

# 维生素 C 发酵中伴生菌对氧化葡萄糖杆菌的影响

焦迎晖<sup>1,2</sup> 张惟材<sup>1\*</sup> 谢 莉<sup>1,2</sup> 袁红杰<sup>1</sup> 陈梦霞<sup>2</sup>

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)<sup>1</sup>

(维生药业石家庄有限公司 石家庄 050035)<sup>2</sup>

**摘要:** 通过分析维生素 C 二步发酵过程中活菌数、产酸量、pH、糖酸转化活力等, 研究了蜡状芽孢杆菌 (俗称大菌) 对氧化葡萄糖杆菌 (俗称小菌) 生长和产酸的影响。结果表明, 在大菌存在情况下, 小菌的活菌数约为单菌培养条件下的 5 倍, 产酸量为单菌培养条件下的 2~3 倍, 糖酸转化活力为单菌培养条件下的 2~3 倍, 提示在混合菌发酵条件下大菌仅仅是通过刺激小菌的生长而促进小菌产酸。用小菌休止细胞进行的糖酸转化实验结果也表明, 无论大菌的发酵上清液还是破碎的菌体, 都未发现对小菌产酸产生直接影响。

**关键词:** 2-酮基-L-古龙酸, 氧化葡萄糖杆菌, 蜡状芽孢杆菌

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0035-04

## EFFECTS OF *BACILLUS CEREUS* ON *GLUCONOBACTER OXYDANS* IN VITAMIN C FERMENTATION PROCESS

JIAO Ying-Hui<sup>2</sup> ZHANG Wei-Cai<sup>1</sup> XIE Li<sup>2</sup> YUAN Hong-Jie<sup>1</sup> CHEN Meng-Xia<sup>2</sup>

(Institute of Biotechnology, Beijing 100071)<sup>1</sup>

(Wei-Sheng Pharmaceutical Co., Ltd, Shijiazhuang 050035)<sup>2</sup>

**Abstract:** The effects of *Bacillus cereus* on the growth of *Gluconobacter oxydans* and 2-keto-L-gulonic acid (2-KGA) formation during two-step fermentation process of vitamin C were investigated. It is shown that under co-culture conditions of the two strains, comparing to single strain fermentation with *G. oxydans*, as much as about 5 times of cells of *G. oxydans*, 2~3 times 2-KGA and 2~3 times of bioconversion activities were formed, suggesting that the improved 2-KGA formation may caused only by stimulation of *B. cereus* on the growth of *G. oxydans*. The results of bioconversion with resting cells of *G. oxydans* also showed that neither the culture supernatant nor the cell-free extracts indicated any obvious clue of direct effect on the biotransformation activity.

**Key words:** 2-Keto-L-gulonic acid, *Gluconobacter oxydans*, *Bacillus cereus*

我国于 70 年代首创的维生素 C 二步发酵法, 是以 D-山梨醇经第一步发酵所得的 L-山梨糖再进行第二步发酵生成 2-酮基-L-古龙酸, 最后经转化可得到维生素 C<sup>[1]</sup>。在其推广应用过程中, 菌种和工艺都不断得到优化和改进, 使生产工艺处于国际领先地位<sup>[2]</sup>。其中第二步发酵是由氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*, 俗称小菌) 及其伴生菌混合发酵完成的。可作伴生菌 (俗称大菌) 的菌株较多, 主要有蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 等<sup>[3]</sup>。业已阐明, 氧化葡萄糖杆菌为产酸菌, 但单独培养传代存活率及产酸能力较低<sup>[1]</sup>, 与伴生菌混合培养可促使其生长和产酸<sup>[2]</sup>。但在混合菌发酵体系中两种菌的相互关系尤其是伴生菌的确切作用尚不清楚。虽然近年来有关这方面的研究不少, 但观点

\* 联系人 E-mail: zhangweicai@hotmail.com

收稿日期: 2001-05-25, 修回日期: 2001-08-26

不尽相同。本文选择以蜡状芽孢杆菌为伴生菌的混合菌发酵体系,研究了发酵过程中伴生菌对氧化葡萄糖杆菌在生长和产酸等方面的影响,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*), 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

### 1.2 培养基

种子培养基: L-山梨糖 15g, 玉米浆 3.0g, 蛋白胨 5.0g, 尿素 4.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0g,  $\text{CaCO}_3$  1.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, 定容至 1L, pH 6.8~7.0; 发酵培养基: L-山梨糖 70~80g (分消), 玉米浆 20g, 尿素 4.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10g,  $\text{CaCO}_3$  1.0g, 定容至 1L, pH 7.0。

### 1.3 2-酮基-L-古龙酸含量的测定

用碘量法测定<sup>[3]</sup>。

### 1.4 小菌休止细胞的制备

离心收集 30℃ 振荡培养不同时间的小菌菌体, 分别用生理盐水和磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤数次并重悬于该缓冲液中, 制成休止细胞悬液。

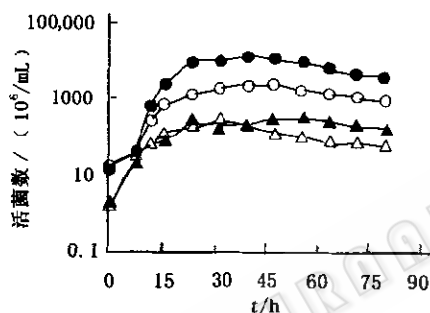


图1 培养过程中活菌数的变化  
—○—单独小菌, —●—混菌中小菌,  
—▲—混菌中大菌, —△—单独大菌

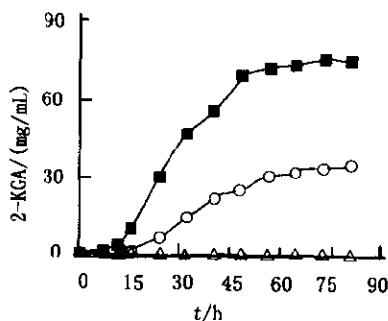


图2 培养过程中的产酸情况  
—○—单独小菌, —■—混菌中小菌,  
—△—单独大菌

### 1.5 细胞糖酸转化活力的测定

在含 2% 山梨糖的磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 加一定量休止细胞悬液, 30℃ 振荡培养 1h, 立即中止反应, 用碘量法测定 2-KGA 的生成量, 计算反应速率<sup>[4]</sup>。细胞糖酸转化活力以 1h 内转化 L-山梨糖生成 2-KGA 的毫克数表示。

### 1.6 大菌组分的制备

将 30℃ 振荡培养 30h 的大菌菌液离心, 上清液为大菌胞外液; 菌体用生理盐水洗涤 2 次, 重悬于生理盐水中, 超声破碎, 离心取上清液为大菌胞内液。

## 2 结果

### 2.1 培养过程中的活菌数

在摇瓶培养条件下分别进行小菌和大菌的单菌培养及大小菌的混菌培养, 取样测定小菌和大菌的活菌数, 结果见图 1。由图 1 可见, 在发酵的各个阶段, 小菌单菌和混菌培养条件下的小菌生长情况接近, 但混菌培养条件下小菌的生长更为迅速, 最高密度约为单菌培养时的 5 倍。

### 2.2 培养过程中的产酸情况

考察了上述各种培养条件下 2-KGA 的累积情况, 结果见图 2。由图 2 可见, 在整个发酵过程中, 大菌单菌培养条件下没有 2-KGA 累积, 在混菌培养条件下 2-KGA 的累积为小菌单菌培养条件下的 2 倍左右。

2.3 不同培养条件下休止细胞的糖酸转化活力

对上述不同培养时期的大菌、小菌及混菌休止细胞的糖酸转化活力进行了分析, 结果如图 3 所示。由此结果可见, 单独的大菌几乎测不到糖酸转化活力, 小菌单菌及混菌培养分别在发酵 48h 和 56h 时糖酸转化活力达最高值, 且后者为前者的 2.4 倍。

2.4 培养过程中的 pH 变化

测定了各种培养条件下不同时期发酵液的 pH, 结果见图 4。由图 4 可见, 大菌单菌发酵液 pH 先是迅速上升, 之后趋于平稳; 总体上看小菌单菌发酵液 pH 呈缓慢下降趋势; 而混合菌发酵液的 pH 则经历了一个先升高后下降的过程。

2.5 大菌组分对小菌转化作用的影响

在小菌休止细胞中分别加入大菌胞内液和胞外液, 对照组加培养基, 测定糖酸转化活力, 以考察胞内液和胞外液对小菌糖酸转化活力的影响, 结果见表 1。通过  $q$  检验,  $q_3^1 = 0.07$ , 查表得  $q_{0.05}(12, 2) = 3.08$ ,  $q_3^1 < 0.05(12, 2)$ , 表明无论是否添加大菌胞外液和胞内液, 对小菌休止细胞的糖酸转化活力没有显著差异, 因此, 在这种分析条件下两种成分对小菌的产酸没有直接影响。

3 讨论

多年来有关混合菌发酵中大小菌的相互关系以及小菌转化 L-山梨糖的代谢途径尚未澄清。关于小菌的山梨糖代谢国内外学者一般认为近似于山梨糖途径<sup>[5-7]</sup>。而 Asakura 和

Hoshino<sup>[8]</sup>从氧化葡萄糖杆菌中分离到一种可将 L-山梨糖直接转化为 2-KGA 的酶, 称为醇醛脱氢酶。很可能小菌的山梨糖代谢与山梨糖途径存在较大差异。

对于混合菌发酵体系中大小菌的关系比较明确的认识是, 小菌具有将 L-山梨糖转化为 2-KGA 的能力, 而大菌本身不产酸, 从本文取得的实验结果也进一步证实了这一点。同时也证实了在混合菌发酵过程中大菌具有刺激小菌生长的作用。从本文的实验结果还可以看到, 在混菌培养条件下尽管小菌的密度达到小菌单菌培养条件下的 5 倍左右, 而 2-KGA 的累积水平只有小菌单菌发酵条件下的 2 倍多, 混菌培养条件下休止细胞的最大糖酸转化活力也只有小菌单菌培养条件下的 2 倍多。这些实验结果都不支

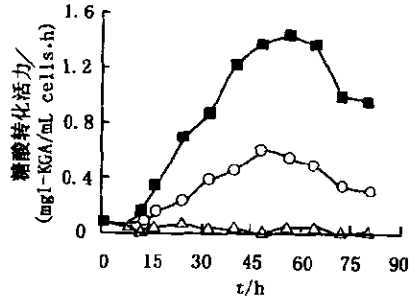


图 3 不同时期的糖酸转化活力

—○—单独小菌, —■—混合菌,  
—△—单独大菌

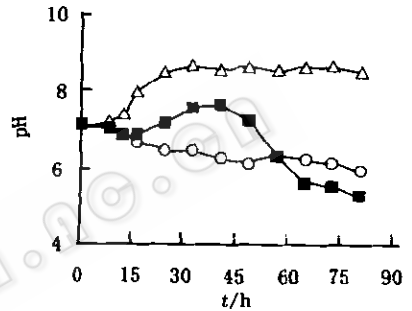


图 4 培养过程中 pH 的变化

—○—单独小菌, —■—混合菌,  
—△—单独大菌

表 1 大菌胞内和胞外液对小菌休止细胞糖酸转化活力的影响

组别	样品	例数 <i>n</i>	糖酸转化活力 (mg 2-KGA/mL cells·h)	
			$\bar{X} \pm s$	<i>P</i>
1	小菌 + 培养基	5	$0.574 \pm 0.037$	$> 0.05$
2	小菌 + 大菌胞内液	5	$0.572 \pm 0.037$	$> 0.05$
3	小菌 + 大菌胞外液	5	$0.571 \pm 0.022$	$> 0.05$

持大菌促进小菌生长的同时还刺激小菌产酸的论点。从添加各种成份进行小菌休止细胞糖酸转化的实验结果也看到, 大菌的胞外液或胞内液对小菌休止细胞的糖酸转化活力并没有直接影响。因此我们认为, 在混合菌发酵过程中, 大菌所起的作用仅仅是促进小菌的生长, 而对产酸的促进作用是因使小菌密度提高的结果。

### 参 考 文 献

- [1] 尹光琳, 陶增鑫, 严自正, 等. 微生物学报, 1980, 20 (3): 246 ~ 251.
- [2] 冯 树, 张忠泽. 微生物学杂志, 1999, 19 (2): 46 ~ 51.
- [3] 尹光琳, 何建明, 任双喜, 等. 工业微生物, 1997, 27 (1): 1 ~ 7.
- [4] 魏东芝, 袁渭康, 尹光琳, 等. 生物工程学报, 1992, 8 (3): 277 ~ 282.
- [5] Makover S, Ramsey G B, Vane F M, *et al.* Biotechnol Bioeng, 1975, 17: 1485 ~ 1514.
- [6] Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, *et al.* Biotechnol Biochem, 1998, 58 (2 ~ 3): 309 ~ 315.
- [7] 薛震役, 尹光琳. 微生物学通报, 2000, 27 (2): 89 ~ 92.
- [8] Asakura A, Hoshino T. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63 (1): 46 ~ 53.