

# D-异抗坏血酸间接发酵法的研究

## II. 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌的发酵条件

蒋明珠 汪崇林 白照熙 许鸿发\* 韩瑞环

(山西省生物研究所,太原)

2-酮基-D-葡萄糖酸 (2-Keto-D-gluconic acid) 的主要用途是合成 D-异抗坏血酸的前体,它还可作显影剂、抗氧化剂和速凝剂<sup>[1-3]</sup>。本文主要报道 2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌发酵条件的研究结果。

### 材 料 和 方 法

1. 菌株: 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) K1005。

2. 斜面培养基和培养方法: 斜面培养基(g): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, 自来水 1000ml, pH6.7。

将保存菌种移接于上述斜面, 28℃ 培养 24 小时。

3. 摇瓶培养基和培养方法:

种子培养基(g): 葡萄糖 10, 酵母膏 3, 蛋白胨 10, 牛肉膏 3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3, 自来水 1000 ml, pH6.7。

发酵培养基(g): 葡萄糖 200, 玉米浆 18,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25,  $K_2HPO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  0.5, 尿素 2,  $CaCO_3$  50, 自来水 1000ml, pH6.7。

取一环已活化的菌苔, 接入种子培养基 (250ml 三角瓶装量 25ml), 28—30℃ 振荡培养 24 小时, 以 8% 的接种量接入发酵培养基 (装量同上), 28—30℃ 振荡培养 64 小时左右, 进行测定。

4. 分析方法

(1) 用国产精密 pH 试纸测定 pH。

(2) 发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸的定性

测定\*\*, 参照 Koepsell 等<sup>[4]</sup>的方法, 略有修改, 用纸层析法进行。展开剂为正丁醇:吡啶:水 (3:2:1.5), 上行展开, 显色剂为 0.2% 邻苯二胺酒精溶液 (含 1% 浓硝酸)。

(3) 发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸和葡萄糖的定量测定, 参照 Stubbs 等<sup>[5]</sup>的方法。测定旋光和还原铜值时, 发酵液须事先离心, 使其清澈透明。

### 实 验 结 果

#### 一、影响 2-酮基-D-葡萄糖酸产量的因素

1. 利用不同碳源产酸情况

基础培养基(g): 玉米浆 5, 尿素 2,  $KH_2PO_4$  0.6,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25,  $CaCO_3$  2.5, 自来水 1l, pH6.7。

除可溶性淀粉按 5% 加入外, 其它各种碳源按 10% 加入。用葡萄糖酸钙作碳源时, 不加  $CaCO_3$ 。28—30℃ 发酵 48 小时, 用纸层析法测定是否产 2-酮基-D-葡萄糖酸。

所试淀粉、蔗糖、麦芽糖、菊糖、D-果糖、葡萄糖、山梨醇、甘露糖、葡萄糖酸钙 9 种碳源, K1005 菌只能利用葡萄糖和葡萄糖酸钙产生 2-酮基-D-葡萄糖酸。用葡萄糖作为生产 2-酮基-D-葡萄糖酸的碳源较为适宜。

2. 不同氮源对产酸的影响

以发酵培养基 (玉米浆、尿素除外) 为基础

\* 现在工作单位: 安徽生物研究所

\*\* 标准样品: 美国产品 (SIGMA Chemical Company U. S. A.)

培养基,加入不同氮源(有机和无机氮源分别按1%和0.4%加入),28—30℃发酵64小时,进行定量测定,结果见表1。

表1 不同氮源对 K1005 菌株产 2-酮基-D-葡萄糖酸的影响

项目 结果 氮源	发酵后 pH	2-酮基-D-葡萄糖酸 (g/100ml)	对糖的转化率 (%)
玉米浆	4.4	11.22	57.2
酵母膏	4.4	19.74	99.8
蛋白胨	4.1	19.43	99.1
尿素	4.6	11.40	58.1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.1	15.82	80.6
NaNO <sub>3</sub>	5.4	10.68	54.4

表1表明,上述6种含氮化合物都可作2-酮基-D-葡萄糖酸产生菌的氮源。

3. 摇瓶不同装量对产酸的影响

于250 ml三角瓶中装入不同量的发酵培养基,28—30℃发酵65小时。

表2 摇瓶不同装量对 K1005 菌株产 2-酮基-D-葡萄糖酸的影响

结果 装量 (ml)	发酵后 pH	2-酮基-D-葡萄糖酸 (g/100ml)	对糖的转化率 (%)
15	3.8	18.25	91.3
25	4.1	12.51	63.8
50	4.4	4.81	24.5
75	4.6	4.81	24.5

试验结果说明(表2),装量为15ml时,2-酮基-D-葡萄糖酸产量最高,说明该菌发酵2-酮基-D-葡萄糖酸时需要较大通气量。

4. 不同培养温度对产酸的影响

将摇瓶分别置于不同温度,振荡培养47—88小时,进行定量测定。

结果说明(表3),在相同时间内,28—30℃时转化率最高。培养温度低,发酵周期延长,培养温度高,对糖转化率降低。因而采用28—30℃较为适宜。

5. 铁、铜离子对产酸的影响

进行了Fe<sup>+++</sup>、Cu<sup>++</sup>对产酸影响的试验,28—30℃发酵62小时。

表3 不同培养温度对 K1005 菌株产 2-酮基-D-葡萄糖酸的影响

结果 温度 (℃)	发酵时间 (小时)	2-酮基-D-葡萄糖酸 (g/100ml)	对糖的转化率 (%)
23—24	64	16.57	84.5
	88	17.76	90.5
28—30	47	11.32	57.7
	65	17.60	89.7
32—33	48	12.04	61.4
	65	16.70	85.1

表4 铁、铜离子对 K1005 菌株产 2-酮基-D-葡萄糖酸的影响

处理 结果	发酵后 pH	2-酮基-D-葡萄糖酸 (g/100ml)	对糖的转化率 (%)
Fe <sup>+++</sup> 10ppm 30ppm	5.2	15.56	79.3
	5.2	15.41	78.6
Cu <sup>++</sup> 0.1ppm 1.0ppm	5.2	14.99	76.4
	5.2	15.35	78.3
对 照	5.2	14.85	75.7

结果(表4)说明,Fe<sup>+++</sup>10—30ppm和Cu<sup>++</sup>0.1—1ppm对K1005菌产酸都无不利影响。

二、种子培养基和发酵培养基

1. 种子培养基

设计了三种种子培养基(%):(1)葡萄糖1.0,蛋白胨1.0,牛肉膏0.3,酵母膏0.3,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3;(2)葡萄糖2.0,牛肉膏0.3,酵母膏0.5,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3;(3)葡萄糖2.0,酵母膏1.0。分别接种后,培养24小时,按8%的接种量接入发酵培养基,28—30℃发酵64小时,测定结果表明:种子培养基中需有较多的有机氮源,1号培养基较为理想。3种培养基的产率分别为16.82、8.95、10.38g/100ml,对糖的转化率分别为85.7、45.6、52.9%。

2. 发酵培养基

为寻求发酵产酸的最佳条件,进行了多因素、多水平的发酵培养基的正交试验,选用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表,因素和水平设计如表5。K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O加量不变,分别为0.05%、0.05%和0.025%。

表 5  $L_9(3^4)$  正交试验因素与水平设计

因素 水平	葡萄糖%	尿素%	玉米浆%	$\text{CaCO}_3$ %
I	18	0.15	2.2	5
II	20	0.20	1.8	4
III	22	0.25	1.5	6

根据正交试验数据的结果与分析,以下述培养基配比组合较好:葡萄糖 20%, 尿素 0.15%, 玉米浆 1.8%,  $\text{CaCO}_3$  6%。发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸的含量为 18.25g/100ml, 对糖的转化率达 93.1%。但最佳发酵培养基配比组合(葡萄糖 20%, 尿素 0.15%, 玉米浆 1.8%,  $\text{CaCO}_3$  5%)不在试验配比组合中。为证实分析结论,做了上述两种培养基的比较试验。结果表明,两种培养基产酸量分别为 18.25g/100 ml, 18.23 g/100 ml, 对糖的转化率分别为 93.1%, 93.0%。从经济角度考虑,还是以最佳发酵培养基配比组合较为理想。

### 三、K1005 菌株发酵产生 2-酮基-D-葡萄糖酸的过程

为了解 K1005 菌发酵产生 2-酮基-D-葡萄糖酸的过程,定期测定发酵液中 2-酮基-D-葡萄糖酸、葡萄糖的含量和 pH 值,结果如图 1 所示。

从图 1 中可看出, K1005 菌株在发酵过程中,随着葡萄糖的消耗, 2-酮基-D-葡萄糖酸逐

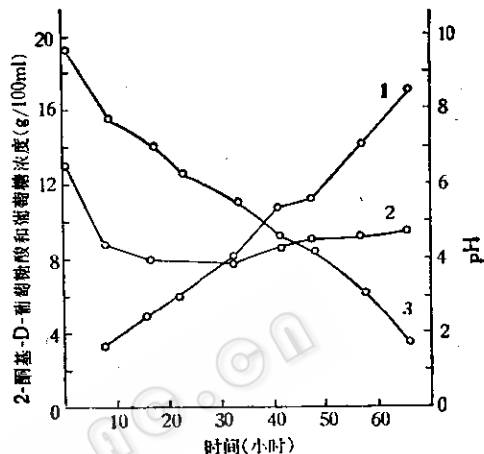


图 1 2-酮基-D-葡萄糖酸发酵过程

1. 2-酮基-D-葡萄糖酸, 2. pH, 3. 葡萄糖

渐积累。葡萄糖消耗殆尽, 2-酮基-D-葡萄糖酸积累达到高峰。发酵初期, pH 值随葡萄糖消耗而迅速下降, 但随着发酵的继续, pH 值逐渐回升, 接近发酵终点时, pH 值趋于稳定。

### 参 考 文 献

- [1] Geay, P. P. and Stone, I.: US Patent, 2159986, 1939.
- [2] Ohle, H.: US Patent, 2160621, 1939.
- [3] Jaffe, G. M. et al.: US Patent, 3381027, 1968.
- [4] Koepsell, H. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**: 5142—5144, 1952.
- [5] Stubbs, J. J. et al.: *Ind. Eng. Chem.*, **32**: 1626—1631, 1940.