉米浆 3g，牛肉膏 3g，酵母浸粉 3g，尿素 1g，蛋白胨 10g， KH_2PO_4 1g， MgSO_4 0.2g， CaCO_3 1g，

加水至 1L, 调 pH 为 6.8, 121℃灭菌 20min, 制成种子培养基; 优选地, 所述发酵培养基制备为: 按比例称取 L-山梨糖 40-120g, 玉米浆 10-50g, 尿素 10-25g, KH_2PO_4 0.5-3g, MgSO_4 0.2-1.2g, CaCO_3 0.5-5g 加水至 1L, 调 pH 为 6.5-7.5, 121℃灭菌 20min, 制成发酵培养基; 更优选地, 所述发酵培养基制备为: 按比例称取 L-山梨糖 80g, 玉米浆 20g, 尿素 12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 7.0, 121℃灭菌 20min, 制成发酵培养基。

4. 一种检测维生素 C 工业混菌传代不同代数蛋白质变化的方法, 其特征是包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取存于液氮的 10-200 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10-200 μL 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上, 28-35℃, 培养 24-48 小时;

② 种子培养:

将经步骤 (1) ① 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 24h-48h, 得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养, 以 24h-48h 为传代周期, 以体积比为 1%-10% 为

传代比接入新的种子培养基中，传代 100-150 天，选定 3-4 个取样时间取 3-4 个样；

③分纯：

将步骤(1)②获得的 3-4 个样的混菌细胞划线分纯，再分别接种于固体培养基上，28-35℃培养 24 h-48 h；再分别转入种子培养基，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养 24 h-48 h，得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中；

④不同进化时期巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌培养：

将步骤(1)③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到种子培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL，进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL，在 28-35℃，200-280 r/min 摇床振荡培养 10-15h；

(2) 细胞内蛋白质的测定：

①细胞收集及淬灭：

分别将步骤(1)④获得的巨大芽孢杆菌培养物和氧化葡萄糖杆菌培养物，在 4℃下，以 4000~6000rpm 的转速离心，收集下层的细胞，并用 pH 为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞；

②提取细胞内蛋白：

取所述破碎细胞，每份 80~100mg 分别置于离心管中，每管加入 0.5~1mL 细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎 20~50s；加入 5~15μL 质量比为 2~4:1 的 DNase I /RNaseA 酶混合溶液，混匀，4℃静置反应 10~30min；加入 5~15μL 80~120mM 的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃静置 1~3h；15000rpm 离心 25~

40min; 取上清, 得到蛋白溶液;

所述细胞裂解液为: $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 质量浓度为 4% 的 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸, 40 mM 的 Tris, 余量为水;

③蛋白浓度测定:

采用 Bradford 试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝 G-250 溶液中, 测定步骤 (2) ②获得的各个蛋白溶液在 595nm 处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

④沉淀蛋白

分别取舍 50~100 μg 蛋白的步骤 (2) ②获得的各个蛋白溶液, 每份加入 4~6 倍体积的 $-20^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$ 的丙酮, 在 $-20^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$ 的条件下放置 12~20h; 离心, 弃上清, 沉淀用 $-20^{\circ}\text{C} \sim -40^{\circ}\text{C}$ 的体积浓度为 70%-85% 的丙酮水溶液洗涤; 干燥得到蛋白干粉;

⑤蛋白还原以及酶解

分别向各个蛋白干粉中, 添加 20~40 μL 40~60mM 的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白; 再加入 1~4 μL 三(2-羧乙基)膦, 在 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 还原反应 1-1.5h, 再加入 1~2 μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应 10~15min, 终止还原反应; 再加入 20~30 μL 浓度为 0.2~0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶水溶液, 37°C 蛋白酶解 12~18 小时, 得酶解液;

⑥蛋白标记

向步骤 (2) ⑤获得的各个酶解液中分别加入一管用 60~80 μL 乙醇溶解的 iTRAQ 标记试剂, 室温反应 1-1.5h;

⑦溶液混合

将步骤 (2) ⑥标记后的各个来自巨大芽孢杆菌的蛋白溶液混合; 将步骤 (2) ⑥标记后的各个来自氧化葡萄糖杆菌的蛋白溶液混

合；于-40℃保存；

⑧差异表达蛋白鉴定

将(2)⑦中得到的两组混合液，进行 Q-Tof 质谱鉴定，得到蛋白谱，通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白；

(3) 聚类分析：

采用 Expander4.0 对步骤(2)⑧中得到的数据进行标准化后，进行 K-means 聚类，得到具有不同变化规律的数据类别，获得候选差异蛋白；

(4) 过程分析

将步骤(3)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表，观察并分析这些蛋白变化的规律，进而发现混菌进化培养在提高氧化葡萄糖杆菌产 2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

5. 一种分析维生素 C 生产菌株传代过程磷脂组变化的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 固体培养：

取 10–500 μL 保藏于体积浓度为 15–30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和 10–500 μL 保藏于体积浓度为 15–30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，28–35℃，培养 24 h–48 h；

(2) 种子培养：

将经步骤(1)培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在 28–35℃，200–280 rpm 摇床振荡培养，24 h–48 h，得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 – 2×10^{10} cfu/mL，使氧化葡萄糖杆菌

的密度为 2×10^8 – 2×10^{11} cfu/mL, 在 28–35°C, 200–280 rpm 摇床振荡培养, 以 24 h–48 h 为传代周期, 以体积比为 1%–10% 为传代比接入新的种子培养基中, 传代 100–150 天, 在 0–100 或 0–150 天选 3–5 个取样时间取 3–5 个样;

(3) 分纯:

将步骤(2)获得的 3–5 个传代培养混菌菌株划线分纯, 再分别接种于固体培养基上, 28–35°C 培养 24 h–48 h; 再分别转入种子培养基, 在 28–35°C, 200–280 rpm 摇床振荡培养 24 h–48 h, 得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和进化了的氧化葡萄糖杆菌种子液;

(4) 发酵:

将所述进化了的巨大芽孢杆菌、进化了的氧化葡萄糖杆菌以及混合的进化了的巨大芽孢杆菌和进化了的氧化葡萄糖杆菌分别接种到发酵培养基中, 使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 – 2×10^{10} cfu/mL, 使进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 – 2×10^{11} cfu/mL, 在 28–35°C, 200–280 rpm 摇床振荡培养 10 h–15 h;

(5) 细胞磷脂组的提取:

①取在步骤(4)摇床振荡培养 10 h–15 h 的三种细胞悬液 100–200 mL, 1000–3000 rpm 离心 3–10 min, 去除上清液, 保留细胞, 用 pH=7.2–7.4 的磷酸盐缓冲液洗细胞 1–3 次, 相同条件离心, 去除上清, 得到细胞;

②将步骤①所得细胞制成干粉, 称取 200–300 mg 细胞干粉, 置于离心管 A 中, 加入 0.5–0.8 mL 超纯水, 充分混匀;

③向离心管 A 中再加入 2–4 mL 提取液, 充分混匀; 1000–3000 rpm 离心 3–10 min, 使溶液分层, 取下层有机溶剂层, 置于离心

管 B 中;

④重复步骤③ 2–4 次, 至细胞完全沉降;

⑤向离心管 B 中, 加入 0.8–1.2 mol/L KCl 水溶液 0.5–1.5 mL, 充分混匀, 2000–4000 rpm 离心 3–10 min, 除去含水溶性杂质的上清;

⑥再向离心管 B 加入 1–3 mL 超纯水, 充分混匀, 2000–4000 rpm 离心 3–10 min, 去上清;

⑦蒸馏或氮气吹干步骤⑥所得混合物中的有机溶剂, 得到总磷脂提取混合物;

⑧将所述总磷脂提取混合物溶于 0.2–2 mL 储存液中制成样品, 冷冻–40°C 以下保存;

⑨检测前, 向所述样品内加入磷脂标准品, 使磷脂标准品终浓度为 0.5–1.5 $\mu\text{g/mL}$;

所述提取液是含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为 1–2:1, 所述二丁基羟基甲苯的质量分数为 0.005–0.01%;

所述储存液为含有二丁基羟基甲苯的氯仿/甲醇溶液, 所述氯仿/甲醇的体积比为 1–4:1, 所述二丁基羟基甲苯的质量分数为 0.005–0.01%;

(6) LC-MS 检测

采用 LC-MS 对步骤 (5) 获得的加入了磷脂标准品的样品进行检测, 得到维生素 C 生产菌株传代过程的磷脂组的分子结构和含量数据;

(7) 多元统计分析

将步骤 (6) 获得的维生素 C 生产菌株传代过程的磷脂组的分子含量数据, 进行多元统计分析, 得到区分不同传代时间维生

素 C 生产菌株的差异磷脂分子标志物;

(8) 过程分析

将步骤(7)获得的差异磷脂分子标志物的含量按照不同传代时间制成图表,观察并分析这些磷脂分子变化的规律,进而发现在混菌传代培养过程中起关键作用的磷脂分子及相关代谢途径,从而为以提高 2-酮基-L-古龙酸为目的的菌种改造和培养条件优化提供方向;

优选地,所述方法的特征是所述细胞制成干粉的方法为使用液氮在研钵内研磨细胞;

优选地,所述方法的特征是所述步骤(5)⑦中所述蒸馏为 30–40°C 减压蒸馏;

优选地,所述方法的特征是所述磷脂标准品为磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、溶血性磷脂酰乙醇胺和磷脂酸至少两种;

优选地,所述方法的特征是所述磷脂酰甘油,磷脂酰乙醇胺,溶血性磷脂酰乙醇胺或磷脂酸的脂肪酸疏水尾长度为每条 10–20 个碳原子;

优选地,所述方法的是所述 LC-MS 检测条件为:

色谱柱: Hypersil GOLD Silica, 其规格为 150mm × 2.1mm, 5μm;

进样量: 10 μL;

柱温: 25 °C;

流动相 A (%): 氯仿 (89.5), 甲醇 (10), 氢氧化铵 (0.5);

流动相 B (%): 氯仿 (55), 甲醇 (39), 氢氧化铵 (0.5), 水 (5.5);

梯度程序: 0–7 min, 20–30% B; 7–15 min 30–40% B; 15–20 min 40–50% B; 20–25 min 50% B; 25–35min, 50–20% B;

35–45min, 20% B;

离子化方式: ESI (负离子方式);

扫描方式: MS Scan;

扫描范围: m/z 400–900;

扫描速度: 1000 scan/s;

毛细管电压: 3 KV;

锥孔电压: 30 V;

萃取电压 3 V;

离子源温度: 100°C;

脱溶剂气温度: 350°C;

锥孔气流量: 50 L/Hr

脱溶剂气流量: 400 L/Hr;

进/出口能量: 50;

碰撞能量: 2;

HM1/LM1/HM2/LM2: 15.0;

Ion Energy 1: 1.0;

Ion Energy 2: 2.0;

优选地, 所述方法的特征是所述多元统计分析方法为 Pareto 预处理后进行主成分分析;

6. 一种检测维生素 C 生产菌株传代过程中营养环境变化的方法, 包括如下步骤:

(1) 混菌传代培养:

① 固体培养:

取保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (Gluconobacter oxydans) 和保藏于体积浓度为 15-30% 的甘

油水溶液中的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分别接种于固体培养基上, 28-35℃, 培养 24-48 h;

②种子培养:

将经步骤(1)①培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 24-48 h, 分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液;

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡混菌培养, 以 24-48h 为传代周期, 以体积比为 1%-10% 为传代比接入新的种子培养基中, 传代 100-150 天得到混菌细胞, 在传代 0-100 天或 0-150 天中选定 3-4 个时间取样, 取 3-4 个样;

③分纯:

将步骤(1)②获得的 3-4 个样的混菌细胞划线分纯后再分别接种于固体培养基上, 28-35℃培养 24-48 h; 再分别转入新的种子培养基, 在 28-35℃, 200-280 rpm 摇床振荡培养 24-48 h, 分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液; 保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中;

④发酵:

将步骤(1)③获得的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌, 分别接种到新的种子培养基中, 使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL, 氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL, 在 28-35℃, 200-280 r/min 摇床振荡培养 10-15 h;

(2) 营养环境中物质的测定:

①培养液的收集:

分别取步骤(1)④获得的巨大芽孢杆菌培养液、氧化葡萄糖杆菌培养液和混菌体系培养液 1-2 mL, 以 5000-10000 rpm 的转速离心, 收集上清, 并用 0.22 μm 纤维素微孔滤膜过滤, 得滤液;

②样品制备:

取步骤(2)①获得的滤液 10-50 μL 置于离心管中, 加入 50-200 μL 的 0.04-0.14 mg/ml 氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物, 冷冻干燥; 加入 40-100 μL 浓度为 20 mg/mL 的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于 30 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中脗化反应 60-120 min; 再加入 50-100 μL N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于 35 $^{\circ}\text{C}$ -40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴进行硅烷化反应 30-60 min;

③GC-TOFMS 检测:

将 1 μL 步骤(2)②获得的样品进到气相色谱仪中, 色谱柱为 DB-5MS, 所述色谱柱的规格为 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ -280 $^{\circ}\text{C}$, 载气为高纯氦气, 流速 0.6-0.8 ml/min, 分流比 3: 1-20: 1, 柱温箱升温程序为: 初始 50 $^{\circ}\text{C}$ -80 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min-5 min, 以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升到 260 $^{\circ}\text{C}$ -300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min-8 min, 使用 EI 电离源, 源温 230 $^{\circ}\text{C}$ -260 $^{\circ}\text{C}$, 检测器电压 2300 V-2700V, 电离电压 60 eV-80 eV, 电流 30 μA -50 μA ; 质谱检测范围 50-800 m/z; 营养环境物质的鉴定使用 NIST 2005 数据库, 质谱数据的处理和营养环境物质相对含量的测定使用 Masslynx 4.1 软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到营养环境物质的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤(2)获得的营养环境物质的相对含量的数据进行 Pareto 预处理;

②用 Metlab 7.0 (Mathworks. Inc.) 软件对步骤(3)①预处

理后的数据进行主成分分析，得到差异营养环境标志物；

(4) 过程分析

将差异营养环境标志物的相对含量按照不同传代时间制成图表，观察并分析这些物质变化的规律，检测出维生素 C 生产菌株传代过程中营养环境的变化。

7. 分析维生素 C 生产菌株传代过程中小分子代谢物变化的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 混菌传代培养：

① 固体培养：

取保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 和保藏于体积浓度为 15-30% 的甘油水溶液中的巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 分别接种于固体培养基上，28-35℃，培养 24-48 h；

② 种子培养：

将经步骤 (1) ① 培养的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌分别转入种子培养基，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养 24-48 h，分别得到巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；

将巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌接种到一个新的种子培养基中，使巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL，使氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养，以 24-48h 为传代周期，以体积比为 1%-10% 为传代比接入新的种子培养基中，传代 100-150 天得到混菌细胞，在传代 0-100 天或 0-150 天中选定 3-4 个时间取样，取 3-4 个样；

③ 分纯：

将步骤 (1) ② 获得的 3-5 个样的混菌细胞划线分纯后再分别

接种于固体培养基上，28-35℃培养 24-48 h；再分别转入新的种子培养基，在 28-35℃，200-280 rpm 摇床振荡培养 24-48 h，分别得到进化了的巨大芽孢杆菌种子液和氧化葡萄糖杆菌种子液；保藏于体积浓度为 15-30%的甘油水溶液中；

④发酵：

将步骤（1）③获得的进化了的巨大芽孢杆菌和氧化葡萄糖杆菌以及将两种菌混合在一起的混合菌，分别接种到新的种子培养基中，使进化了的巨大芽孢杆菌的密度为 2×10^7 - 2×10^{10} CFU/mL，进化了的氧化葡萄糖杆菌的密度为 2×10^8 - 2×10^{11} CFU/mL，在 28-35℃，200-280rpm 摇床振荡培养 10-15 h；

（2）胞内小分子代谢物样品的制备和测定：

①各取在步骤（1）④获得的三种细胞悬液 100-200 mL，分别在 1000-3000 rpm 离心 3-10 min，去除上清液，保留细胞，用 pH=7.2-7.4 的磷酸盐缓冲液洗细胞 1-3 次，相同条件离心，去除上清，得到细胞；

②将步骤（2）①所得细胞制成干粉，各称取 30-60 mg 细胞干粉，分别置于三个离心管中，再加入 0.5-1.5 mL 提取液，加入 30-70 μL 浓度为 0.020-0.060 mg/mL 氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标物，混匀；1000-3000 rpm 离心 3-10 min，取上清液置于三个新的离心管中冷冻干燥；

③将步骤（2）②获得三个离心管中分别加入 40-100 μL 浓度为 10-30 mg/mL 的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于 30℃-40℃水浴中脗化反应 60-120 min；再加入 50-100 μL N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于 35℃-40℃水浴进行硅烷化反应 30-60 min；

所述提取液为体积分数为 50-70%的甲醇水溶液；

④GC-TOF/MS 检测：

将 1 μL 步骤 (2) ③获得的样品进到气相色谱仪中, 色谱柱为 DB-5MS, 所述色谱柱的规格为 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ -280 $^{\circ}\text{C}$, 载气为高纯氦气, 恒压 80-100KPa, 分流比 3:1-20:1, 柱温箱升温程序为: 初始 50 $^{\circ}\text{C}$ -80 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min-6 min, 以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升到 260 $^{\circ}\text{C}$ -300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min-8 min, 使用 EI 电离源, 源温 230 $^{\circ}\text{C}$ -260 $^{\circ}\text{C}$, 检测器电压 2300 V-2700V, 电离电压 60 eV-80 eV, 电流 30 μA -50 μA ; 质谱检测范围 50-800 m/z; 小分子代谢物的鉴定使用 NIST 2005 数据库, 质谱数据的处理和代谢物相对含量的测定使用 Masslynx 4.1 软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到小分子代谢物的相对含量;

(3) 主成分分析:

①将步骤 (2) ④获得的维生素 C 生产菌株传代过程的小分子代谢物的相对含量数据进行 Pareto 预处理;

②用 SIMCA-P 11.5 软件对预处理后的数据进行主成分分析, 得到区分不同传代时间维生素 C 生产菌株的小分子代谢物标志物;

(4) 过程分析

将小分子代谢物标志物的含量按照不同传代时间制成图表, 观察并分析小分子代谢物标志物变化的规律, 检测出维生素 C 生产菌株传代过程中细胞内小分子代谢物的变化,

优选地, 其中所述细胞制成干粉的方法为液氮研磨细胞。

8. 含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的用途, 其特征是将含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌接种到发酵培养基中, 培养, 获得 2-酮基-L-古龙酸;

优选地，所述含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的构建为：

(1) 山梨酮脱氢酶基因的体外扩增：

采用细菌基因组提取试剂盒提取氧化葡萄糖杆菌的基因组为模板；以 SEQ ID No.1 所示序列为上游引物，以 SEQ ID No.2 所示序列为下游引物，进行 PCR 扩增，回收 PCR 扩增产物；

(2) 编码山梨酮脱氢酶基因载体的构建：

取步骤 (1) 获得的 PCR 扩增产物用 HindIII 酶和 BamHI 酶双酶切；取载体 pBBR1 用 KpnI 酶和 HindIII 酶双酶切；连接，转化入大肠杆菌 DH5 α 中，获得编码山梨酮脱氢酶基因载体；

(3) 编码山梨酮脱氢酶基因载体转化入氧化葡萄糖杆菌

将氧化葡萄糖杆菌涂布在固体培养基上，在 30℃ 条件下培养 48 小时；用 2ml 无菌水将菌体洗下，冰浴 10min，4℃，4000rpm 离心 5min 后收集细胞，用预冷的无菌水洗一次，10%甘油洗两次后，100 μ l 10%甘油重悬细胞；与步骤 (2) 所得编码山梨酮脱氢酶基因载体的水溶液 10 μ l 混合均匀置于电转杯中，冰浴 5min，将电转杯置于电转仪中 1800V 电击；电击产物与 900 μ l 种子培养基混合均匀，在 30℃，140rpm 条件下培养 2 小时，将培养物涂布于固体培养基上，在 30℃ 条件下培养 4 天，获得的单菌落转入种子培养基中，在 30℃，250rpm 条件下培养，获得含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌；

更优选地，含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的构建为：

(1) 山梨酮脱氢酶基因的体外扩增：

采用细菌基因组提取试剂盒提取氧化葡萄糖杆菌的基因组；取该基因组溶液 1 μ l，5 $\times$ FastPfu buffer 4 μ l，20mM 的 dNTP 2 μ l，

20nM 的引物 1 0.4 μ l, 20nM 的引物 2 0.4 μ l, 无菌水 11.8 μ l, FastPfu 酶 0.4 μ l, 在 PCR 管中混合均匀; 将 PCR 管放入 PCR 仪中进行扩增循环, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 2min; 95 $^{\circ}$ C 20s, 55 $^{\circ}$ C 35s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min; 4 $^{\circ}$ C 30min; 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将 PCR 产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物;

所述引物 1 的序列为: 5'-

CCCAAGCTTGACTGGCAGCAGCGCAAC-3'

所述引物 2 的序列为: 5'-

CGCGGATCCCCGTGATAGCGGCACATGTC-3'

(2) 编码山梨酮脱氢酶基因载体的构建:

取步骤(1)获得的 PCR 扩增产物溶液 8 μ l, 与 1 μ l 10 $\times$ digest buffer, 0.5 μ l HindIII 酶, 0.5 μ l BamHI 酶混合均匀, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行酶切反应 2 小时; 反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将酶切产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切 PCR 产物; 取载体 pBBR1MCS 溶液 8 μ l, 与 1 μ l 10 $\times$ digest buffer, 0.5 μ l KpnI 酶, 0.5 μ l HindIII 酶混合均匀, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下进行酶切反应 2 小时; 反应后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将酶切产物条带切下, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切载体产物; 取酶切 PCR 产物 5.5 μ l, 酶切载体产物 3 μ l, 10 $\times$ ligase buffer 1 μ l, DNA ligase 0.5 μ l, 混合均匀, 在 22 $^{\circ}$ C 条件下进行连接反应 30min; 将连接产物用化学转化法转化入大肠杆菌 DH5 α 中, 涂布于含抗生素的 LB 固体培养基上, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 12h; 培养后获得的单菌落在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 12h, 用质粒小量提取试剂盒提取质粒, 获得编码山梨酮脱氢酶基因载体;

(3) 编码山梨酮脱氢酶基因载体转化入氧化葡萄糖杆菌

将氧化葡萄糖杆菌涂布在固体培养基上,在 30℃条件下培养 48 小时;用 2ml 无菌水将菌体洗下,冰浴 10min, 4℃, 4000rpm 离心 5min 后收集细胞,用预冷的无菌水洗一次,10%甘油洗两次后,100μl 10%甘油重悬细胞;与步骤(2)所得编码山梨酮脱氢酶基因载体的水溶液 10μl 混合均匀置于电转杯中,冰浴 5min,将电转杯置于电转仪中 1800V 电击;电击产物与 900μl 种子培养基混合均匀,在 30℃,140rpm 条件下培养 2 小时,将培养物涂布于固体培养基上,在 30℃条件下培养 4 天,获得的单菌落转入种子培养基中,在 30℃,250rpm 条件下培养,获得含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌;

所述固体培养基为: L-山梨糖 20g, 玉米浆 3g, 牛肉膏 3g, 酵母浸粉 3g, 尿素 1g, 蛋白胨 10g, 琼脂 20g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 6.8, 121℃灭菌 20min;

所述种子培养基为: L-山梨糖 20g, 玉米浆 3g, 牛肉膏 3g, 酵母浸粉 3g, 尿素 1g, 蛋白胨 10g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.2g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 6.8, 121℃灭菌 20min;

(4) 混菌发酵

将步骤(3)获得的含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌和巨大芽孢杆菌接种到发酵培养基中,使含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的密度为 4×10^8 cfu/ml, 使巨大芽孢杆菌的密度为 4×10^8 cfu/ml, 在 30℃, 250rpm 条件下培养 120h, 获得 2-酮基-L-古龙酸;

所述发酵培养基为: 按比例称取 L-山梨糖 80g, 玉米浆 20g, 尿素 12g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.5g, CaCO_3 1g, 加水至 1L, 调 pH 为 7.0, 121℃灭菌 20min。

9. 一种检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化的方法，其特征是包括如下步骤：

(1) 细胞内蛋白质的测定：

① 细胞收集及淬灭：

取 3-5 份氧化葡萄糖杆菌以 8%~16% 的体积比分别接种到发酵培养基 A 中，另取 3-5 份所述氧化葡萄糖杆菌以 8%~16% 的体积比分别接种到发酵培养基 B 中，将两种接种后的培养基在 28℃~32℃，转速为 200~250rpm 的条件下培养发酵，在发酵过程中选取 1 h、15 h 为取样点取出发酵液样品，在 4℃ 下，以 4000~6000rpm 的转速离心，收集下层的细胞，并用 pH 为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液清洗，用液氮淬灭，终止代谢反应；用液氮研磨破碎细胞，获得 3-5 份从培养基 A 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞，3-5 份从培养基 A 中发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞，3-5 份从培养基 B 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞，3-5 份从培养基 B 中发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞；

所述发酵培养基 A 为：80 g·L⁻¹ 山梨糖，20 g·L⁻¹ 玉米浆，1 g·L⁻¹ KH₂PO₄，0.2 g·L⁻¹ MgSO₄，和 12 g·L⁻¹ 尿素，余量为水；

所述发酵培养基 B 为：80 g·L⁻¹ 山梨糖，20 g·L⁻¹ 玉米浆，1 g·L⁻¹ KH₂PO₄，0.2 g·L⁻¹ MgSO₄，and 12 g·L⁻¹ 尿素，0.8~1.5mg·mL⁻¹ 的谷胱甘肽，余量为水；

② 提取细胞内蛋白：

取步骤①获得的破碎细胞，每份 100~200mg 分别置于离心管中，每管加入 0.5~2ml 细胞裂解液，混匀，冰上间歇超声破碎 20~50s；加入 5~15μL 的质量比为 2~4:1 的 DNase I /RNaseA 酶混合溶液，混匀，4℃ 静置反应 10~30min；加入 5~15μL 80~120mM 的苯甲基磺酰氟异丙醇溶液，4℃ 静置 1~3h；15000rpm

离心 25 ~ 40min; 取上清, 得到蛋白溶液; 所述细胞裂解液为: 8 mol·L⁻¹ 尿素, 质量浓度为 4% 的(3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸), 40 mM 的 Tris, 余量为水;

③蛋白浓度测定:

采用 Bradford 试剂盒, 将牛血清蛋白由低浓度到高浓度加入考马斯亮蓝 G-250 溶液中, 测定步骤②获得的各个蛋白溶液在 595nm 处的吸光值, 建立标准曲线; 测定各个蛋白溶液蛋白的浓度;

④沉淀蛋白

分别取包含 50~150 μg 蛋白的步骤③获得的各个蛋白溶液, 加入 4~6 倍体积的-20℃ ~ -40℃的丙酮, 沉淀 12~20h; 离心, 弃上清, 沉淀用-20℃ ~ -40℃的体积浓度为 70%-85%的丙酮水溶液洗涤; 冷冻干燥备用; -80℃贮存;

⑤蛋白还原以及酶解

向步骤④所得的各个干燥蛋白中, 添加 10~40μL 40~60mM 的三乙基碳酸氢铵水溶液溶解蛋白;

加入 1~4μL 三(2-羧乙基)膦, 在 50~60℃反应 1h, 对各个蛋白进行还原化处理; 然后加入 1~2μL 甲基硫代磺酸甲酯, 室温反应 10~15min, 终止还原反应;

向上述溶液中, 加浓度为 0.2~0.3μg/μL 的胰蛋白酶水溶液 20~30μL, 37℃反应 12~18 小时, 进行蛋白酶解;

⑥蛋白标记

在每个经步骤⑤酶解的蛋白酶解液中分别加入一管用 60~80μL 乙醇溶解的 iTRAQ 标记试剂, 室温反应 1h;

⑦溶液混合

将步骤溶液⑥获得的溶液混合得 3-5 份混合液, 使每个混合

液中都包括从培养基 A 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基 A 中发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白、从培养基 B 中发酵 1 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白和从培养基 B 中发酵 15 h 收集淬灭的破碎细胞再经步骤②-⑥后获得的标记蛋白；于-20℃保存；

⑧差异表达蛋白鉴定

将⑦中得到的混合液，进行 Q-Tof 质谱鉴定，得到蛋白谱，通过定量得到各混合组样品的差异表达蛋白；

(2) 主成分分析：

采用 matlab 对步骤(1)⑧中得到的数据进行标准化后，进行主成分分析，得到具有不同变化规律的数据类别，获得候选差异蛋白；

(3) 过程分析

将步骤(2)获得的候选差异蛋白含量按照时间序列制成图表，观察并分析这些蛋白变化的规律，进而发现谷胱甘肽在提高氧化葡萄糖杆菌产 2-酮-L-古龙酸过程中的作用。

10. 寻找发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法，其特征是包括下述步骤：

(1) 对玉米浆的化学成分的测定：

① 样品的制备：

将 0.5-2g 均匀的发酶用原料玉米浆置于离心管中，离心收集上清；将获得的上清液用超纯水稀释 10-40 体积倍，取 10-40 μ L 置于另一离心管中，加入 30-50 μ L 的 0.040mg/mL 氘标记的琥珀酸甲醇溶液为内标；冷冻干燥后，加入 50-100 μ L 浓度为 20mg/mL

的甲氧基胺盐酸盐的吡啶溶液于 30℃-40℃水浴中脗化反应 60-120min; 再加入 60-100 μ L N-甲基-N-三甲基硅烷三氟乙酰胺于 35℃-40℃水浴进行硅烷化反应 20-50min;

②气相色谱-飞行时间质谱联用仪测定方法:

将 1 μ L 步骤①获得的样品进到气相色谱中, 色谱柱为 DB-5MS, 所述色谱柱的规格为 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 进样口温度 250℃-280℃, 载气为高纯氦气, 流速 0.6-0.8ml/min, 分流比 30:1-10:1, 柱温箱升温程序为: 初始 50℃-80℃保持 2-5min, 以 4℃/min-8℃/min 的速度升到 250℃-300℃, 保持 8-10min, 使用 EI 电离源, 源温 230℃-280℃, 检测器电压 2300V-2700V, 电离电压 60eV-80eV, 电流 30 μ A-50 μ A; 质谱检测范围 50-800m/z; 成分的鉴定使用 NIST 数据库, 质谱数据的处理和成分相对含量的测定使用 Masslynx 4.1 软件; 并通过对色谱峰面积积分处理, 并与内标物的峰面积对照, 得到发酵用原料玉米浆中化学成分的相对含量;

(2) 偏最小二乘判别分析法

①将方法(1)获得的数据进行标准化和预处理;

②用 SIMCA-P 11.5 软件对预处理后的数据进行偏最小二乘法判别分析, 得到用于表达样本相似性和差异性的得分图、载荷图和 VIP 图; 在得分图中, 样品点相互之间距离越近, 说明样本的相似度越大, 距离越远, 说明样本差异越大, 可用来寻找不同批次玉米浆中各物质的相似和差异; 在载荷图中, 每个点表示每个物质, 距离中心点距离越远的物质, 其不同批次的含量差异越大, 便可作为玉米浆的质量控制指标; VIP 表示每个物质对区分样本的贡献大小, VIP>1 可以认为是对玉米浆质量影响最为显著的指标。

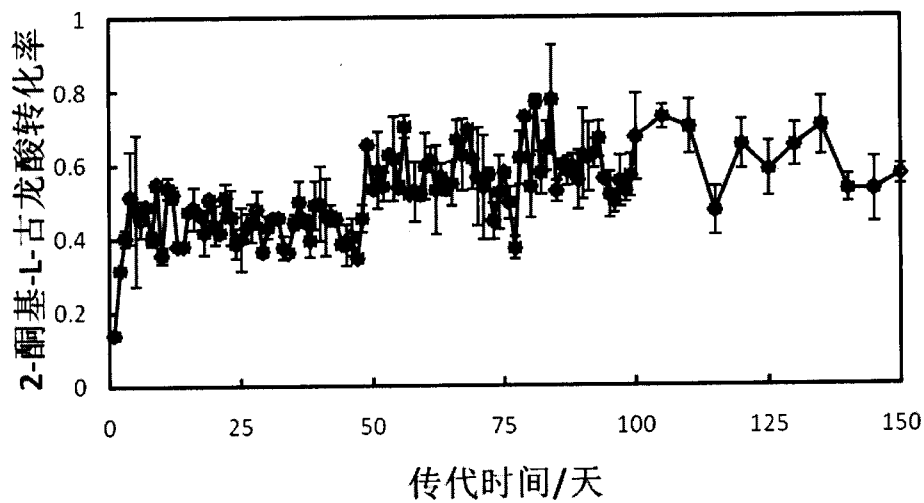


Fig. 1

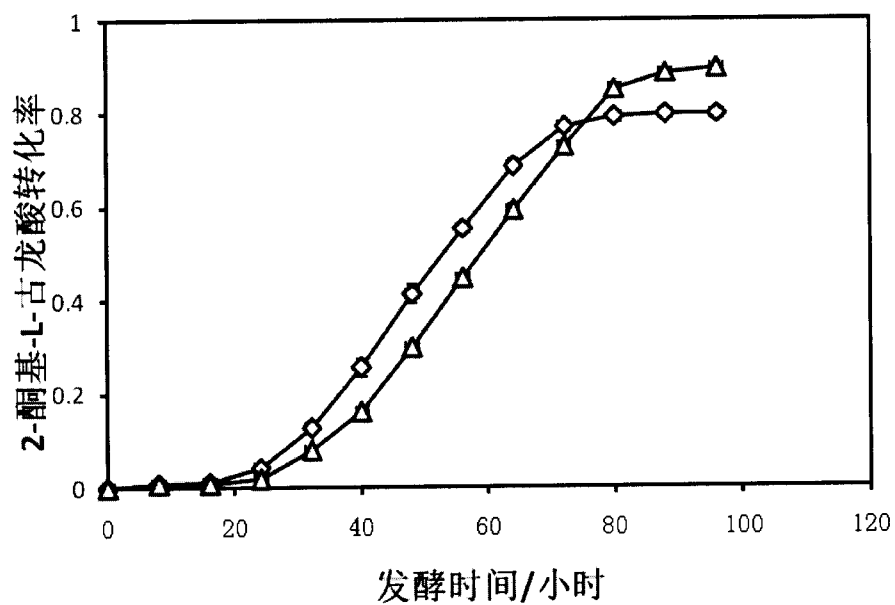


Fig. 2

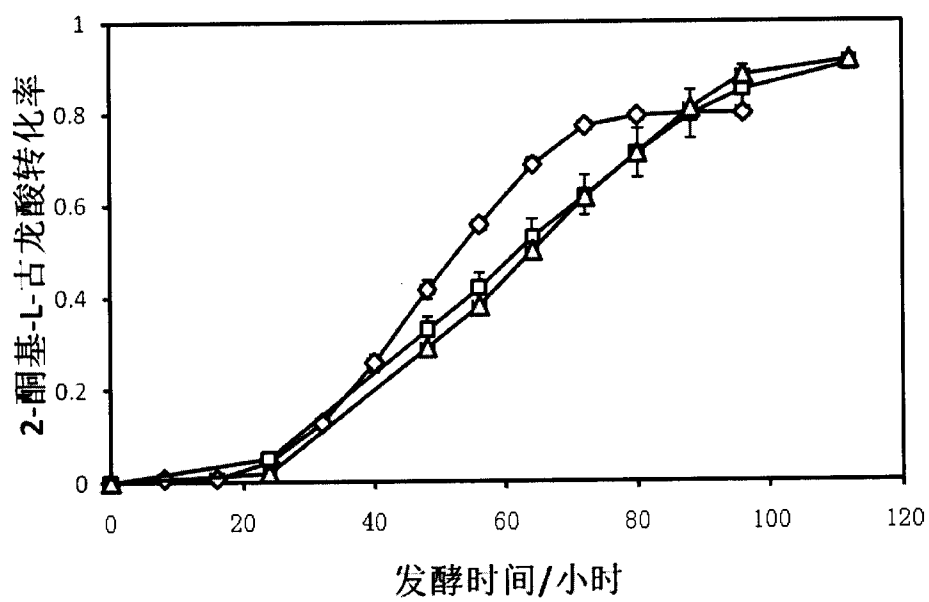


Fig. 3

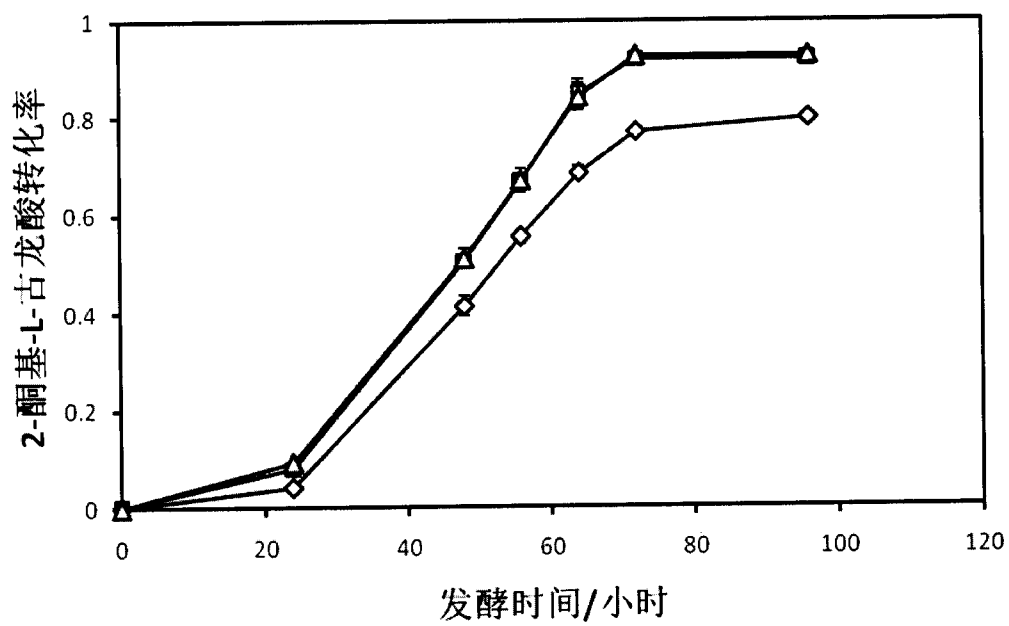


Fig. 4

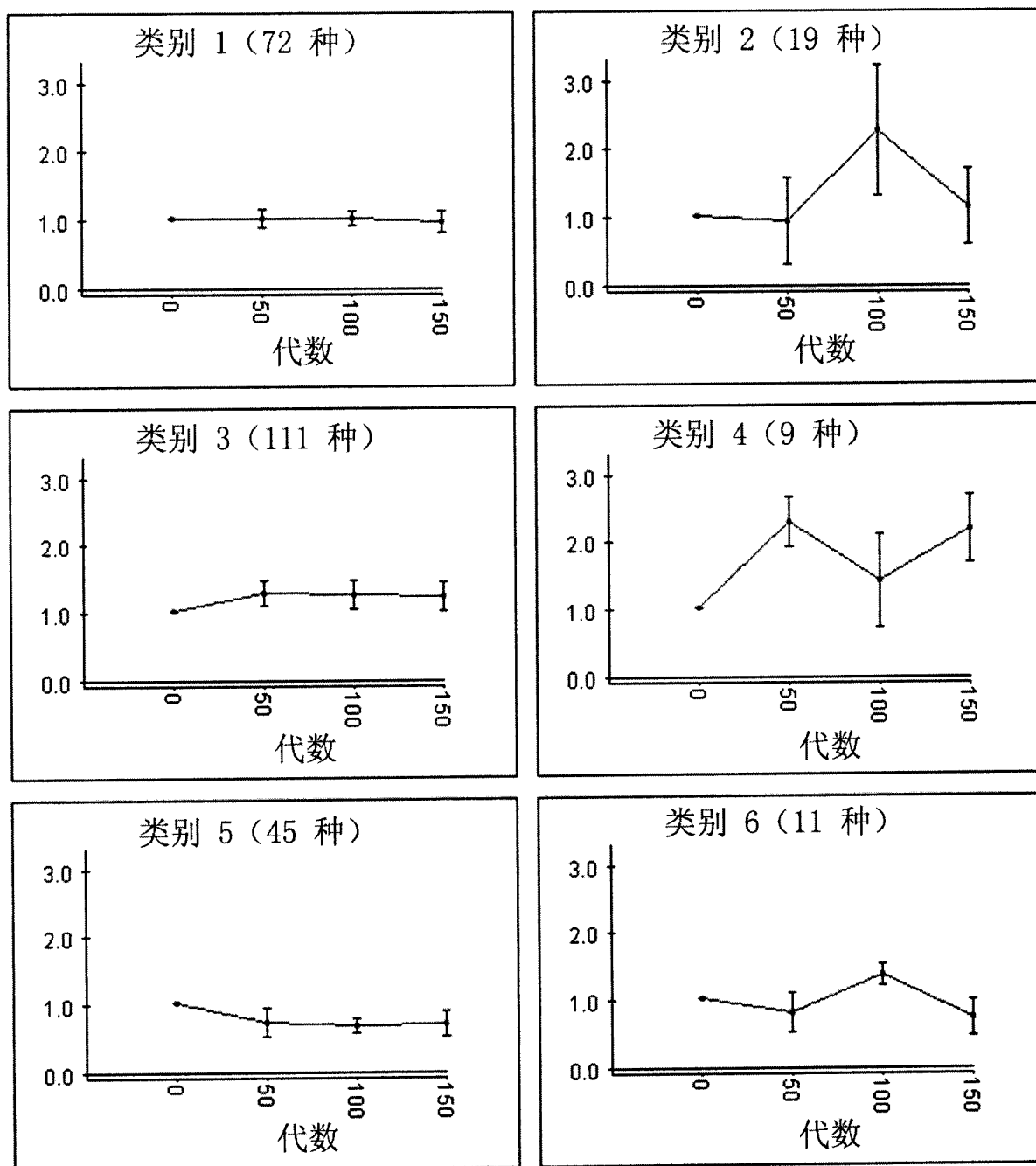


Fig. 5

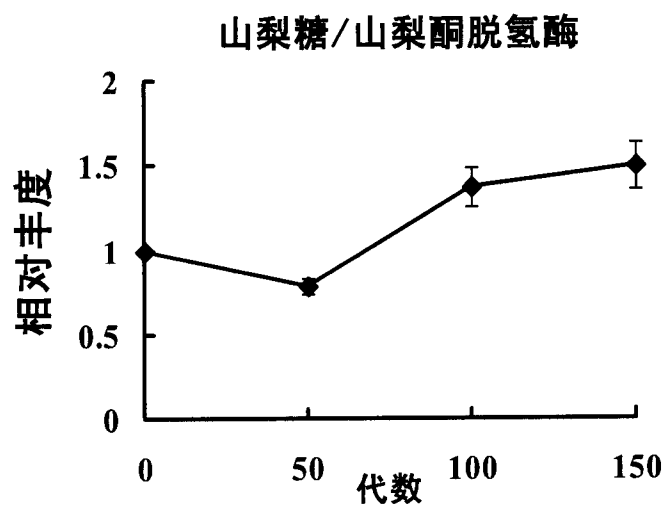


Fig. 6

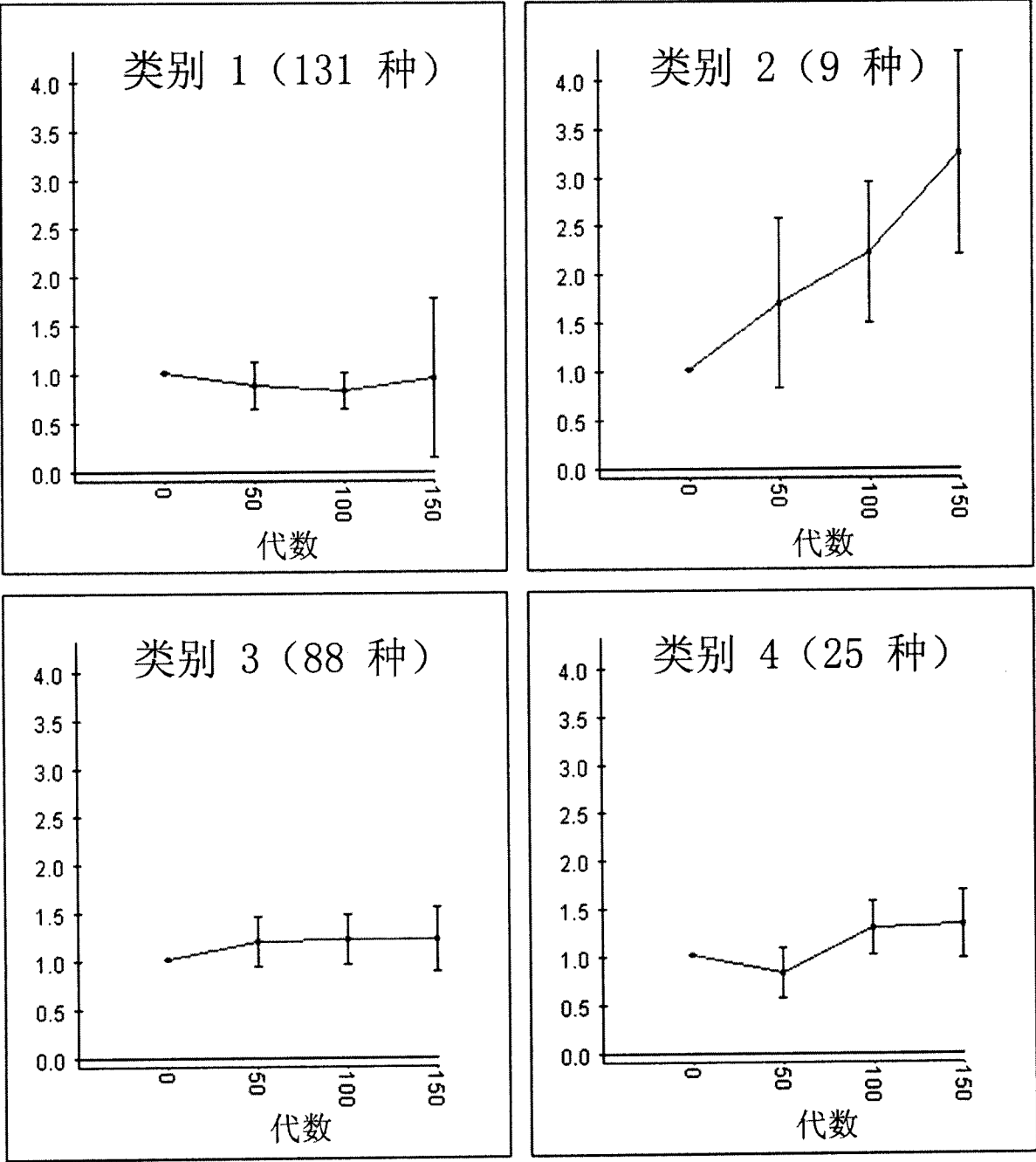


Fig. 7

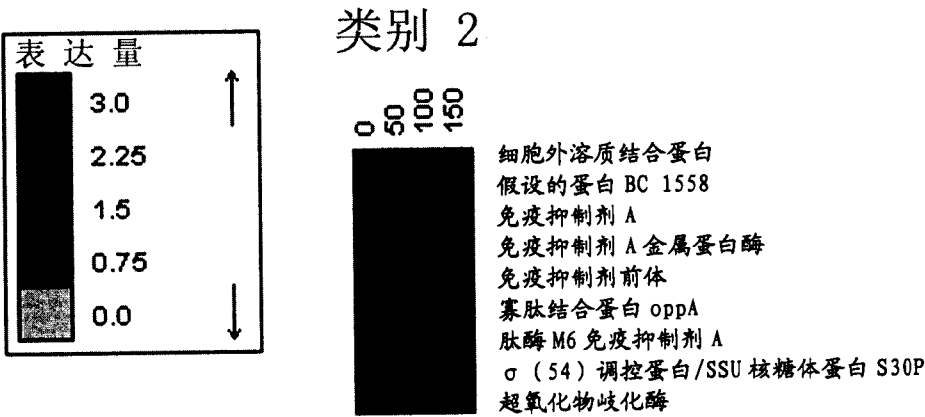


Fig. 8

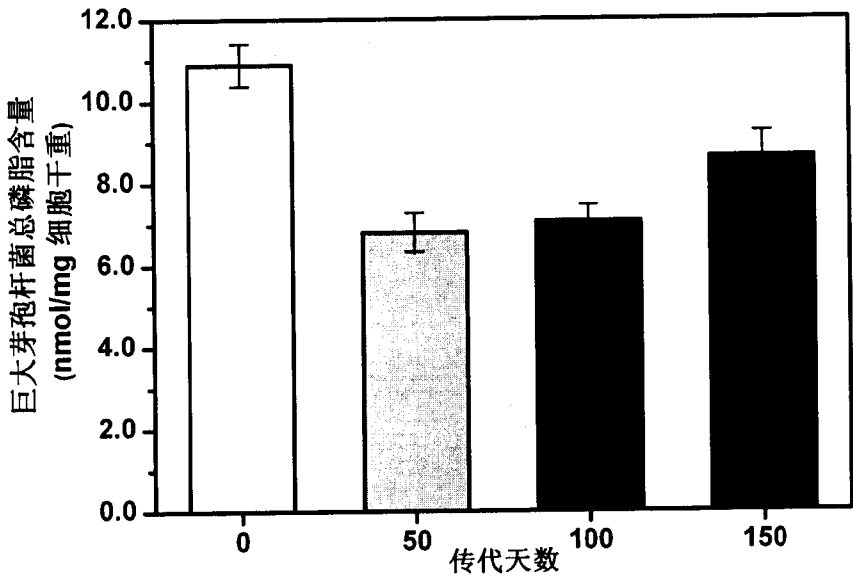


Fig. 9

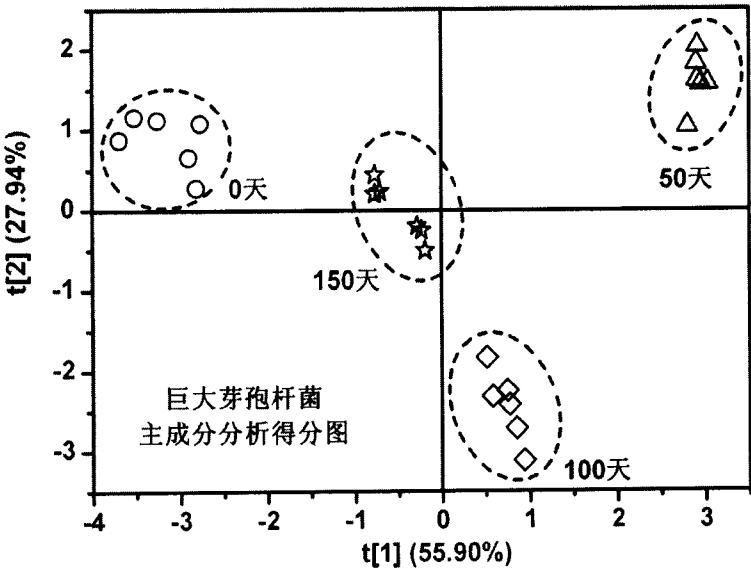


Fig. 10-1

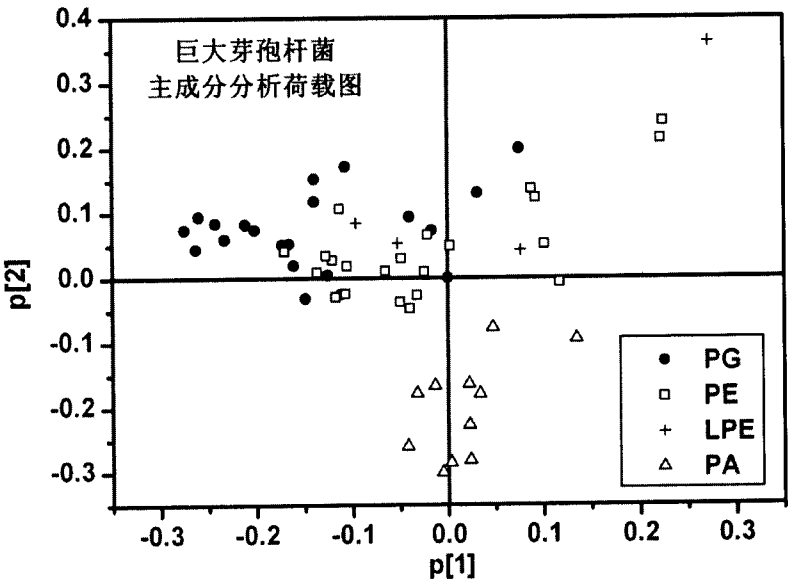


Fig. 10-2

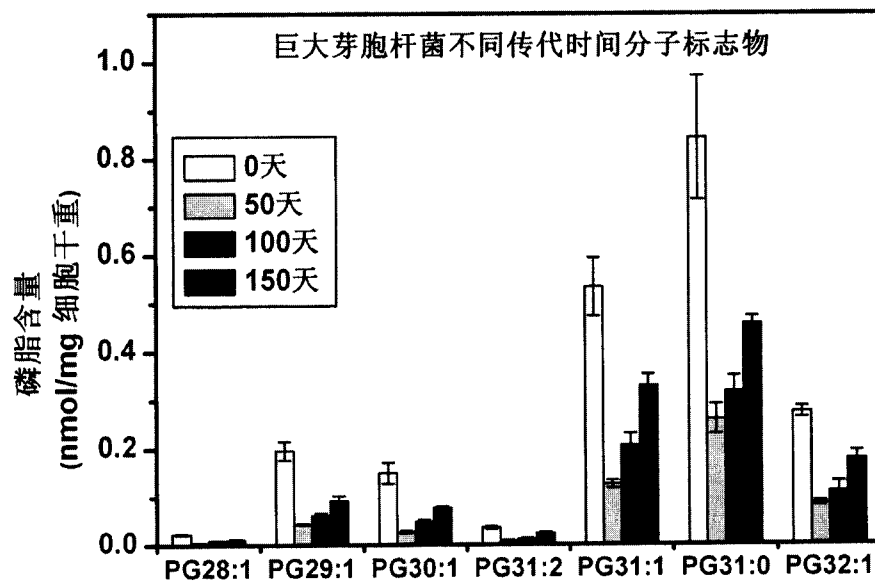


Fig. 11-1

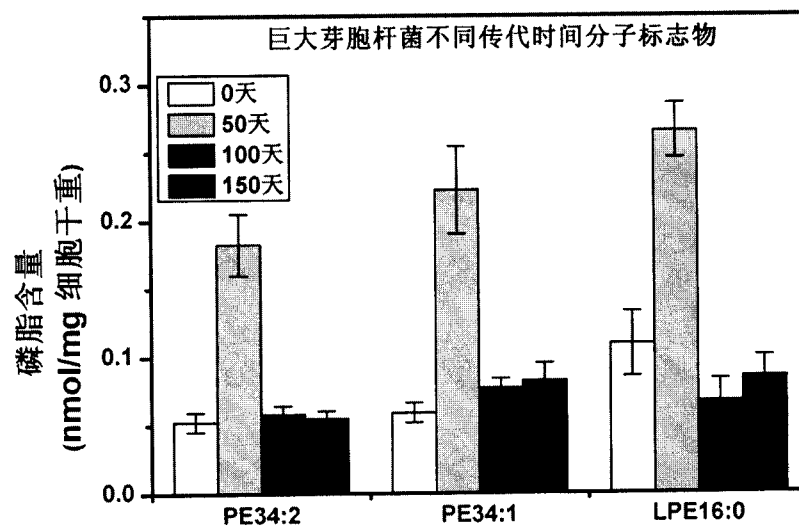


Fig. 11-2

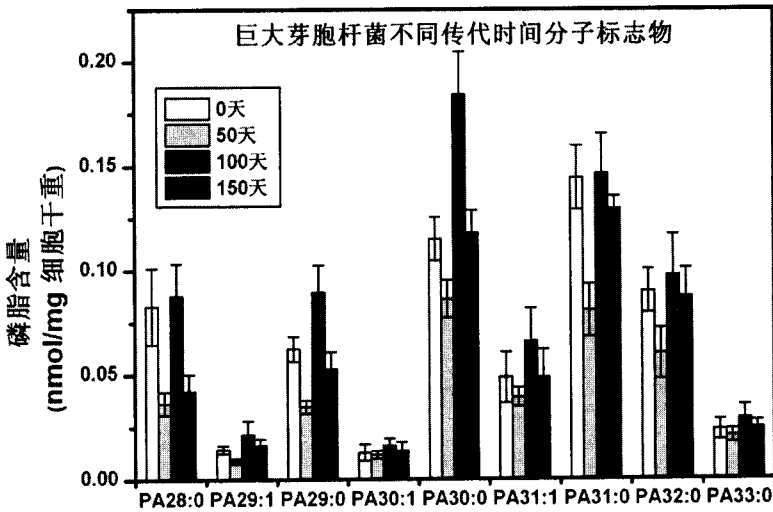


Fig. 11-3

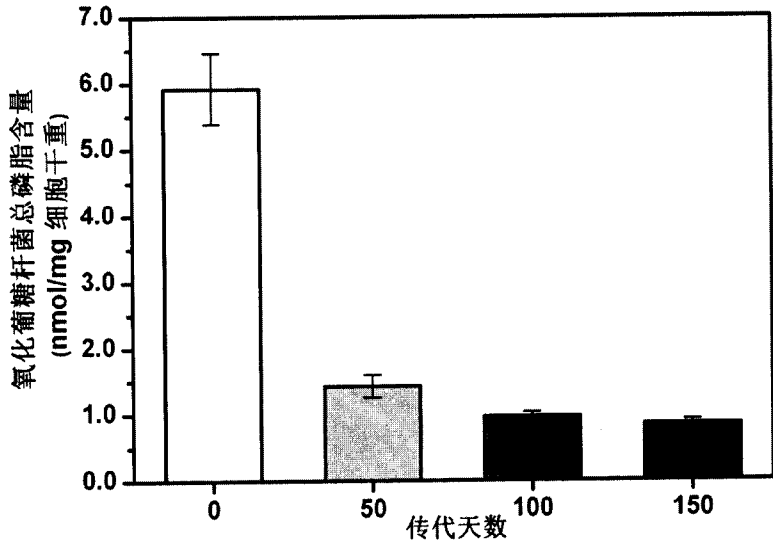


Fig. 12

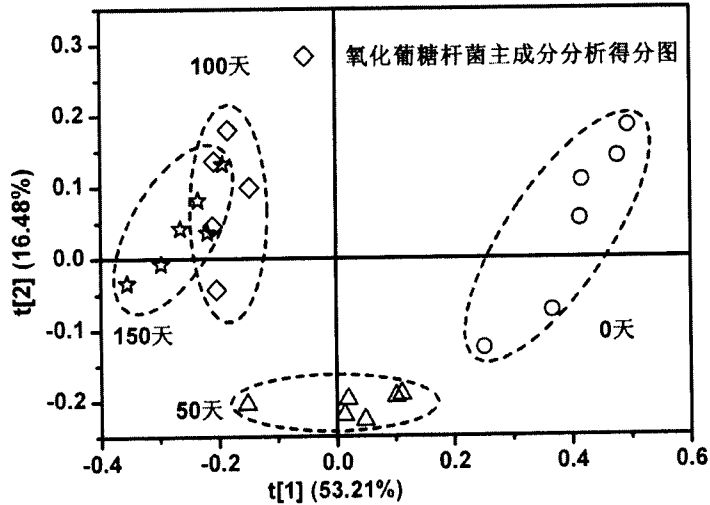


Fig. 13-1

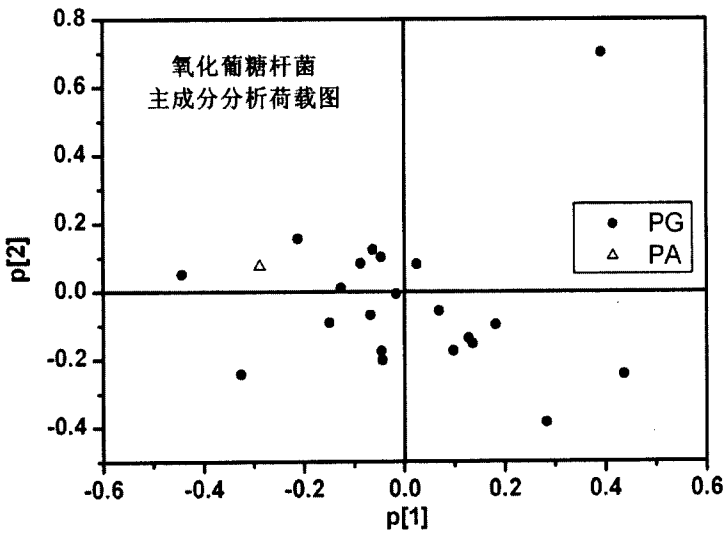


Fig. 13-2

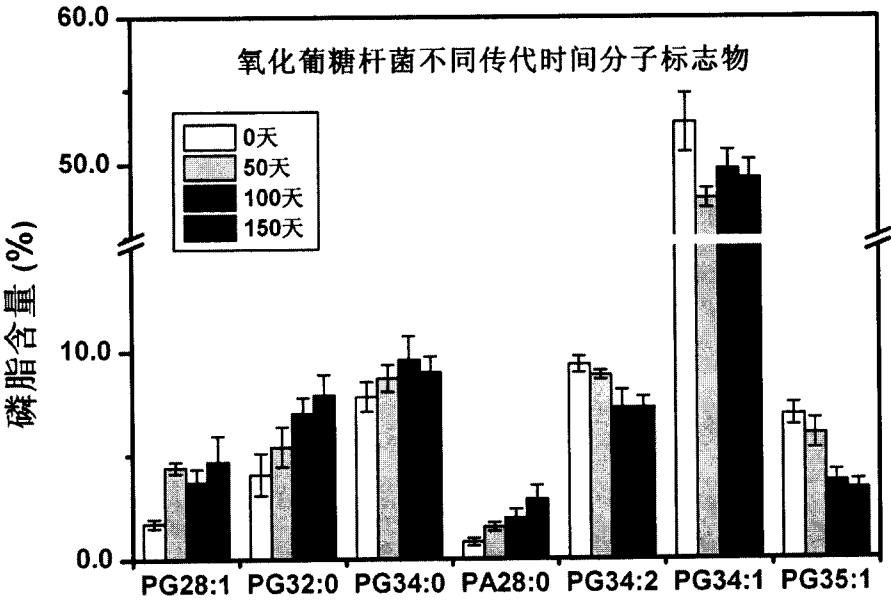


Fig. 14

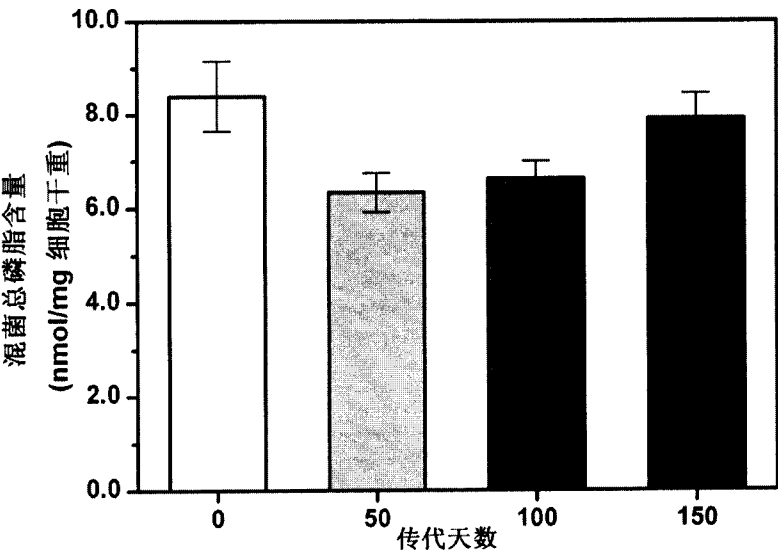


Fig. 15

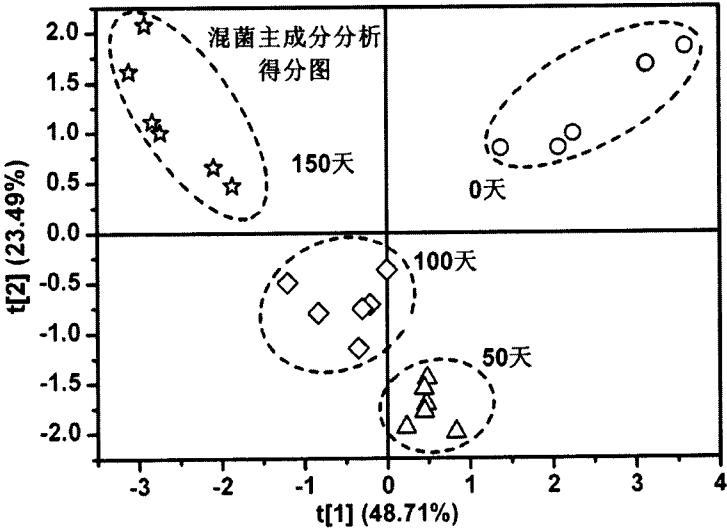


Fig. 16-1

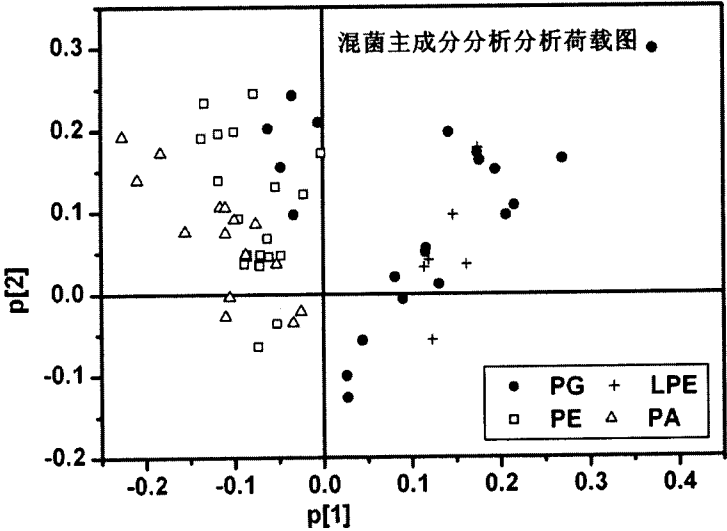


Fig. 16-2

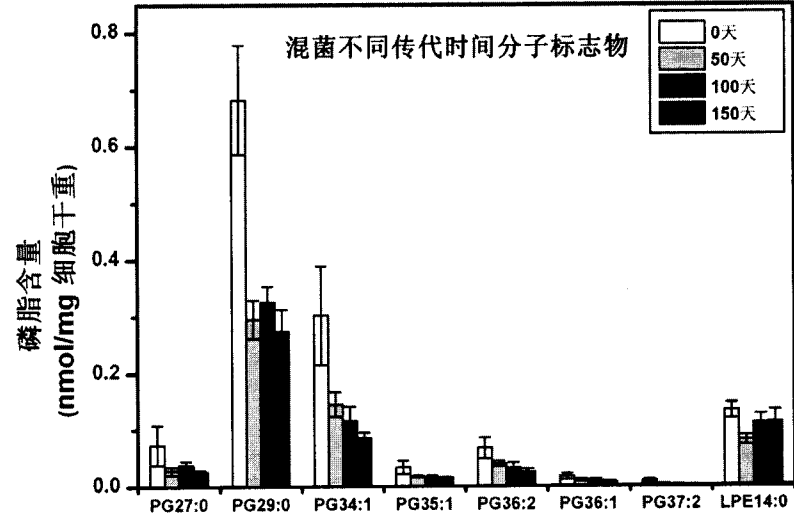


Fig. 17-1

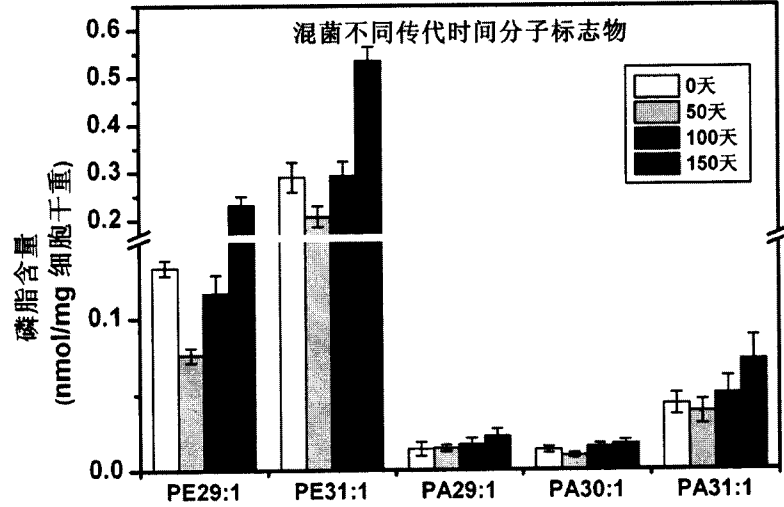


Fig. 17-2

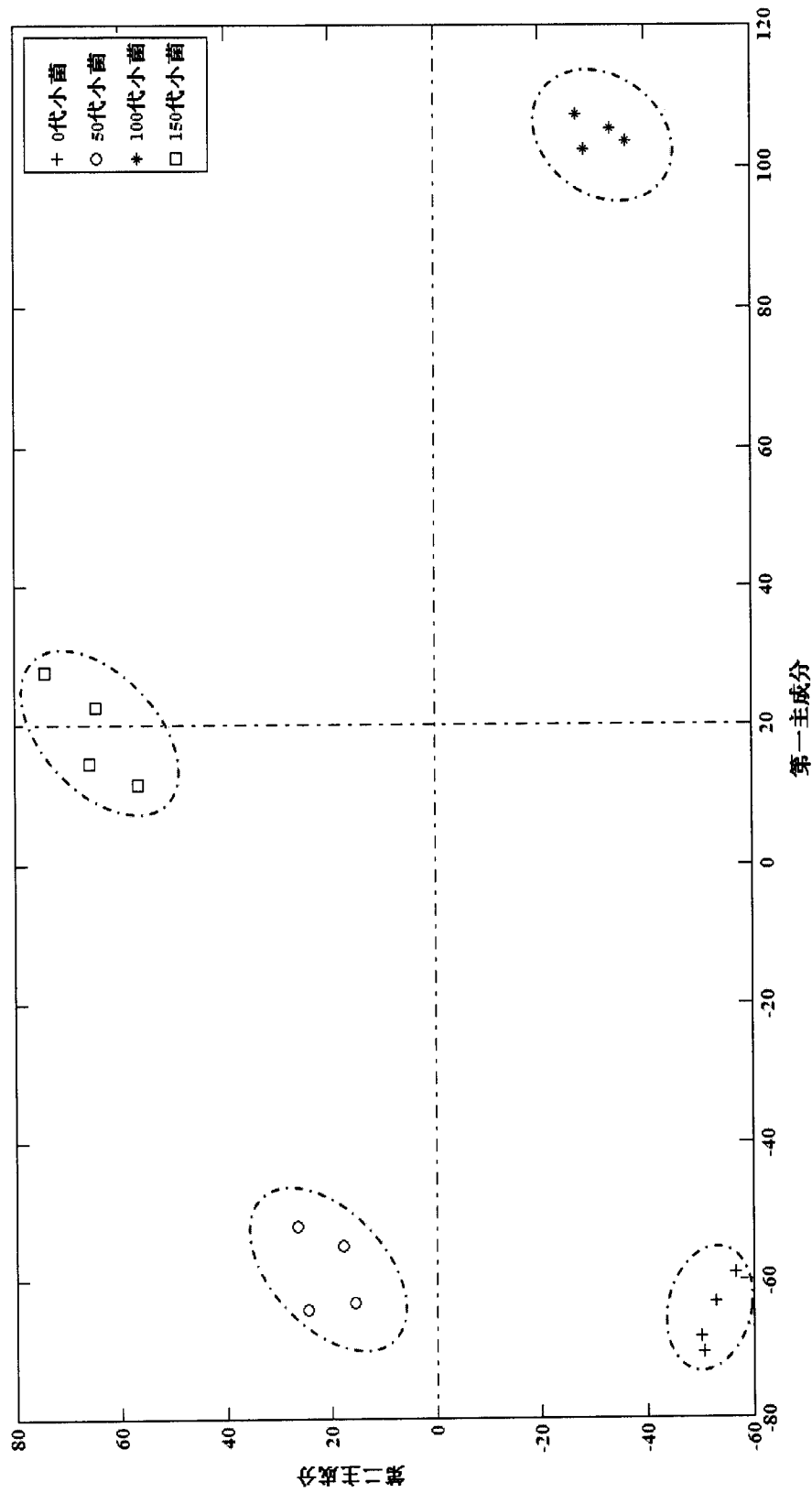


Fig. 18-1

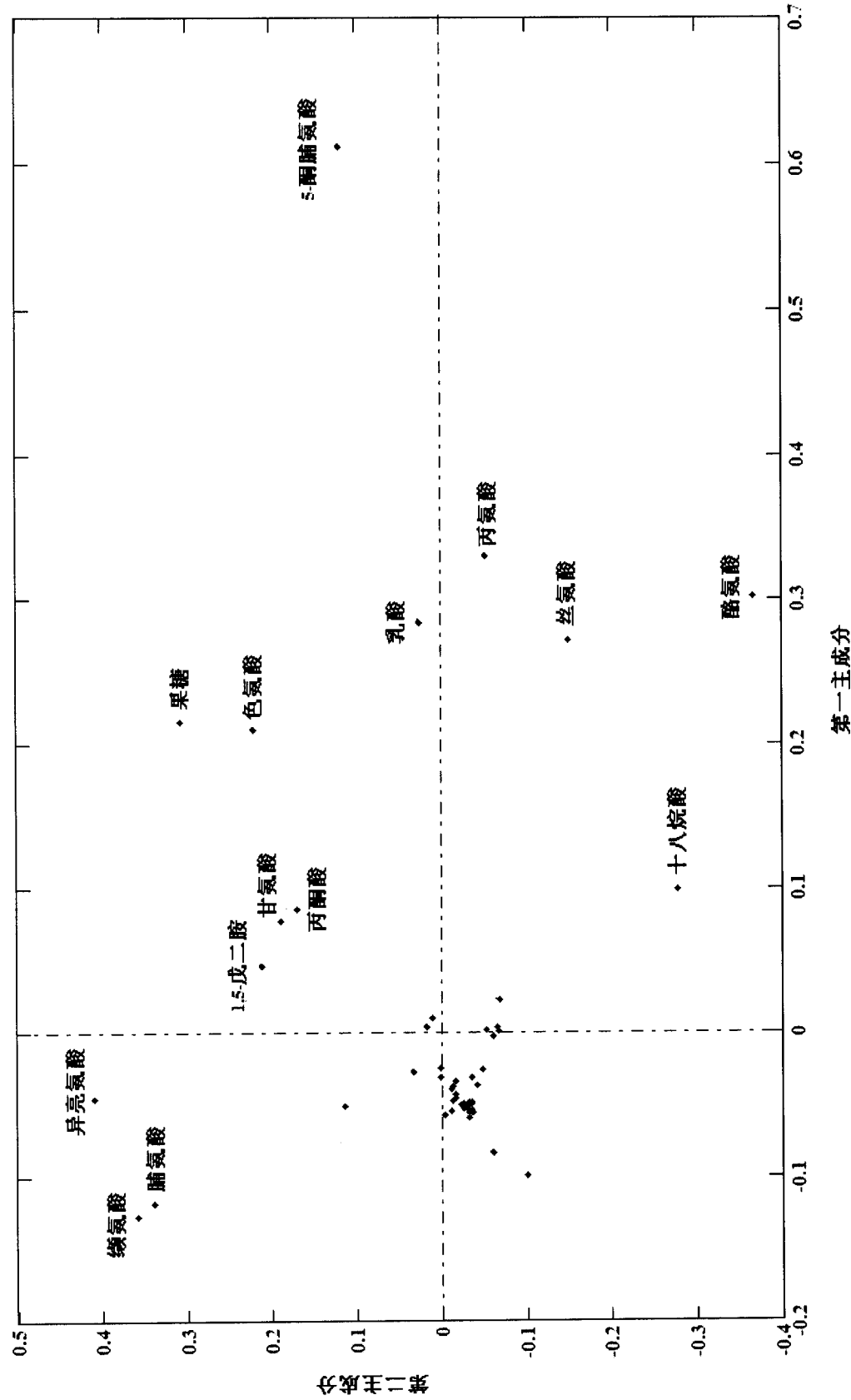


Fig. 18-2

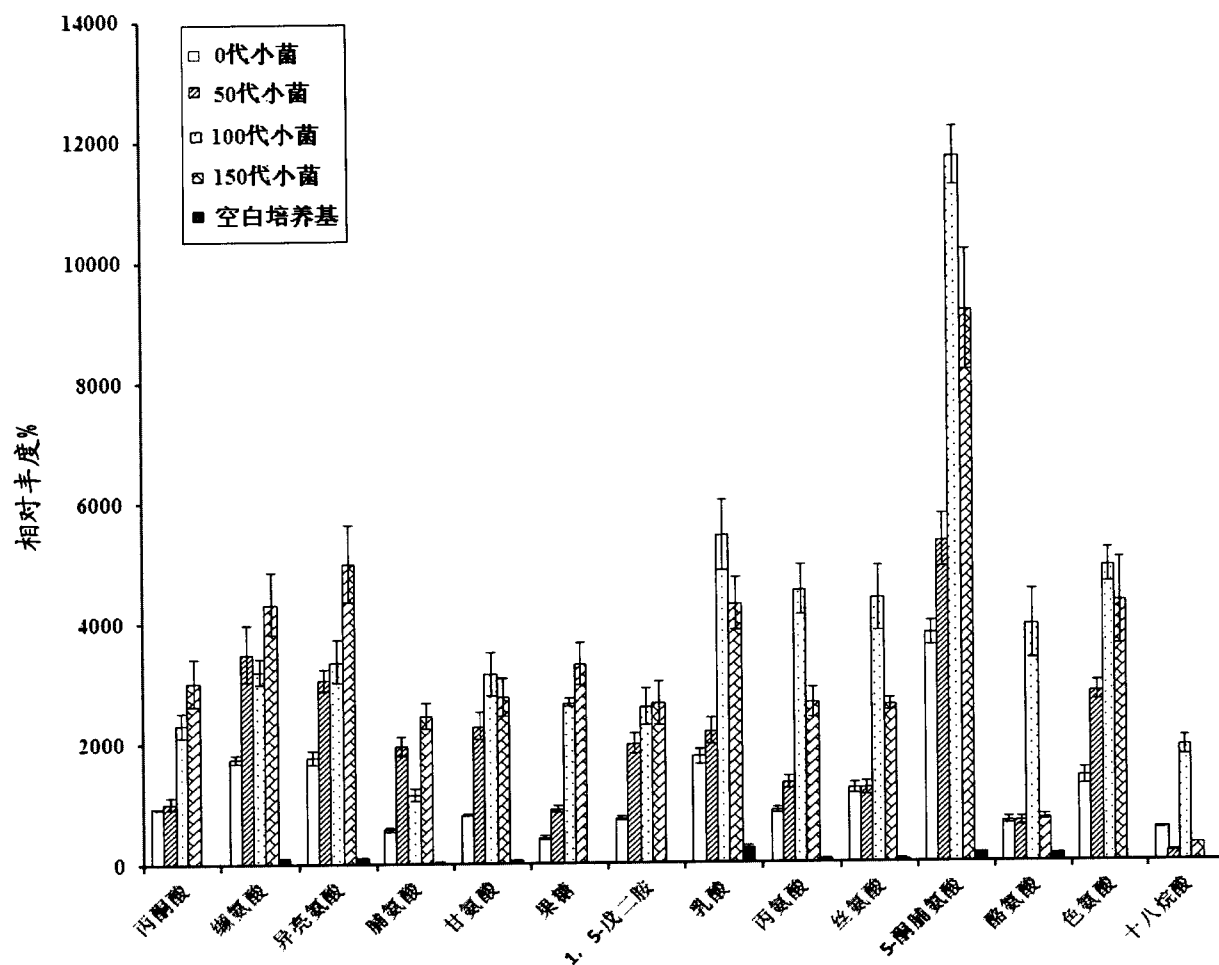


Fig. 19

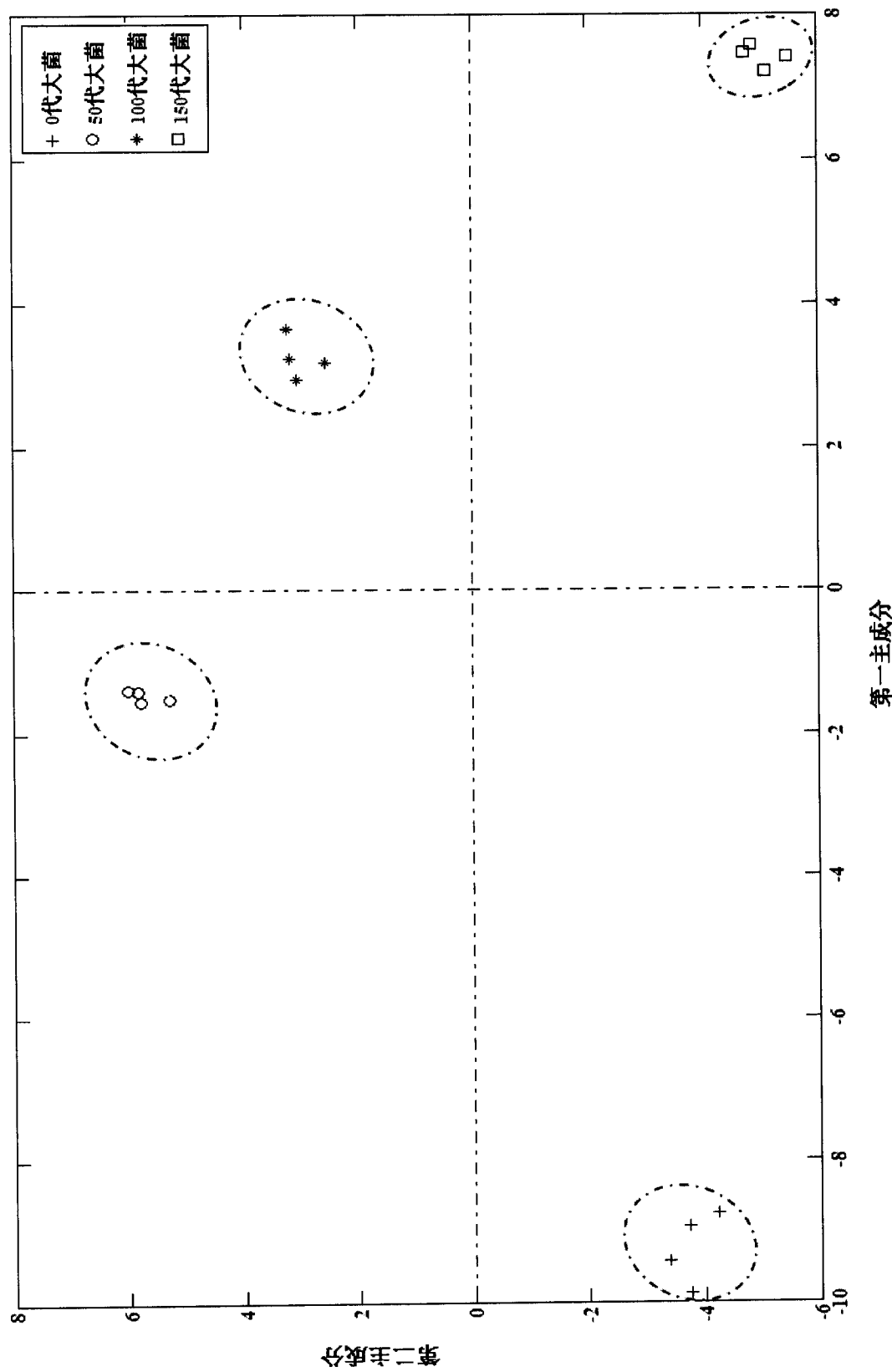


Fig. 20-1

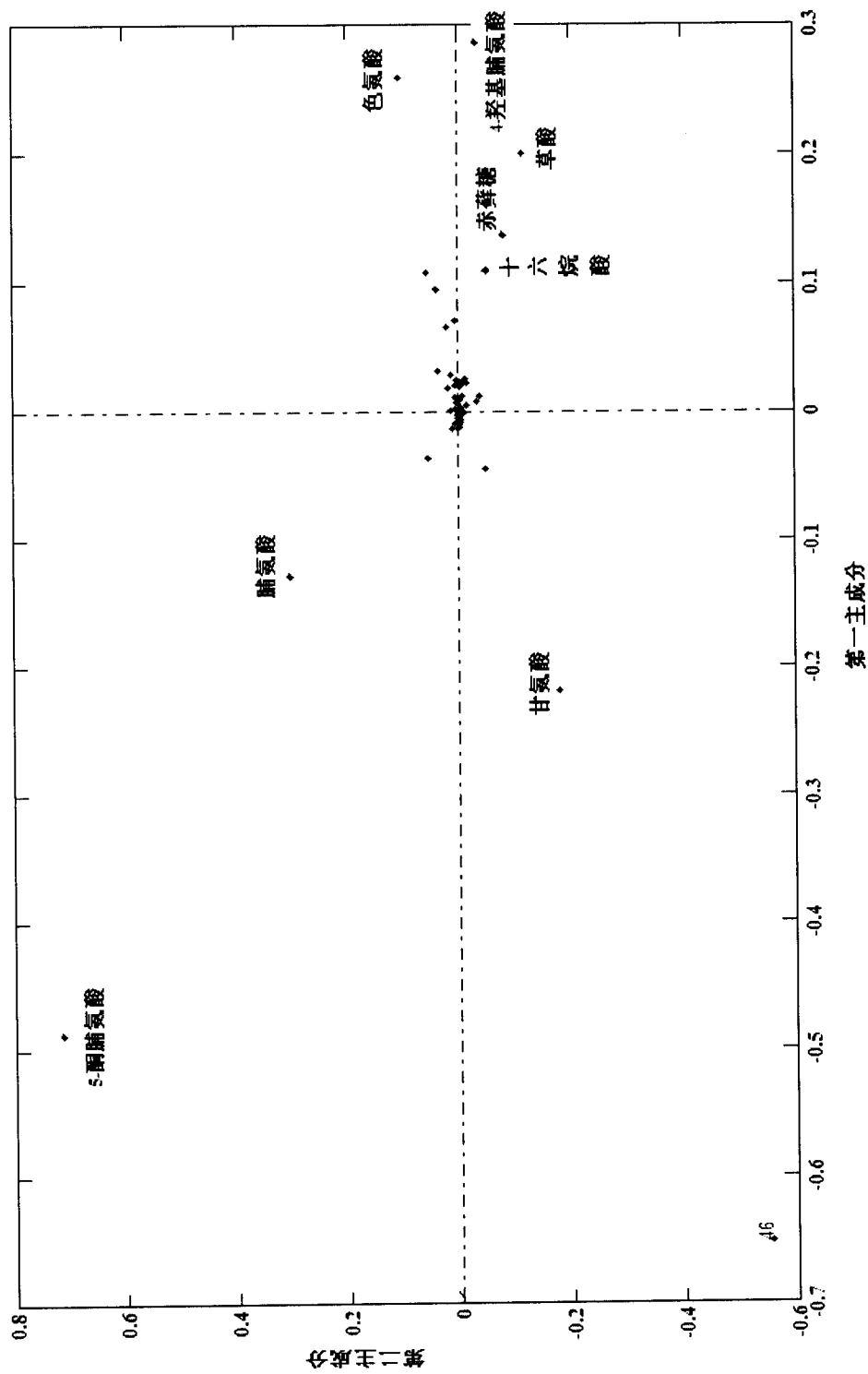


Fig. 20-2

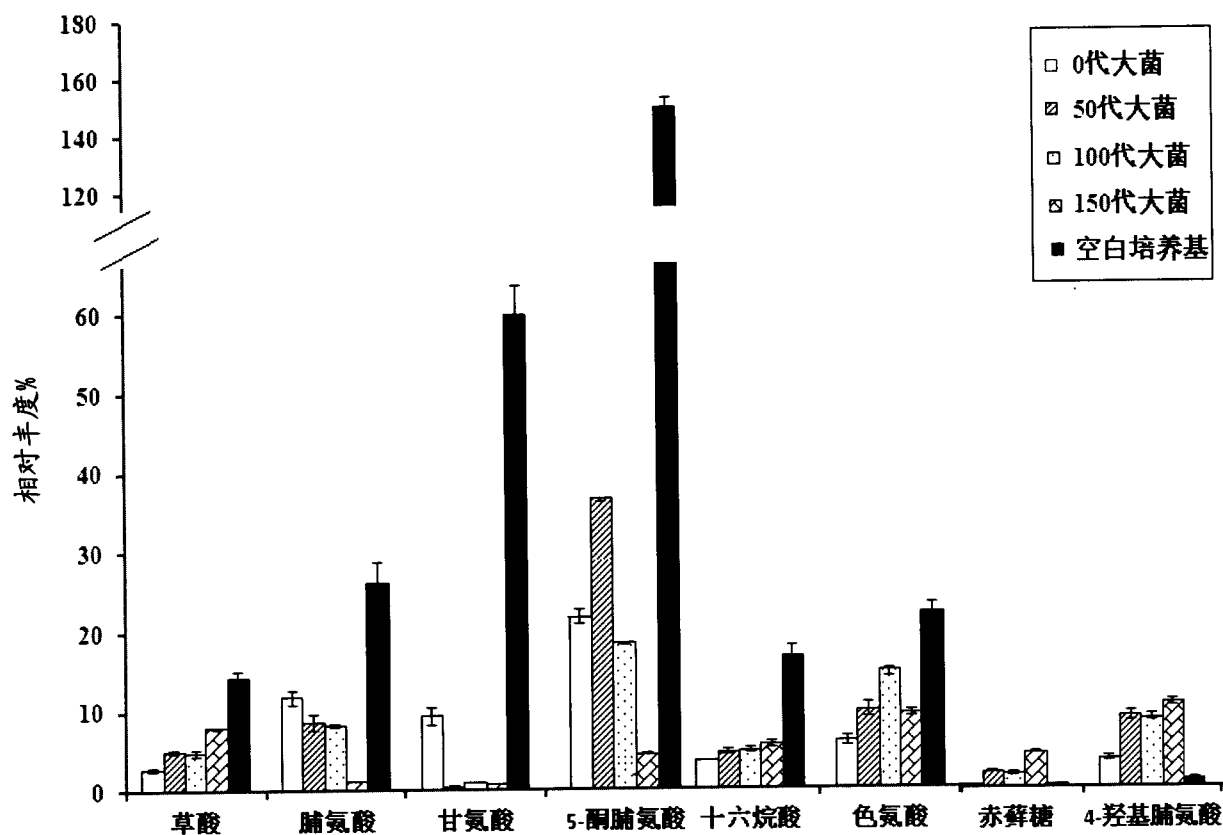


Fig. 21

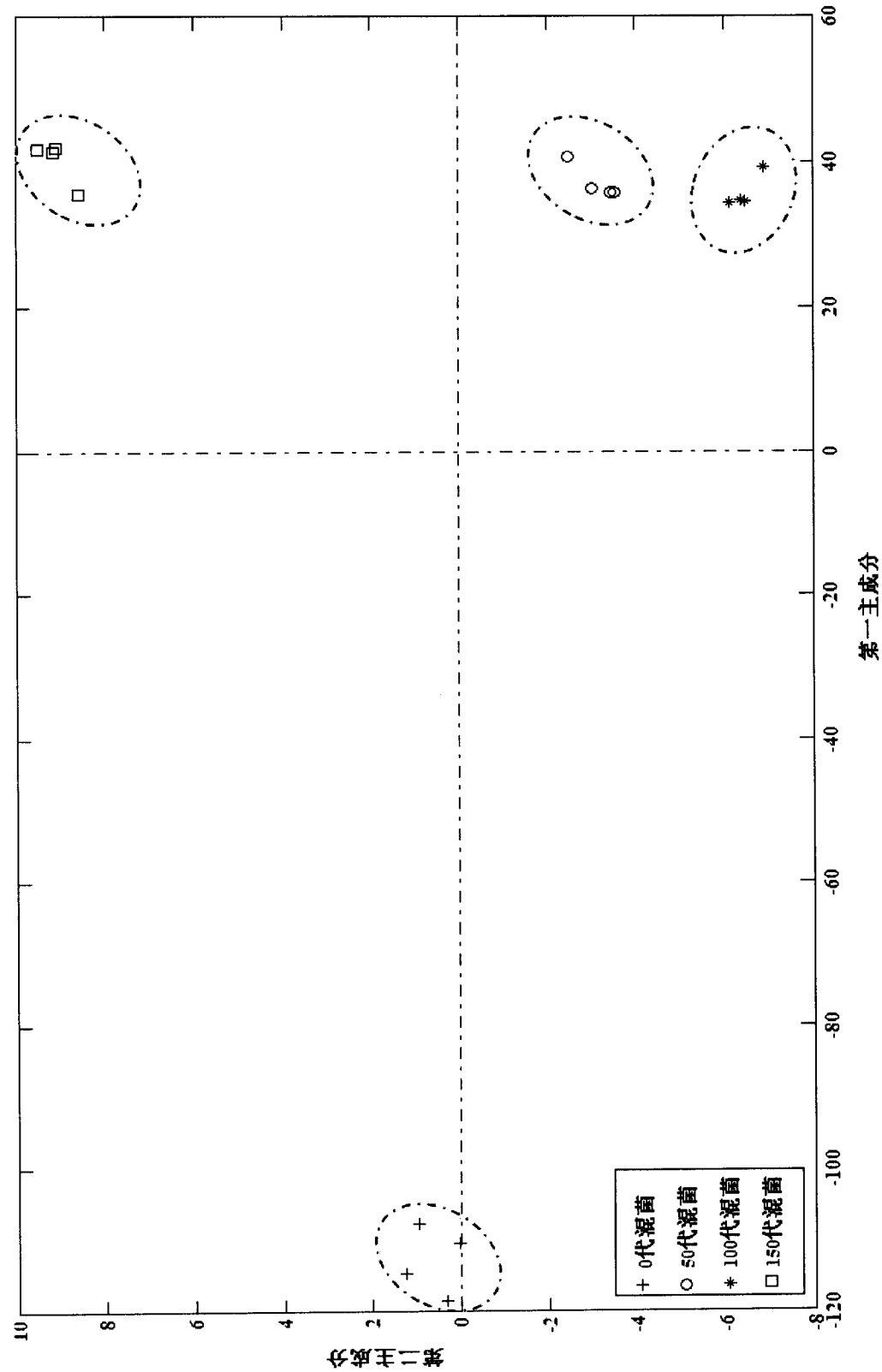


Fig. 22-1

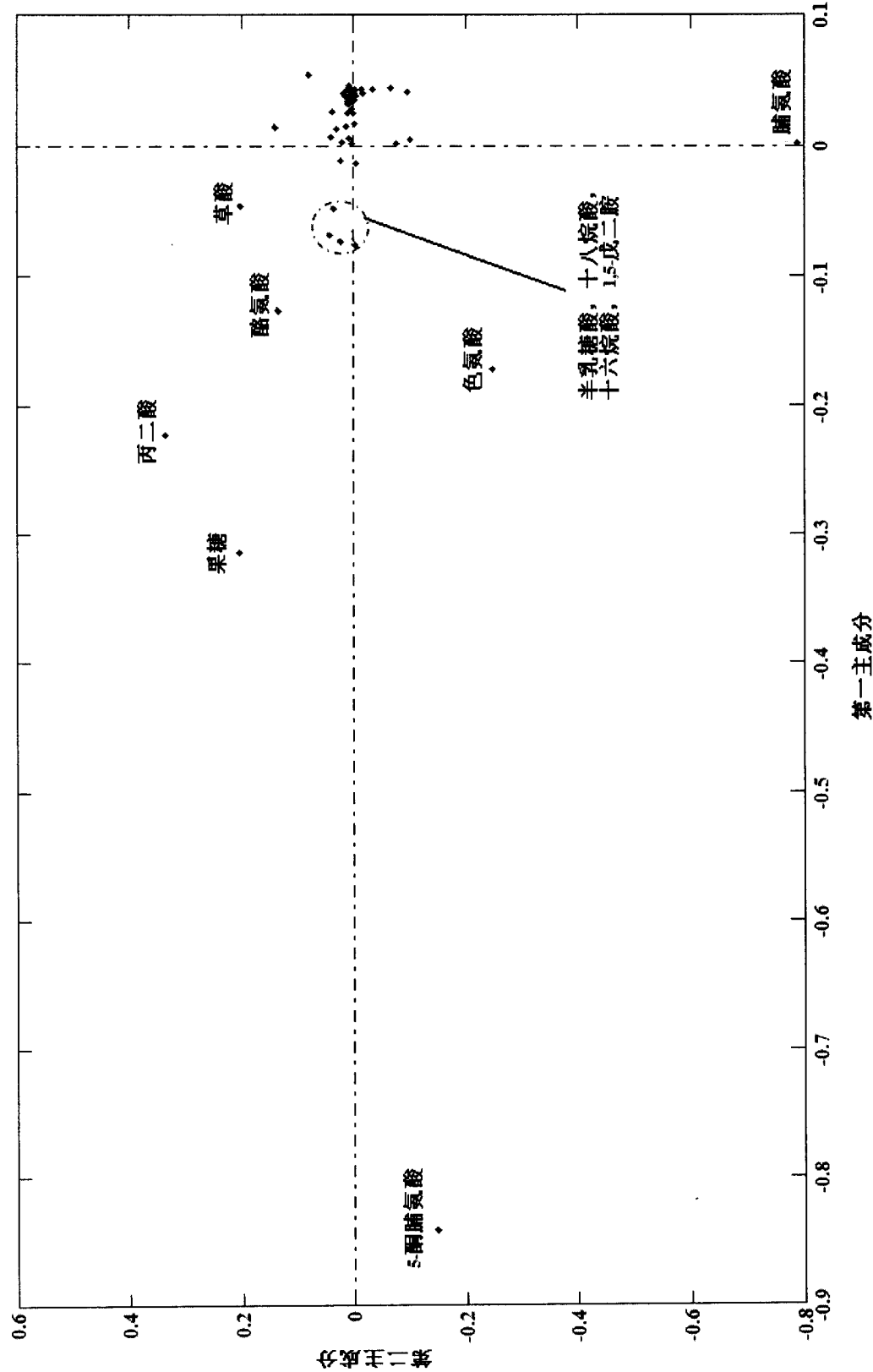


Fig. 22-2

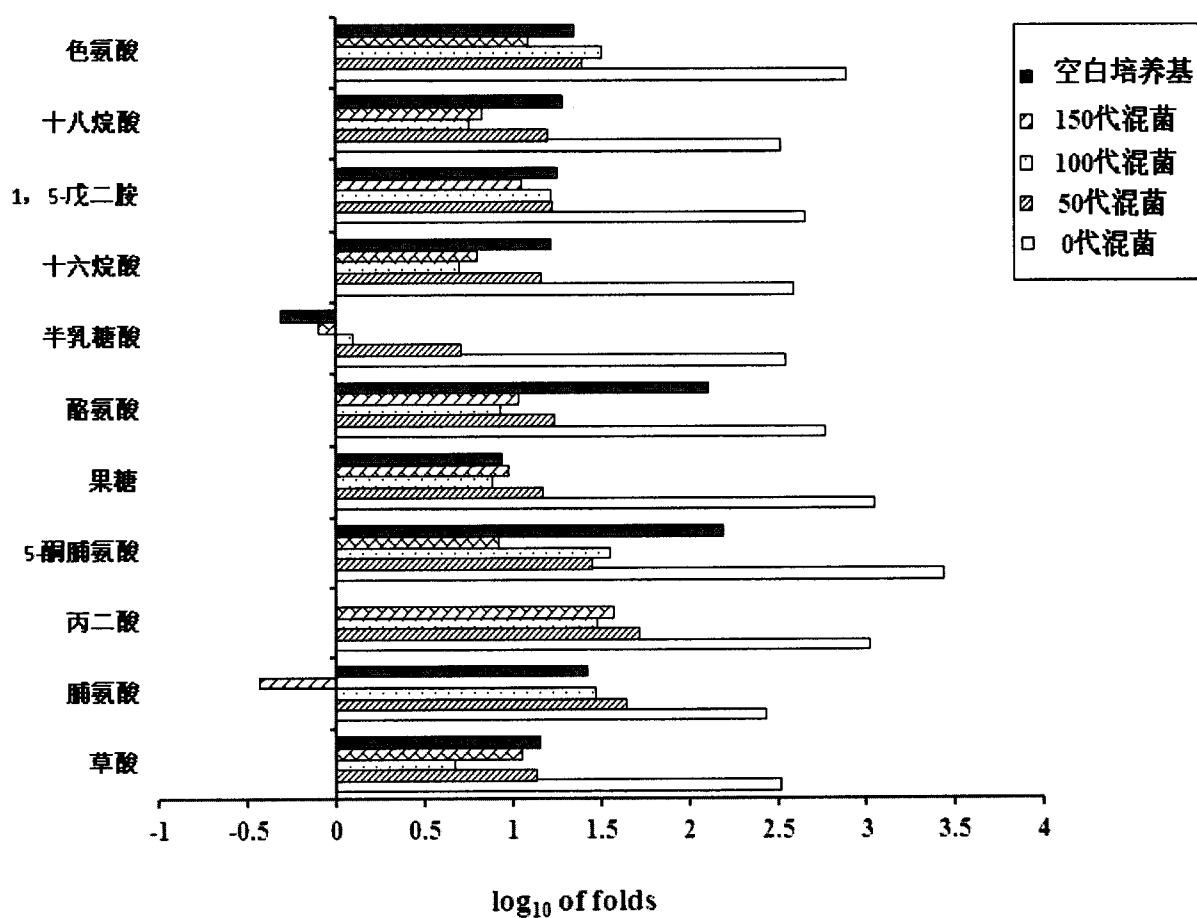


Fig. 23

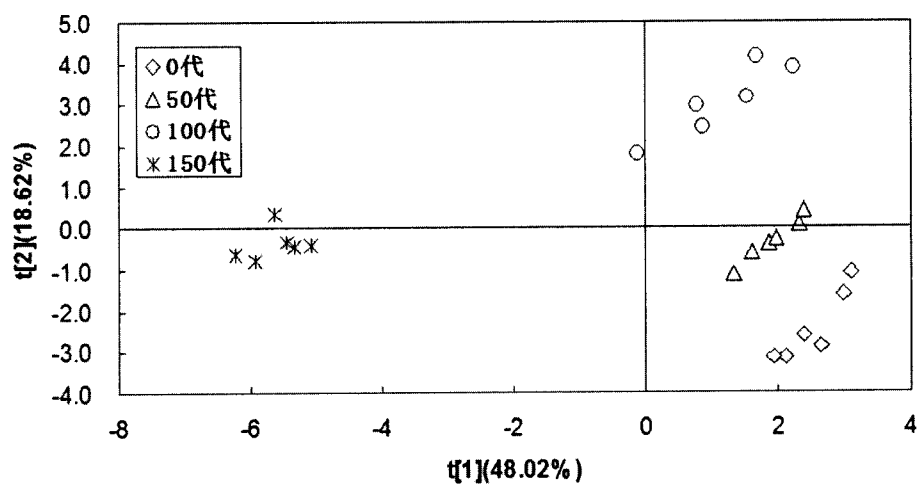


Fig. 24-1

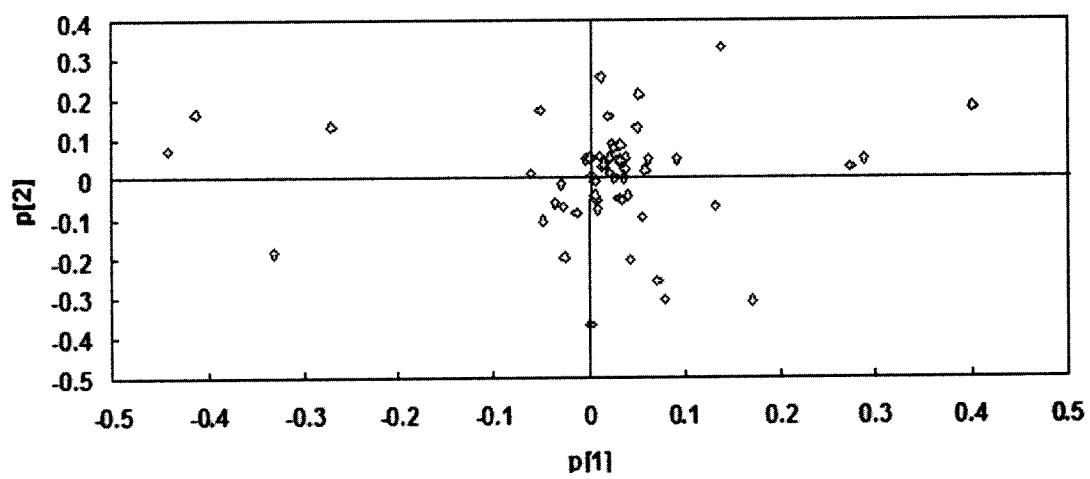


Fig. 24-2

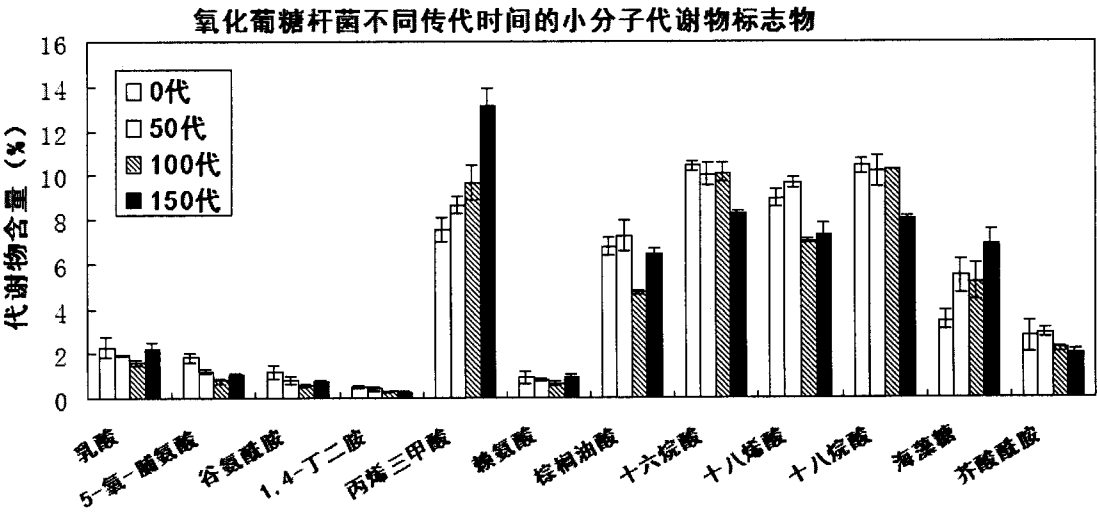


Fig. 25

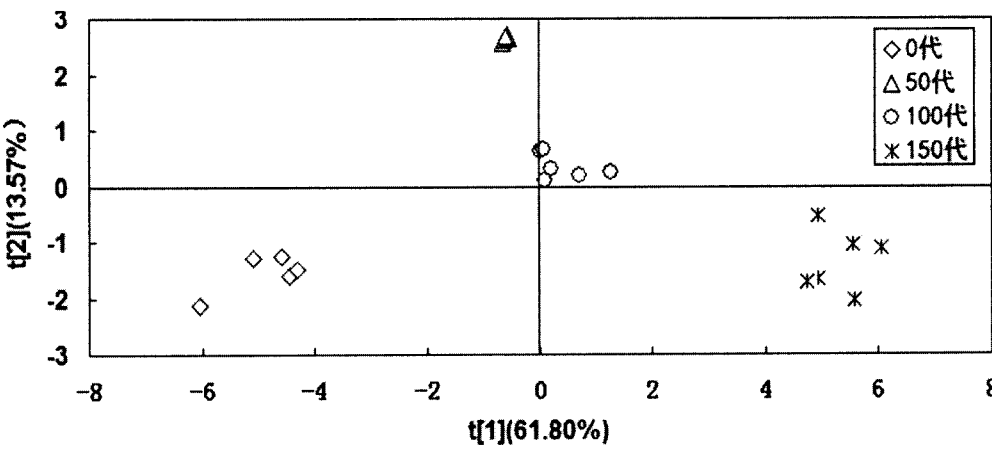


Fig. 26-1

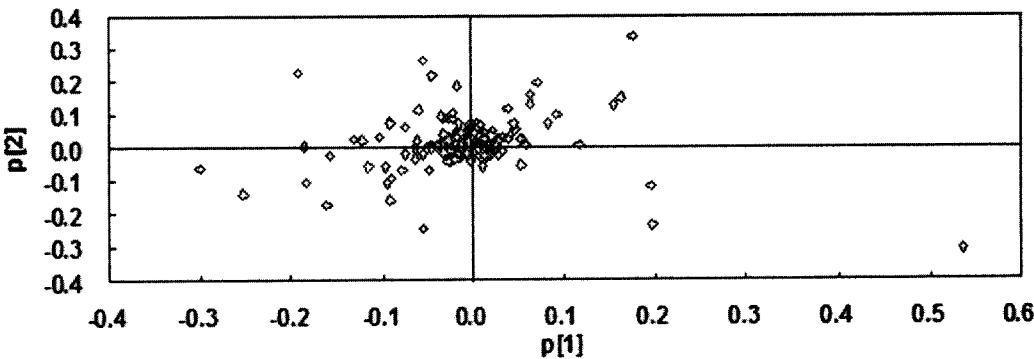


Fig. 26-2

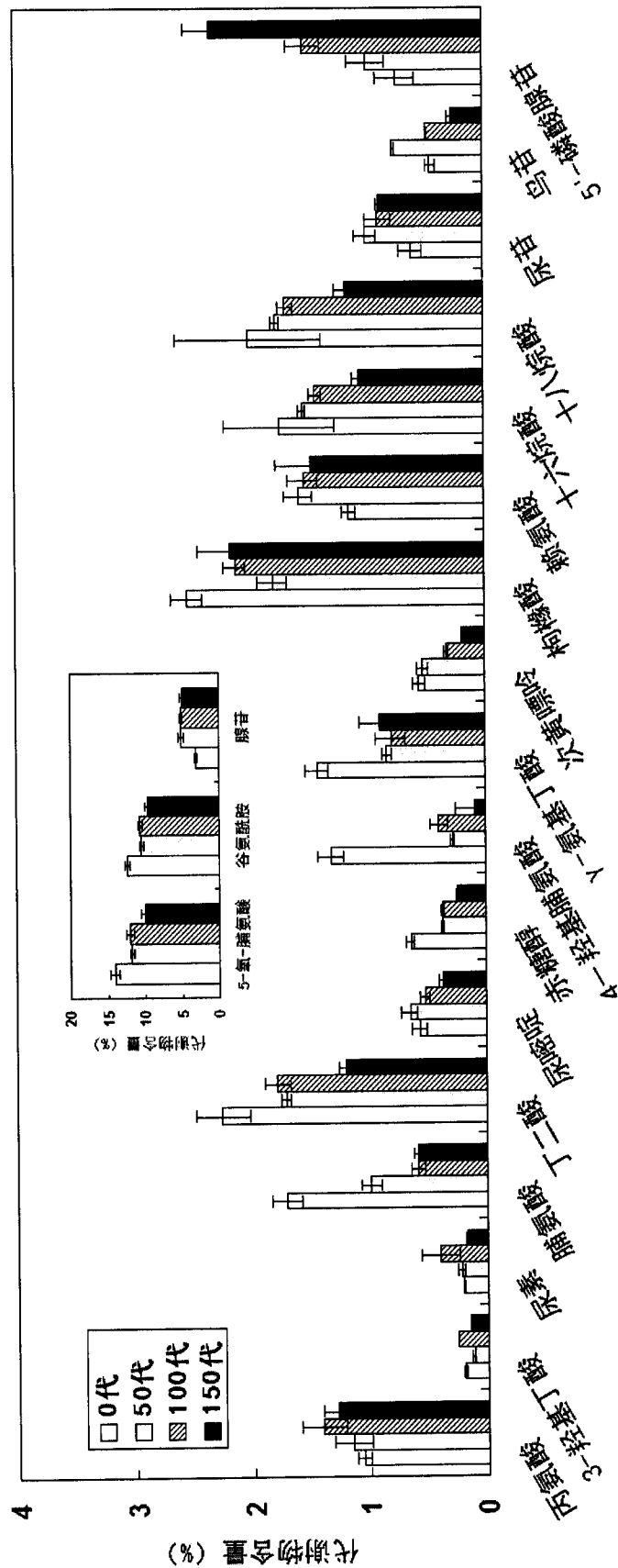


Fig. 27

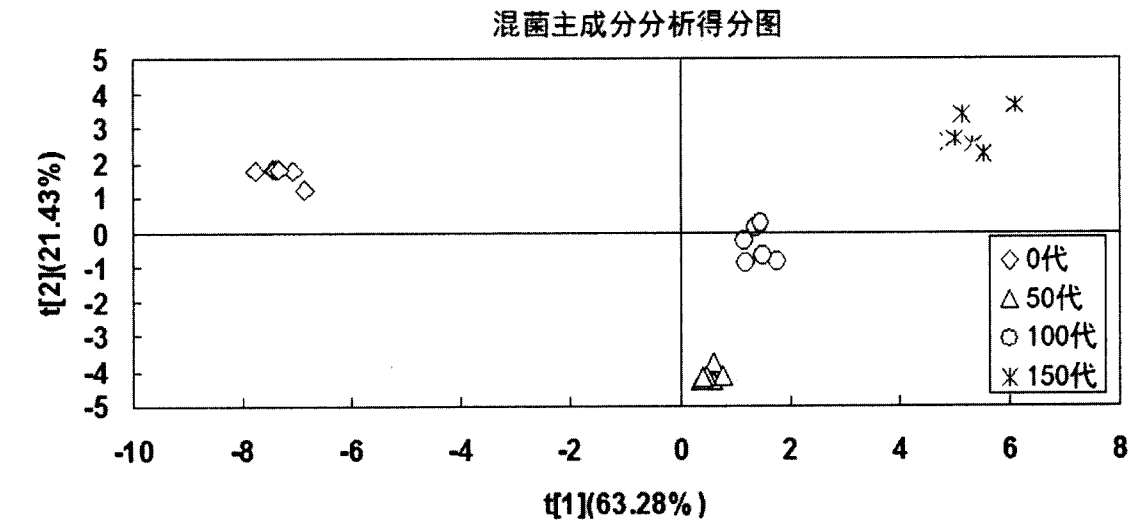


Fig. 28-1

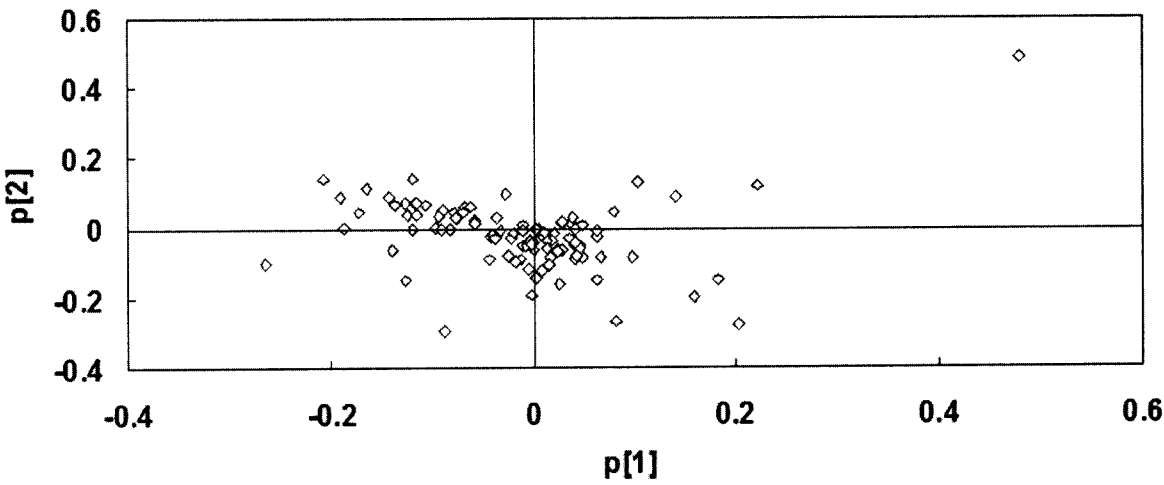


Fig. 28-2

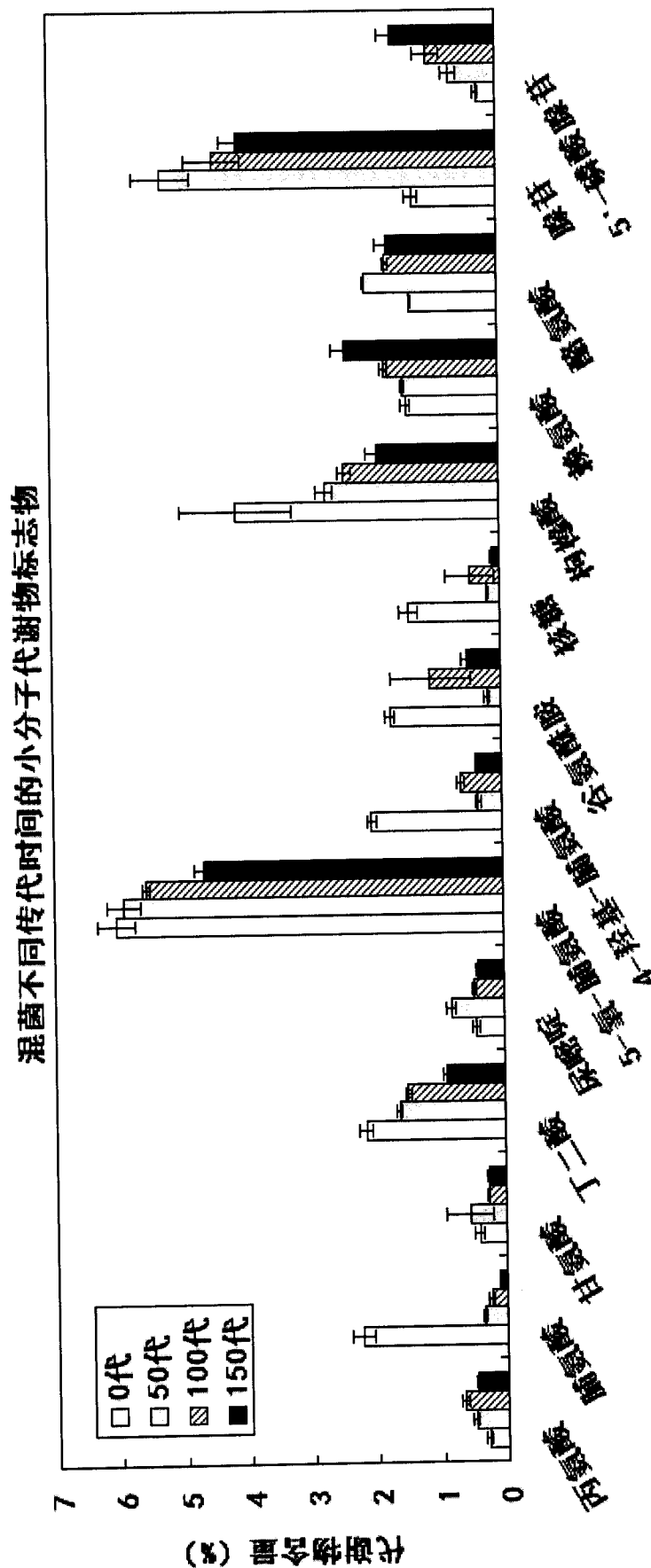


Fig. 29

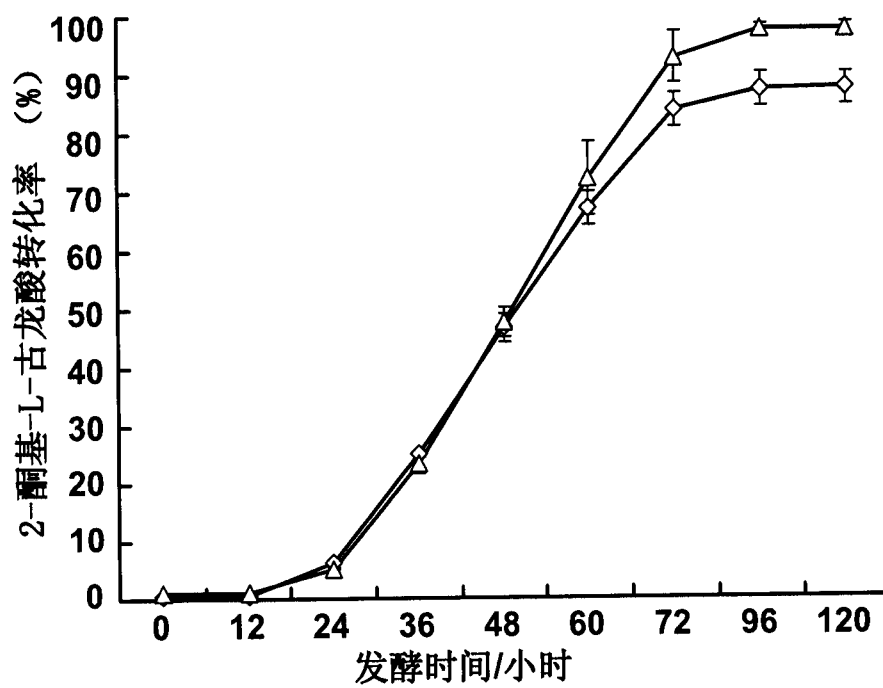


Fig. 30

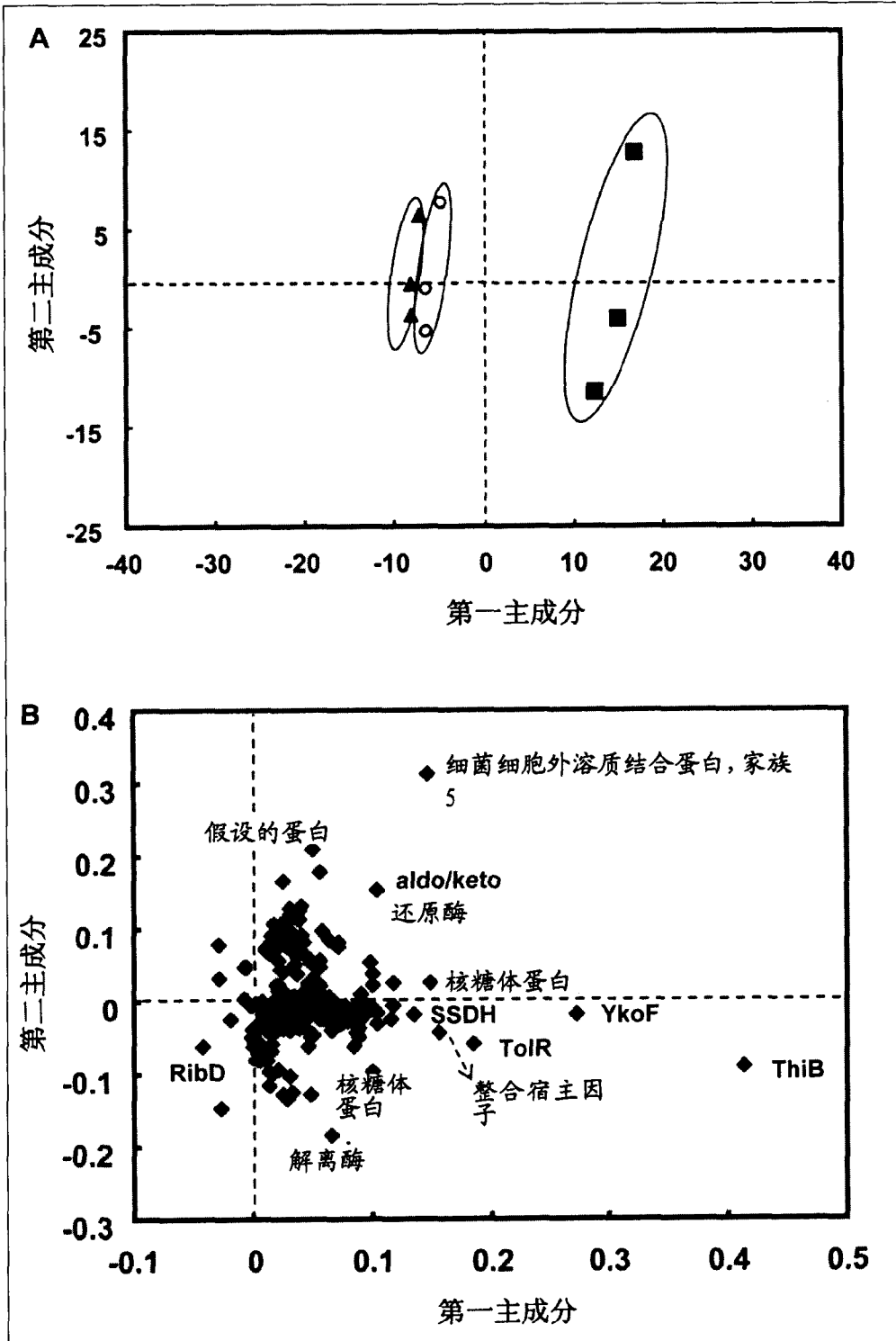


Fig. 31

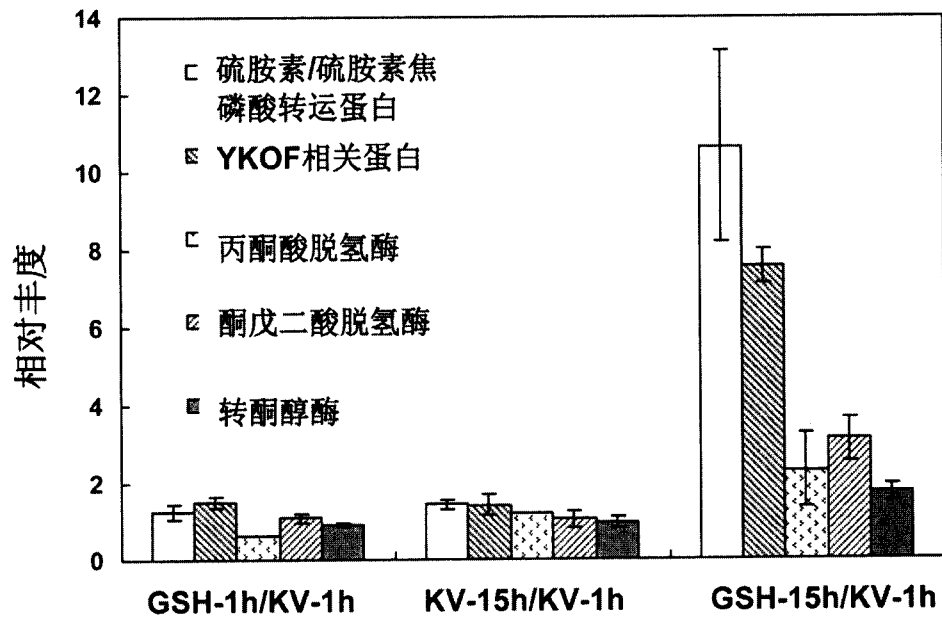


Fig. 32

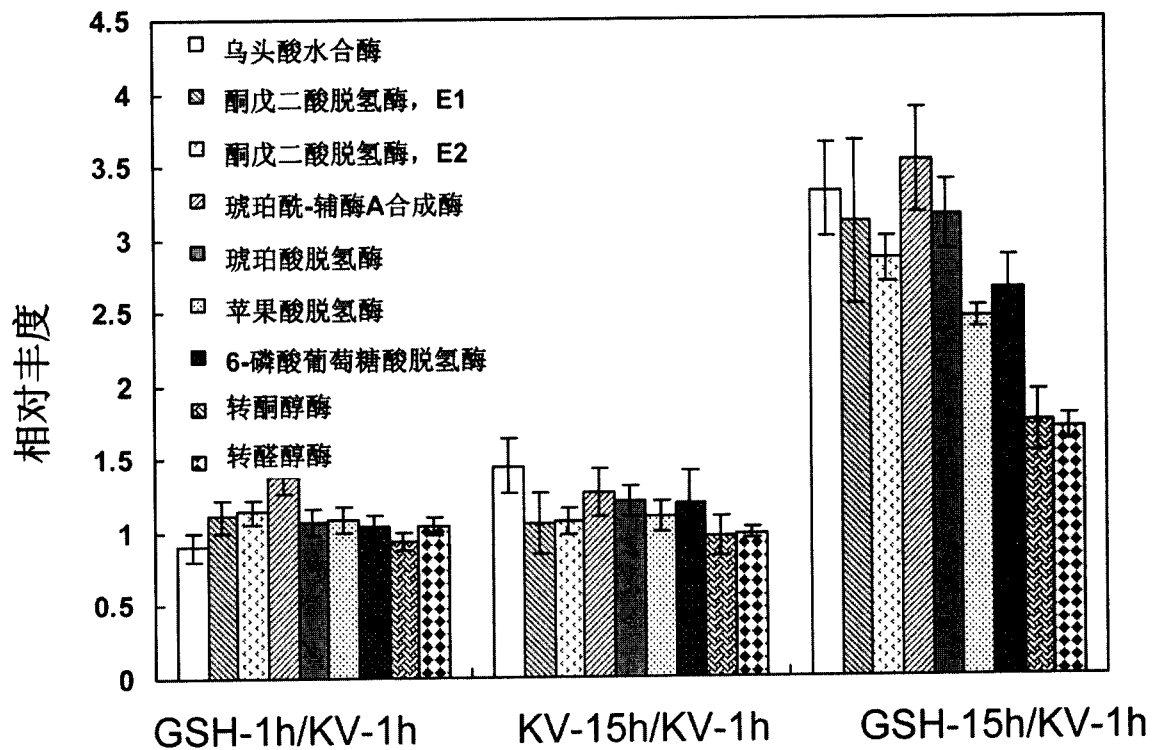


Fig. 33

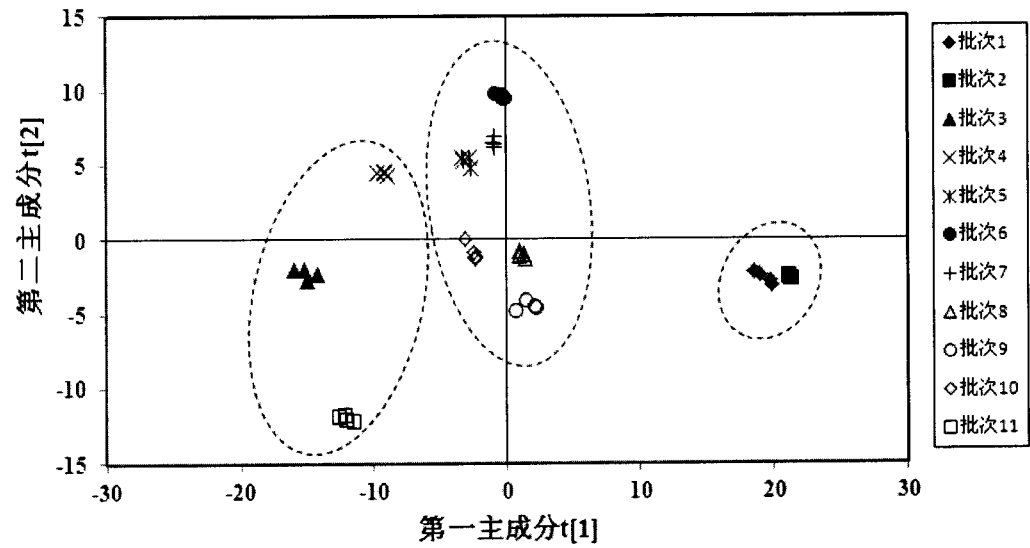


Fig. 34-1

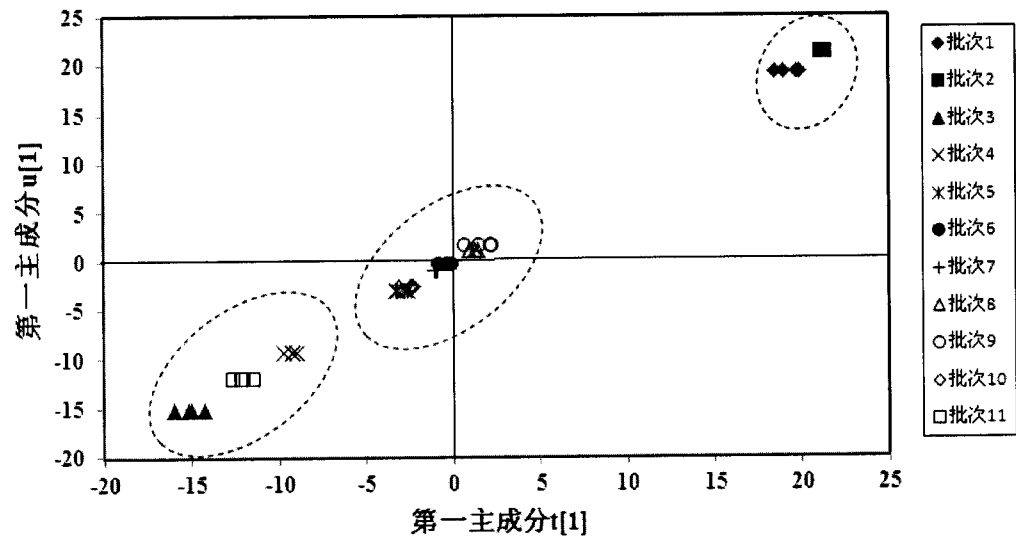


Fig. 34-2

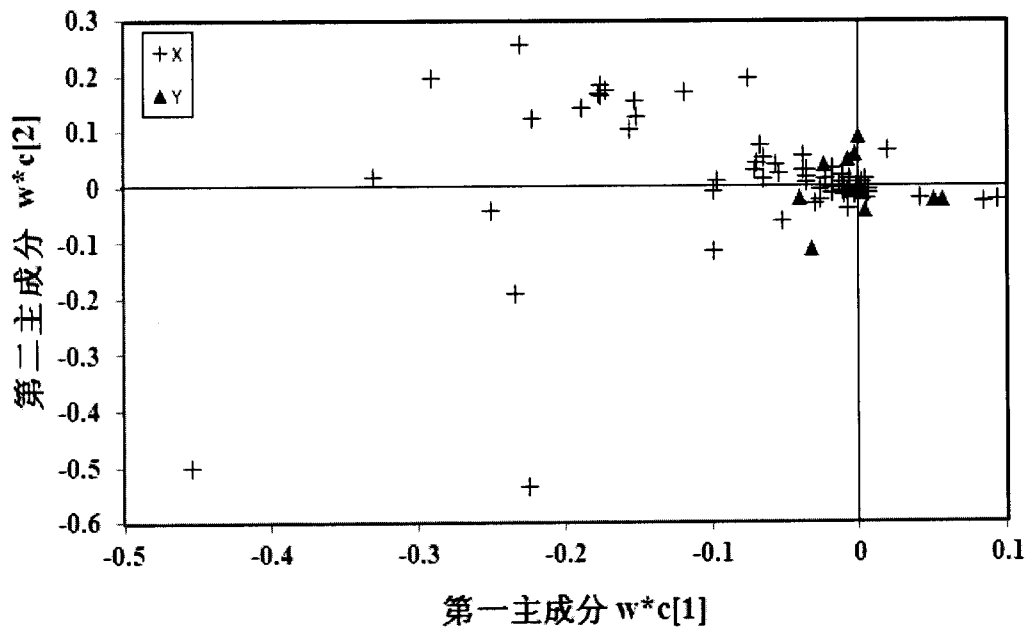


Fig. 35-1

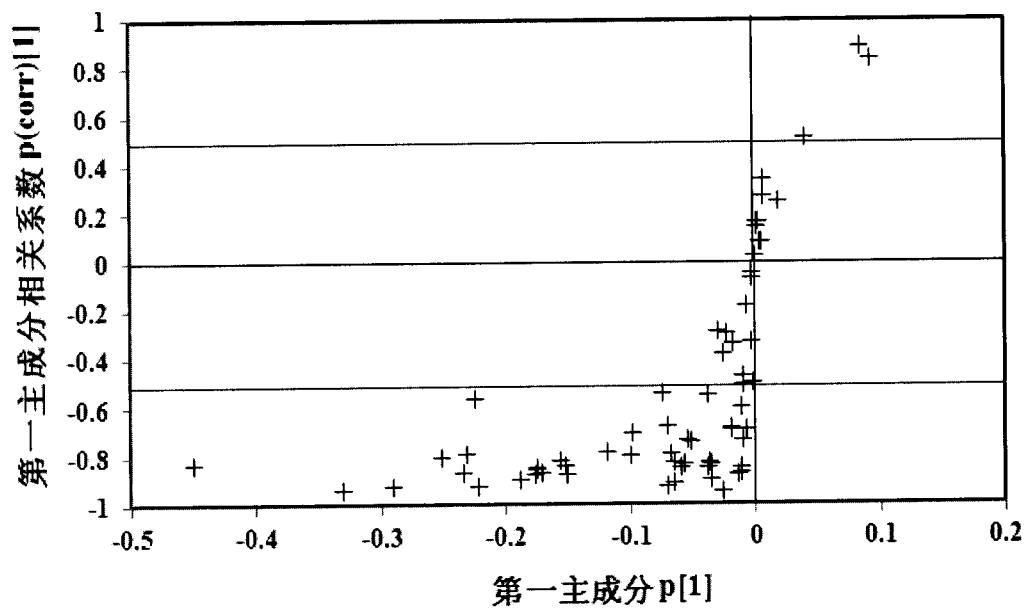


Fig. 35-2

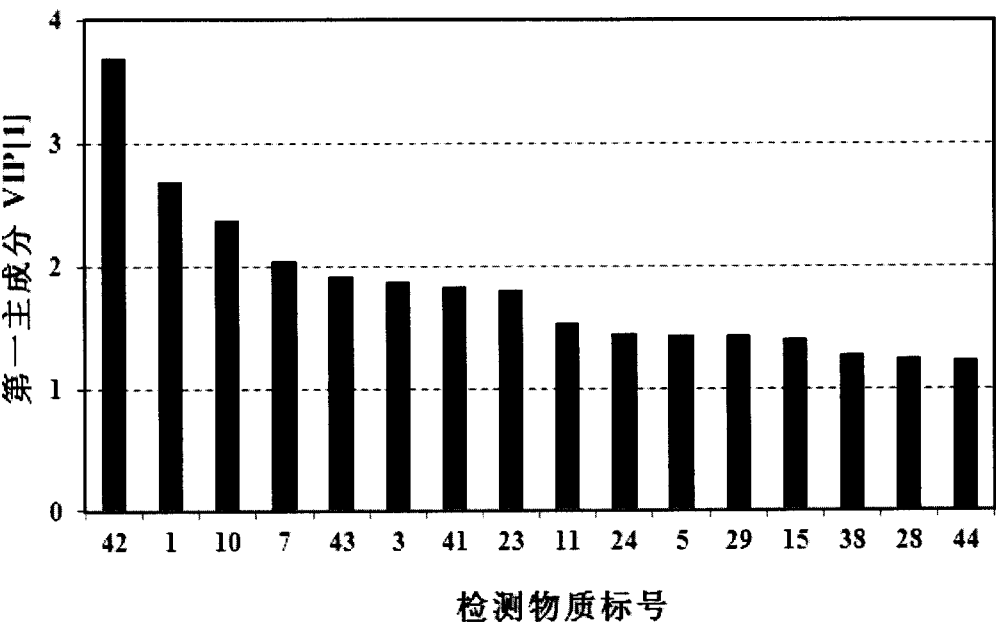


Fig. 36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076310

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12P, C12N 15, G01N 33, G01N 30, G01N 27, C12Q 1, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS, WPI, EPODOC: bacillus megaterium, gulonic acid, gluconobacter oxydans, megaterium, ketogulonicigenium vulgare, corn steep liquor, glutathione, sorbose dehydrogenase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	CN 102352403 A (TIANJIN UNIVERSITY), 15 February 2012 (15.02.2012), see claims 1-7	1, 3
P, X	CN 102331474 A (TIANJIN UNIVERSITY), 25 January 2012 (25.01.2012), see claim 1	10
P, X	GAO, Yun et al., Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-L-gulonic acid fermentation, JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 27 July 2011 (27.07.2011), vol. 59, no. 18, pages 9845-9853, see the section of material and method	10
A	CN 1515669 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 28 July 2004 (28.07.2004), see the whole document	8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 23 August 2012 (23.08.2012)	Date of mailing of the international search report 06 September 2012 (06.09.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Lihua Telephone No.: (86-10) 62085676

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076310

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MA, Qian et al, Proteomic analysis of ketogulonicigenium vulgare under glutathione reveals high demand for thiamin transport and antioxidant protection, PLOS ONE, 22 February 2012 (22.02.2012), vol. 7, no. 2, pages 1-12, see the section of material and method	9
A	CN 101603060 A (TIANJIN UNIVERSITY), 16 December 2009 (16.12.2009), see the whole document	1-7, 9
A	CN 102010885 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 13 April 2011 (13.04.2011), see the whole document	1-7
A	CN 1621518 A (NORTH CHINA PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. et al.), 01 June 2005 (01.06.2005), see the whole document	8
A	NIU, Jianshuang et al., Effect of Corn Steep Liquor on 2-Keto-L-Gulonic Acid in Two-Step VC Fermentation, JOURNAL OF MICROBIOLOGY, March 2011 (03.2011), vol. 31, no. 2, pages 29-31, see the whole document	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076310

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group one: claims 1-7 relate to a method for increasing the output of 2-keto-L-gulonic acid via a subculture of mixed bacteria, and to a method for detecting protein changes, analyzing phospholipid group changes, detecting nutritional environment changes and analyzing small molecule metabolite changes by employing said culture method, and the specific technical feature thereof is the subculture of mixed bacteria, including solid culture, seed culture, isolation and purification and ferment;

group two: claim 8 claims the protection for the use of gluconobacter oxydans containing a vector encoding sorbosone dehydrogenase gene, and the specific technical feature thereof is the construction of the gluconobacter oxydans containing a vector encoding sorbosone dehydrogenase gene;

group three: claim 9 claims the protection for a method for detecting protein changes in cells during an action of glutathione on gluconobacter oxydans, and the specific technical feature thereof is the protein changes in cells during the action of glutathione on gluconobacter oxydans;

group four: claim 10 claims the protection for a method of quality control indexes for corn steep liquor used as a material for ferment, and the specific technical feature thereof is the quality control of the corn steep liquor.

The above four groups of claims do not share a same or corresponding special technical feature therebetween, and thus do not belong to a single general inventive concept. Therefore, they do not meet the requirement as defined in PCT Rule 13.1 and 13.2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/076310

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102352403 A	2012-02-15	None	
CN 102331474 A	2012-01-25	None	
CN 1515669 A	2004-07-28	WO 9420609 A	1994-09-15
		CA 2157762 A	1994-09-15
		CN 1120350 A	1996-04-10
		CN 1105777 C	2003-04-16
		EP 0753575 A	1997-01-15
		US 5753481 A	1998-05-19
		US 5861292 A	1999-01-19
		US 6197562 B	2001-03-06
CN 101603060 A	2009-12-16	CN 101603060 B	2011-06-01
CN 102010885 A	2011-04-13	None	
CN 1621518 A	2005-06-01	WO 2005052160 A1	2005-06-09
		CN 100395332 C	2008-06-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076310

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:

C12P 39/00 (2006.01) i

C12P 7/60 (2006.01) i

C12N 15/53 (2006.01) i

G01N 30/72 (2006.01) i

G01N 33/68 (2006.01) i

G01N 27/62 (2006.01) i

C12Q 1/02 (2006.01) i

C12R 1/01 (2006.01) n

C12R 1/11 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/076310

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12P, C12N15, G01N33, G01N30, G01N27, C12Q1, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CPRS, WPI, EPODOC: 古龙酸, 氧化葡萄糖杆菌, 巨大芽孢杆菌, 玉米浆, 谷胱甘肽, 山梨酮脱氢酶, gulonic acid, gluconobacter oxydans, megaterium, ketogulonicigenium vulgare, corn steep liquor, glutathione, sorbose dehydrogenase

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
P, X	CN102352403A (天津大学) 15.2 月 2012 (15.02.2012), 参见权利要求 1-7	1, 3
P, X	CN102331474A (天津大学) 25.1 月 2012 (25.01.2012), 参见权利要求 1	10
P, X	Yun Gao 等, Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-L-gulonic acid fermentation, Journal of agricultural and food chemistry, 27.7 月 2011 (27.07.2011), 第 59 卷, 第 18 期, 9845-9853 页, 参见材料和方法部分	10
A	CN1515669A (藤泽药品工业株式会社) 28.7 月 2004 (28.07.2004), 参见全文	8

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

23.8 月 2012 (23.08.2012)

国际检索报告邮寄日期

06.9 月 2012 (06.09.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

王丽华

电话号码: (86-10) **62085676**

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

第一组：权利要求1-7涉及混菌传代培养提高2-酮基-L-古龙酸产量的方法、以及采用所述培养方法进行蛋白质变化检测、分析磷脂组变化、营养环境变化检测以及分析小分子代谢物变化的方法，其特定技术特征在于混菌传代培养，包括固体培养、种子培养、分纯和发酵；

第二组：权利要求8请求保护含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的用途，其特定技术特征为含有编码山梨酮脱氢酶基因载体的氧化葡萄糖杆菌的构建；

第三组：权利要求9请求保护检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化的方法，其特定技术特征为检测谷胱甘肽作用于氧化葡萄糖杆菌过程中细胞内蛋白质变化；

第四组：权利要求10请求保护发酵用原料玉米浆的质量控制指标的方法，其特定技术特征在于玉米浆的质量控制。

以上四组权利要求之间没有相同或相应的特定技术特征，因此，不属于一个总的发明构思，不符合PCT条约R.13.1和R.13.2的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
P, X	Qian Ma 等, Proteomic analysis of ketogulonicigenium vulgare under glutathione reveals high demand for thiamin transport and antioxidant protection, PLOS ONE, 22.2 月 2012 (22.02.2012), 第 7 卷, 第 2 期, 1-12 页, 参见材料和方法部分	9
A	CN101603060A (天津大学) 16.12 月 2009 (16.12.2009), 参见全文	1-7、9
A	CN102010885A (江南大学) 13.4 月 2011 (13.04.2011), 参见全文	1-7
A	CN1621518A (华北制药集团有限责任公司等) 01.6 月 2005 (01.06.2005), 参见全文	8
A	牛建双等, 玉米浆对 Vc 二步发酵产 2-酮基-L-古龙酸影响的研究, 微生物学杂志, 3 月 2011 (03.2011), 第 31 卷, 第 2 期, 第 29-31 页, 参见全文	10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/076310

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102352403A	2012-02-15	无	
CN102331474A	2012-01-25	无	
CN1515669A	2004-07-28	WO9420609A	1994-09-15
		CA2157762A	1994-09-15
		CN1120350A	1996-04-10
		CN1105777C	2003-04-16
		EP0753575A	1997-01-15
		US5753481A	1998-05-19
		US5861292A	1999-01-19
		US6197562B	2001-03-06
CN101603060A	2009-12-16	CN101603060B	2011-06-01
CN102010885A	2011-04-13	无	
CN1621518A	2005-06-01	WO2005052160A1	20050609
		CN100395332C	20080618

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类:

C12P39/00 (2006.01) i
C12P7/60 (2006.01) i
C12N15/53 (2006.01) i
G01N30/72 (2006.01) i
G01N33/68 (2006.01) i
G01N27/62 (2006.01) i
C12Q1/02 (2006.01) i
C12R1/01 (2006.01) n
C12R1/11 (2006.01) n